

Aus der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. VIRCHOW

**Über den Einfluss der
Glukokortikosteroide
Dexamethason, Prednisolon und Fluticason
auf die BDNF – Sekretion mononukleärer Zellen
des Menschen**

Eine klinisch-experimentelle Studie

Inaugural–Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae

[Dr. med.]

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock



von

Jens Klotz aus Aachen

Rostock 2009

urn:nbn:de:gbv:28-diss2010-0043-5

Dekan : Herr Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

- Gutachter:**
1. Herr Prof. Dr. med. J. Christian Virchow
Zentrum für Innere Medizin
Abteilung für Pneumologie
Universitätsklinik Rostock
 2. Herr Priv.- Doz. Dr. rer. nat. A. Braun
Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin
Hannover
 3. Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Podbielski
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
Universitätsklinik Rostock

Tag der Promotion: 2.03.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allergisches Asthma bronchiale	3
1.1.1	Übersicht	3
1.1.2	Die allergische Entzündung bei Asthma	5
1.1.2.1	IgE – vermittelte Degranulation der Mastzellen	5
1.1.2.2	Die TH – 2 Immunantwort	7
1.1.2.3	Eosinophile Granulocyten	7
1.1.2.4	Alveolarmakrophagen	8
1.2	Die Innervation der unteren Atemwege	8
1.2.1	Sympathische und parasympathische Innervation	9
1.2.2	Non – adrenerge, non – cholinerge Neurone	10
1.2.3	Sensible Innervation	10
1.3	Neurotrophine	12
1.3.1	Geschichte, Struktur und Rezeptoren	12
1.3.2	Neurotrophine und das Immunsystem	13
1.3.3	BDNF und allergisches Asthma	14
1.3.4	BDNF und Infektion	15
1.3.5	Makrophagen und Monocyten als prominente BDNF – Produzenten	16
1.4	Fragestellung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Studiendesign	19
2.1.1	Rekrutierung von Probanden und Patienten	19
2.1.2	Ein – und Ausschlusskriterien	19
2.1.3	Votum der Ethikkommission	20

2.2	Gewinnung der Blutproben	20
2.3	Gewinnung monocytenangereicherter PBMC	21
2.3.1	Separation der Zellen	21
2.3.2	Zellzählung und Einstellung der Zellzahl	25
2.3.3	Einstellen der Zellzahl für die Versuche	26
2.3.4	Herstellung von Fluticason – Lösungen	27
2.4	Zellkultur	27
2.4.1	Methode	27
2.4.2	Material	27
2.4.3	Durchführung	31
2.5	Durchflusszytometrie	33
2.5.1	Methode	33
2.5.2	Material	35
2.5.3	Durchführung	37
2.5.4	Auswertung der Durchflusszytometrie	37
2.6	ELISA	39
2.6.1	Methode	39
2.6.2	Material	41
2.6.3	Durchführung	42
2.7	Statistik	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Probanden – und Patientencharakteristika	44
3.2	Zellcharakteristika in den Zellkulturen	46
3.2.1	Anteil an CD14 ⁺ Zellen (Monocyten)	46
3.2.2	Zell – Überlebensrate	46

3.3	BDNF - Sekretion in den Zellkulturen	47
3.3.1	BDNF – Sekretion mit und ohne TNF- α – Stimulation	47
3.3.2	Auswirkung des Lösungsmittels Ethanol auf die BDNF – Sekretion	50
3.3.3	Einfluss der Glukokortikosteroide auf die BDNF – Sekretion bei Probanden	51
3.3.3.1	Dexamethason	51
3.3.3.2	Prednisolon	52
3.3.3.3	Fluticason	53
3.3.3.4	Vergleich der Glukokortikosteroid – Wirkungen bei Probanden	54
3.3.4	Einfluss der Glukokortikosteroide auf die BDNF – Sekretion bei Patienten	55
3.3.4.1	Dexamethason	55
3.3.4.2	Prednisolon	56
3.3.4.3	Fluticason	57
3.3.4.4	Vergleich der Glukokortikosteroid – Wirkungen bei Patienten	58
4	Diskussion	59
4.1	BDNF – ein Produkt vieler Quellen	60
4.2	BDNF und entzündliche Erkrankungen	62
4.3	Vielfältige Wirkungen der Glukokortikosteroide	64
4.4	Einfluss von Glukokortikosteroiden auf die BDNF – Sekretion	66
4.5	Auswirkungen der BDNF-Suppression durch Glukokortikosteroide	68
5	Schlussfolgerung und Hypothese	70

6	Publikationsliste	71
7	Anhang	82
7.1	Abkürzungsverzeichnis	82
7.2	Abbildungsverzeichnis	84
7.3	Tabellenverzeichnis	86
7.4	Publikationsverzeichnis von Jens Klotz	87
7.5	Danksagung	88
7.6	Eidesstattliche Erklärung	89

Thesen zur Dissertation

1 Einleitung

Hector auch sah er im Felde, den liegenden; und die Genossen saßen umher; noch beklemmt, keuchte, schwindelnd in Ohnmacht, und spie Blut; denn ihn traf kein schwächerer Mann der Achaier.

Homer, „Ilias“, Gesang 15, Vers 9 – 11



Abb.1 Hector, die Griechen zurückdrängend

Nach einer Gemme, aus Vollmer's Mythologie alter Völker, Stuttgart 1874

Erstmalig taucht der Begriff „Asthma“ in dem von Homer verfassten Epos „Iliad“ auf. Homer beschreibt hiermit allerdings keine Krankheit, sondern das „Keuchen“ der Helden im Kampf um Troja. Seine Wurzeln hat das Wort Asthma wahrscheinlich im griechischen „asthmaíno“, was sinngemäß „schwer atmen“ heißt. Als Bezeichnung für eine Krankheit wurde Asthma erstmals von Hippokrates von Kos (460 – 375 v. Chr.) verwendet. An verschiedenen Stellen des Corpus hippocraticum beschrieb er die Krankheit als erschwerte, schnelle Atmung. Nach seinen Vorstellungen ging Asthma auf Schleim zurück, der aus dem Gehirn in die Atemwege läuft und dort die Lichtungen verstopft (1). Im zweiten Jahrhundert nach Christus beschrieben Aretaeus aus Kapadokien und Galen aus Pergamon Asthma als eine Erkrankung der Atemwege. Im neunzehnten Jahrhundert wurde eine Verbindung zwischen der Erkrankung und Muskelfasern der Atemwege hergestellt, bis weit ins zwanzigste Jahrhundert führte man Asthma schließlich auf nervliche Einflüsse auf die

Muskulatur der Atemwege zurück. Der Name „Asthma“ ist also schon seit 2500 Jahren bekannt, dennoch war die zugrunde – liegende Erkrankung beziehungsweise deren Pathogenese bis weit in das 20. Jahrhundert sehr unscharf beschrieben. Erst im 20. Jahrhundert wurde die Erkrankung „Asthma“ spezifisch als eine variable und reversible Atemwegsobstruktion definiert, die mit einer Hyperreagibilität der Atemwege vergesellschaftet ist. Zudem wurde die chronische Entzündung der Atemwege als wesentliches Charakteristikum des Asthma im Detail beschrieben (13).

Erst in den letzten Jahren wurde, gewissermaßen in Rückbesinnung auf die Medizingeschichte, klar, dass eine Überempfindlichkeit der die Atemwege innervierenden Nerven eine wesentliche Rolle bei der Erkrankung spielt. Neuere Arbeiten belegen, dass es eine Verbindung zwischen der chronischen Entzündung und der neuronalen Überempfindlichkeit beim Asthma gibt. Als potente Mediatoren des Entzündungsprozesses, die eine nachhaltige Veränderung der neuronalen Empfindlichkeit induzieren können, sind die Neurotrophine (Nervenwachstums – faktoren) charakterisiert worden. Lymphocyten, Makrophagen und Mastzellen produzieren große Mengen an Neurotrophinen während der allergischen Entzündung (2). Die Neurotrophine sind befähigt, pulmonale Neurone zu einer dauerhaften Funktionsänderung anzuregen und lösen eine nachhaltige neuronale Hyperreaktivität aus (2). Sie regulieren die neuronale Plastizität sowie die Neurotransmitter – und Neuropeptidsynthese des Nervensystems (3,4,5,6). Außerdem haben sie Auswirkungen auf Immunfunktionen und die Physiologie glatter Muskulatur. Eines der Neurotrophine, das an der Kommunikation von Immunzellen und Neuronen im Entzündungsprozess der asthmatischen Lunge beteiligt sein könnte, ist der Brain – derived neurotrophic factor (BDNF) (7,8). Die vorliegende Promotionsarbeit beschäftigt sich, mit Hinblick auf mögliche neue Therapieansätze zur Behandlung und Prävention des Asthma bronchiale und anderer entzündlicher Erkrankungen, mit der Wirkung von Glukokortikosteroiden auf die Freisetzung von BDNF durch Immunzellen.

1.1 Allergisches Asthma bronchiale

1.1.1 Übersicht

Asthma ist bei Kindern und Jugendlichen die häufigste chronische Erkrankung: etwa jedes zehnte Kind unter 15 Jahren leidet darunter. Unter Erwachsenen sollen sich Statistiken zufolge fünf Prozent Asthmatiker befinden (9). Die Prävalenz der Asthma – Erkrankungen hat über Jahre kontinuierlich zugenommen (10), neuere Studien zeigen, dass die Zunahme in westlichen Ländern zum Stillstand zu kommen scheint (11). Asthma ist eine potenziell tödlich verlaufende Krankheit mit 2.422 Todesfällen im Jahr 2003 in Deutschland (Totenscheindiagnose) (12). Man unterscheidet klassischerweise das allergische (extrinsische) Asthma vom nicht – allergischen (intrinsischen) Asthma. Heutzutage werden eine ganze Reihe von Asthma – Phänotypen diskutiert, die jedoch teilweise noch hypothetisch sind (25). Während das nicht – allergische Asthma durch unspezifische Reize wie Infektionen der Atemwege, Medikamentenunverträglichkeiten (z.B. Acetylsalicylsäure), Einwirkung von irritierenden Stoffen (z. B. Lösungsmittel), besondere körperliche Anstrengung und Refluxerkrankung symptomatisch werden kann, wird das allergische Asthma bei entsprechender genetischer Veranlagung durch Allergene ausgelöst.

Wesentliche Merkmale des allergischen Asthmas sind die allergische Atemwegsentszündung, die variable Atemwegsobstruktion und die bronchiale Hyperreaktivität gegenüber unspezifischen Stimuli (wie Kälte oder Anstrengung). Die Hyperreaktivität lässt sich oft objektivieren durch Inhalation von Reizsubstanzen, z. B. Methacholin oder Histamin. Im weiteren Verlauf der Erkrankung beobachtet man das sogenannte „Airway Remodeling“, welches durch chronische Umbauprozesse des Epithels, der Muskulatur und der subepithelialen Strukturen gekennzeichnet ist. Autopsien an in Folge ihrer Krankheit verstorbenen Asthmatikern führten zu der Erkenntnis, dass eine Entzündung Baustein der asthmatischen Erkrankung ist. Die Atemwege zeigten eine Infiltration von Neutrophilen, Eosinophilen, degranulierten Mastzellen, Lymphocyten, eine Verdickung der Basalmembran, einen Verlust der epithelialen Zellintegrität, eine Hypertrophie und Hyperplasie der glatten bronchialen Muskulatur und bisweilen sogar einen Verschluss des Bronchallumens durch Schleim (13).

Zum weiteren Verständnis der Entzündung wurden Biopsien von lebenden Asthma – Patienten entnommen. Die entzündlichen Veränderungen traten in den oberen und unteren Luftwegen auf (14,15) und unterschieden sich je nach Schweregrad der Erkrankung (16,17). Auch bei leichteren Ausprägungen der asthmatischen Erkrankung fanden sich eine Epithelschädigung, Kollagenablagerungen unter der Basalmembran, Mastzell – Degranulation sowie eine Infiltration mit T – Lymphocyten und Eosinophilen. Viele der Zellen zeigten sich aktiviert, die Produktion und Freisetzung von Mediatoren legte den Verdacht nahe, dass sie eine direkte Rolle beim Asthma spielen (13). In bronchoalveolären Lavagen wurden entzündungsvermittelnde Cytokine und chemotaktische Chemokine gefunden (18), die von ortsständigen Zellen und von Entzündungszellen gebildet werden und auf diese wirken. Hier bietet sich ein weiterer Anhaltspunkt für die Bedeutung der Entzündung in der Pathogenese des Asthmas mit einer Auswahl von möglichen autokrinen, endokrinen und parakrinen Netzwerken (13).

Bei der Begutachtung der gewonnenen Erkenntnisse über die Entzündung bei Asthma gilt zu bedenken, dass alle verwendeten Quellen in Ihrer Aussagekraft limitiert sind. Biopsien oder Lavagen beleuchten nur Teilkompartimente des chronischen Entzündungsprozesses, Autopsiebefunde von an Asthma verstorbenen Patienten sind aufgrund extremer Krankheitsausprägung nicht repräsentativ, die Ergebnisse von Tierversuchen nur bedingt auf den Menschen übertragbar. Die gewonnenen Erkenntnisse gleichen also Puzzlesteinen, die zu einem pathophysiologischen Gesamtbild zusammengefasst werden müssen.

Nicht zuletzt dank methodischer Vorteile (Immunzellen sind aus peripherem Blut und der bronchoalveolären Lavage lebender Patienten mit Asthma relativ leicht zu gewinnen) liefert die Immunologie einen großen Anteil des Puzzles, ohne alleine eine Antwort auf das gesamte Geschehen geben zu können. So können die Ursachen der bronchialen Hyperreaktivität nur unter Berücksichtigung neuronaler Aspekte verstanden werden: parasymphatische und sensorische Neurone regulieren weitgehend den Atemwegstonus, parasymphatholytische und sympathomimetische Medikamente sind effektive Bronchodilatoren und werden in der Asthmatherapie eingesetzt (2). Die allergisch entzündete Lunge zeigt Veränderungen der Innervation, die zur bronchialen Hyperreagibilität des Asthmatikers beitragen.

Mediatoren des allergischen Entzündungsprozesses, die dazu befähigt sind, pulmonale Neurone zu einer dauerhaften Funktionsänderung anzuregen, sind die Neurotrophine. Diese können nachhaltig Neurotransmitter – und Neuropeptidsynthese, synaptische Plastizität und Rezeptorexpression vieler Neuronenpopulationen beeinflussen. Voraussetzung für die Entwicklung geeigneter, potentiell prophylaktischer Therapien zur Behandlung des allergischen Asthmas ist das Verständnis der dem Asthma zugrunde liegenden Mechanismen und ihrer lokalen und systemischen Interaktion. Im Folgenden soll daher neben immunologischen Grundlagen auch die Innervation der Lunge und die Bedeutung der Neurotrophine als Regulatoren der neuronalen Plastizität besprochen werden.

1.1.2 Die allergische Entzündung bei Asthma

1.1.2.1 IgE – vermittelte Degranulation der Mastzellen

Inhalierte Allergene treffen auf lokal ansässige, dendritische Zellen, die die Atemwege säumen. Diese stellen die wichtigste Population antigenpräsentierender Zellen (APC) in der Mukosa dar (19). Sie wandern in die drainierenden Lymphknoten, wo sie das prozessierte Antigen in Anwesenheit von T_H2 – Cytokinen spezifischen T – und B – Zellen präsentieren (20, 24). Interaktionen zwischen diesen Zellen lösen Reaktionen aus, die von Cytokinen und costimulatorischen Faktoren abhängig sind. So ist der „Switch“ auf die Synthese von IgE durch B – Lymphocyten von der Bindung der Cytokine Interleukin-4 und Interleukin-13 an Rezeptoren der B – Zelle, sowie der Bindung des CD40 der B – Zelle an seinen Liganden auf der T – Zelle abhängig. Der gebildete antigenspezifische IgE – Antikörper trifft auf hoch affine Rezeptoren ($Fc\epsilon RI$) auf der Oberfläche von Mastzellen, wodurch diese sensibilisiert werden. Beim nächsten Antigenkontakt mit der sensibilisierten Mastzelle kommt es durch Interaktion des Allergens mit dem $Fc\epsilon RI$ – Rezeptor gebundenen IgE zur molekularen „Brückenbildung“, dies führt zur Freisetzung von Mediatoren (22) wie Histamin und Leukotrienen, welche Entzündung, Bronchokonstriktion und Ödembildung hervorrufen (29,30). Aus Mastzellen freigesetzte Mediatoren können chemotaktisch auf weitere Entzündungszellen wirken und diese aktivieren. Es ist bislang jedoch unklar, ob die mit einer zeitlichen Latenz von mehreren Stunden auftretende Spätreaktion damit erklärt ist (79).

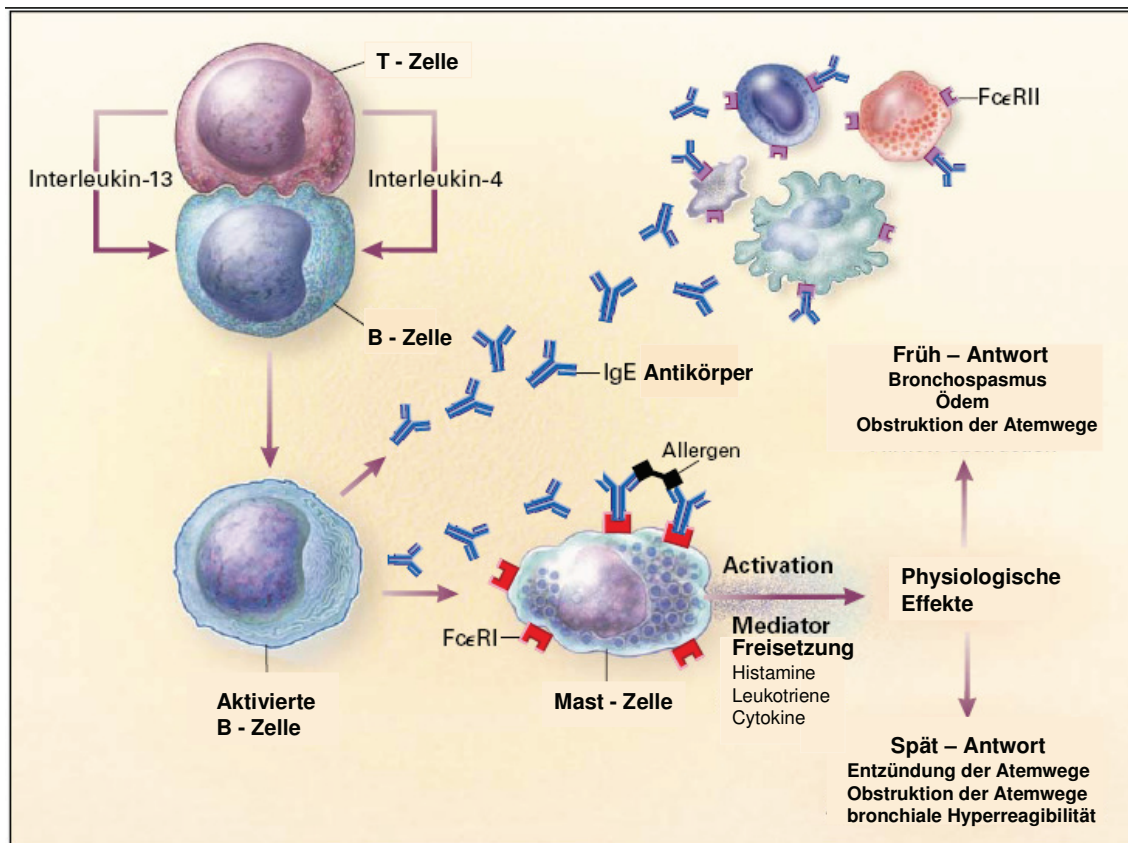


Abb. 2 Das Konzept der allergischen Entzündung der Atemwege

IL-4 und IL-13 bilden das erste Signal an B – Zellen, die Produktion auf IgE – Antikörper umzustellen. Das zweite Signal wird von Molekülen wie CD40 und seinem Liganden (21) gebildet. Die gebildeten IgE – Antikörper zirkulieren im Blut, um letztlich an ihre Rezeptoren (F ϵ RI, hohe Affinität, auf Mastzellen und Basophilen des peripheren Blutes) zu binden. Dies führt, nach Vernetzung mit dem Allergen, zur Ausschüttung neuer Mediatoren, die die lokale Entzündung verstärken. (Adaptiert nach Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. N Engl J Med. 2001;344(5):350-62.(13))

Die IgE – vermittelte Degranulation der Mastzellen gilt als wichtigster Auslöser der allergischen Sofortreaktion (23), und wirft die Frage auf, inwieweit Mastzellen an der Chronifizierung der allergischen Entzündung beteiligt sind. Es wird folgender Circulus vitiosus diskutiert: die aktivierten Mastzellen können unabhängig von T – Zellen durch IL-4 – Freisetzung lokale B – Lymphocyten zur IgE – Produktion anregen und dadurch wiederum ihre IgE – Beladung steigern (27,28,35). Folge eines wiederholten Allergenkontaktes ist die Chronifizierung der Atemwegsentszündung. Es kommt zum Umbau des Lungengewebes, zur Hypertrophie der glatten Muskelzellen, zur Basalmembranverdickung, zur Zunahme Mucus – produzierender Becherzellen (80,81,82,83) und zu einer Hyperreaktivität der die Atemwege innervierenden Nerven.

1.1.2.2 Die T_H2 – Immunantwort

Die Anwesenheit von T – Lymphocyten in der allergisch entzündeten Bronchialschleimhaut ist gut dokumentiert. T – Zellen bestehen aus Sub – populationen, die von unterschiedlichen Arten von Antigenen stimuliert werden können und in der Folge verschiedene Effektor – Funktionen aufweisen. Extrazelluläre Antigene werden von APC aufgenommen, verarbeitet und bevorzugt zusammen mit MHC II Molekülen präsentiert. Dies aktiviert CD4⁺ Helfer T – Zellen. Innerhalb der CD4⁺ Helfer T – Zellpopulation gibt es wiederum die Subpopulationen T_H1 und T_H2, die nur bestimmte Cytokine als Reaktion auf eine Antigen – Stimulation produzieren (43). Pulmonale dendritische Zellen zeigen nach Antigenexposition eine isolierte Hochregulation des Costimulators B7-2 (31). Die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen wie B7-2 auf APC mit CD28 auf T – Zellen gilt als ein wesentlicher Auslöser der T_H2 – gewichteten allergischen Entzündung der Mukosa von Patienten mit allergischem Asthma bronchiale (32,33,34), wobei die T – Zellen vor allem Cytokine der sog. T_H2 – Gruppe (vor allem IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13) produzieren, die die pulmonale Entzündungsreaktion vermitteln: so werden direkt lokale Entzündungszellen wie eosinophile Granulocyten angelockt und aktiviert (IL-5), die IgE Antikörperproduktion durch B – Zellen stimuliert (IL-4, IL-13) oder die Freisetzung von Chemokinen (z. B. Eotaxin, das für die Rekrutierung von eosinophilen Granulocyten wichtig ist) in pulmonalen Fibroblasten gesteuert (38,39). Bei schwerem chronischen Asthma findet sich jedoch auch eine Produktion von Cytokinen der T_H1 – Gruppe, so dass hier eine klare Trennung zwischen T_H1 und T_H2 nicht immer möglich ist (41,42,44).

1.1.2.3 Eosinophile Granulocyten

Unter dem Einfluss von IL-5 kommt es zur Infiltration von Eosinophilen in die Bronchialschleimhaut von Asthmatikern (49). Diese lokale Infiltration in die Mukosa der Atemwege geht mit einer erhöhten Anzahl eosinophiler Granulocyten und derer Mediatoren im peripheren Blut einher (46), wobei diese mit dem Schweregrad der allergischen Entzündung korrelieren und als klinischer Verlaufsparemeter beim allergischen Asthma verwendet werden kann (47,48). Interessanterweise findet sich aber oft eine Dissoziation zwischen Eosinophilie und Atemwegsobstruktion beim

Asthma. Dies wurde nach Allergenprovokation (40) als auch nach therapeutischer spezifischer Ausschaltung der Eosinophilen beobachtet (45). Somit sind die Eosinophilen zwar beim Asthma vermehrt in den Atemwegen vorhanden und mit dem Schweregrad korreliert, es bestehen aber erhebliche Zweifel, ob Eosinophile zur Atemwegsobstruktion beim Asthma beitragen. Im Gegenteil, es wird sogar diskutiert, daß Eosinophile positive Auswirkungen auf die Verengung der Atemwege haben könnten (40).

1.1.2.4 Alveolarmakrophagen

Alveolarmakrophagen stellen den Hauptanteil der durch eine BAL aus den unteren Atemwegen gewonnenen Zellpopulationen bei Asthmatikern wie auch bei gesunden Kontrollprobanden (54). Bei Patienten mit allergischem Asthma zeigen sie jedoch einen veränderten Aktivierungsgrad, nach Allergenstimulation werden von den Alveolarmakrophagen Peroxidradikale und Mediatoren wie IL-1, Leukotrien B₄ (LTB₄), Prostaglandin F_{2a} (PGF_{2a}) und Platelet – activating Factor (PAF) (55) freigesetzt. Sie spielen somit eine erhebliche Rolle bei der Soforttypreaktion. Makrophagen beeinflussen jedoch auch Zellsysteme in der Lunge auf sehr nachhaltige Weise. So können sie durch Sekretion von Neurotrophinen die Aktivität der innervierenden Neurone steuern (2) und somit, wie im folgenden dargestellt, nicht nur maßgeblich die Soforttypreaktion, sondern auch die bronchiale Reagibilität und die Chronifizierung der Entzündung beeinflussen.

1.2 Die Innervation der unteren Atemwege

Der Tonus sowohl der gesunden als auch der allergisch entzündeten Atemwege steht unter neuronaler Kontrolle. Eine allergische Entzündung der oberen und unteren Atemwege verändert Nervenzellen in ihrer Transmitterproduktion und Aktivität nachhaltig (58). Dies trägt nicht nur zur bronchialen Hyperreaktivität und Hypersekretion, sondern auch zur Verstärkung und Chronifizierung der lokalen Entzündungsreaktion bei. Hierbei spielt die lokale Freisetzung von Neuropeptiden aus sensorischen Nerven eine zentrale Rolle (59). Die nervöse Versorgung der unteren Atemwege wird nach klassischer Einteilung in ein autonomes efferentes System (mit einem sympathischen und einem parasympathischen Anteil) und in ein

sensibles System gegliedert. Sensorische und parasympathische Anteile ziehen in Ästen des Nervus vagus in die Lunge, sympathische Anteile ziehen vor allem entlang der Gefäße in die Lunge.

1.2.1 Sympathische und parasympathische Innervation

Die Perikarya der präganglionären efferenten sympathischen Nervenzellen befinden sich in thorakalen und lumbalen Segmenten des Rückenmarks, vor allem im Nucleus intermediolateralis. Deren Axone verlassen über die Vorderwurzel das Rückenmark und gelangen über Spinalnerv und Ramus communicans albus zum Grenzstrang, um dort in paravertebralen Ganglien umgeschaltet zu werden oder direkt zu den prävertebralen Ganglien weiter zu ziehen. Zu Trachea und Lunge ziehen postganglionäre Fasern vom Ganglion cervicale superius, Ganglion stellatum und von oberen thorakalen Grenzstrangganglien. Haupttransmitter dieser Neurone ist Noradrenalin. Eine weitere Kontrolle der Lungenfunktion erfolgt durch die aus dem Nebennierenmark ausgeschüttete Katecholamine. Postganglionäre sympathische Axone bilden ein Nervengeflecht, das am Lungenhilus in die Lunge eintritt (60). Die Atemwegsmuskulatur wird nur von wenigen sympathischen Neuronen erreicht (61). Vor allem zirkulierende Katecholamine vermitteln die dilatierende Wirkung des Sympathikus auf die mit β_2 – Adrenozeptoren dicht besetzte Atemwegsmuskulatur. Sympathische Neurone beeinflussen durch Regulation der cholinergen Signaltransmission (über α_2 – Adrenozeptoren) und der Gefäßpermeabilität (über β_2 – Adrenozeptoren) den Atemwegstonus (62).

Präganglionäre parasympathische Neurone liegen im Nucleus dorsalis nervi vagi und im Nucleus ambiguus. Diese entsenden ihre Axone zu den in den Wandungen der Atemwege gelegenen Ganglien (63), um dort auf kurze, zu den verschiedenen Zielgebieten der unteren Atemwege ziehende postganglionäre Neurone umgeschaltet zu werden (60,64). Diese innervieren mit ihren Nervenendigungen die glatte Atemwegsmuskulatur und exokrinen Drüsen (65). Der Haupttransmitter Acetylcholin wirkt über muskarinerge Rezeptoren bronchokonstriktorisch, vasodilatierend und drüsenaktivierend. Die lokalen parasympathischen Ganglien spielen eine zentrale Rolle für die Regulation des Atemwegstonus (**Abb. 3**).

1.2.2 Non – adrenerge, non – cholinerge Neurone

Neben den bereits erwähnten klassischen Mediatoren Noradrenalin und Acetylcholin existieren eine Reihe von Neuropeptiden, die ausgeprägte pharmakologische Effekte auf den Muskeltonus der Blutgefäße und der Bronchien, die Drüsensekretion und auf Entzündungs – und Immunzellen haben (66,67,68). Neurone, die sich dieser Neuropeptide als Effektormoleküle bedienen werden unter dem Begriff des „ non – adrenergen, non – cholinergen (NANC) Systems “ zusammengefasst. Anatomisch sind diese NANC – Systeme jedoch nicht immer von den klassischen sympathischen und parasympathischen Nerven getrennt, ja oft sogar mit ihnen identisch. Die NANC – Mediatoren können in zwei funktionelle Gruppen eingeordnet werden (69,71,72):

1. Exzitatorische Neurone („e – NANC“): diese bedienen sich der Tachykinine, zu denen unter anderem Substanz P und Neurokinin A gezählt werden, die zu Bronchokonstriktion, Mucussekretion und Steigerung der Gefäßpermeabilität führen und somit entzündungsfördernd wirken (87,88, 89, 90, 131).

2. Inhibitorische Neurone („i – NANC“): diese bedienen sich des oft in Cotransmission mit Acetylcholin freigesetzten, bronchodilatierend und vasokonstriktorisch wirkenden Vasointestinalen Peptids (VIP), sowie des Peptid Histidin Methionin (PHM) und Neuropeptids Y (74,75). Vor allem in cholinergen Neuronen sind Stickstoffmonoxid – Synthetasen (NO-Synthetasen) nachweisbar (70), welche aus der Aminosäure Arginin den potenten Brochodilatator (73) Stickstoffmonoxid (NO) synthetisieren.

1.2.3 Sensible Innervation

Der größte Teil der afferenten Nervenfasern der Atemwege verläuft mit dem Nervus vagus und endet mit der zentralen Projektion in den Nuclei des Tractus solitarius. Die Perikaryen dieser pseudounipolaren Neurone liegen in den vagalen sensiblen Ganglien (Ganglion jugulare und Ganglion nodosum). Außerdem wurde eine zusätzliche afferente Versorgung der Atemwege aus den thorakalen Spinalganglien nachgewiesen (76). Die afferente Innervation der Atemwege erhält Erregungen von Berührungs – und Dehnungsrezeptoren an Trachea, Bronchi und Bronchioli

sowie der Pleura. Sensible Nervenfasern können durch exogene (Capsaicin) und endogene (Histamin, Bradykinin und Prostaglandine) Stimuli (77) aktiviert werden. Die Afferenzen werden nach Myelinisierung und Reiztransduktion unterteilt (60): (1) langsam adaptierende Dehnungsrezeptoren, die in den Wänden der Bronchien und subpleural zu finden sind. Sie vermitteln den Hering – Breuer – Reflex, der die Einatmung als Schutz vor Überdehnung begrenzt. (2) „Irritanzienrezeptoren“, die vor allem in der Schleimhaut liegen. Sie reagieren auf reizende Gase und mechanische Stimuli, sind schnell adaptierend und vermitteln z.B. den Hustenreflex. (3) C–Faser–Rezeptoren, die in Trachea, Bronchien und Lungenparenchym anzutreffen sind. Sie werden durch spezifische Stimuli wie Capsaicin und Bradykinin (78), und durch unspezifische Stimuli erregt.

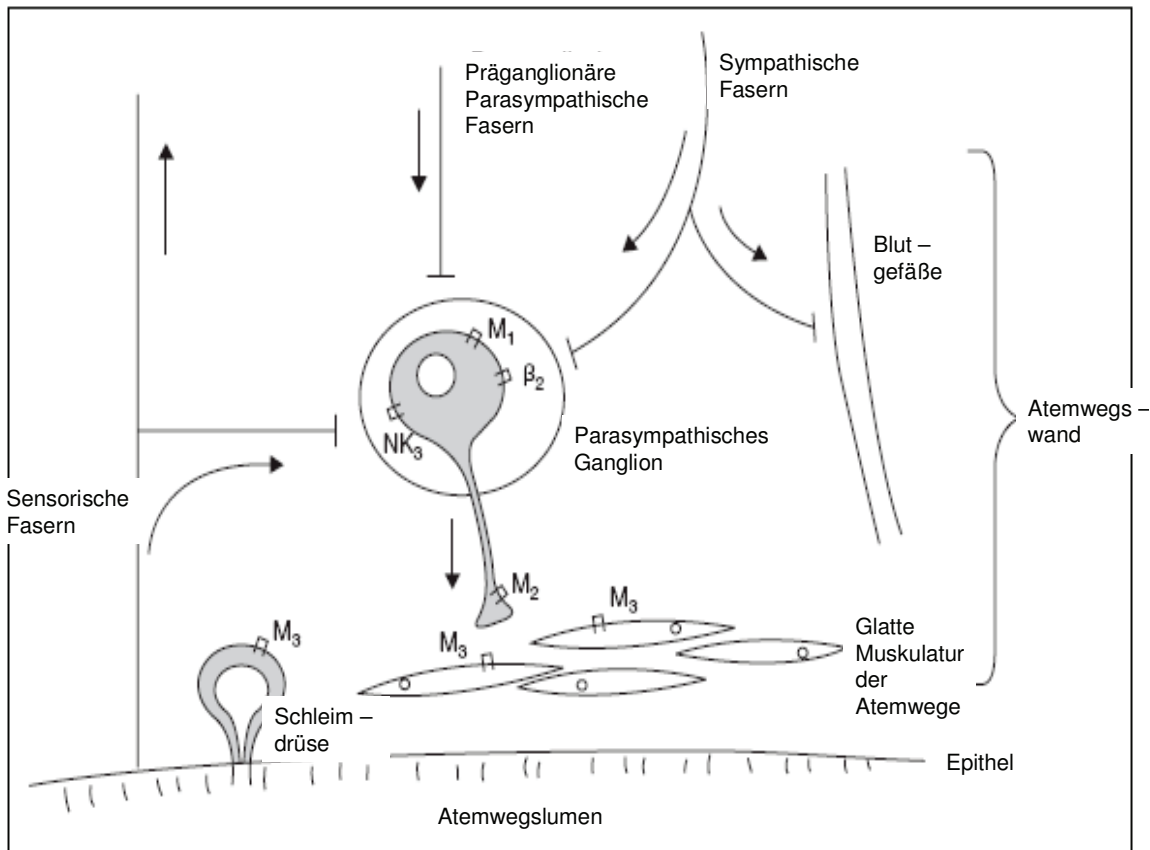


Abb. 3 Parasympathische Ganglien als neuronale Drehscheibe der Atemwege

Die lokalen parasympathischen Ganglien innervieren die glatte Muskulatur, submucöse Drüsen und Blutgefäße der Atemwege. Der von ihnen freigesetzte Mediator Acetylcholin bewirkt eine Obstruktion des Lumens kleiner Bronchi und Bronchioli, einen erhöhten Atemwegswiderstand in größeren Atemwegen, die Stimulation der Zilienschlagfrequenz und die Freisetzung von Schleim. Das Ganglion wird beeinflusst durch präganglionäre parasympathische Nerven, jedoch auch durch sympathische und sensible Nerven. Parasympathische Ganglien stellen daher eine neuronale Drehscheibe dar, die sensorische, sympathische und parasympathische Signalwege integrieren. Adaptiert nach J.C. Virchow, M. Lommatzsch: Anti – cholinergic agents in asthma. In: Therapeutic strategies, Asthma, Current treatments, S 79 – 91, Atlas Medical Publishing Ltd. 2006 (50).

1.3 Neurotrophine

BDNF (engl.: brain derived neurotrophic factor) gehört zusammen mit NGF (Nerve growth factor) sowie den Neurotrophinen (NT) 3 und 4 zur Familie der Neurotrophine. Ihr Name geht zurück auf die ursprünglich beschriebene wesentliche Funktion als Regulatoren des Überlebens und des Wachstums von Neuronen (3).

1.3.1 Geschichte, Struktur und Rezeptoren

In den 1950er Jahren wurde bei der Co – Kultivierung von Neuronen und ihren Zielgewebszellen erkannt, dass die Größe einer neuronalen Population von der Größe des Innervationsgebietes abhängt (92). Es wurde postuliert, dass Zellen des Innervationsgebietes einen Stoff produzieren, der das Wachstum und Überleben von Neuronen positiv beeinflusst. Die älteste derzeit lebende Nobelpreisträgerin Rita Levi – Montalcini erhielt den Preis für die Isolierung und Charakterisierung des ersten, diese Eigenschaften besitzenden, von ihr als „Neurotrophin“ bezeichneten Proteins Nerve growth factor (NGF). In den Folgejahren führte diese Entdeckung zur Entwicklung der klassischen Neurotrophinhypothese (93), die besagt, dass Neurone durch Neurotrophine zu axonalem Wachstum angeregt werden (97). Ohne sie kommt es zur Apoptose der Neurone (98,99,100,101). Postnatal sind die Neurotrophine für das Überleben oder das Wachstum von Neuronen nicht mehr von entscheidender Bedeutung. Sie bestimmen vielmehr die funktionelle Differenzierung und Aktivität erwachsener Neurone (3).

1982 wurde aus Schweinehirnen ein dem NGF strukturverwandtes Neurotrophin isoliert. Es wurde daher „Brain – derived neurotrophic factor“ genannt (94). In den 90 er Jahren folgte die Isolation weiterer, nun nummerierter Neurotrophine (NT-3, NT-4/5 und NT-6). Die Neurotrophine besitzen eine Sequenzhomologie von ca 50 %. BDNF, ein homodimeres Protein, besteht aus zwei 13,5 kDa schweren Untereinheiten (95) mit jeweils 119 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz ist unter Säugern zu 100 % homolog, unter den bekannten Proteinen zeigt nur NT-3 eine derartige Konservierung. Dies ist ein Hinweis auf die universelle und unverzichtbare Funktion von BDNF und NT-3 im Laufe der Evolution (96).

Es wurden zwei Klassen von Neurotrophinrezeptoren entdeckt: der niedrigaffine Pan – Neurotrophinrezeptor p75^{NTR} (103) und die ligandenspezifischen, hochaffinen Tyrosin – Kinase – Rezeptoren der Trk-Familie : trkA für NGF, trkB für BDNF und NT-4/5, sowie trkC für NT-3. Kürzlich wurde entdeckt, dass zusätzlich die Vorläuferproteine der Neurotrophine (sog. „Pro – Neurotrophine“) hochaffin am p75^{NTR} binden können. Die durch die Neurotrophine bzw. Pro – Neurotrophine ausgelösten Wirkungen auf Neurone sind sehr vielfältig, und unter anderem von dem Co – Expressionsmuster der verschiedenen Neurotrophinrezeptoren abhängig (51).

1.3.2 Neurotrophine und das Immunsystem

Mittlerweile ist bekannt, dass als Quelle von Neurotrophinen neben Neuronen oder neuron – assoziiertem Gewebe wie Gliazellen und Schwannzellen (100, 3) auch Zellen des Immunsystems eine große Rolle spielen. So wird BDNF von Mastzellen (104), Neutrophilen, Eosinophilen (105), T- und B-Zellen, Monocyten (106) sowie Makrophagen (7) exprimiert. Neurone selbst können wiederum durch Entzündungszellen zur verstärkten Expression von NGF und BDNF angeregt werden (138,139). Auch die Neurotrophinrezeptoren werden nicht nur von Zellen des Nervensystems exprimiert: sowohl p75^{NTR} als auch die TRK – Rezeptoren werden von Mastzellen, Monocyten, Makrophagen, Granulocyten und Lymphocyten exprimiert (52). Es konnten vielfältige Wirkungen nachgewiesen werden: so beeinflusst NGF Mastzellen (145, 146), Makrophagen (147,148,149,150), Eosinophile (151), B – und T – Zellen (152,153,128,154). Für BDNF liegen diesbezüglich bislang weniger Informationen vor (52). BDNF beeinflusst das Migrationsverhalten von Granulocyten (53) und die Cytokinproduktion mononukleärer Zellen (84). Die weite Verbreitung der Neurotrophin – Rezeptoren auf Entzündungszellen macht jedoch auch für BDNF eine Vielzahl von Wirkungen auf das Immunsystem wahrscheinlich.

Es häufen sich in den letzten Jahren Hinweise darauf, dass es bei entzündlichen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose (119,106), dem systemischen Lupus erythematosus (121), der chronischen Arthritis (122,123), dem Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa (110, 124) und der atopischen Dermatitis (161) zu einer verstärkten lokalen bzw. systemischen Produktion von Neurotrophinen kommt. Dies soll exemplarisch am Beispiel des Asthma und von Infektionen beschrieben werden.

1.3.3 BDNF und allergisches Asthma

Bei Patienten mit allergischem Asthma finden sich erhöhte BDNF – Serumspiegel (126), sowie erhöhte BDNF – Spiegel in der BAL (127). Im Tiermodell des allergischen Asthmas wurde gezeigt, dass es in den Atemwegen zu einer verstärkten BDNF – Produktion durch infiltrierende Immunzellen wie Makrophagen und T – Zellen kommt (128,7). Bemerkenswerterweise erzielen die BAL – BDNF – Spiegel ihr Maximum während des Abklingens der allergischen Entzündung (136). Die Hemmung des verstärkt exprimierten BDNF im Tiermodell führte zu einer Verhinderung der neuronalen Hyperreagibilität der Atemwege, andererseits konnte BDNF bei gesunden Tieren diese Hyperreagibilität auslösen. Daraus folgte die Hypothese, dass BDNF in der allergischen Atemwegsentzündung die Hyperreagibilität der Atemwege mit auslöst (155). Dies wurde bei Patienten mit allergischem Asthma insofern bestätigt, als dass eine Korrelation zwischen BDNF – Serumspiegeln und der bronchialen Hyperreagibilität bestand (125).

Durch welche Mechanismen könnte BDNF die neuronale Hyperreagibilität in den Atemwegen auslösen? Hierzu gibt es aktuell drei verschiedene Erklärungsansätze. Erstens können Neurotrophine wie BDNF die Sensitivität von sensiblen Neuronen erhöhen (135,59,143), unter anderem durch eine Steigerung der Produktion von Neuropeptiden (133,134,140,141)(**Abb.4**). In der BAL von Patienten mit Asthma werden in der Tat erhöhte Spiegel von Substanz P gemessen (85,86). Ein zweiter Erklärungsansatz bezieht sich auf die motorischen Neurone, die ebenfalls trk – Rezeptoren sowie einen retrograden Neurotrophin – Transport aufweisen (144). BDNF könnte Einfluss auf die Produktion und Freisetzung von Neurotransmittern in motorischen Neuronen nehmen. Auch Zellen der glatten Muskulatur können Neurotrophine synthetisieren und tragen deren Rezeptoren (156). Nach Schädigung können glatte Muskelzellen ihre NGF – und BDNF – Produktion sowie die trkA – und trkB – Rezeptor – Expression steigern (157). Es kann daher vermutet werden, dass auch die glatte Muskulatur im Rahmen einer Entzündung auf Neurotrophine mit einer Funktionsänderung reagieren kann (189).

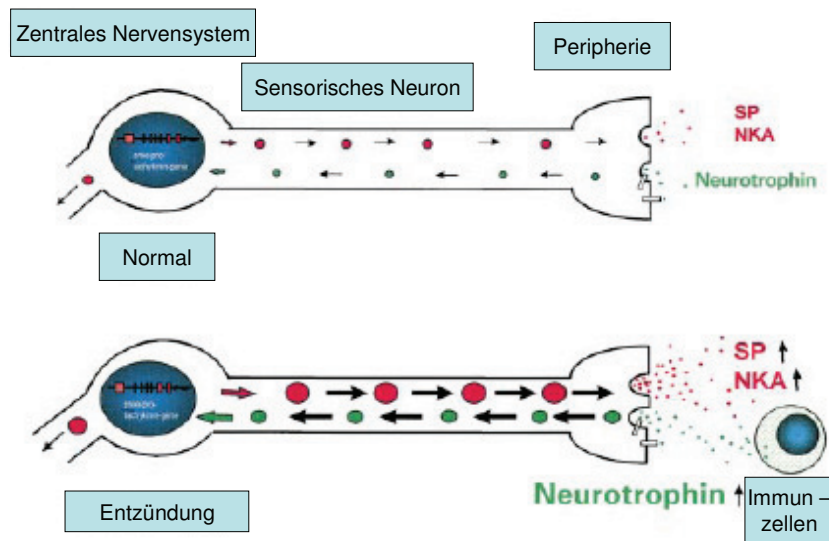


Abb. 4 Kontrolle der neuronalen Neuropeptid – Synthese durch Neurotrophine

Unter physiologischen Bedingungen werden nur geringe Mengen an Neurotrophinen im Zielgebiet der Innervation produziert. Während einer Entzündung produzieren Immunzellen große Mengen an Neurotrophinen, die retrograd zum Zellkörper der Neurone transportiert werden. Im Zellkern bewirken sie eine erhöhte Neuropeptid – Synthese (SP: Substanz P, NKA: Neurokinin A). Diese Neuropeptide werden in die Peripherie transportiert und bei Stimulation freigesetzt. (nach dem Review von A. Braun, M. Lommatzsch, H.Renz, *Clinical and Experimental Allergy*, 2000 (2)).

1.3.4 BDNF und Infektion

Gesteigerte bronchiale Empfindlichkeit während und nach Infektionen der unteren Atemwege stellt ein großes klinisches Problem dar. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass Infektionen mit einer BDNF – Überexpression einhergehen. Bei Meningoencephaliden viraler und bakterieller Genese wurde eine erhöhte Expression von BDNF im Liquor spinalis gefunden (158,142). In den Atemwegen von RSV – infizierten Kindern zeigte sich eine Überexpression von BDNF und Neurotrophinrezeptoren. Dies lässt eine wichtige Rolle von Neurotrophinen in der Pathogenese der Atemwegs – Überempfindlichkeit während der RSV – Infektion vermuten (132). Im Rahmen bakterieller Infektionen der unteren Atemwege erwachsener Patienten zeigen sich erniedrigte BDNF – Serumspiegel als Ausdruck einer gesteigerten BDNF – Freisetzung aus Thrombocyten (180). Dies weist darauf hin, dass sowohl Leukocyten als auch Thrombocyten durch eine verstärkte BDNF – Sekretion eine bronchiale Hyperreagibilität bei Atemwegsinfektionen auslösen könnten.

1.3.5 Makrophagen und Monocyten als prominente BDNF – Produzenten

In einem Maus – Modell der allergischen Atemwegsentzündung wurden vor allem Makrophagen als zelluläre Quelle der in der entzündeten Lunge gesteigerten BDNF – Produktion beschrieben (7). Bei Patienten mit Multipler Sklerose zeigten sich in entzündeten Hirnläsionen infiltrierende mononukleäre Zellen und Makrophagen als wichtigste BDNF – Quelle (106). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Makrophagen bzw. Monocyten eine wichtige Quelle für BDNF in entzündetem Gewebe darstellen. Schulte – Herbrüggen et al. konnten zeigen, dass unstimulierte menschliche Monocyten des peripheren Blutes konstitutiv BDNF sezernieren und die Hauptquelle für dieses Neurotrophin unter den PBMC (peripheral blood mononuclear cells) darstellen (8) (**Abb. 5**).

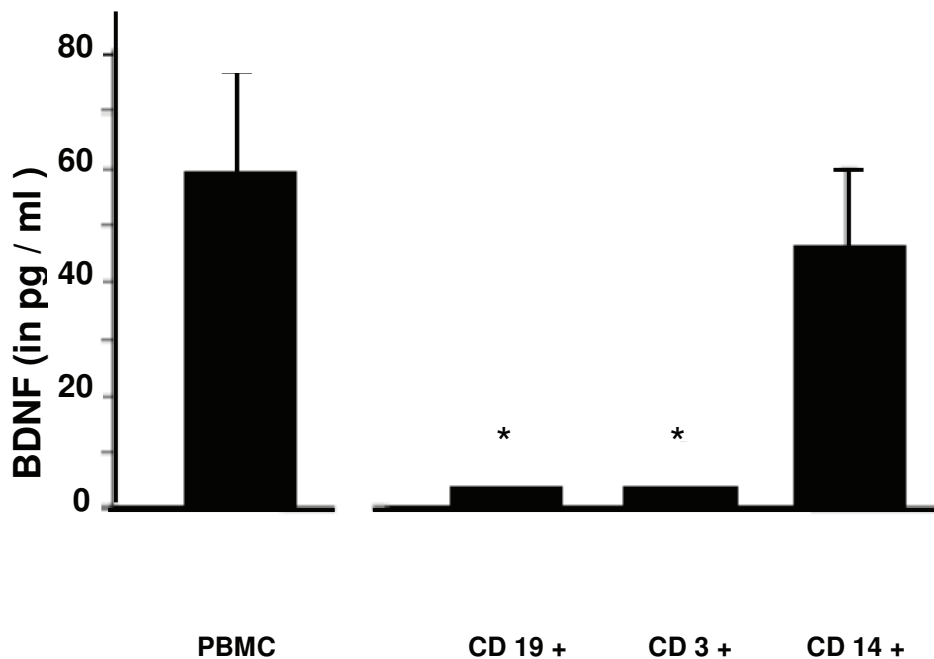


Abb. 5 BDNF-Synthese durch humane PBMC und aufgereinigte Zellsubpopulationen

PBMC zeigten eine basale BDNF Freisetzung (2×10^5 Zellen pro well, 24 h Zellkultur). In den Überständen aufgereinigter B – Zellen (CD19+) und T – Zellen (CD3+) war kein BDNF nachweisbar (* unter der Nachweisgrenze von 4 pg / ml), während die unstimulierten aufgereinigten CD14+ Monocyten BDNF sezernierten. Die Balken zeigen Mittelwerte mit Standardabweichung. Adaptiert nach Schulte – Herbrüggen et al. (8).

In Stimulationsversuchen mit Cytokinen, die typischerweise bei Bronchialasthma und Multipler Sklerose involviert sind (167), gingen Schulte – Herbrüggen et al. der Frage nach, ob die basale BDNF – Sekretion von Monocyten durch spezifische Entzündungsmediatoren gesteigert werden kann. Es konnte nachgewiesen werden, dass neben IL-6 vor allem das proinflammatorische TNF- α die BDNF – Sekretion durch PBMC steigert. Hingegen zeigten Cytokine wie IL1- β , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 und IL-15 keinen Effekt (8)(**Abb. 6**).

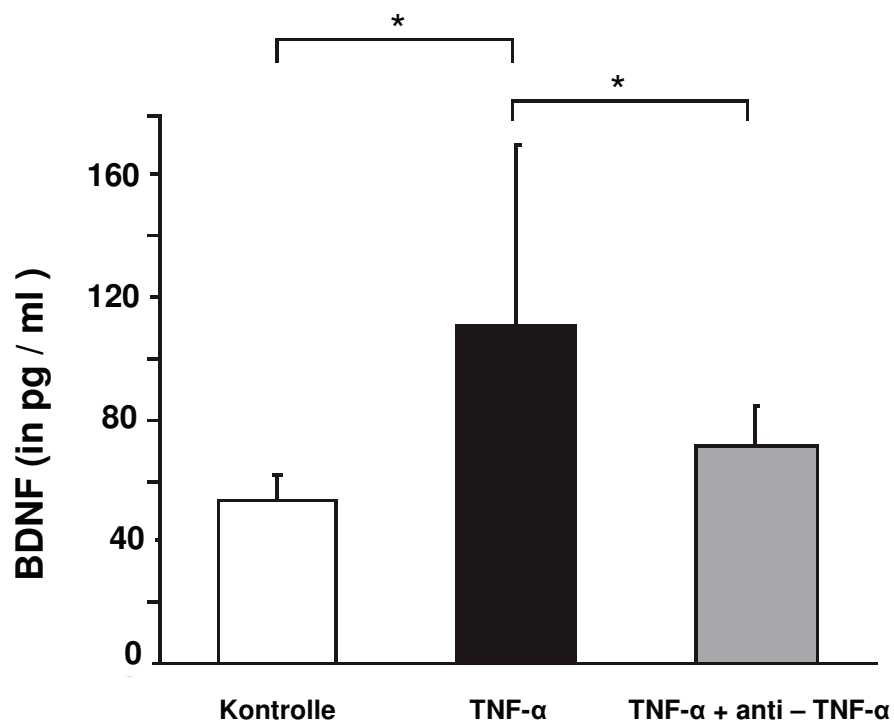


Abb. 6 BDNF Freisetzung aus Monocyten unter TNF- α Stimulation

BDNF Spiegel wurden in Zellüberständen nach 24 Std. Kultur gemessen, 12 Versuche, 4×10^5 Zellen. Stimuliert wurde mit TNF- α 50 ng / ml, gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Unter Zugabe von TNF- α kam es zu einem signifikanten Anstieg der BDNF – Freisetzung, Zugabe eines spezifischen monoklonalen Antikörpers gegen TNF- α neutralisierte diesen Effekt wieder. Adaptiert nach O. Schulte – Herbrüggen et al.(8).

Bislang unklar ist jedoch, ob Pharmaka einen Einfluss auf die Freisetzung von BDNF aus Immunzellen haben. Hierbei sind insbesondere die Glukokortikosteroide von Interesse, da diese eine große Bedeutung in der Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale haben.

1.4 Fragestellung

Glukokortikosteroide stellen die Basistherapie des allergischen Asthmas und anderer chronisch entzündlicher Erkrankungen dar. Sie haben eine starke anti – inflammatorische Wirkung, hemmen aber auch – auf bisher unbekannte Weise – die postinflammatorische neuronale Hyperreagibilität. Eine Beeinflussung der BDNF – Sekretion durch Glukokortikosteroide ist daher denkbar. Folgende Fragestellungen sollten daher im Rahmen dieser Dissertation erstmals beantwortet werden:

1. Welchen Effekt zeigen die Glukokortikosteroide Fluticason, Prednisolon und Dexamethason auf die BDNF – Sekretion humaner mononukleärer Zellen? Gibt es Unterschiede zwischen den einzelnen Glukokortikosteroiden?
2. Unterscheidet sich die Freisetzung von BDNF aus humanen mononukleären Zellen zwischen gesunden Kontrollprobanden und Patienten mit akuten entzündlichen Erkrankungen? Unterscheidet sich der Effekt von Glukokortikosteroiden auf die BDNF – Sekretion zwischen gesunden Kontrollprobanden und Patienten mit akuten entzündlichen Erkrankungen?

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

2.1.1 Rekrutierung von Probanden und Patienten

Für die Studie wurden 30 gesunde Probanden im Alter zwischen 15 und 50 Jahren männlichen und weiblichen Geschlechts gewonnen und mündlich und schriftlich über Ziel und Durchführung der Studie informiert. Bei schriftlicher Einverständniserklärung und Erfüllung der Ein – und Ausschlusskriterien wurden die Probanden in die Studie aufgenommen.

Auf den Stationen der Pneumologie, Gastroenterologie, Infektiologie und Nephrologie der Universitätsklinik Rostock wurden 23 Patienten im Alter zwischen 23 und 83 Jahren männlichen und weiblichen Geschlechts mit akut entzündlichen Erkrankungen unterschiedlicher Genese rekrutiert. Von allen Patienten lag die klinische Anamnese, der Status praesens, das Blutbild und der CRP – Wert (C – reaktives Protein) vor. Letztere Laborwerte wurden im Zentrallabor der Universitätsklinik bestimmt. Die Patienten wurden schriftlich und mündlich über das Ziel und den Ablauf der Studie informiert und gebeten, einen Fragebogen auszufüllen. Dieser enthielt Fragen zu Geburtsdatum, Gewicht, Körpergröße, Medikation, Grunderkrankungen sowie allergischen Erkrankungen. Bei schriftlicher Einverständniserklärung und Erfüllung der Ein – und Ausschlusskriterien wurden die Patienten in die Studie aufgenommen.

2.1.2 Ein – und Ausschlusskriterien

Folgende Kriterien führten bei gesunden Probanden zum Ausschluss aus der Studie:

- Zeichen einer akuten oder im Verlauf der letzten 7 Tage abgelaufenen entzündlichen oder infektiösen Erkrankung
- bekannte allergische Erkrankungen, Asthma bronchiale
- Einnahme immunsupprimierender Medikamente

Einschlusskriterien der Patienten:

- Klinische Diagnose einer akuten entzündlichen Erkrankung. Zusätzlich Nachweis von Leukocytenzahlen über 10.000 / μ l und CRP – Werten über 100 mg/l.

Ausschlusskriterien der Patienten:

- Kritischer Zustand des Patienten (z. B. Intubationspflichtigkeit, Übernahme auf die Intensivstation)
- Beeinträchtigung der Einsichts – bzw. Einwilligungsfähigkeit in die Studie
- Allergische Erkrankungen
- Einnahme immunsupprimierender Medikamente
- Vorliegen einer malignen Erkrankung
- Dialysepflichtigkeit
- Erkrankungen des hämatopoetischen Systems

2.1.3 Votum der Ethikkommission

Die vorliegende Studie wurde bei der Ethikkommission der Ärztekammer Mecklenburg – Vorpommern beantragt. Die Ethikkommission äußerte keine berufsrechtlichen oder berufsethischen Bedenken gegen die Durchführung dieser klinisch – experimentellen Studie.

2.2 Gewinnung der Blutproben

Material:

- Stauschlauch
- Octenisept Wunddesinfektionsmittel
- Sterile Wattetupfer
- Monovette – Kanüle 0,8 x 38 mm (SARSTEDT, Nümbrecht, D)
- 9 ml S-Monovette Kalium – EDTA (SARSTEDT, Nümbrecht, D)

Durchführung:

Von den Studienteilnehmern wurden jeweils 36 ml Blut aus der Vena cubitalis entnommen. Das Vollblut wurde zur Vermeidung der Gerinnung in vier 9 ml – EDTA – Monovetten gesammelt und vor Weiterverarbeitung eine halbe Stunde auf Eis aufbewahrt. Um den Einfluss tageszeitabhängiger Vorgänge zu minimieren erfolgte die Blutabnahme morgens zwischen 8.00 und 12.00 Uhr (bei Patienten innerhalb von 24 h nach Krankenhauseinweisung).

2.3 Gewinnung monocytenangereicherter PBMC

2.3.1 Separation der Zellen

Methode :

Um Monocyten – angereicherte PBMC zu isolieren, wurde die Methode der Dichtegradienten – Zentrifugation mittels OptiPrep™ gewählt. Hierbei werden die Zellen des Blutes aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte durch Zentrifugation separiert. Im menschlichen Blut bilden die Monocyten im Schnitt einen Anteil der Leukocytenpopulation von ca. 8 %. Sie haben mit 15-20 μm einen größeren Durchmesser als die Lymphocyten (6-20 μm), während ihre Dichte mit 1,063 g/ml knapp unterhalb der von Lymphocyten (1,071 g/ml) und deutlich unterhalb der Dichte der restlichen Blutzellen liegt.

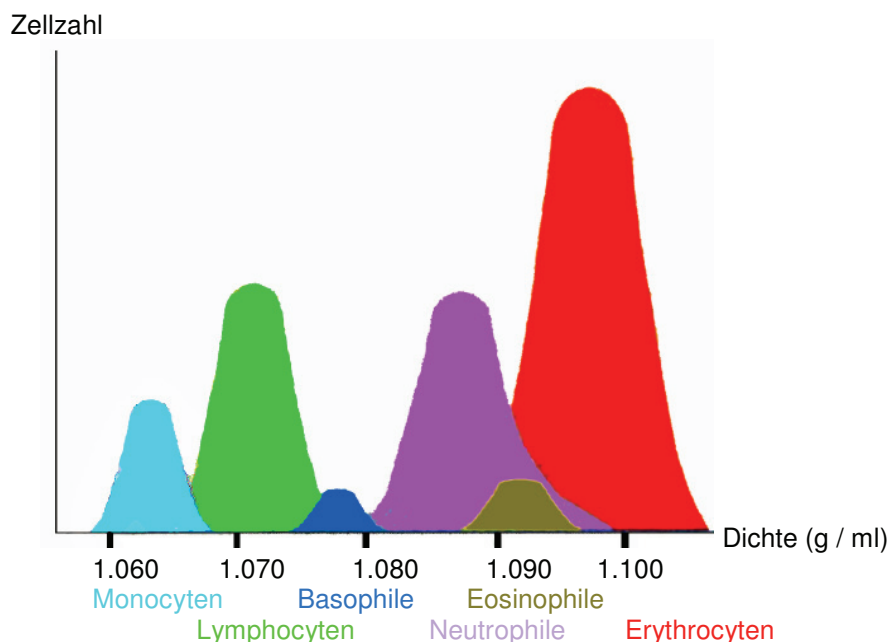


Abb. 7 Dichte und Verteilung der Zellen im menschlichen Blut

Adaptiert nach einer Abbildung im OptiPrep™ Application Sheet (Fa. Axis Shield)

Die in dieser Arbeit nach dem OptiPrep™ Application Sheet durchgeführte Separation ermöglicht nach dem von Graziani – Bowering et al. (26) entwickelten Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation die Anreicherung von Monocyten unter Verwendung von Vollblut. Die Zentrifugation unter Verwendung einer OptiPrep Verdünnungslösung (OptiPrep™ ist eine 60 % (m/v) Lösung von Iodixanol in Wasser, Dichte = 1,32 g/ml) erlaubt die Separation von ca. 60 % der im Vollblut befindlichen Monocyten.

Material :

- Kolbenhubpipette 100 – 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, D)
- Pipettenspitzenhalter ep T.I.P.S. blau (50 – 1000 µl) (Eppendorf, Hamburg, D)
- Pipettierhilfe ACCU-JET (Brand, Wertheim, D)
- Pipettenspitzen 25 ml (Greiner Bio-one, Frickenhausen, D)
- Pipettenspitzen 5 ml (Greiner Bio-one, Frickenhausen, D)
- Sterilbank MICROFLOW (Nunc, Wiesbaden, D)
- Zentrifuge Megafuge 1,0 R (Kendro-Heraeus, Stuttgart, D)
- Falconröhrchen 15 ml (Greiner Bio-one, Frickenhausen, D)
- Falconröhrchen 50 ml (Greiner Bio-one, Frickenhausen, D)
- Wasserbad
- Kühlschrank 4 °C
- Gefriertruhe – 20 °C

Reagenzien:

- RPMI 1640 (Gibco, New York USA)
- Fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin, D)
- Dulbecco´s PBS (Gibco, New York USA)
- Penicillin / Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, D)
- OptiPrep Lösung (Axis Shield, Oslo, NW)

Lösungen:*Solution B:*

Frisch hergestellt vor jeder Isolation aus Kulturmedium RPMI 1640 + 10 % (v/v) FCS inaktiviert + 1 % (v/v) Penicillin / Streptomycin. FCS wurde in 50 ml Falconröhrchen bei 56 °C 30 Minuten im Wasserbad inaktiviert, zur Aufbewahrung bei – 20 °C eingefroren, vor Gebrauch im Kühlschrank bei 4 °C aufgetaut. Ebenso wurde Penicillin / Streptomycin bei – 20 °C aufbewahrt und wie FCS inakt. im Kühlschrank aufgetaut.

Work Solution (WS):

Frisch hergestellt aus 2 Teilen Optiprep und 1 Teil Solution B (= Dichte von ca. 1.216 g / ml).

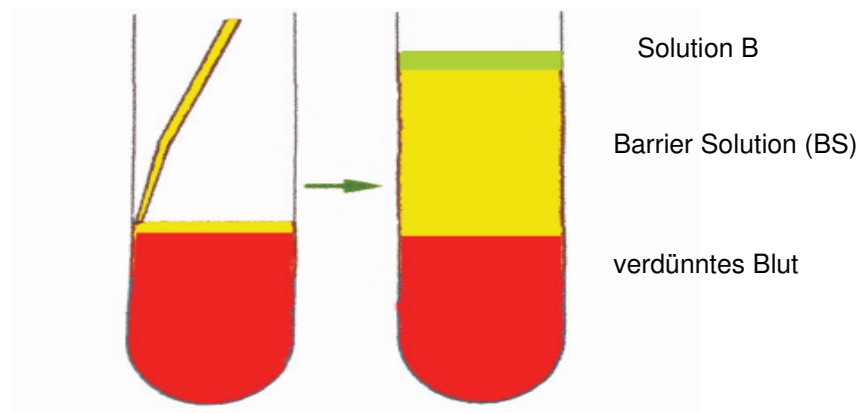
Barrier Solution (BS):

Frisch hergestellt aus 14,54 ml WS und 34 ml Solution B (= Dichte von 1.074 g / ml.)

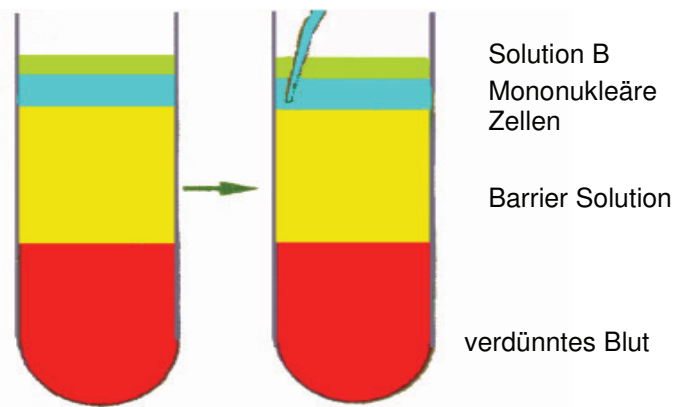
Lösungen und verwendete Materialien wurden im Kühlschrank zusammen mit dem gesammelten Blut auf eine Temperatur von 4 °C gebracht, alle Arbeitsschritte zur Gewinnung der verwendeten Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank durchgeführt.

Durchführung:

Unter sterilen Bedingungen im Laminar Flow wurden 32,5 ml Blut in einem 50 ml Falconröhrchen mit 13,77 ml WS verdünnt und durchmischt. In zwei 50 ml Falconröhrchen wurde 23 ml verdünntes Blut pipettiert und jeweils mit 23 ml BS überschichtet. Auf die Oberfläche wurde 1 ml Solution B geschichtet (**Abb. 8**). Daraufhin erfolgte eine 30 minütige Zentrifugation (700 g, 4 °C, ohne Bremse).

**Abb. 8 Überschichten des Blutes**

Adaptiert nach OptiPrep™ Application Sheet (Fa. Axis Shield).

**Abb. 9 Aufpipettieren der Monocyten**

Adaptiert nach OptiPrep™ Application Sheet (Fa. Axis Shield).

Die nach Zentrifugation unter der Oberfläche flottierenden mononukleären Zellen wurden mit der Pipette aufgezogen (**Abb.9**) und in einem neuen 50 ml Falconröhrchen gesammelt. Die Zellsuspension wurde mit PBS steril auf 40 ml aufgefüllt, 10 µl der verdünnten Zellsuspension wurden zur Zellzählung verwendet. Nach Errechnung der Zellzahl wurde ein 2 Millionen Zellen fassendes Volumen zur weiteren Verarbeitung abpipettiert.

2.3.2 Zellzählung und Einstellung der Zellzahl

Methode :

Zählen der Zellen anhand der Neubauer – Zählkammer, eine mit einem geeichten Zählnetz überzogene Glasplatte.

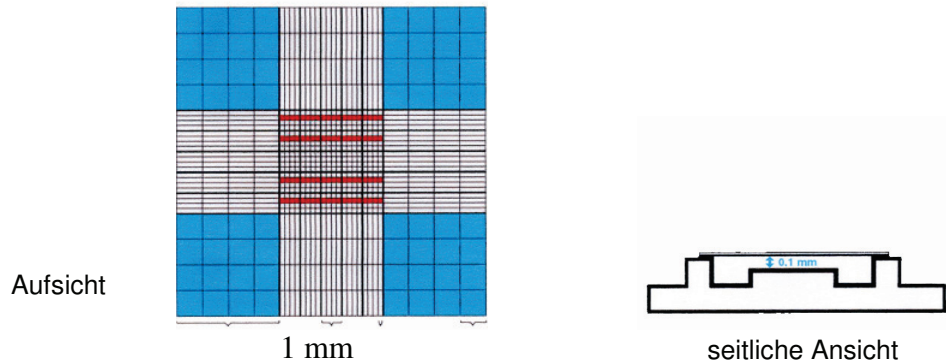


Abb. 10 Neubauer Zählkammer

Das Zählnetz setzt sich aus neun großen Quadraten zusammen. Die blau dargestellten Quadrate dienen der Leukocytenzählung. Beidseits des Zählnetzes befinden sich zwei Stege, über denen ein Deckglas platziert wird. Wenn dieses satt aufliegt besteht zwischen Zählnetz und Deckglas ein Abstand von 0.1 mm (Kammertiefe). Das erfasste Volumen entspricht bei einem großen Quadrat $0.1 \mu\text{l}$ ($1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3$, entsprechend $0.1 \mu\text{l}$) (Quelle: "Die manuelle (mikroskopische) Zellzählung". Interaktives Lernprogramm HemoSurf, Version 3.0, Universität Bern 2006)

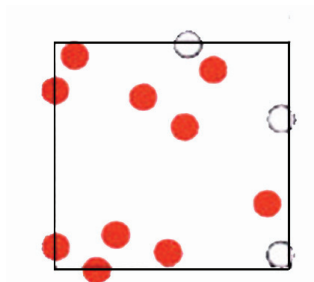


Abb. 11 Neubauer Zählkammer Zählweise

Die Leukocyten werden von links nach rechts ausgezählt, Reihe für Reihe, dabei werden die Zellen gezählt, die auf der linken oder unteren Grenzlinie liegen oder diese gerade noch berühren. Zellen die auf der oberen oder rechten Grenzlinie liegen oder diese gerade noch berühren werden nicht mitgezählt. Gefüllte Kreise (●) werden mitgezählt, nicht gefüllte (○) nicht. Aus der Summe der gezählten Zellen aller 4 Eckfelder wurde für 1 Eckfeld der Mittelwert errechnet, dieser Wert multipliziert mit 10000 ergibt die Zellzahl / ml Zellsuspension.

Material:

- Zellsuspension
- Zählkammer Neubauer (Brand, Wertheim, D)
- Kolbenhubpipette 2 – 20 µl (Eppendorf, Hamburg, D)
- Pipettenspitzenhalter ep T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, D)
gelb (20 – 200 µl)
- Lichtmikroskop Wilovert S (Helmut Hund, Wetzlar, D)

Durchführung :

Es wurden 10 µl der Zellsuspension mit einer Pipette in die Neubauer Zählkammer überführt. Die aus jeweils 16 Kleinquadraten bestehenden 4 Eckfelder wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

2.3.3 Einstellen der Zellzahl für die VersucheMaterial:

- Kolbenhubpipette 100 – 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, D)
- Pipettenspitzenhalter ep T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, D)
blau (50 – 1000 µl)
- Zentrifuge Megafuge 1,0 R (Kendro-Heraeus, Stuttgart, D)

Durchführung:

Das jeweils 2 Millionen Zellen fassende Volumen wurde aus der Zellsuspension in 15 ml Falconröhrchen abpipettiert. Mit Bremse wurde bei 1200 U / min über 10 Minuten bei 20 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und wieder, wie unten beschrieben, mit 1 ml angesetzter Nährlösung aufgefüllt, so dass sich eine Zellkonzentration von 2 Millionen Zellen / ml ergab. Die so gewonnenen Zellen wurden für die Zellkultur verwendet, ein mit Nährlösung versetzter Anteil an restlichen Zellen wurde zur Bestimmung der Viabilität und zur Bestimmung des Monozyten – Anteils mittels FACS zurückgestellt.

2.3.4 Herstellung von Fluticason – Lösungen

Da Fluticasonpropionat nur eine Löslichkeit von 0,0695 mg / Liter bei 25 °C hat (Material Safety Data Sheet, Fa. GlaxoSmithKline) wurde zunächst eine Stammlösung von Fluticason in Ethanol hergestellt, aus der dann Nährlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Fluticason bereitet wurden (**Tab. 3**), die höchste verwendete Konzentration an Fluticason in wässrigem Medium liegt bei 10^{-7} mol/l Fluticason. Fluticason wurde freundlicherweise von der Firma Glaxo Smith Kline, Brentford, UK zur Verfügung gestellt.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Methode

Die aufgereinigten mononukleären Zellen wurden in verschiedenen Kulturmedien mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dexamethason, Prednisolon und Fluticason gehalten und zusätzlich mit Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) versetzt.

2.4.2 Material

Arbeitsmittel:

- Kolbenhubpipette 100 – 1000 μ l (Eppendorf, Hamburg, D)
- Pipettenspitzenhalter ep T.I.P.S. blau (50 – 1000 μ l) (Eppendorf, Hamburg, D)
- Kolbenhubpipette 50 μ l (Eppendorf, Hamburg, D)
- Pipettenspitzenhalter ep T.I.P.S. gelb (2 – 200 μ l) (Eppendorf, Hamburg, D)
- Kolbenhubpipette 10 μ l (Eppendorf, Hamburg, D)
- Falconröhrchen 15 ml (Greiner Bio-one, Frickenhausen, D)
- Sterilbank MICROFLOW (Nunc, Wiesbaden, D)
- Zentrifuge Megafuge 1,0 R (Kendro-Heraeus, Stuttgart, D)
- PP – Röhrchen 1,3 ml (Greiner Bio-one, Frickenhausen, D)
- 16 – Well – Zellkulturplatten (Greiner Bio-one, Frickenhausen, D)
- Brutschrank CELLSTAR (Nunc, Wiesbaden, D)

Substanzen und Reagenzien

- RPMI 1640 (Gibco, New York USA)
- Fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin, D)
- Penicillin / Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, D)
- Dulbecco´s PBS (Gibco, New York, USA)
- Recombinant Human TNF- α (Strathmann Biotec AG, Hamburg, D)
(Specific Activity 2×10^{-7} units / mg)
- Fortecortin 8 mg, 2ml / Amp (Merck Pharma GmbH, Darmstadt, D)
(Dexamethasondihydrogenphosphat)
- Prednisolut 25 mg / 5 ml Amp (Jenapharm GmbH&Co. KG, Jena, D)
(Prednisolonhydrogensuccinat)
- Fluticasonpropionat (Glaxo Smith Kline, Brentford, UK)
- Ethanol 96 % (unvergällt)

Stammlösungen und Gebrauchslösungen

Zellsuspension: 2×10^6 Zellen/ ml PBS-Puffer

Kulturmedium: RPMI 1640 + 10% FCS + 1% Penicillin /Streptomycin

TNF- α :

Stammlösung 0,1 μg / μl :

50 μg TNF- α gelöst in 500 μl PBS/0,1% BSA.

Gebrauchslösung 1 ng / μl :

100 μl Stammlösung + 9,9 ml PBS/0,1 % BSA, aliquotiert, eingefroren bei -20 °C.

Dexamethason

Stammlösung Dexamethason 10^{-3} mol/l:

Verwendet wurde Dexamethasondihydrogenphosphat.

Dexamethason - Gebrauchslösungen:

Dexamethason 10^{-5} mol/l, Dexamethason 10^{-7} mol/l. Verdünnung der Stammlösung in Aqua purificata, bei -20 °C eingefroren.

Prednisolon

Stammlösung Prednisolon 10^{-3} mol/l:

Verwendet wurde Prednisolonhydrogensuccinat .

Prednisolon-Gebrauchslösungen:

Prednisolon 10^{-5} mol/l, Prednisolon 10^{-7} mol/l, Verdünnung der Stammlösung in Aqua purificata, bei - 20 °C eingefroren.

Fluticason

Stammlösung Fluticason 10^{-3} mol/l

Verwendet wurde Fluticasonpropionat, gelöst in 96 % Ethanol.

Fluticason – Gebrauchslösung:

Fluticason 10^{-4} mol/l: Verdünnung der Stammlösung in 96 % Ethanol, bei – 20 °C eingefroren

Kulturmedien für Dexamethason Versuche	Herstellung
Kulturmedium mit Dexamethason (10^{-5} Mol /l)	20 µl Gebrauchslösung Dexamethason (10^{-3} mol /l), Kulturmedium ad 2 ml
Kulturmedium mit Dexamethason (10^{-7} Mol /l)	20 µl Gebrauchslösung Dexamethason (10^{-5} mol /l), Kulturmedium ad 2 ml
Kulturmedium mit Dexamethason (10^{-9} Mol /l)	20 µl Gebrauchslösung Dexamethason (10^{-7} mol /l), Kulturmedium ad 2 ml
Kulturmedium mit TNF- α (50 µg/l)	100 µl Gebrauchslösung TNF- α (1 ng / µl), Kulturmedium ad 2 ml
Kulturmedium mit TNF- α (50 µg/l) und Dexamethason(10^{-5} Mol /l)	100 µl Gebrauchslösung TNF- α (1 ng / µl) und 20 µl Gebrauchslösung Dexamethason (10^{-3} mol /l), Kulturmedium ad 2 ml
Kulturmedium mit TNF- α (50 µg/l) und Dexamethason(10^{-7} Mol /l)	100 µl Gebrauchslösung TNF- α (1 ng / µl) und 20 µl Gebrauchslösung Dexamethason (10^{-5} mol /l), Kulturmedium ad 2 ml
Kulturmedium mit TNF- α (50 µg/l) und Dexamethason(10^{-9} Mol /l)	100 µl Gebrauchslösung TNF- α (1 ng / µl) und 20 µl Gebrauchslösung Dexamethason (10^{-7} mol /l), Kulturmedium ad 2 ml

Tabelle 1 Für Dexamethason – Zellkulturen vorbereitete Kulturmediumansätze

Kulturmedien für Prednisolon Versuche	Herstellung
Kulturmedium mit Prednisolon (10^{-5} Mol/l)	20 μ l Gebrauchslösung Prednisolon (10^{-3} mol/l), Kulturmedium ad 2 ml
Kulturmedium mit Prednisolon (10^{-7} Mol/l)	20 μ l Gebrauchslösung Prednisolon (10^{-5} mol/l), Kulturmedium ad 2 ml
Kulturmedium mit Prednisolon (10^{-9} Mol/l)	20 μ l Gebrauchslösung Prednisolon (10^{-7} mol/l), Kulturmedium ad 2 ml
Kulturmedium mit TNF- α (50 μ g/l)	100 μ l Gebrauchslösung TNF- α (1 ng / μ l), Kulturmedium ad 2 ml
Kulturmedium mit TNF- α (50 μ g/l) und Prednisolon (10^{-5} Mol/l)	100 μ l Gebrauchslösung TNF- α (1 ng / μ l) und 20 μ l Gebrauchslösung Prednisolon (10^{-3} mol/l), Kulturmedium ad 2 ml
Kulturmedium mit TNF- α (50 μ g/l) und Prednisolon (10^{-7} Mol/l)	100 μ l Gebrauchslösung TNF- α (1 ng / μ l) und 20 μ l Gebrauchslösung Prednisolon (10^{-5} mol/l), Kulturmedium ad 2 ml
Kulturmedium mit TNF- α (50 μ g/l) und Prednisolon (10^{-9} Mol/l)	100 μ l Gebrauchslösung TNF- α (1 ng / μ l) und 20 μ l Gebrauchslösung Prednisolon (10^{-7} mol/l), Kulturmedium ad 2 ml

Tabelle 2 Für Prednisolon-Zellkulturen vorbereitete Kulturmediumansätze

Kulturmedien für Fluticason Versuche	Herstellung
Kulturmedium mit Ethanol 0,01 %	20 μ l Ethanol 96 %, Kulturmedium ad 200 ml :
Kulturmedium mit Fluticason (10^{-7} Mol/l), Ethanol 0,01 %	20 μ l Stammlösung Fluticason (10^{-3} mol/l Ethanol), Kulturmedium ad 200 ml :
Kulturmedium mit Fluticason (10^{-8} Mol/l), Ethanol 0,01 %	20 μ l Gebrauchslösung Fluticason (10^{-4} mol/l Ethanol), Kulturmedium ad 200 ml:
Kulturmedium mit TNF- α (50 μ g/l), Ethanol 0,01 %	100 μ l Gebrauchslösung TNF- α (1 ng / μ l), Kulturmedium mit Ethanol 0,01 % ad 2ml
Kulturmedium mit TNF- α (50 μ g/l) und Fluticason (10^{-7} Mol/l), Ethanol 0,01 %	100 μ l Gebrauchslösung TNF- α (1 ng / μ l), Kulturmedium mit Fluticason (10^{-7} Mol/l), Ethanol 0,01 % ad 2 ml
Kulturmedium mit TNF- α (50 μ g/l) und Fluticason (10^{-8} Mol/l), Ethanol 0,01 %	100 μ l Gebrauchslösung TNF- α (1 ng / μ l), Kulturmedium mit Fluticason (10^{-8} Mol/l), Ethanol 0,01 % ad 2 ml

Tabelle 3 Für Fluticason – Zellkulturen vorbereitete Kulturmediumansätze

2.4.3 Durchführung

Wie unter 2.3.2 beschrieben wurden die nach Zellzählung 2×10^6 Zellen fassenden Volumina abzentrifugiert, die Überstände verworfen und die Pellets in unterschiedlichen Kulturmedien ad 1 ml gelöst und auf die Kulturplatten gegeben, so dass sich die in Tabelle 4 dargestellten Ansätze ergaben.

Zum Zwecke der Übersichtlichkeit werden in dieser Arbeit die Abkürzungen und Farben für die verschiedenen Ansätze der Glukokortikosteroide beibehalten.

Die Zellkulturen wurden 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C in einer 5%-igen CO₂ – Atmosphäre kultiviert. Aus jedem Well wurden zweimal 350 µl Überstand entnommen und in beschrifteten 1,3 ml PP – Röhrchen bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei – 80 °C tiefgefroren. Die Zellen am Boden der Wells wurden zur Messung mittels Flow Cytometrie verwendet.

Dexamethason	im Well der Kulturplatte enthaltene Konzentrationen an TNF- α und Dexamethason
K	
K D5	10^{-5} mol / l Dexamethason
K D7	10^{-7} mol / l Dexamethason
K D9	10^{-9} mol / l Dexamethason
TNF	50 μ g / l TNF- α
TNF D5	10^{-5} mol / l Dexamethason und 50 μ g / l TNF- α
TNF D7	10^{-7} mol / l Dexamethason und 50 μ g / l TNF- α
TNF D9	10^{-9} mol / l Dexamethason und 50 μ g / l TNF- α
Prednisolon	im Well der Kulturplatte enthaltene Konzentrationen an TNF- α und Prednisolon
K	
K P5	10^{-5} mol / l Prednisolon
K P7	10^{-7} mol / l Prednisolon
K P9	10^{-9} mol / l Prednisolon
TNF	50 μ g / l TNF- α
TNF P5	10^{-5} mol / l Prednisolon und 50 μ g / l TNF- α
TNF P7	10^{-7} mol / l Prednisolon und 50 μ g / l TNF- α
TNF P9	10^{-9} mol / l Prednisolon und 50 μ g / l TNF- α
Fluticason	im Well der Kulturplatte enthaltene Konzentrationen an TNF- α und Fluticason
K	
K Etoh	Ethanol 0,01 %
K F7	10^{-7} mol / l Fluticason und 50 μ g / l TNF- α , Ethanol 0,01 %
K F8	10^{-8} mol / l Fluticason und 50 μ g / l TNF- α , Ethanol 0,01 %
TNF	50 μ g / l TNF- α , Ethanol 0,01 %
TNF F7	10^{-7} mol / l Fluticason und 50 μ g / l TNF- α , Ethanol 0,01 %
TNF F8	10^{-8} mol / l Fluticason und 50 μ g / l TNF- α , Ethanol 0,01 %

Tabelle 4 Darstellung der Versuchsansätze

2.5 Durchflusszytometrie

2.5.1 Methode

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Verfahren zur Analyse von Zellen in Suspension auf der Grundlage von Streulicht – und Fluoreszenzeigenschaften. Sie ermöglicht die simultane Messung der relativen Zellgröße, der Granularität sowie drei verschiedener Fluoreszenzfarben an einzelnen Zellen. Die Zellsuspension wird über ein Schlauchsystem mittels Überdruck in den Messbereich geführt, wo die Zellen hintereinander gereiht (hydrodynamische Focussierung) einen monochromatischen Laserstrahl durchlaufen. Der Laserstrahl wird durch die Zellen abgeschwächt und gestreut. Über Photodetektoren kann die Ablenkung des Strahles senkrecht zur Bewegungsachse (Seitwärtsstreuung, sideward scatter = SSC) gemessen werden, wodurch sich die Granularität der Zellen ermitteln lässt. Die gemessene Absorption des Lichtes entlang des Strahlenganges (Vorwärtsstreuung, forward scatter = FSC) gilt als ein Maß für die Größe der Zellen. Weiter besteht die Möglichkeit, Antigene auf oder in den Zellen durch Fluoreszenzfarbstoff – gekoppelte Antikörper zu detektieren. Drei der hierbei am häufigsten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind Phytoerythrin (PE), Cytochrom-5 (Cy5) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Auf Anregungen durch Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert Cy5 tiefrotes Licht der Wellenlänge 650 nm, PE oranges Licht (585 nm) und FITC grünes Licht (530 nm). Die Intensitäten der Wellenlängen werden detektiert und dadurch die Menge an zelladhärenten Antikörpern gemessen, welche wiederum proportional der Menge an Oberflächenantigenen der Zelle ist. Eine Reihe weiterer Fluoreszenzfarbstoffe steht zur Detektion zur Verfügung, so wird in dieser Arbeit zur Viabilitätsbestimmung 7 – Aminoactinomycin (7-AAD) verwendet. Der verwendete Durchflusszytometer Facs (Facs = Fluorescence – Activated – Cell Sorter) von Becton Dickinson verwendet einen Argon Laser mit 488 nm Wellenlänge. Die durch das Laserlicht angeregten Farbstoffe emittieren Licht größerer Wellenlänge, welches über 3 Photo – multiplier – tubes (PMT) FL 1 – 3 gemessen werden kann (**Abb.12**). Die gewonnenen Daten wurden mittels CellQuest v.3.3 (Becton & Dickinson, Heidelberg, D) ausgewertet.

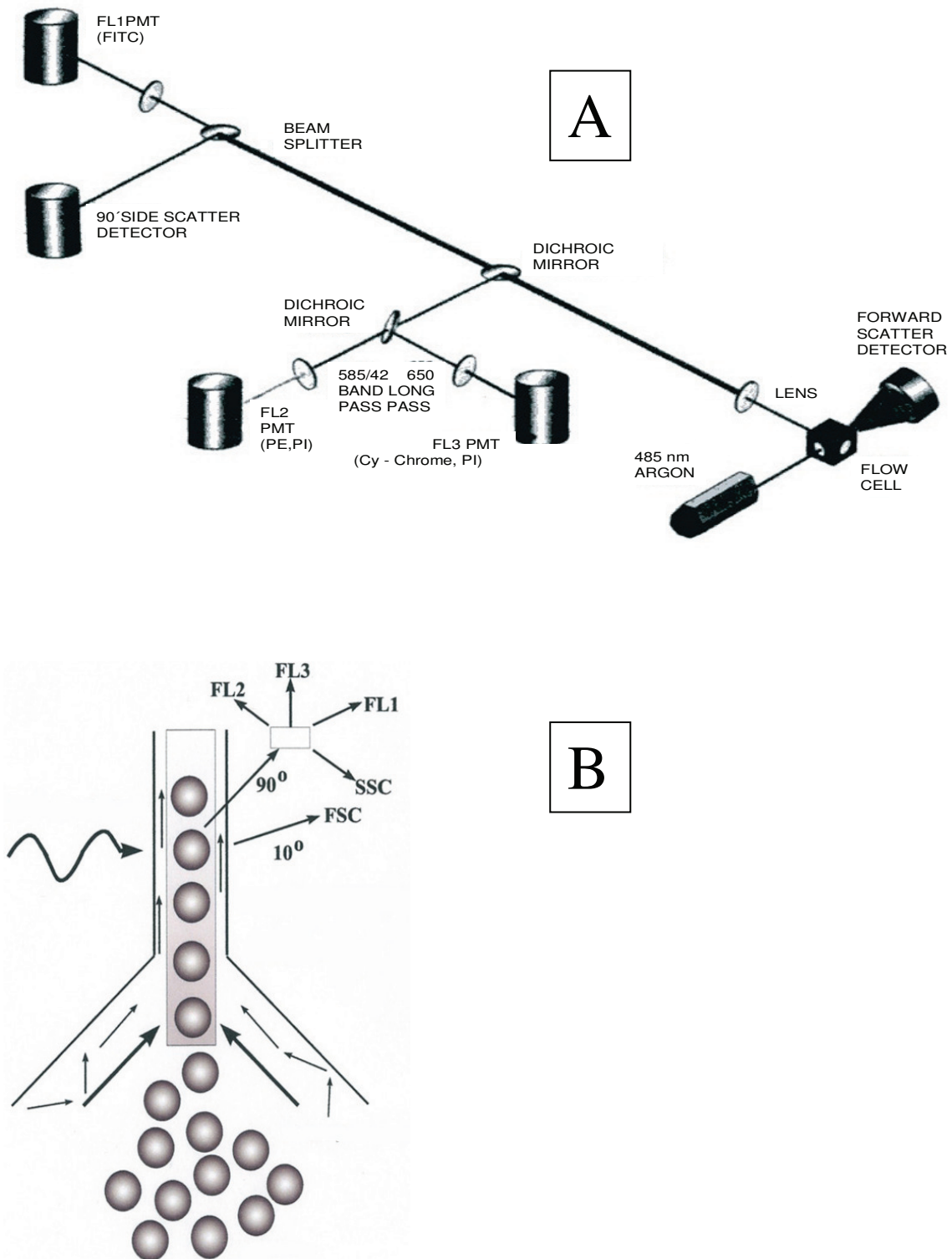


Abb. 12 Durchflusszytometrie (FACS)

A: Schematischer Aufbau eines Facscan mit einem einzelnen Argon – Laser und 5 Detektionsparametern. Jeweils ein Detektor ist für Forward (Zellgröße) und Sideward (Zellgranularität) Scatter. (Quelle: http://www.pharmingen.com/protocols/flow-cytometry/fluorochrome_absorb.shtml). B: Die Zellen durchlaufen einzeln die sog. „Flow Cell“. Über die drei Photomultiplier und die entsprechenden Filter wird die Fluoreszenzintensität (FL 1 – 3) jeder Zelle bestimmt. (Quelle: http://www2.vetmed.uni-muenchen.de/micro//Kurs4_04.pdf).

Zur Darbietung der Messergebnisse können einzelne Zellen als Punkte in einem Koordinatensystem (Dotplot) abgebildet werden, wobei die Achsen des Diagramms durch zwei der gemessenen Parameter gebildet werden. Werden Größe und Granularität (FSC vs.SSC) gegeneinander präsentiert, ergeben sich verschiedene Populationen darstellende Punktwolken, wobei sich die Population der Monocyten (da die Monocyten etwas reicher an Granula und auch größer als die Lymphocyten sind) rechts oberhalb der Lymphocyten - Population befindet. Die Populationen können durch sogenannte Gates eingefasst werden und weiter anhand vorhandener Oberflächenantigene charakterisiert werden.

Ziel des Einsatzes der Durchflusszytometrie bei dieser Arbeit:

- Bestimmung des Anteils an Monocyten (CD14⁺ Zellen), der wichtigsten BDNF – Quelle unter mononukleären Zellen (8)
- Bestimmung der toten (7-AAD positiven) Zellen vor und nach Zellkultur, zur besseren Beurteilung der BDNF – Konzentrationen im Zellkulturüberstand

Es wurde daher zu 2 Zeitpunkten gemessen:

- Tag 0: Direkt nach der Zellaufreinigung, zur Ermittlung des Anteils an CD14⁺ und 7-AAD positiven Zellen vor Einbringung der Zellen in den Brutschrank.
- Tag 1: Der Anteil an CD14⁺ und 7-AAD positiven Zellen 24 h nach Einbringung der Zellkulturen in den Brutschrank.

2.5.2 Material

Arbeitsmittel:

- Kolbenhubpipette 100 – 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, D)
- Pipettenspitzenhalter ep T.I.P.S. blau (50 – 1000 µl) (Eppendorf, Hamburg, D)
- Kolbenhubpipette 50 µl (Eppendorf, Hamburg, D)
- Pipettenspitzenhalter ep T.I.P.S.

-
- gelb (2 – 200 µl) (Eppendorf, Hamburg, D)
 - Kolbenhubpipette 10 µl (Eppendorf, Hamburg, D)
 - Röhrchen FACS 5 ml (Becton&Dickinson, Heidelberg, D)
 - Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, D)
weiß und braun
 - Zentrifuge MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, D)
 - Durchflusszytometer FACScan (Becton&Dickinson, Heidelberg, D)
 - FACS – Software CellQuest v 3.3 (Becton&Dickinson, Heidelberg, D)

Substanzen und Reagenzien:

- Antikörper CD14 (Becton&Dickinson, Heidelberg, D)
(R – Phycoerythrin (R-PE) conjugated mouse anti-human monoclonal Antibody)
- Antikörper Iso Pe (Becton&Dickinson, Heidelberg, D)
(Mouse IgG2a R – Phycoerythrin (R-PE) conjugated Mouse IgG2a, K –
Immunoglobulin Isotype control Monoclonal Antibody)
- 7 AAD Viability Dye (Beckman Coulter, Fullerton, CA)
- Dulbecco´s PBS (Gibco, New York, USA)
- Fetales Kälberserum (FCS) (Sigma, Deisenhofen, D)
- FACS Spüllösung FACS Rinse (Becton&Dickinson, Heidelberg, D)
- FACS Reinigungslösung FACS Clean (Becton&Dickinson, Heidelberg, D)

Stammlösungen und Gebrauchslösungen

- FACS Puffer: PBS + 2 % FCS Inaktiv
(Inaktivieren von FCS: FCS im Wasserbad bei 56 °C, 30 min)
- NaN₃ – Stammlösung (10%):
(Herstellung: 1g NaN₃ – Pulver aufgelöst in 10 ml PBS)
- CD14 PE, in einer Verdünnung von 1:2
(Herstellung: CD14 PE : 500 µl + Facs Puffer : 490 µl
+ Natrium Acid 10 % : 10 µl)
- Iso PE, in einer Verdünnung von 1:2
(Herstellung: Iso PE : 500 µl + Facs Puffer : 490 µl
+ Natrium Acid 10 % :10 µl)

2.5.3 Durchführung

Inkubation mit FACS – Antikörpern

Von jedem Versuchsansatz wurden 2 Microtubes zur Messung vorbereitet:

Microtube 1: = 50 µl Zellsuspension (ca. 100000 Zellen)

mit 10 µl Iso PE 1:2 und 10 µl FACS Puffer als Kontrolle

Microtube 2: = 50 µl Zellsuspension (ca. 100000 Zellen)

mit 10 µl CD14 PE 1:2 und 10 µl 7-AAD

zur Bestimmung der CD14⁺ und der toten Zellen.

Nach kurzem Anzentrifugieren wurde 30 min im Dunkeln bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert, vor der Messung 2 mal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, nochmals mit 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt.

Messung

Neben FSC und SSC wurden Kanal FL 2 zur Bestimmung PE – konjugierter Antikörper und Kanal FL 3 zur Bestimmung von 7-AAD verwendet. Es wurden jeweils 10000 Meß – Ereignisse ausgezählt. Das obere Limit der Hintergrundfluoreszenz wurde so gesetzt, dass nicht mehr als 1 % des verwendeten Isotyps oder Autofluoreszenz – Kontrollen im Geltungsbereich erschienen.

2.5.4 Auswertung der Durchflusszytometrie

Vor Anlegen der Zellkultur und nach 24 Stunden Zellkultur erfolgte die Auswertung der separierten Zellen am Durchflusszytometer zur Erfassung des Anteils an CD14⁺ Zellen (Monocyten) und 7-AAD positiven Zellen (toten Zellen). 7 – Amino-Actinomycin D (7-AAD) interkaliert zwischen Cytosin und Guanin und verändert dabei seine Fluoreszenzeigenschaften. Mit 7-AAD wird ausschließlich die DNA von toten Zellen gefärbt, da 7-AAD nur in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen kann (120, 130).

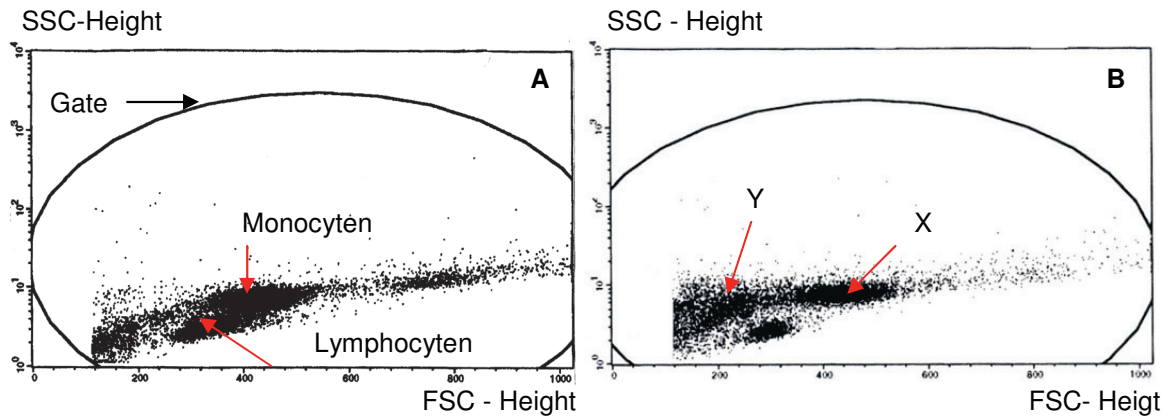


Abb. 13 Punktwolkendarstellung der PBMC

A: Nach Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation: Morphologisch intakte Monocyten werden aufgrund ihrer Größe und Granularität oberhalb der Lymphocyten dargestellt. **B:** Nach 24 Stunden Zellkultur: Aus einer ursprünglich homogenen Monocytenpopulation entwickeln sich 2 Populationen von Monocyten (57): Eine abnehmende Zahl der Zellen unveränderter Granularität und Größe mit einem hohen Anteil CD14 – exprimierender Zellen (X) und eine zunehmende Zahl kleinerer Zellen mit Zeichen des Zelluntergangs und wenigen CD14 – exprimierenden Zellen (Y).

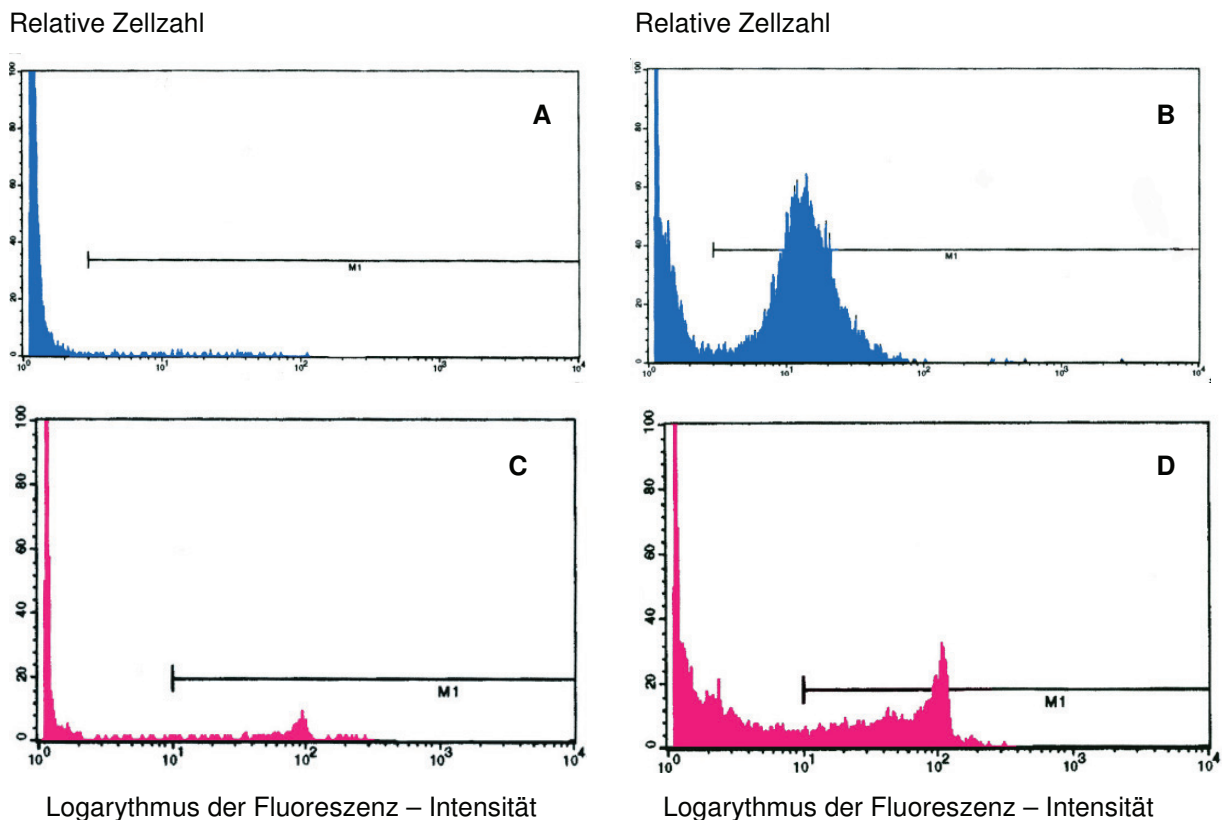


Abb. 14 Bestimmung der Monocyten (CD14⁺) und toten Zellen (7-AAD-positiv)

A,C: Hintergrundfluoreszenz für CD14 (blau) und 7-AAD (rot). Um unspezifische Bindungsstellen zu detektieren, wurde mit den jeweiligen Isotyp-Antikörpern inkubiert und ein Geltungsbereich (M1) festgelegt, in dem sich unter 1 % der Messereignisse befinden. **B:** Im Geltungsbereich liegen die Messereignisse der CD14⁺ Zellen. **D:** Im Geltungsbereich liegen die Messereignisse der 7-AAD positiven Zellen. Alle Versuche wurden vor Anlegen der Zellkultur und nach 24 Stunden Zellkultur durchgeführt.

Bestimmt wurde die Anzahl nicht lebensfähiger Zellen nach der Dichtegradientenzentrifugation (Tag 0) und nach der Zellkultur (Tag 1). Der Anteil toter Zellen am Tag 0 lag unter 5 %. Die Bestimmung der nicht lebensfähigen Zellen am Tag 1 diente der Ermittlung eines Korrekturfaktors. Um die Produktion von BDNF der Proben mit der Kontrolle und untereinander beurteilen zu können, mussten die nicht mehr lebensfähigen (nicht an der Produktion beteiligten Zellen) berücksichtigt werden. Es wurde die Differenz an lebenden Zellen in der Kontrolle und der Proben ermittelt und daraus ein Korrekturfaktor ermittelt, anhand dessen die BDNF-Werte angepasst wurden, wobei die lebenden Zellen der Kontrolle = 100 % gesetzt wurden (**Tab. 5**).

	BDNF-Wert gemessen	% lebende Zellen	auf K = 100 % bezogen	Umrechnungs - faktor	Korrigierter BDNF-Wert
Kontrolle	45,02	72,64	100%	1	45,02
Fluticason 10 ⁻⁷ mol.	10,67	62,07	85,45%	1,17	12,49

Tabelle 5 Beispielhafte Darstellung der Korrekturberechnung toter Zellen

2.6 ELISA

2.6.1 Methode

Mittels ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) können geringe Konzentrationen eines Proteins aus einem Stoffgemisch quantitativ (oder auch qualitativ) erfasst werden. Beim hier verwendeten direkten Sandwich – ELISA wird an einen Träger aus Kunststoff (ELISA Microtiterplatte, Festphase) ein monoklonaler Antikörper (Capture Antibody), auch primärer Antikörper (Ab1, **Abb. 15**) genannt, gebunden. Damit das Antigen nicht auch an den Träger bindet, wird eine Proteinlösung (BSA) auf die Platte gegeben. Diese verhindert eine Bindung von Antigen an dieselbe Oberfläche (Blockade). Die Probe mit dem zu erfassenden Antigen wird zugegeben, wobei dieses fest an die spezifische Bindungsstelle des Capture Antibody gebunden wird. Ein zweiter, polyclonaler Antikörper (sekundärer Antikörper, Ab2, Detection Antibody), wird aufgetragen, welcher wiederum mit einer Bindungsstelle das Substrat bindet. Mit seiner zweiten Bindungsstelle bindet dieser die ebenfalls zugegebene Streptavidin-Peroxidase, ein Enzym, das

Reduktionsäquivalente von Tetramethylbenzidin auf Wasserstoffperoxid überträgt. Hierbei wird Tetramethylbenzidin in seine farbige, oxidierte Form mit alternierenden Doppelbindungen umgewandelt. Die Farbentwicklung wird mittels Zugabe von Schwefelsäure abgestoppt. Das von dem Farbstoff absorbierte Licht (oxidiertes Tetramethylbenzidin: Absorptionsmaximum bei Wellenlänge 450 nm) kann am Spektralphotometer gemessen werden und ist proportional der gebundenen Menge des Proteins. Durch die mitgeführte Standardreihe kann die Antigenkonzentration aus der Absorption errechnet werden.

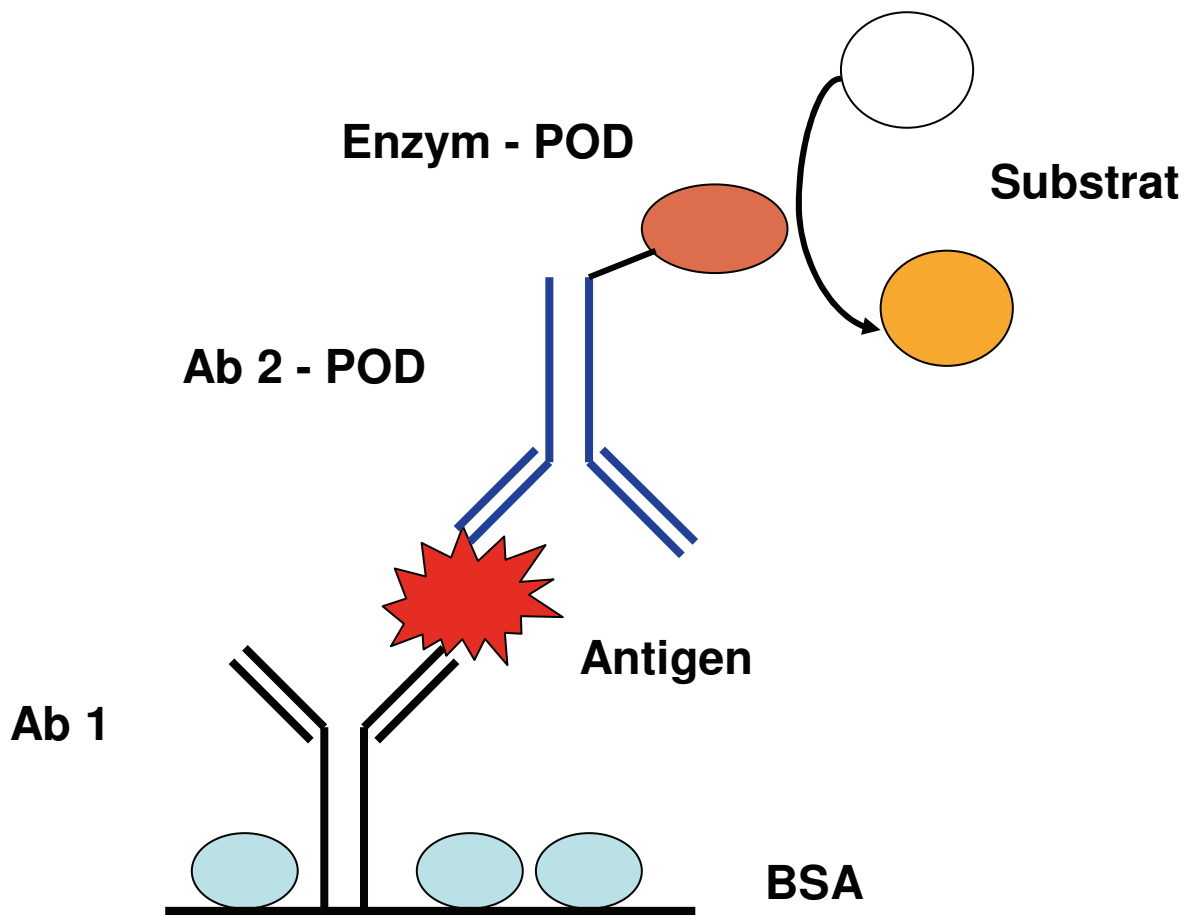


Abb. 15 Das ELISA-Prinzip

2.6.2 Material

Arbeitsmittel:

- Pipettierhilfe ACCU-JET (Brand, Wertheim, D)
- Pipettenspitzen 25 ml (Greiner Bio-one, Frickenhausen, D)
- Pipettenspitzen 5 ml (Greiner Bio-one, Frickenhausen, D)
- Pipettenspitzenhalter ep T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, D)
blau (50 – 1000 µl)
- Pipettenspitzenhalter ep T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, D)
gelb (20 – 200 µl)
- Kolbenhubpipette 100 – 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, D)
- Kolbenhubpipette 20 – 200 µl (Eppendorf, Hamburg, D)
- Reagent Reservoir Costar 50 ml (Corning Gmbh Life Sciences,
Wiesbaden, D)
- Transferpette 8 (10 – 50 µl,) (Eppendorf, Hamburg, D)
- Elisa – Platte (96 Well, Microlon) (Greiner Bio-one, Frickenhausen, D)
- Parafilm
- PP-Röhrchen 1,3 ml (Greiner Bio-one, Frickenhausen, D)
- Schüttler (Stovall Life Sc.Inc., Greenboro,USA)
- Photometer Anthos HT III (Anthos Mikrosysteme, Krefeld, D)

Substanzen und Reagenzien

- ELISA- Kit Duoset human BDNF (R&D Systems, Wiesbaden, D)
 - Capture Antibody: 360 µg /ml PBS
 - Detection Antibody: 4500 ng / ml Reagent Diluent
 - Standard human BDNF: 230 ng / ml in Reagent Diluent
 - Streptavidin HRP (Streptavidin conjugated to horesradish – peroxidase)
- Entwickler (R&D Systems, Wiesbaden, D)
 - Color Reagent A : H₂O₂ und Color Reagent B: Tetramethylbenzidin
- Tween 20 (Merck-Schuchardt, Hohenbr., D)
- Bovines serum – Albumin (BSA) (Sigma, Deisenhofen, D)
- H₂SO₄, 2 – normal (Sigma, Deisenhofen, D)

Stammlösungen und Gebrauchslösungen

- Capture Antibody Gebrauchslösung: 4 µg / ml PBS
- Detection Antibody Gebrauchslösung: 25 ng /ml Reagent Diluent (1:180)
- BDNF Standard Gebrauchslösung: 1 ng / ml Reagent Diluent
- Streptavidin: 1: 200 verdünnt in Reagent Diluent
- Stopp – Lösung: 2n H₂SO₄
- PBS-Puffer: 80 g NaCl, 2,051 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ und 2,04 g KH₂PO₄ werden in 1000 ml Aqua dest. aufgelöst, der pH-Wert auf 7,3 eingestellt, zum Gebrauch 1:10 verdünnt.
- Waschpuffer: PBS Puffer mit 0,05 % Tween 20.
- Blockpuffer: 1 % BSA, 5 % Saccharose, 0,05 % NaN₃ in PBS
- Reagent Diluent: 1 % BSA in PBS
- Substrat Lösung: 1:1 Mischung aus Color Reagent A (H₂O₂) und Color-Reagent B (Tetramethylbenzidin)

2.6.3 Durchführung

Capture – Antibody Gebrauchslösung wurde mittels Transferpipette auf die ELISA – Platte aufgetragen (50 µl/ Well). Die Platte wurde mit Parafilm abgedeckt, über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen und am nächsten Tag zweimal mit PBS Puffer gewaschen. Daraufhin erfolgte die Auftragung von 100 µl Blockpuffer je Well. Es wurde 1 Stunde im Dunkeln stehen gelassen, daraufhin dreimal mit PBS-Puffer ausgewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Standard-Verdünnungsreihe aufgetragen (1000 – 2 pg / ml). Auf einer Platte wurden Standardverdünnungen und Proben jeweils zur Doppelbestimmung aufgetragen (50 µl / Well). Die Platte wurde mit Parafilm verschlossen, 2 Stunden vorsichtig geschüttelt, und dann fünfmal mit PBS-Puffer ausgewaschen. Daraufhin wurden 50 µl / Well der Detection Antibody – Gebrauchslösung (25 ng / ml) aufgetragen, Parafilm aufgezo- gen und die Platte über Nacht im Dunkeln stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde, nach zehnmalem Auswaschen mit PBS – Puffer, Steptavidin – Gebrauchslösung (1:200; 50 µl / Well) aufgetragen und 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Platte zehnmal mit PBS – Puffer gewaschen. Im letzten Arbeitsschritt erfolgte nun die Auftragung von 50 µl / Well frisch gemischtem (1:1) Color Reagent A und B. Nach 20 minütiger lichtgeschützter Entwicklung erfolgte die Zugabe der Stop –

Solution (50 μ l 2N Schwefelsäure / Well). Unmittelbar im Anschluß wurden die optischen Dichten der Proben mit Hilfe des Anthos HT3 – Readers bei 450 nm Wellenlänge und einem Referenzfilter bei 595 nm vermessen. Die Umrechnung der optischen Dichten in entsprechende Konzentrationen erfolgte computergestützt auf Basis der Standard–Verdünnungsreihen. Das Detektionslimit lag bei 4 pg / ml BDNF.

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Analyseprogramm SPSS (Statistical package for social sciences, Chicago, IL, USA). Die Parameter waren typischerweise nicht normalverteilt. Zum Vergleich der unabhängigen Stichproben (Patienten versus Kontrollen) wurde daher der Mann-Whitney-U-Test gewählt. Für die Vergleiche der gesunden Probanden bzw. der Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten wurde der Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben verwendet. Die Korrelationen wurden mit Hilfe des Spearman-Korrelationskoeffizienten berechnet. p – Werte < 0,05 wurden als signifikant gewertet. Die Ergebnisse wurden mittels Boxplot dargestellt (**Abb. 16**).

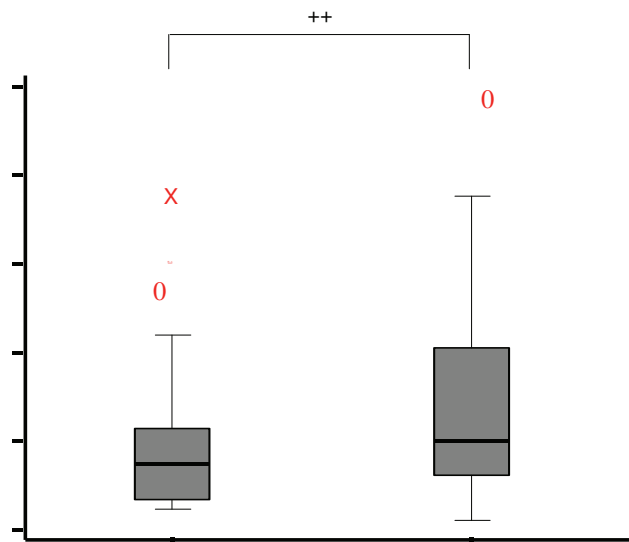


Abb. 16 Schema eines Boxplots

Dargestellt sind der Median (schwarzer Balken innerhalb der Box), die 25. und 75. Perzentile (unteres und oberes Ende der Box, somit 50 % der Werte) und alle Fälle, die weniger als 1,5 Interquartilsabstände vom oberen Quartil nach oben oder vom unteren Quartil nach unten entfernt liegen (vertikale Linien). X = mehr als 3 Kastenlängen vom 25. Perzentil entfernt liegende Werte (Extremwerte), 0 = mehr als 1,5 Kastenlängen vom 25. Perzentil entfernt liegende Werte (Ausreißer). Das Signifikanzniveau ist über der jeweiligen Grafik angegeben (++= hoch signifikant mit $p < 0,01$, += signifikant mit $p < 0,05$, ohne Darstellung = nicht signifikant).

3. Ergebnisse

3.1 Probanden – und Patientencharakteristika

Das mittlere Alter der 30 Kontrollprobanden lag bei 28,5 Jahren (Standard – abweichung: 7,4 Jahre), es wurden 19 weibliche und 11 männliche Probanden untersucht (**Tab. 6**). 16 männliche und 7 weibliche Patienten erfüllten die Einschlusskriterien und wurden in die Studie eingeschlossen (**Tab. 7**). Das mittlere Alter der Patienten lag bei 61,4 Jahren (Standardabweichung: 19,0 Jahre).

Proband	Geschlecht	Alter
1	w	25
2	w	25
3	m	27
4	m	36
5	m	24
6	w	23
7	w	24
8	m	34
9	w	26
10	w	26
11	w	34
12	m	15
13	w	37
14	w	32
15	m	33

Proband	Geschlecht	Alter
16	m	27
17	m	46
18	w	33
19	w	25
20	w	35
21	m	27
22	w	50
23	w	22
24	m	28
25	w	22
26	m	26
27	w	22
28	w	23
29	w	22
30	w	25

Tab. 6 Probandencharakteristika

Gezeigt werden das Alter zum Zeitpunkt der Blutentnahme und das Geschlecht der in die Studie eingeschlossenen Kontrollprobanden. Proband 9 litt an M. Meulengracht, Proband 23 an einem Jodmangelstruma und Proband 29 an einem M. Raynaud. Die anderen Probanden berichteten über keine Grunderkrankungen.

Patient	Alter	Geschlecht	Diagnose	relevante Begleiterkrankungen	CRP (mg/l)	Leukocyten ($\times 10^9/l$)
1	53	m	Pankreatitis	Alkoholabusus	368	16,8
2	78	m	Pneumonie	DM II, Apoplex Herzinsuffizienz, Prostatakarzinom,	262	11,9
3	60	m	Pneumonie		238	10,5
4	51	w	Pneumonie	Adenokarzinom des Magens, DM II	168	13,5
5	62	m	Pneumonie	Depression	159	17,6
6	61	m	Pneumonie	HT, Alkoholabusus, Hyperuricämie	463	10,8
7	75	m	Pneumonie		315	10,8
8	77	w	Pneumonie	DM II, Niereninsuffizienz, HT, Apoplex	273	14,3
9	78	m	Pneumonie	DM II, Herzrhythmusstörungen	113	18
10	75	m	Pneumonie	DM II	154	18,3
11	79	m	Pneumonie	HT, Herzinsuffizienz, AA	116	11,5
12	56	w	Erysipel	Tiefe Beinvenenthrombose, DM II, Herzrhythmusstörung	148	16,6
13	80	m	HWI	DM II, Herzinsuffizienz	296	10,5
14	32	m	Gastroenteritis	Dilatative Kardiomyopathie	237	12,8
15	78	m	Pneumonie	Herzrhythmusstörungen	193	19,7
16	23	m	Cholangitis		266	11
17	83	w	Cholangitis	HT	177	14,4
18	47	m	Pankreatitis	HT, AA	138	14,9
19	32	m	Pneumonie		484	10,6
20	73	m	Pneumonie	KHK, AA, DM II	163	17
21	23	w	Pneumonie		194	16,4
22	72	w	Pneumonie	Z.n. Beckenvenenthrombose, HT	102	10,8
23	64	w	Pneumonie	Depressionen	217	10,7

Tab. 7 Patientencharakteristika

Gezeigt werden das Alter, das Geschlecht, die Hauptdiagnose, Nebendiagnosen, der CRP – Wert und die Leukocytenzahlen. Abkürzungen: AA Absolute Arrhythmie, DM II Diabetes mellitus Typ 2, HT Arterieller Hypertonus, HWI Harnwegsinfekt, KHK Koronare Herzkrankheit.

3.2 Zellcharakteristika in den Zellkulturen

3.2.1 Anteil an CD14⁺ Zellen (Monocyten)

Bei den Kontrollprobanden fand sich in den aufgereinigten mononukleären Zellen ein mittlerer Gehalt von 40,9 % (Standardabweichung: 11,9 %) CD14⁺ Zellen, bei den Patienten ein mittlerer Gehalt von 42,5 % (Standardabweichung: 13,5 %) CD14⁺ Zellen.

3.2.2 Zell – Überlebensrate

Der Anteil an toten Zellen nach Aufreinigung zu Beginn der Zellkultur lag bei allen Proben der Probanden und Patienten unter 5 % (0,21 % – 4,82 %). Der Anteil an toten Zellen nach 24 Stunden Zellkultur ist in den Tabellen 8 (Probanden) und 9 (Patienten) dargestellt.

Zellkultur	Kontrollen n = 30	TNF- α n = 30	K F7 n = 14	K F8 n = 14	TNF F7 n = 14	TNF F 8 n = 14
Mittelwert (%)	22,4	16,5	35,7 *	32,7	12,2 *	14,2 *
Standardabweichung	10,1	10,5	10,0	12,5	3,8	5,9

Zellkultur	K P5 n = 14	K P7 n = 14	K P9 n = 14	TNF P5 n = 14	TNF P7 n = 14	TNF P9 n = 14
Mittelwert (%)	29,2 *	21,4	18,6	16,3	21,3	24
Standardabweichung	10,6	9,2	7,7	4,6	8,1	9,8

Zellkultur	K D5 n = 8	K D7 n = 8	K D9 n = 8	TNF D5 n = 8	TNF D7 n = 8	TNF D9 n = 8
Mittelwert (%)	27,8 *	18,3	19,1	19,2	23,7	22,3
Standardabweichung	8,1	6,2	8,6	4,0	9,0	10,3

Tabelle 8 Anteil der toten Zellen der Probandengruppe

Anteil toter Zellen in % aller Zellen nach 24 Stunden Zellkultur in den untersuchten Medien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zu jeweiligen Kontrollen sind mit * gekennzeichnet. (K: Kontrolle, TNF: mit TNF- α stimuliert. D5, D7, D9: Dexamethason der Konzentrationen 10^{-5} Mol/l, 10^{-7} Mol/l bzw. 10^{-9} Mol/l Kulturmedium, P5, P7, P9: Prednisolon der Konzentrationen 10^{-5} Mol/l, 10^{-7} Mol/l bzw. 10^{-9} Mol/l Kulturmedium, F7, F8: Fluticason der Konzentrationen 10^{-7} Mol/l bzw. 10^{-8} Mol/l Kulturmedium).

Zellkultur	Kontrollen n = 23	TNF- α n = 23	K F7 n = 14	K F8 n = 14	TNF F7 n = 14	TNF F 8 n = 14
Mittelwert (%)	20,4	12,9 *	27,3 *	27,3 *	15,9	16,4
Standardabweichung	12,6	8,2	14,5	15,6	7,4	7,9

Zellkultur	K P5 n = 14	K P 7 n = 14	TNF P 5 n = 14	TNF P 7 n = 14	K D7 n = 8	TNF D7 n = 8
Mittelwert (%)	25 *	18,7 *	14,3	14,1	16,4	15,8
Standardabweichung	13,7	10,2	6,2	8,6	5,5	8,2

Tabelle 9 Anteil der toten Zellen der Patientengruppe

Anteil toter Zellen in % aller Zellen nach 24 Stunden Zellkultur in den untersuchten Medien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zu jeweiligen Kontrollen sind mit * gekennzeichnet. (K: Kontrolle, TNF: mit TNF- α stimuliert, D7: Dexamethason der Konzentration 10^{-7} Mol/l Kulturmedium, P5, P7: Prednisolon der Konzentrationen 10^{-5} Mol/l bzw. 10^{-7} Mol/l Kulturmedium, F7, F8: Fluticason der Konzentrationen 10^{-7} Mol/l bzw. 10^{-8} Mol/l Kulturmedium).

3.3 BDNF – Sekretion in den Zellkulturen

3.3.1 BDNF – Sekretion mit und ohne TNF- α – Stimulation

In den Zellkulturüberständen der Mediumkontrolle der Kontrollprobanden war BDNF nachweisbar (Mittelwert 93,9 pg/ml). Unter TNF- α – Stimulation wurde die BDNF – Freisetzung hochsignifikant gesteigert (Mittelwert 142,9 pg/ml) (**Abb.17 A**).

Auch in den Zellkulturüberständen der Mediumkontrolle der Patienten war BDNF nachweisbar (Mittelwert 100,8 pg/ml). Unter TNF- α – Stimulation wurde die BDNF – Freisetzung ebenfalls hochsignifikant gesteigert (Mittelwert 177,7 pg/ml) (**Abb.17 B**).

Die Unterschiede in der BDNF – Sekretion zwischen Probanden und Patienten (mit und ohne TNF- α – Stimulation) waren statistisch nicht signifikant, es zeigte sich jedoch ein Trend zu stärkerer BDNF – Sekretion bei den Patienten (**Abb. 18**).

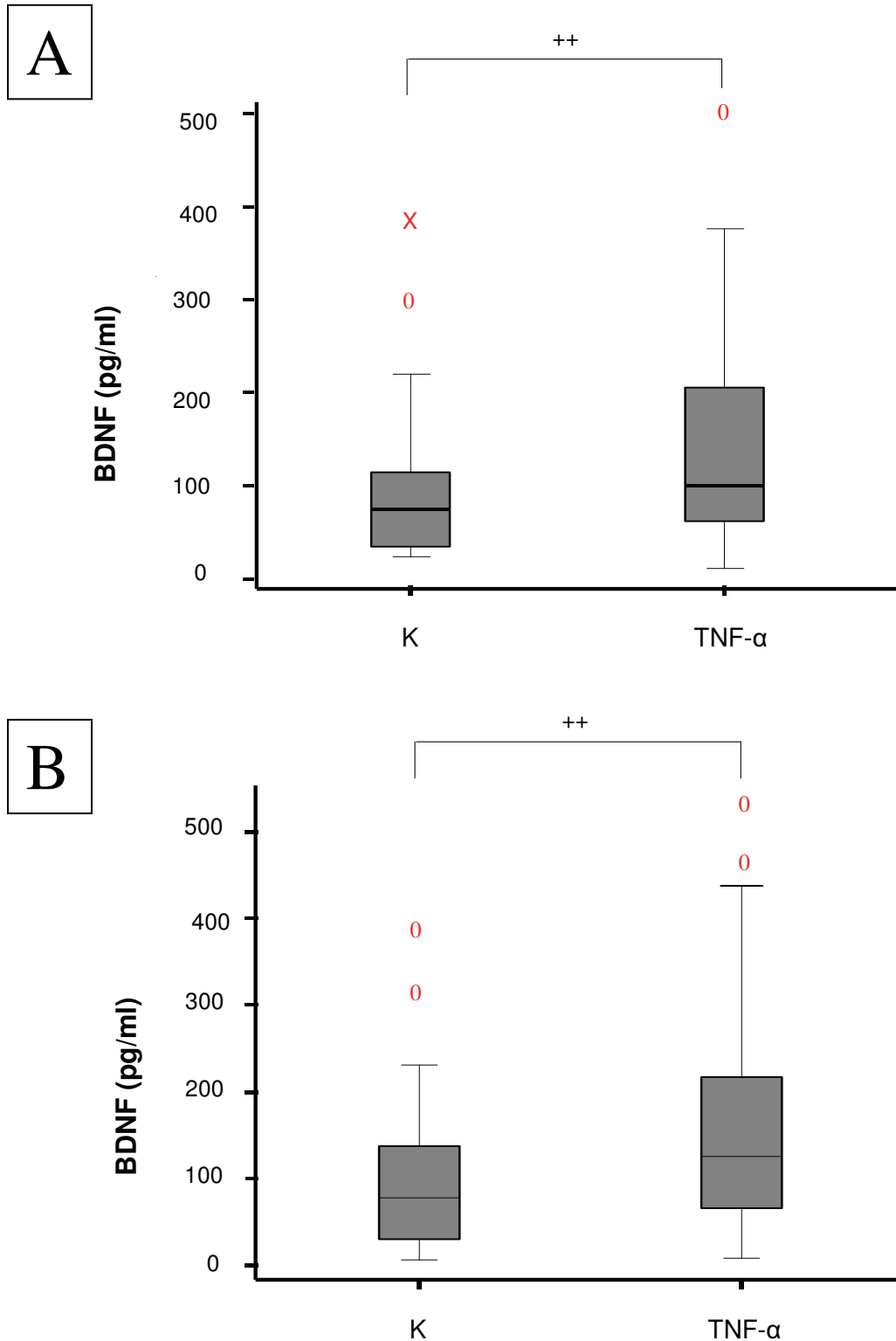


Abb. 17 BDNF – Freisetzung: Kontrolle versus TNF- α – Stimulation

Darstellung der nach 24 Stunden im Zellkulturüberstand gemessenen BDNF – Konzentrationen (in pg/ml). Es werden alle unstimulierten Kontrollwerte ($n = 23$) allen ermittelten Werten mit TNF- α – Stimulation ($n = 23$) gegenübergestellt. A: Kontrollprobanden, B: Patienten. Median: schwarzer Balken innerhalb der Box, 25. und 75. Perzentile unteres und oberes Ende der Box. Fälle, die weniger als 1,5 Interquartilsabstände vom oberen Quartil nach oben oder vom unteren Quartil nach unten entfernt liegen: vertikale Linien. X = mehr als 3 Kastenlängen vom 25. Perzentil entfernt liegende Werte (Extremwerte), 0 = mehr als 1,5 Kastenlängen vom 25. Perzentil entfernt liegende Werte (Ausreißer). ++ = hoch signifikant mit $p < 0,01$.

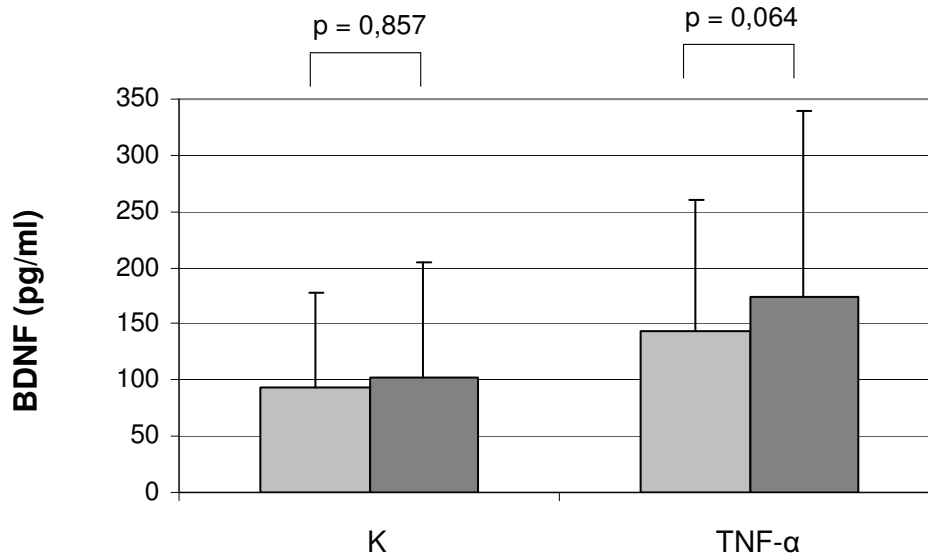


Abb. 18 BDNF – Freisetzung bei Kontrollprobanden und Patienten

Gezeigt sind die BDNF – Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach 24 Stunden (in pg/ml). Die Balken zeigen Mittelwerte. Die Fehlerbalken zeigen Mittelwert + Standardabweichung. Die jeweiligen Kontrollwerte werden den nach TNF- α – Stimulation ermittelten Werten der Kontrollprobanden (n = 30, helle Schattierung) und der Patienten (n = 23, dunkle Schattierung) gegenübergestellt.

Bei keinem der untersuchten Kontrollprobanden, jedoch bei 5 von 23 Patienten (21,7%: 3 Patienten mit Pneumonie, 1 Patient mit Cholangitis und 1 Patient mit Pankreatitis) fand sich nach TNF- α – Stimulation ein mehr als vierfacher Anstieg des BDNF – Ausgangswertes der Mediumkontrolle. Zwischen der BDNF – Sekretion der Patienten (mit und ohne TNF- α – Stimulation) und den gemessenen CRP – Konzentrationen und Leukocytenzahlen fanden sich keine signifikanten Korrelationen (**Tab. 10**).

BDNF - Sekretion	CRP	Leukocyten
Mediumkontrolle	r = - 0,231	r = 0,18
TNF- α – Stimulation	r = - 0,172	r = 0,38

Tab. 10 Korrelation BDNF – Sekretion und CRP / Leukocyten

Dargestellt sind die Korrelationskoeffizienten (nach Spearman) zwischen BDNF – Sekretion der Patienten in der Zellkultur und den CRP-Konzentrationen sowie Leukocytenzahlen. Keine der Korrelationen war signifikant.

3.3.2 Auswirkung des Lösungsmittels Ethanol auf die BDNF – Sekretion

Um mögliche Auswirkungen des bei der Herstellung der Fluticason – Stammlösung verwendeten Ethanol auf die Messungen zu bestimmen, wurden im Rahmen der Zellkulturen für die Fluticasonversuche neben den mit 0,01% Ethanol im Kulturmedium versetzten Kontrollen zum Vergleich Kontrollen ohne Ethanol angelegt. Die BDNF – Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,597$) (**Abb. 19**). Der Gehalt an 0,01 % Ethanol in den für die Fluticason verwendeten Zellkulturen hatte somit keinen signifikanten Einfluss auf die BDNF – Freisetzung.

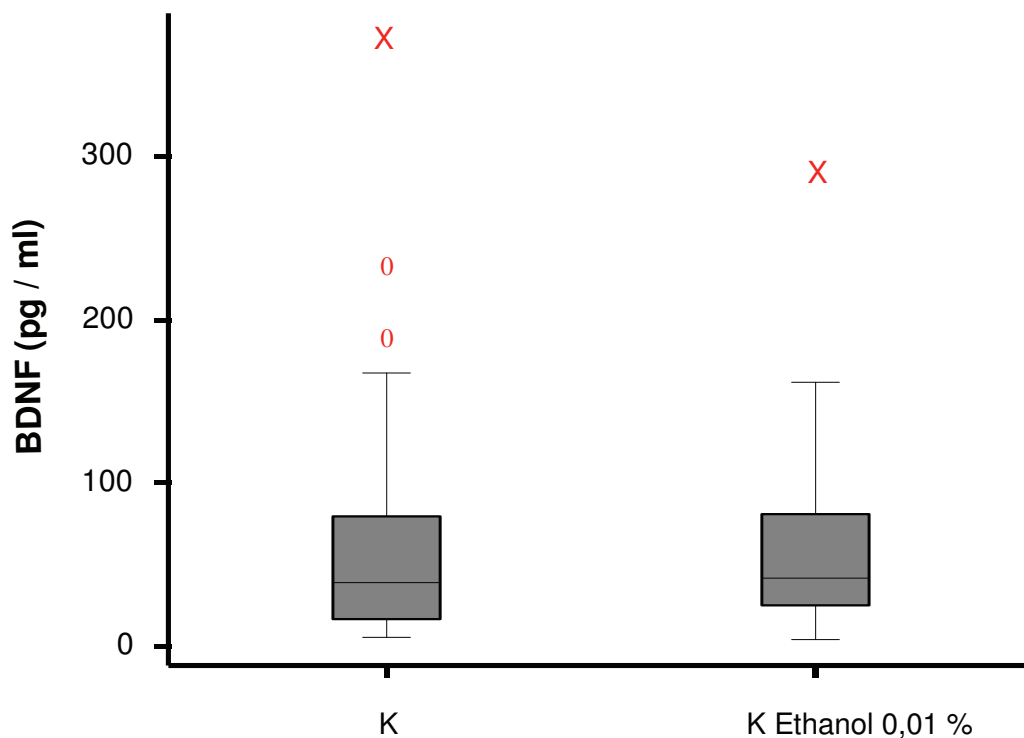


Abb. 19 BDNF – Freisetzung in Ethanol – haltigem Medium

Gezeigt sind die nach 24 Stunden im Zellkulturüberstand gemessenen BDNF – Konzentrationen (in pg/ml). Es werden die im Zellüberstand aller 0,01 % Ethanol enthaltenden Zellkulturen ($n = 28$) gemessenen BDNF – Konzentrationen den gemessenen BDNF – Konzentrationen im Überstand der zum Vergleich angelegten Kontrollen ohne Ethanol ($n = 28$) gegenübergestellt.

Median: schwarzer Balken innerhalb der Box, 25. und 75. Perzentile unteres und oberes Ende der Box. Fälle, die weniger als 1,5 Interquartilsabstände vom oberen Quartil nach oben oder vom unteren Quartil nach unten entfernt liegen: vertikale Linien. X = mehr als 3 Kastenlängen vom 25. Perzentil entfernt liegende Werte (Extremwerte), 0 = mehr als 1,5 Kastenlängen vom 25. Perzentil entfernt liegende Werte (Ausreißer).

3.3.3 Einfluss der Glukokortikosteroide auf die BDNF – Sekretion bei Probanden

3.3.3.1 Dexamethason

Unstimulierte oder mit TNF- α stimulierte Zellkulturen wurden mit verschiedenen Dexamethason – Konzentrationen inkubiert (n = 8 Probanden). In den unstimulierten Kontrollen fand sich kein signifikanter Einfluss von Dexamethason auf die BDNF – Sekretion. Nach TNF- α – Stimulation fand sich nur unter der höchsten Dexamethason – Konzentration eine signifikante Suppression der BDNF – Sekretion (**Abb. 20**).

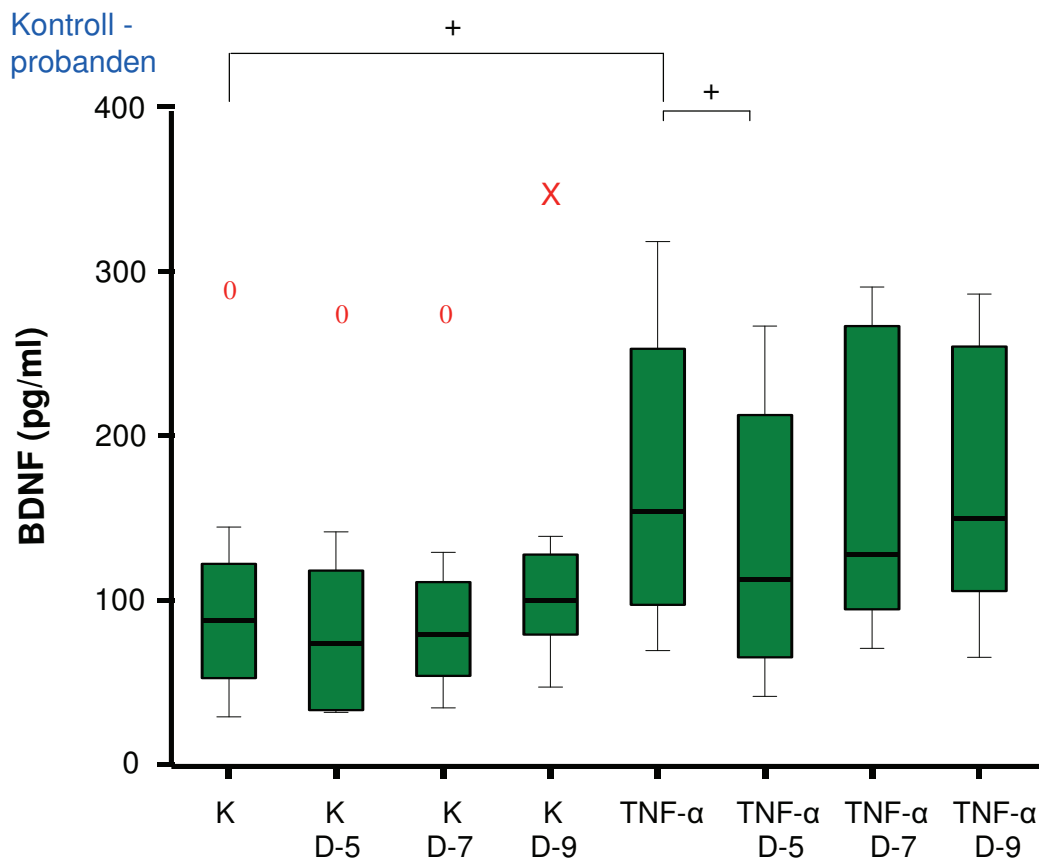


Abb. 20 Einfluss von Dexamethason auf die BDNF – Sekretion bei Kontrollprobanden

Gezeigt sind die nach 24 Stunden Kultur im Zellkulturüberstand gemessenen BDNF – Konzentrationen (in pg/ml). Abkürzungen: D-5, D-7, D-9: Dexamethason der Konzentrationen 10^{-5} Mol/l, 10^{-7} Mol/l bzw. 10^{-9} Mol/l Kulturmedium. Median: schwarzer Balken innerhalb der Box, 25. und 75. Perzentile: unteres und oberes Ende der Box. Fälle, die weniger als 1,5 Interquartilsabstände vom oberen Quartil nach oben oder vom unteren Quartil nach unten entfernt liegen: vertikale Linien. X = mehr als 3 Kastenlängen vom 25. Perzentil entfernt liegende Werte (Extremwerte), 0 = mehr als 1,5 Kastenlängen vom 25. Perzentil entfernt liegende Werte (Ausreißer). + = signifikant mit $p < 0,05$.

3.3.3.2 Prednisolon

Unstimulierte oder mit TNF- α stimulierte Zellkulturen wurden mit verschiedenen Prednisolon – Konzentrationen inkubiert (n = 14 Probanden). Sowohl in den unstimulierten Kontrollen als auch nach TNF- α – Stimulation fand sich unter der höchsten Prednisolon – Konzentration eine signifikante Suppression der BDNF – Sekretion (**Abb. 21**).

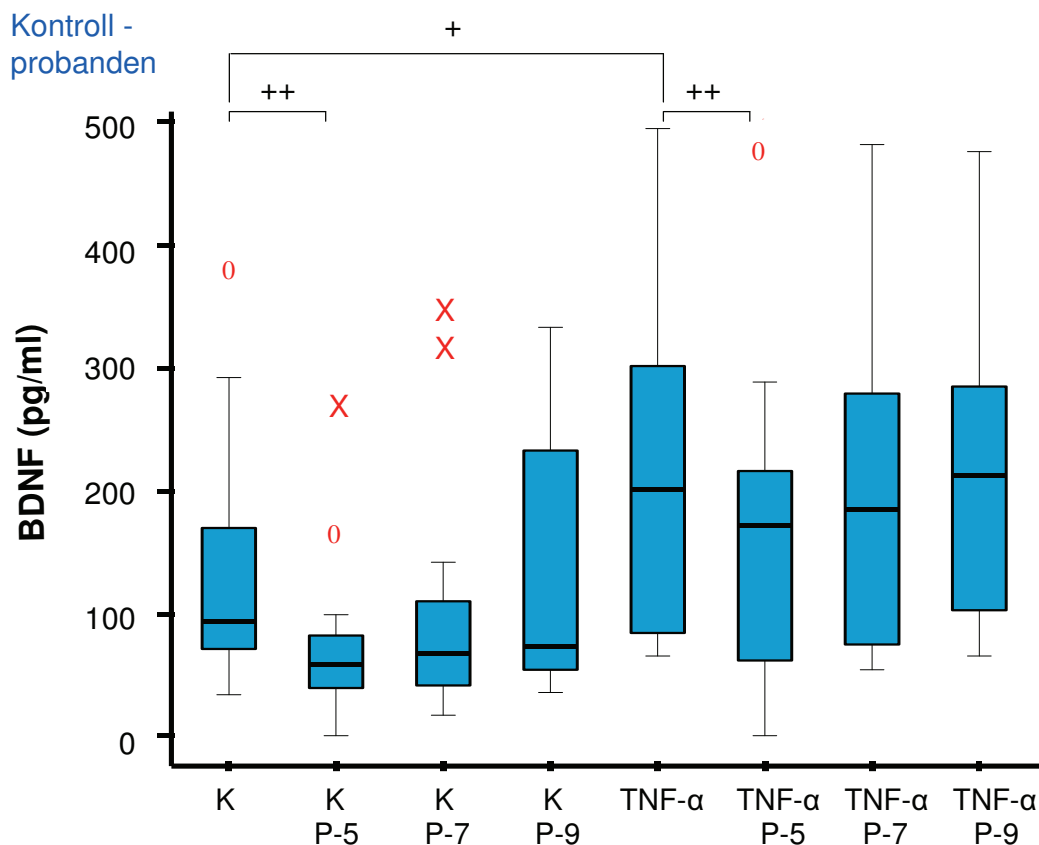


Abb. 21 Einfluss von Prednisolon auf die BDNF – Sekretion bei Kontrollprobanden

Gezeigt sind die nach 24 Stunden Kultur im Zellkulturüberstand gemessenen BDNF – Konzentrationen (in pg/ml). Abkürzungen: P-5, P-7, P-9: Prednisolon der Konzentrationen 10^{-5} Mol/l, 10^{-7} Mol/l bzw. 10^{-9} Mol/l Kulturmedium. Median: schwarzer Balken innerhalb der Box, 25. und 75. Perzentile: unteres und oberes Ende der Box. Fälle, die weniger als 1,5 Interquartilsabstände vom oberen Quartil nach oben oder vom unteren Quartil nach unten entfernt liegen: vertikale Linien. X = mehr als 3 Kastenlängen vom 25. Perzentil entfernt liegende Werte (Extremwerte), 0 = mehr als 1,5 Kastenlängen vom 25. Perzentil entfernt liegende Werte (Ausreißer).

++ = hoch signifikant mit $p < 0,01$, + = signifikant mit $p < 0,05$.

3.3.3.3 Fluticason

Unstimulierte oder mit TNF- α stimulierte Zellkulturen wurden mit verschiedenen Fluticason – Konzentrationen inkubiert (n = 14 Probanden). Sowohl in den unstimulierten Kontrollen als auch nach TNF- α – Stimulation fand sich unter den verwendeten Fluticason – Konzentrationen eine signifikante Suppression der BDNF – Sekretion (**Abb. 22**).

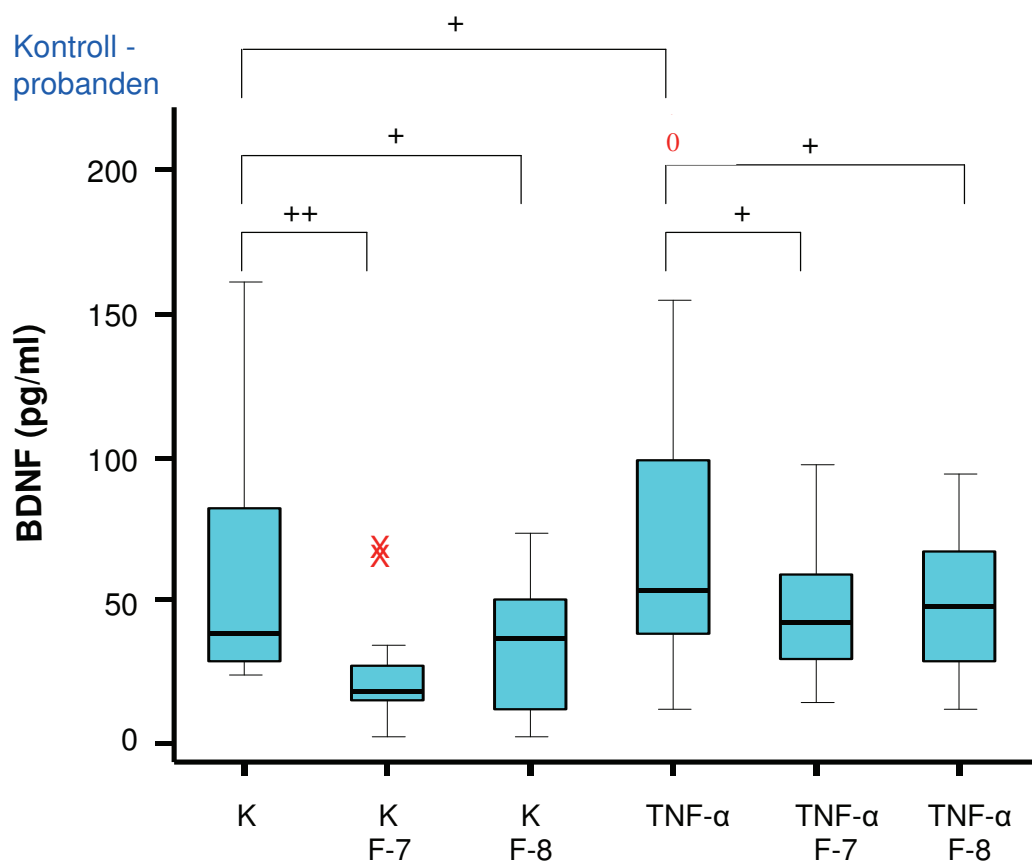


Abb. 22 Einfluss von Fluticason auf die BDNF – Sekretion bei Kontrollprobanden

Gezeigt sind die nach 24 Stunden Kultur im Zellkulturüberstand gemessenen BDNF – Konzentrationen (in pg/ml). Abkürzungen: F-7, F-8: Fluticason der Konzentrationen 10^{-7} Mol/l bzw. 10^{-8} Mol/l Kulturmedium. Median: schwarzer Balken innerhalb der Box, 25. und 75. Perzentile: unteres und oberes Ende der Box. Fälle, die weniger als 1,5 Interquartilsabstände vom oberen Quartil nach oben oder vom unteren Quartil nach unten entfernt liegen: vertikale Linien. X = mehr als 3 Kastenlängen vom 25. Perzentil entfernt liegende Werte (Extremwerte), 0 = mehr als 1,5 Kastenlängen vom 25. Perzentil entfernt liegende Werte (Ausreißer). ++ = hoch signifikant mit $p < 0,01$, + = signifikant mit $p < 0,05$.

3.3.3.4 Vergleich der Glukokortikosteroid – Wirkungen bei Probanden

Zum direkten Vergleich der 3 Glukokortikosteroide werden die BDNF – Sekretionen prozentual in Bezug zur Mediumkontrolle bzw. TNF- α – Kontrolle (diese als 100 % gesetzt), in der bei allen Glukokortikosteroiden verwendeten Konzentration von 10^{-7} Mol /l, dargestellt (**Abb. 23**).

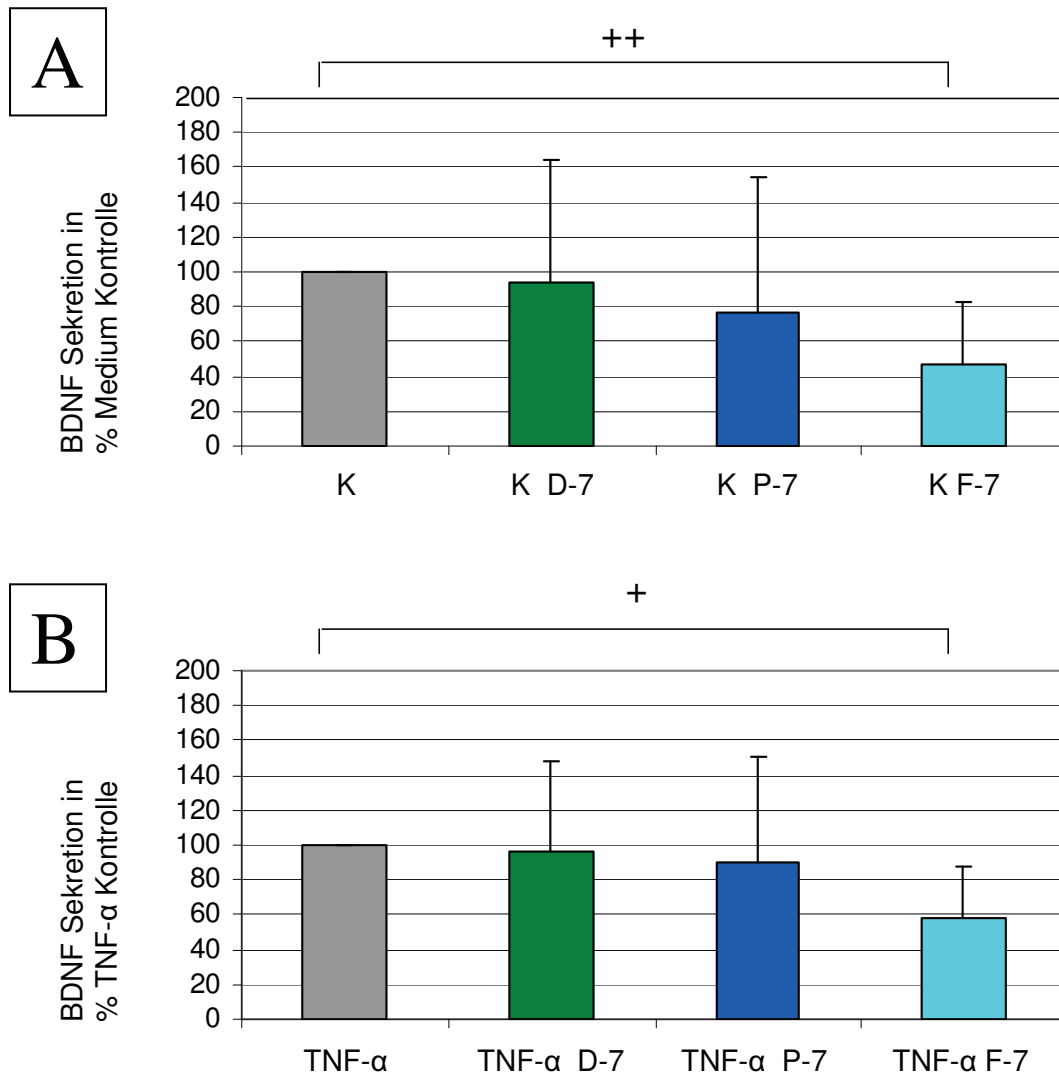


Abb. 23 Einfluss der Glukokortikosteroide auf die BDNF – Sekretion (Probanden)

A: BDNF – Mittelwerte in Prozent der Mediumkontrolle (diese als 100 % gesetzt). B: BDNF – Mittelwerte in Prozent der TNF- α – Kontrolle (diese als 100 % gesetzt). Die Fehlerbalken zeigen Mittelwert + Standardabweichung, + = signifikant, ++ = hoch signifikant. In einer Konzentration von 10^{-7} Mol /l führte nur Fluticason zu einer signifikanten Suppression der BDNF – Sekretion.

3.3.4 Einfluss der Glukokortikosteroide auf die BDNF – Sekretion bei Patienten

3.3.4.1 Dexamethason

Unstimulierte oder mit TNF- α stimulierte Zellkulturen wurden mit Dexamethason der Konzentration 10^{-7} Mol /l inkubiert (n = 8 Probanden). Auf Versuche mit weiteren Verdünnungen wurde aufgrund begrenzt gewonnener Zellzahlen verzichtet. In den Mediumkontrollen fand sich kein signifikanter Einfluss von Dexamethason auf die BDNF – Sekretion. Nach TNF- α – Stimulation zeigte sich eine signifikante Suppression der BDNF – Sekretion (**Abb. 24**).

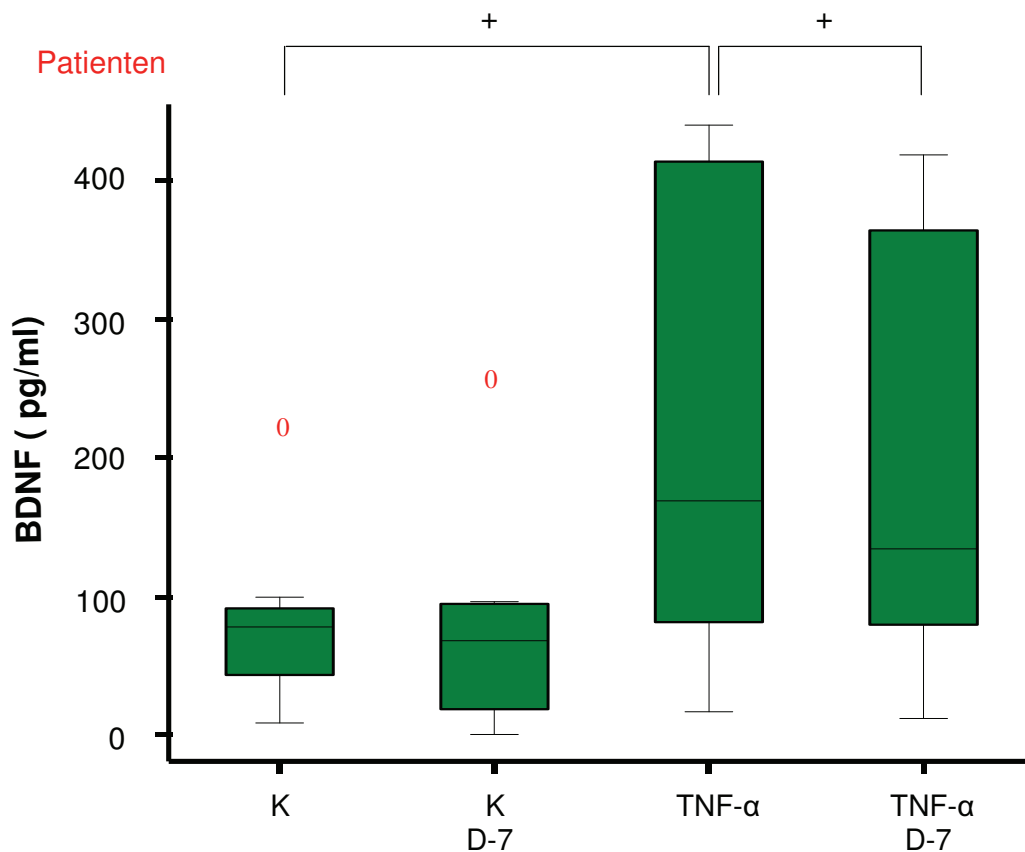


Abb. 24 Einfluss von Dexamethason auf die BDNF – Sekretion bei Patienten

Gezeigt sind die nach 24 Stunden Kultur im Zellkulturüberstand gemessenen BDNF – Konzentrationen (in pg/ml). D-7: Dexamethason der Konzentration 10^{-7} Mol /l Kulturmedium. Median: schwarzer Balken innerhalb der Box, 25. und 75. Perzentile: unteres und oberes Ende der Box. Fälle, die weniger als 1,5 Interquartilsabstände vom oberen Quartil nach oben oder vom unteren Quartil nach unten entfernt liegen: vertikale Linien. 0 = mehr als 1,5 Kastenlängen vom 25. Perzentil entfernt liegende Werte (Ausreißer). + = signifikant mit $p < 0,05$.

3.3.4.2 Prednisolon

Unstimulierte oder mit TNF α stimulierte Zellkulturen wurden mit Prednisolon der Konzentrationen 10^{-5} bzw. 10^{-7} Mol /l inkubiert (n = 14 Probanden). Auf Versuche mit weiteren Verdünnungen wurde aufgrund begrenzt gewonnener Zellzahlen verzichtet. Sowohl in den Mediumkontrollen als auch nach TNF- α – Stimulation fand sich bei keiner Prednisolon – Konzentration eine signifikante Suppression der BDNF – Sekretion (**Abb. 25**).

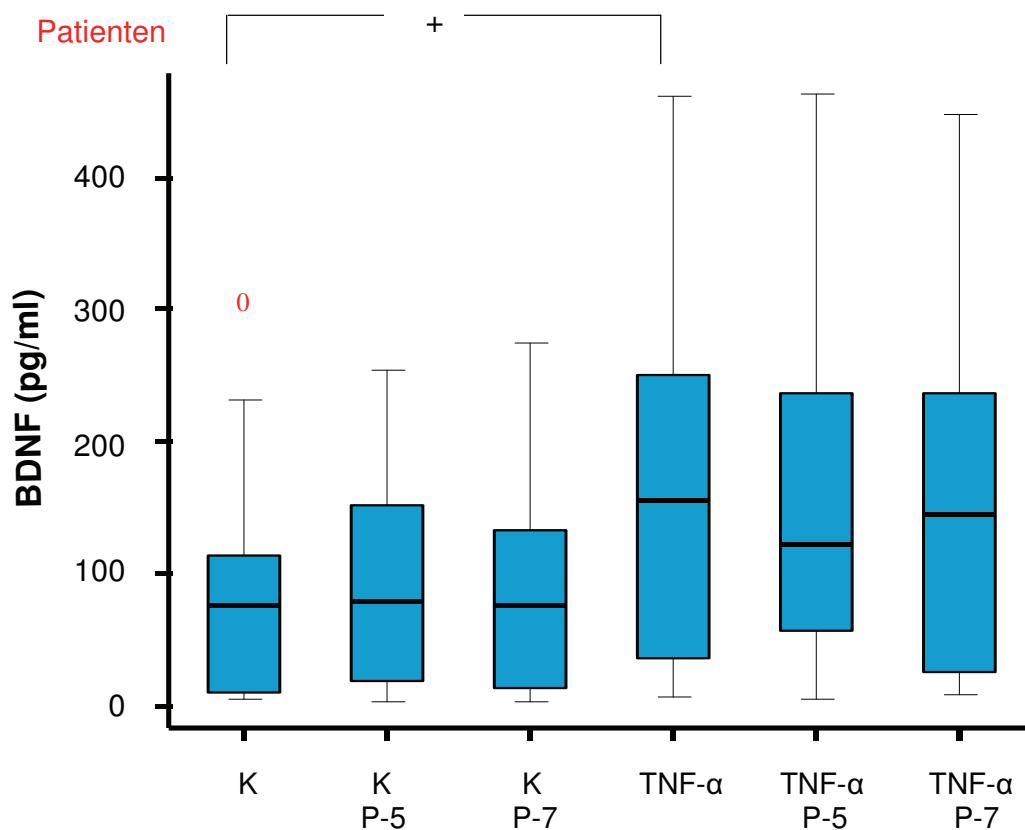


Abb. 25 Einfluss von Prednisolon auf die BDNF – Sekretion bei Patienten

Gezeigt sind die nach 24 Stunden Kultur im Zellkulturüberstand gemessenen BDNF – Konzentrationen (in pg/ml). Abkürzungen: P-5, P-7: Prednisolon der Konzentrationen 10^{-5} Mol /l, 10^{-7} Mol /l Kulturmedium. Median: schwarzer Balken innerhalb der Box, 25. und 75. Perzentile: unteres und oberes Ende der Box. Fälle, die weniger als 1,5 Interquartilsabstände vom oberen Quartil nach oben oder vom unteren Quartil nach unten entfernt liegen: vertikale Linien. 0 = mehr als 1,5 Kastenlängen vom 25. Perzentil entfernt liegende Werte (Ausreißer). + = signifikant mit $p < 0,05$.

3.3.4.3 Fluticason

Unstimulierte oder mit TNF- α stimulierte Zellkulturen wurden mit Fluticason der Konzentrationen 10^{-7} Mol/l bzw. 10^{-8} Mol/l inkubiert (n = 14 Probanden). In den Mediumkontrollen fand sich kein signifikanter Einfluss von Fluticason auf die BDNF – Sekretion. Nach TNF- α – Stimulation fand sich unter beiden Fluticason – Konzentrationen eine signifikante Suppression der BDNF – Sekretion (**Abb. 26**).

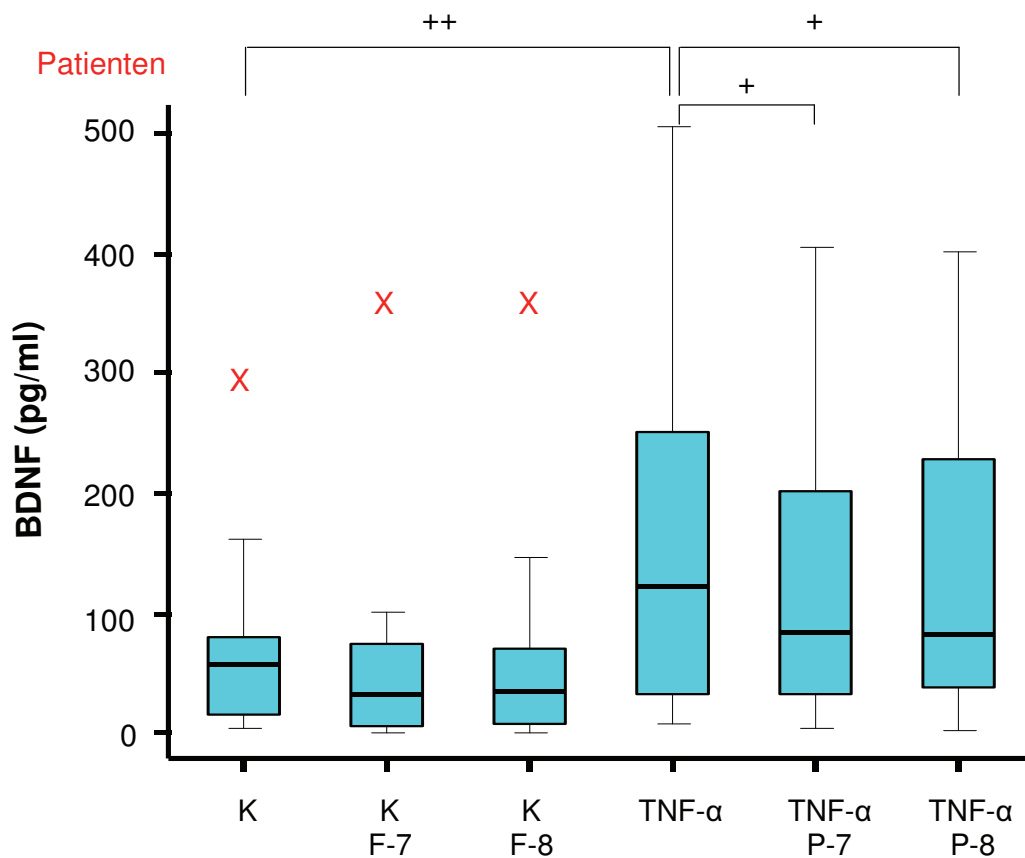


Abb. 26 Einfluss von Fluticason auf die BDNF – Sekretion bei Patienten

Gezeigt sind die nach 24 Stunden Kultur im Zellkulturüberstand gemessenen BDNF – Konzentrationen (in pg/ml). Abkürzungen: F-7, F-8: Fluticason der Konzentrationen 10^{-7} Mol/l bzw. 10^{-8} Mol/l Kulturmedium. Median: schwarzer Balken innerhalb der Box, 25. und 75. Perzentile: unteres und oberes Ende der Box. Fälle, die weniger als 1,5 Interquartilsabstände vom oberen Quartil nach oben oder vom unteren Quartil nach unten entfernt liegen: vertikale Linien. X = mehr als 3 Kastenlängen vom 25. Perzentil entfernt liegende Werte (Extremwerte), ++ = hoch signifikant mit $p < 0,01$, + = signifikant mit $p < 0,05$.

3.3.4.4 Vergleich der Glukokortikosteroid – Wirkungen bei Patienten

Zum direkten Vergleich der 3 Glukokortikosteroide werden die BDNF – Sekretionen prozentual in Bezug zur Mediumkontrolle bzw. TNF- α – Kontrolle (diese als 100 % gesetzt), in der bei allen Glukokortikosteroiden verwendeten Konzentration von 10^{-7} Mol /l, dargestellt (**Abb. 27**).

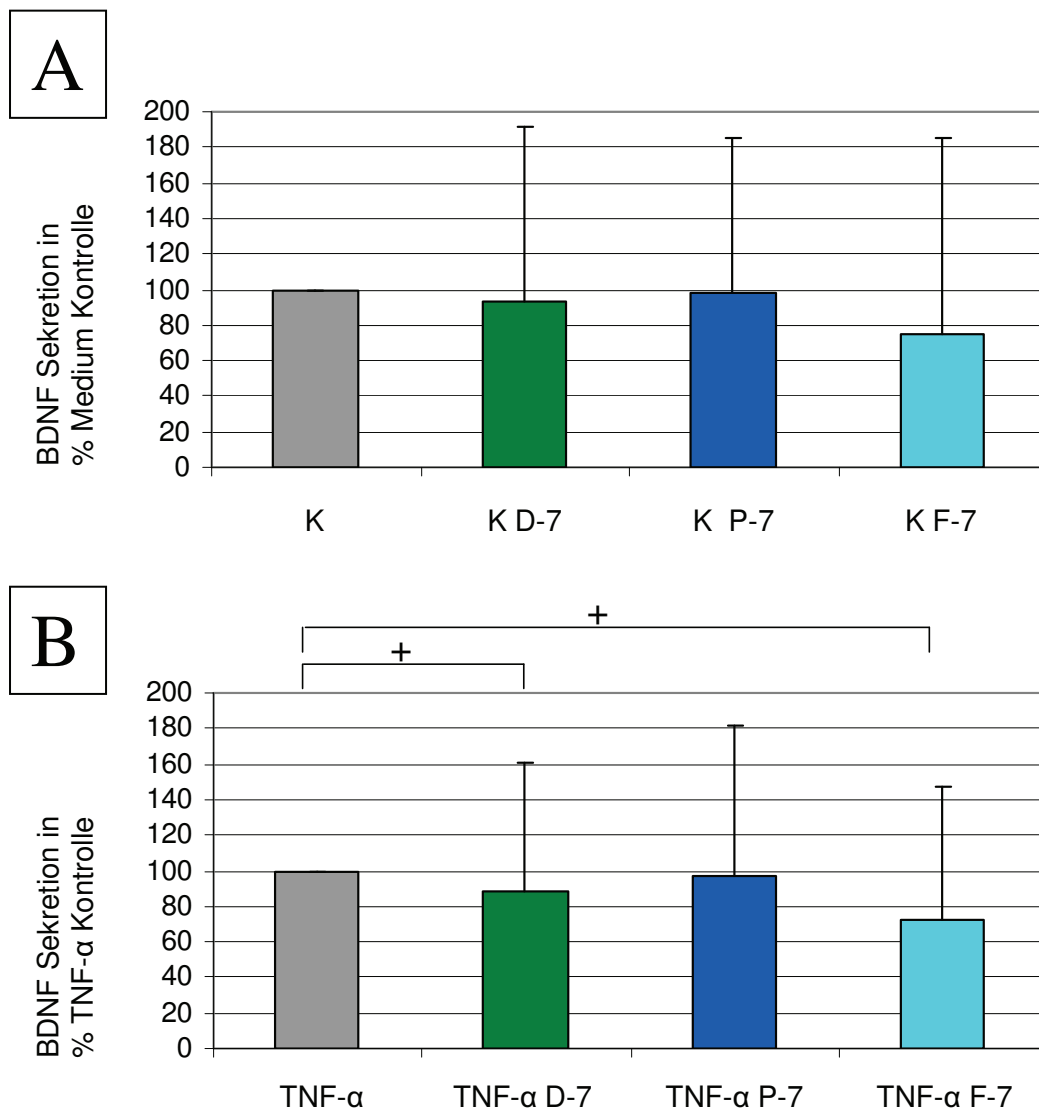


Abb. 27 Einfluss der Glukokortikosteroide auf die BDNF – Sekretion (Patienten)

A: BDNF – Mittelwerte in Prozent der Mediumkontrolle (diese als 100 % gesetzt). B: BDNF – Mittelwerte in Prozent der TNF- α – Kontrolle (diese als 100 % gesetzt). Die Fehlerbalken zeigen Mittelwert + Standardabweichung, + = signifikant mit $p < 0,05$. In den mit TNF- α versetzten Medien führte die Zugabe von Dexamethason oder Fluticason in einer Konzentration von 10^{-7} Mol /l zu einer signifikanten Suppression der BDNF – Sekretion.

4 Diskussion

BDNF ist ein entscheidender Mediator der neuronalen Plastizität des heranwachsenden und erwachsenen Menschen, sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Anpassungsprozessen. Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale ist er ein wichtiger Kandidat für die Vermittlung postinflammatorischer neurologischer Dysfunktionen.

BDNF zirkuliert im Blutplasma des Menschen, ist in Thrombocyten gespeichert und wird von mononukleären Zellen des peripheren Blutes sezerniert. Die Funktion und Regulation von BDNF in der Zirkulation und in Thrombocyten und mononukleären Zellen ist bislang jedoch wenig verstanden. In kürzlich publizierten Studien wurden erstmals Normalwerte für die BDNF – Konzentrationen im Plasma und in Thrombocyten des Menschen erstellt (174) und Monocyten als Hauptquelle von BDNF unter den mononukleären Zellen des peripheren Blutes identifiziert (8). Es wurde zudem gezeigt, dass sowohl TNF- α als auch LPS (Lipopolysaccharid) die BDNF – Sekretion mononukleärer Zellen des humanen Blutes steigern können (8, 180). In verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie dem allergischen Asthma bronchiale, der atopischen Dermatitis, der Multiplen Sklerose und der Psoriasis wurden Hinweise für erhöhte BDNF – Konzentrationen in zirkulierenden Thrombocyten gefunden (125, 181). Die Frage, ob auch die Sekretion von BDNF durch systemisch zirkulierende mononukleäre Zellen in chronisch entzündlichen Erkrankungen verändert ist, ist weniger klar. In einigen Erkrankungen zeigten sich Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen, in anderen Erkrankungen nicht (125). Völlig unklar ist bislang, welchen Einfluss bestimmte Pharmaka auf die BDNF – Sekretion mononukleärer Zellen des Menschen haben.

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, erstmals systematisch den Einfluss verschiedener Glukokortikosteroide (Dexamethason, Prednisolon, Fluticason) auf die BDNF – Sekretion humaner mononukleärer Zellen zu untersuchen. Desweiteren sollte beleuchtet werden, ob dieser Einfluss der Glukokortikosteroide bei Patienten mit akuten entzündlichen Erkrankungen und bei gesunden Probanden möglicherweise unterschiedlich ist.

Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Sekretion von BDNF (sowohl basal als auch nach TNF- α – Stimulation) durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes unterscheidet sich nicht signifikant zwischen Patienten mit akuten entzündlichen Erkrankungen und gesunden Probanden, wiewohl sich ein Trend zu einer höheren BDNF – Sekretion bei Patienten mit akuten entzündlichen Erkrankungen findet.
2. Glukokortikosteroide wie Dexamethason, Prednisolon und Fluticason hemmen dosisabhängig die BDNF – Sekretion mononukleärer Zellen des peripheren Blutes. Im Vergleich der Glukokortikosteroide untereinander zeigt Fluticason die stärkste Suppression der BDNF – Sekretion. Die beobachteten Effekte der Glukokortikosteroide auf die BDNF – Sekretion mononukleärer Zellen gleichen sich bei Patienten mit akuten entzündlichen Erkrankungen und bei gesunden Probanden.

4.1 BDNF – ein Produkt vieler Quellen

BDNF kann von vielen verschiedenen Zellen des Körpers wie Neuronen, Epithelien, Immunzellen und Muskelzellen produziert werden, und wird zudem in hohen Mengen in Thrombocyten gespeichert (**Abb. 28**). Dementsprechend finden sich hohe BDNF – Konzentrationen in inneren Organen wie der Harnblase, der Lunge und dem Colon (5) und im Serum (174). Diese BDNF – Konzentrationen sind teilweise sogar höher als im Gehirn, daher ist der Begriff „Brain – derived neurotrophic factor“ wohl eher von historischer Bedeutung (5).

Im peripheren Blut des Menschen sind zwei Zellpopulationen für die BDNF – Sekretion und BDNF – Speicherung von besonderer Bedeutung: mononukleäre Zellen (insbesondere Monocyten) sind wichtige BDNF – Produzenten, und Thrombocyten sind wichtige BDNF – Speicher, die in bestimmten Situationen gespeichertes BDNF auch wieder abgeben können. BDNF wird in beträchtlichen Mengen in Thrombocyten aufgenommen, gespeichert und von diesen auch wieder sezerniert (nach Stimulation mit Entzündungsmediatoren oder nach Einwirkung von Scherkräften), ohne von Thrombocyten oder Thrombocyten-Vorläufern synthetisiert

zu werden (164-166). Unter den zirkulierenden Leukocyten sind die Monocyten die wichtigste Quelle aktiver BDNF – Produktion. Es findet sich bereits eine basale BDNF – Sekretion in Ruhe, diese kann durch Stimulation mit bestimmten Entzündungsmediatoren (wie TNF- α oder Interleukin-6) als auch bestimmten bakteriellen Toxinen (wie Lipopolysaccharid, LPS) gesteigert werden (8, 180). Somit ist es also denkbar, dass sowohl Thrombocyten als auch Leukocyten in lokalen entzündlichen Prozessen eine verstärkte Sekretion von BDNF aufweisen. In diesem Zusammenhang muss daran erinnert werden, dass auch Thrombocyten zur Gruppe der Entzündungszellen zu zählen sind, da sie aktiv in Entzündungsgebiete einwandern und durch die Freisetzung diverser Mediatoren erheblichen Einfluss auf die Entzündung nehmen (36,37,56).

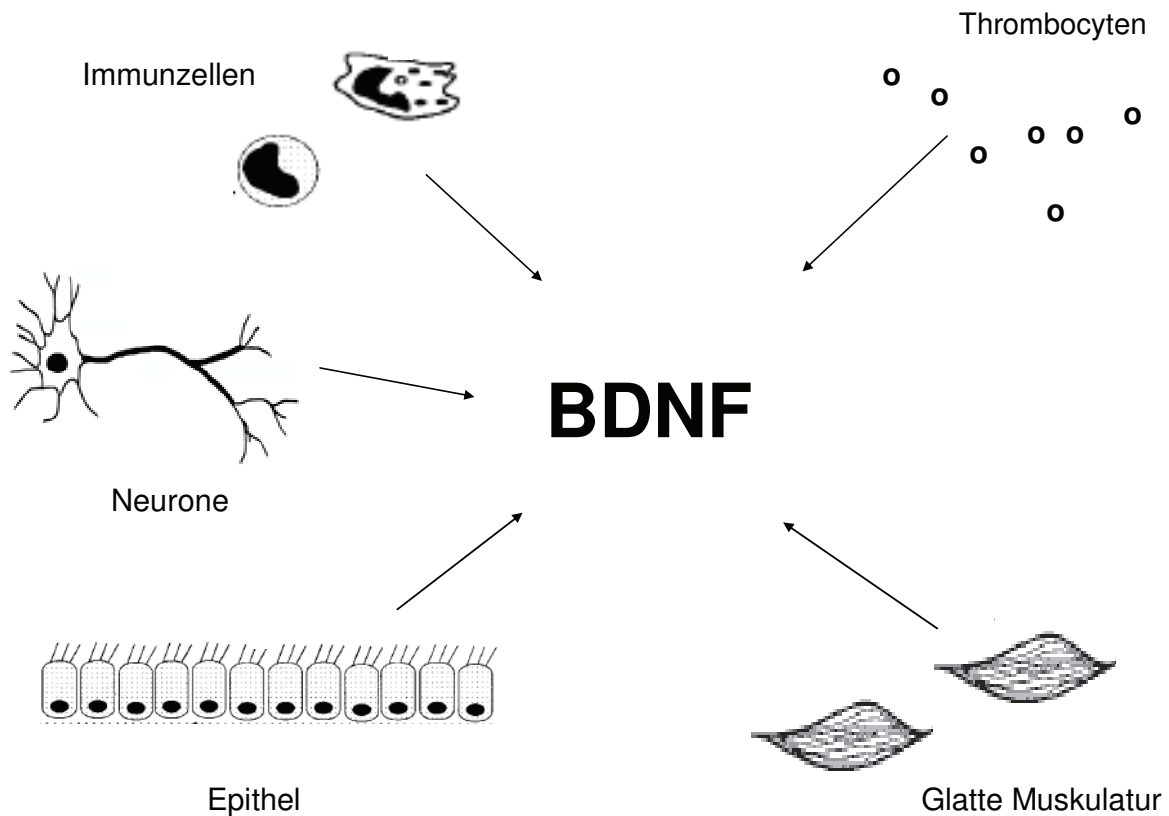


Abb. 28 BDNF – Quellen im Menschen

BDNF wird von verschiedenen Zellen wie Muskelzellen, Epithelien, Neuronen oder Immunzellen synthetisiert und sezerniert. Thrombocyten (und deren Vorläufer) weisen die Besonderheit auf, dass sie BDNF nicht synthetisieren können, dafür aber BDNF aufnehmen, speichern und (nach Stimulation) auch wieder abgeben können.

4.2 BDNF und entzündliche Erkrankungen

Neurotrophine wie BDNF vermitteln im adulten Organismus neuronale Plastizität, unter anderem durch eine Beeinflussung der Synthese von Neurotransmittern und Neuropeptiden in sensorischen und motorischen Neuronen. Der Umstand, dass Neurotrophine von verschiedenen Immunzellen sezerniert werden und postinflammatorische neuronale Dysfunktionen wie eine bronchiale Hyperreagibilität oder eine Hyperalgesie auslösen können, weist darauf hin, dass Neurotrophine eine zentrale Mittlerfunktion zwischen Nervensystem und Immunsystem haben könnten. In den letzten Jahren mehrte sich die Zahl von Publikationen, in denen die Pathogenese entzündlicher Erkrankungen mit Neurotrophinen in Zusammenhang gebracht wird. Für NGF, dem am besten untersuchten Neurotrophin, sind erhöhte Blut – Konzentrationen im Rahmen einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen beschrieben worden (107, 108), wie der Multiplen Sklerose, der rheumatoiden Arthritis, der Colitis ulcerosa oder dem Lupus erythematoses (102). Beim Lupus gelten die NGF – Konzentrationen im Blut sogar als Hinweis für die Aktivität der Erkrankung (109). Auch im Rahmen von Infektionen wurde eine erhöhte NGF – Sekretion beschrieben (108). NGF wird von verschiedenen Immunzellen sezerniert, wird jedoch nicht in Thrombocyten gespeichert.

BDNF ist das einzige Neurotrophin, welches sowohl in Thrombocyten gespeichert als auch von Leukocyten produziert wird. Durch die gleichzeitige Aktivierung von Thrombocyten und Leukocyten in Entzündungsprozessen ist daher davon auszugehen, dass BDNF höhere lokale Konzentrationen als NGF in entzündeten Organen erreicht. Nicht zuletzt dieser Umstand hat dafür gesorgt, dass BDNF (welches erst 20 Jahre nach NGF entdeckt wurde) zunehmend in den Focus neuroimmunologischer Forschung gerückt ist. Eine erhöhte BDNF – Produktion bzw. erhöhte BDNF – Konzentrationen sind bereits bei verschiedenen Erkrankungen beschrieben worden, unter anderem bei der chronischen Pankreatitis (159), der Colitis ulcerosa (110), der Multiplen Sklerose (119,106) und der atopischen Dermatitis (161). Auch verschiedene akute Infektionen gehen mit einer verstärkten lokalen BDNF – Sekretion einher (162,132, 158, 142).

In der Lunge wird BDNF physiologischerweise in der glatten Muskulatur sowie im gesamten respiratorischen Epithel exprimiert (5). Tierexperimentelle Studien weisen darauf hin, dass es in der allergischen Entzündung der Atemwege zu einer verstärkten Expression in Epithelien als auch einer erheblichen Expression von BDNF in infiltrierenden Immunzellen kommt (7), und dass diese Überproduktion zur neuronalen Hyperreagibilität der Atemwege beiträgt (155)(**Abb. 29**). Bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale findet sich eine erhöhte Thrombocyten – BDNF – Beladung, die mit der bronchialen Hyperreagibilität gegenüber Histamin korreliert (125). Als Ursache dieses Phänomens wird vermutet, dass eine entzündungsbedingte Überproduktion von BDNF in den Atemwegen von Patienten mit allergischem Asthma sowohl zu einer bronchialen Hyperreagibilität als auch zu einer verstärkten Aufnahme von BDNF in zirkulierende Thrombocyten führt (125).

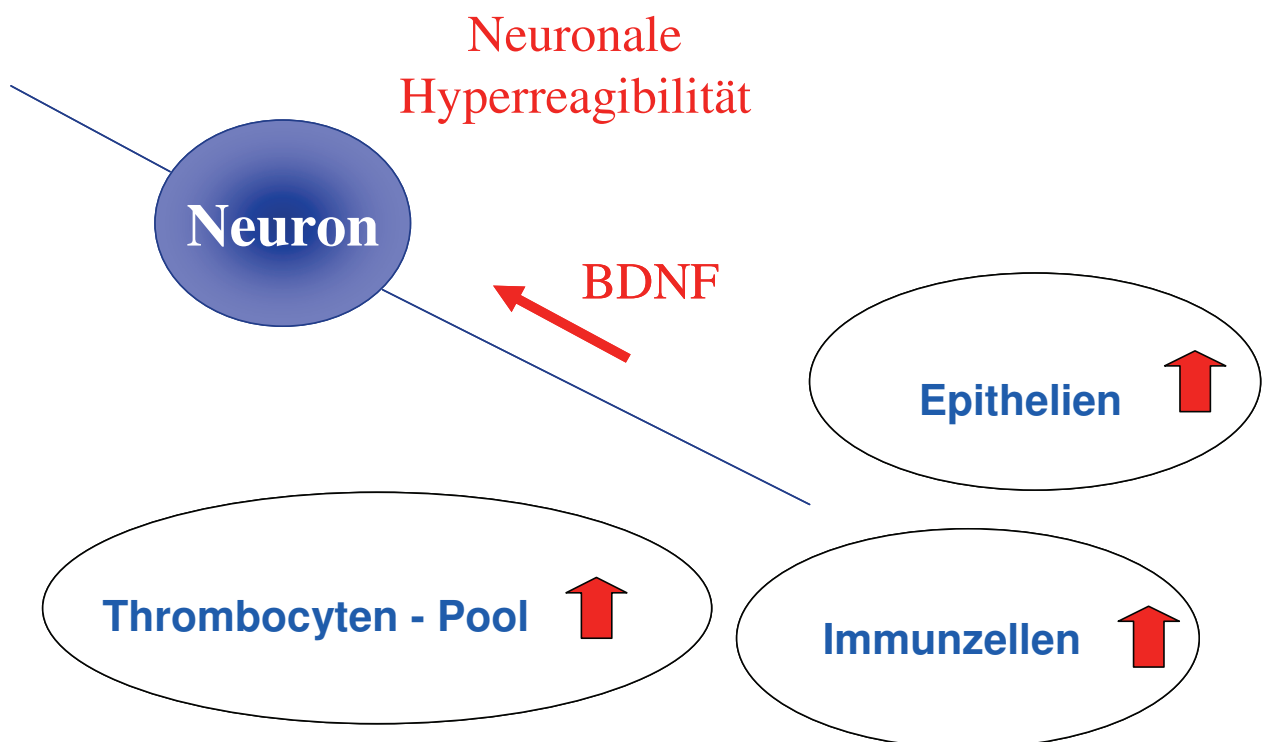


Abb. 29 Konzept zur Bedeutung von BDNF in Entzündungsprozessen

In Entzündungsprozessen kommt es zu einer vermehrten Sekretion von BDNF durch Epithelien und Immunzellen. Zudem kann sekundär auch die Speicherung von BDNF in Thrombocyten erhöht sein. Diese Phänomene führen zu einem erhöhten Angebot von BDNF in den Zielgebieten der Innervation. Durch retrograden Transport dieser erhöhten BDNF-Mengen in den Neuronen kann es durch eine nachhaltige Änderung der Neurotransmitter- und Neuropeptidsynthese zu einer neuronalen Hyperreagibilität kommen.

4.3 Vielfältige Wirkungen der Glukokortikosteroide

Kortikosteroide werden physiologischerweise in der Nebennierenrinde gebildet. Nach ihrer biologischen Wirkung werden sie in 3 Gruppen eingeteilt: die Androgene, die Mineralokortikosteroide und die Glukokortikosteroide. Letztere beeinflussen nicht nur, wie ihr Name sagt, die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels; sie nehmen auch Einfluss auf den Fett – und Eiweißstoffwechsel. Beim Stress nehmen sie eine zentrale Rolle ein, indem sie, neben der Erhöhung des Blutzuckerspiegels, die Erregbarkeit des Gehirns und die Leistungsfähigkeit des Herzens steigern (111). Ihre therapeutische Bedeutung haben die Glukokortikosteroide jedoch erst mit Entdeckung ihrer antiphlogistischen Eigenschaften erlangt. In der Behandlung chronisch – entzündlicher Erkrankungen wie dem Asthma sind synthetische, in ihrer Pharmakokinetik und ihrer antiphlogistischen Wirkung optimierte Glukokortikosteroide heute von zentraler Bedeutung.

Der molekulare Wirkungsmechanismus von Glukokortikosteroiden ist komplex. Glukokortikosteroide binden an intrazelluläre Rezeptoren. Es kommt zur Abspaltung eines Hitzeschockproteins, woraufhin der Glukokortikosteroid – Rezeptorkomplex in den Nucleus gelangt und, nach Bildung eines Dimers, an die Promotor – Region eines Gens an der DNA binden kann. Über Induktion bzw. Repression können auf diese Weise eine Vielzahl von Genen direkt beeinflusst werden (**Abb. 30**).

Aktivierte Glukokortikosteroidrezeptoren können jedoch auch indirekt Einfluss auf die Genexpression nehmen. So kann NF- κ B, ein Transkriptionsfaktor, der viele proinflammatorische Gene induziert, von dem aktivierten Glukokortikosteroid -rezeptor gehemmt werden (112,113,114,115,116). Die anti – inflammatorische Wirkung von Glukokortikosteroiden kann grundsätzlich über zwei Möglichkeiten erfolgen. Einerseits kann die Transkription proinflammatorischer Gene gehemmt werden: die Synthese einer großen Zahl pro – inflammatorischer Cytokine wird unter dem Einfluss von Glukokortikosteroiden gedrosselt (177). Andererseits kann aber auch die Transkription anti – inflammatorischer Gene gesteigert werden. So kommt es unter Glukokortikosteroiden zu einer vermehrten Synthese anti – inflammatorischer Mediatoren wie Lipocortin 1, SLPI (secretory leucocyte protease

Inhibitor), I κ B (welches NF- κ B hemmt) oder IL-10 sowie zu einer vermehrten Expression von β_2 – Rezeptoren. (**Abb. 30**).

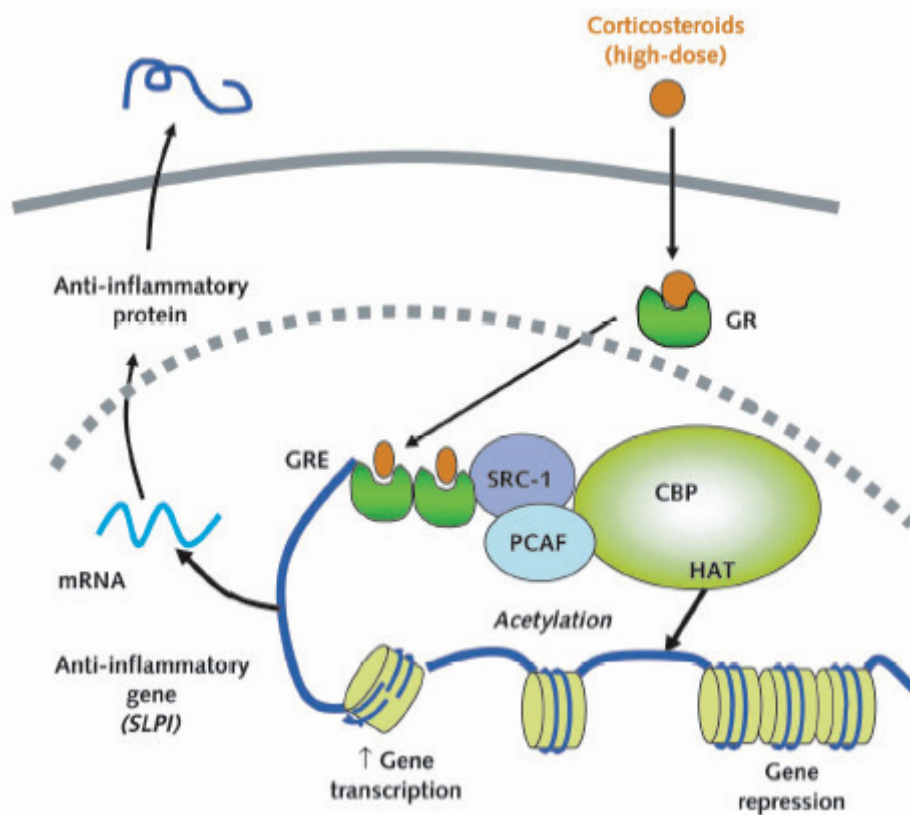


Abb. 30 Wirkung von Glukokortikosteroiden auf die Genexpression

Glukokortikosteroide binden intrazellulär an Glukokortikosteroidrezeptoren (GR), die im Zellkern dann an sogenannte "glucocorticoid response elements" (GRE) in den Promoterregionen steroid – sensitiver Gene binden. Glukokortikosteroide können auch (direkt oder indirekt) an ko – ativierende Moleküle wie CBP, PCAF oder SRC-1 binden, die über ihre Histon Acetyltransferase (HAT) Aktivität die Genexpression in anti – inflammatorischer Proteine wie SLPI (secretory leukoprotease inhibitor) steigern können. (Adaptiert nach Barnes et al., Ann Intern Med 2003 (91)).

Glukokortikosteroide beeinflussen über die genannten Mechanismen die Anzahl und Aktivität einer Reihe von Entzündungszellen: sie verkürzen die Überlebenszeit und reduzieren die Proliferation von Immunzellen (185,137) und hemmen die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Immunzellen (117,118,120). Andererseits beeinflussen Glukokortikosteroide aber auch Strukturzellen, wie Epithelzellen, Endothelzellen, Drüsen und glatte Muskelzellen. So können sie beim Asthma unter anderem die Endotheldurchlässigkeit verringern, zu einer vermehrten Expression von β_2 – Rezeptoren auf Muskelzellen führen und die Schleimsekretion der Schleimdrüsen reduzieren (**Abb. 31**). Die Wirkung der Glukokortikosteroide ist daher sowohl auf molekularer Ebene als auch auf zellulärer Ebene sehr komplex. Diese Bandbreite an Wirkungen in Organen wie der Lunge erklärt den Erfolg der Glukokortikosteroide in der Asthmatherapie: es werden sowohl Entzündungszellen

als auch Strukturzellen positiv beeinflusst. Spezifische Therapieansätze, die nur die Entzündungszellen bekämpfen, sind in der Asthmatherapie weniger erfolgreich (45).

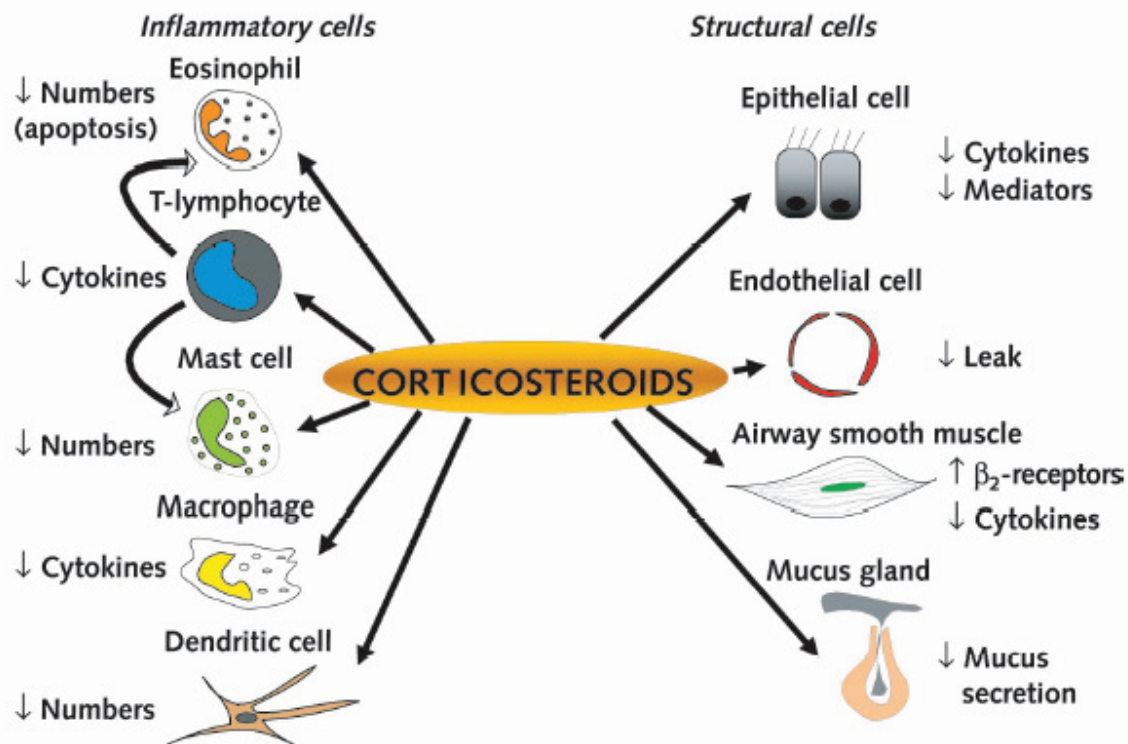


Abb. 31 Die zelluläre Bandbreite der Glukokortikosteroid – Wirkungen

Glukokortikosteroide beeinflussen sowohl Immunzellen als auch Strukturzellen in Organen wie der Lunge (Adaptiert nach Barnes et al., Ann Intern Med 2003 (91)).

4.4 Einfluss von Glukokortikosteroiden auf die BDNF – Sekretion

Zum Einfluss von Glukokortikosteroiden auf die BDNF – Produktion oder BDNF – Sekretion ist bislang wenig bekannt. Einige neurologische Arbeiten zeigten, dass Glukokortikosteroide das BDNF – codierende Gen in Neuronen des Hippocampus hemmen können (182,183,184). Andere Arbeiten zeigten einen Einfluss von Glukokortikosteroiden auf die NGF – Freisetzung von Immunzellen (188). Glukokortikosteroide können die BDNF – Serum-Spiegel, die die Beladung der Thrombocyten mit BDNF widerspiegeln, bei Patienten mit Asthma senken (160). Zur Wirkung von Glukokortikosteroiden auf die BDNF – Sekretion von Immunzellen lagen jedoch bislang keine Daten vor.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde erstmals der Einfluss von Glukokortikosteroiden auf die BDNF – Sekretion mononukleärer Zellen des humanen

Blutes systematisch untersucht. Es zeigte sich, dass Glukokortikosteroide wie Dexamethason, Prednisolon und Fluticason dosisabhängig die BDNF – Sekretion mononukleärer Zellen gesunder Kontrollprobanden hemmen. Im Vergleich der Glukokortikosteroide untereinander zeigte Fluticason die stärkste Suppression der BDNF-Sekretion.

Zirkulierende mononukleäre Zellen von Patienten mit akuten entzündlichen Erkrankungen zeigten eine Tendenz zu einer verstärkten basalen Sekretion von BDNF im Vergleich zu zirkulierenden mononukleären Zellen von gesunden Kontrollprobanden (insbesondere nach TNF- α – Stimulation), dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Somit scheint die in der Literatur beschriebene starke lokale Überexpression von BDNF in Entzündungsgebieten vor allem durch die Zunahme der Anzahl lokaler Immunzellen als auch durch eine lokale Aktivierung von Immunzellen bedingt zu sein. Unsere Untersuchungen zum Einfluss von Dexamethason, Prednisolon und Fluticason auf BDNF – Sekretion der mononukleären Zellen von Patienten mit akuten entzündlichen Erkrankungen zeigten, dass das Ausmass der Suppression der BDNF – Sekretion durch Glukokortikosteroide mit gesunden Kontrollprobanden durchaus vergleichbar war. Somit scheinen auch die aktivierten Immunzellen von Patienten mit akuten entzündlichen Erkrankungen bezüglich der BDNF – Sekretion steroid-sensitiv zu sein.

Sowohl bei gesunden Kontrollprobanden als auch bei Patienten mit akuten entzündlichen Erkrankungen erwies sich das topische Steroid Fluticason auf molarer Basis als der potenteste Suppressor der BDNF – Sekretion. Topische Steroide wie Fluticason werden sehr erfolgreich in der Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale eingesetzt. Aufgrund ihrer geringen oralen Bioverfügbarkeit und hoher lokaler Wirkstoffkonzentrationen und somit geringer systemischer Nebenwirkungen werden topische Steroide der systemischen Therapie mit Glukokortikosteroiden (wie Prednisolon und Dexamethason) vorgezogen. Da BDNF eine wichtige Rolle in der Pathogenese der bronchialen Hyperreagibilität beim Asthma spielt, könnte die hohe BDNF – suppressorische Potenz von Fluticason den therapeutischen Erfolg von Fluticason in der Asthma-Therapie teilweise erklären.

4.5 Auswirkungen der BDNF – Suppression durch Glukokortikosteroide

BDNF ist von entscheidender Bedeutung für die neuronale Entwicklung in der pränatalen und perinatalen Periode (3)(163,5). Desweiteren spielt BDNF eine wichtige Rolle in der Protektion und Regeneration von Nerven bei chronischen und akuten Gewebsschädigungen im erwachsenen Organismus. So trägt BDNF zur Regeneration und zur Verhinderung von Apoptose verletzter Neurone bei (168,169,170,171,172). BDNF kann bei Verletzungen oder Schädigungen der Nerven durch die Neurone selbst oder durch Schwann-Zellen bereitgestellt werden (186,187). Auch infiltrierende Immunzellen können durch eine BDNF – Sekretion Neurone vor chronischen Schäden oder Apoptose bewahren. Bei der Multiplen Sklerose wird der BDNF – Freisetzung aus Immunzellen eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben (106). Bei der Meningoencephalitis werden die erhöhten BDNF – Liquorspiegel ebenfalls mit einer neuroprotektiven Rolle in Verbindung gebracht (158). Eine durch Neurotrophine vermittelte Re – Innervation geschädigter Schleimhaut wird als wichtiger Teil der Mukosaregeneration im Rahmen entzündlicher Darmerkrankungen wie der Colitis ulcerosa angesehen (124, 175). Insofern könnte eine Hemmung der BDNF – Sekretion durch Glukokortikosteroide negative Auswirkungen haben, da neuroprotektive Mechanismen unterdrückt werden könnten (**Abb. 32**). Ein Beispiel dafür ist die Suppression der BDNF – Expression durch Dexamethason im ZNS (182,183,184). Bei Kindern, die als Frühgeborene hohen Dexamethason Dosen ausgesetzt waren, wurde eine spätere Beeinträchtigung ihrer motorischen und kognitiven Fähigkeiten beobachtet. Diese könnte im Zusammenhang mit einer Dexamethason – bedingten Verminderung der BDNF – Sekretion stehen (176).

Die Überexpression von BDNF durch Immunzellen in chronisch entzündlichen Erkrankungen scheint jedoch in vielen Fällen über das Ziel (Neuropotektion) hinauszuschießen und eine Hypersensitivität bzw. Hyperreagibilität der Neurone zu induzieren. So führt BDNF nach lokaler Injektion in die Haut zu einer Hyperalgesie (130). Bei chronischer Pankreatitis könnte BDNF zum Schmerzempfinden beitragen (178,179). Die Hyperalgesie nach BDNF – Exposition beruht nicht nur auf einer lokalen Neuromodulation. Durch retrograden Transport des Neurotrophins aus der Peripherie in das Rückenmark kommt es durch eine Modulation zentralnervöser

Strukturen auch zu einer Hypersensitivität auf Rückenmarksebene (173,138,129). Bei Harnblasenentzündungen wird BDNF in Zusammenhang mit einer postinflammatorischen Hyperreflexie des Organs gebracht (162). Bei allergischem Asthma und bei infektiösen Atemwegserkrankungen wird die lokale Überexpression von BDNF für die Hyperreagibilität und Obstruktion der Atemwege verantwortlich gemacht (132, 180, 136, 125, 155). Die Hyperreagibilität der Neurone könnte zudem durch die lokale Freisetzung von Neuropeptiden selbst zu einer verstärkten Entzündung beitragen. Eine Suppression von BDNF durch Glukokortikosteroide könnte daher bei akuten und chronischen Entzündungen die postinflammatorische Hyperalgesie, die Hyperreagibilität anatomischer Strukturen (wie der Atemwege) sowie indirekt die Entzündung positiv beeinflussen. Somit ergibt sich aus den Literaturdaten und den Ergebnissen der vorliegenden Promotionsarbeit eine Zweiseitigkeit der Glukokortikosteroid-Therapie beim Menschen: es könnten einerseits Neuroprotektion behindert und andererseits Schmerzen, Atemwegsobstruktionen und eine Chronifizierung der Entzündung verhindert werden (**Abb. 32**).

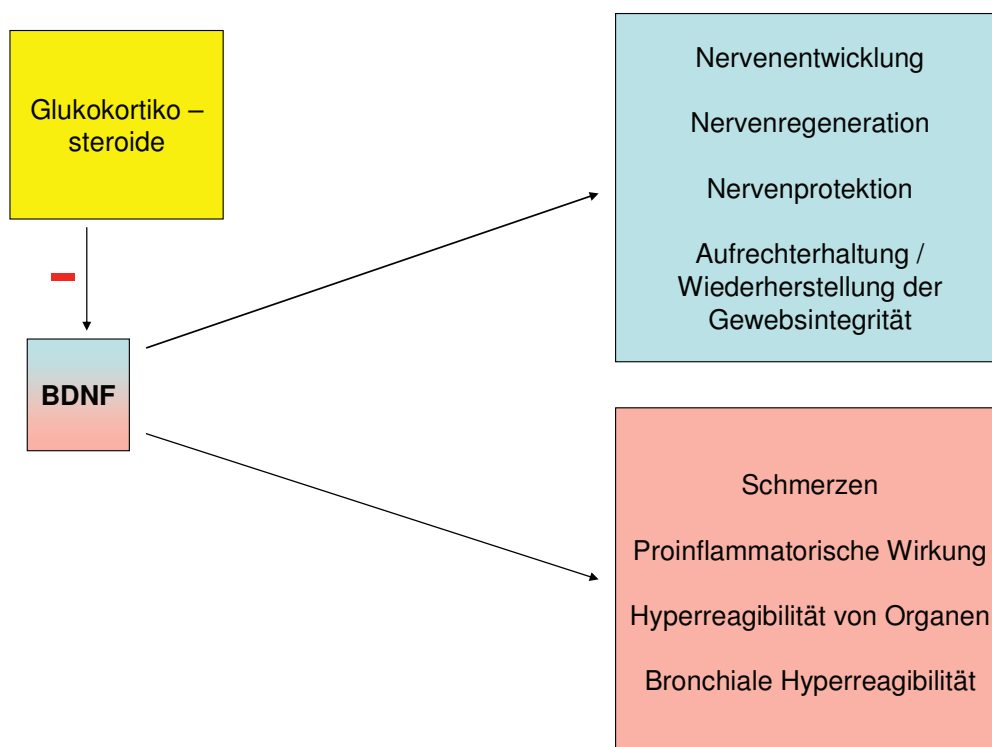


Abb. 32 Die Janusköpfigkeit der BDNF – Suppression durch Glukokortikosteroide

Die Suppression der BDNF – Sekretion durch Glukokortikosteroide könnten sowohl die positiven (blau) als auch die negativen Auswirkungen (rot) von BDNF bei chronisch entzündlichen Erkrankungen hemmen

5 Schlussfolgerung und Hypothese

BDNF ist ein Mediator neuronaler Plastizität, der bei entzündlichen Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale postinflammatorische neurologische Dysfunktionen (wie eine bronchiale Hyperreagibilität) auslösen kann. In der vorliegenden Promotionsarbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Glukokortikosteroide Dexamethason, Prednisolon und Fluticason die BDNF – Sekretion mononukleärer Zellen des humanen peripheren Blutes dosisabhängig hemmen, und dass innerhalb der Glukokortikosteroide das topische Steroid Fluticason auf molarer Basis die stärkste Suppression der BDNF – Sekretion zeigt. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass ein Teil der positiven Wirkungen von Steroiden in entzündlichen Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale auf einer Hemmung von BDNF und einer nachfolgenden Dämpfung der neuronalen Hypersensitivität und Hyperreagibilität beruht. Da BDNF in Entzündungsprozessen jedoch auch neuroprotektive Funktionen hat, ist eine Corticoid – Therapie bezüglich der neuronalen Integrität mit Risiken behaftet. Es sind daher weitere Studien vonnöten, die die genauen Auswirkungen einer Glukokortikosteroid – Therapie auf die Funktionalität und Integrität BDNF – abhängiger neuronaler Strukturen in entzündlichen Erkrankungen beleuchten.

6 Publikationsliste

- 1 Nolte D. Asthma: Das Krankheitsbild, der Asthmapatient, die Therapie. Urban und Schwarzenberg, 1998.
- 2 Braun A, Lommatzsch M, Renz H. The Role of neurotrophins in allergic bronchial asthma. *Clin Exp Allergy*. 2000; 30: 178-86.
- 3 Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*. 1996;19: 289-317.
- 4 Kerr BJ, Bradbury EJ, Bennet DL, Trivedi PM, Dassan P, French J, Shelton DB, McMahon SB, Thompson SW. Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA – evoked responses in the rat spinal cord. *J Neurosci*. 1999; 19: 5138 – 5148.
- 5 Lommatzsch M, Braun A, Mannsfeldt A, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Paus R, Fischer A, Lewin GR, Renz H. Abundant production of brain – derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. Implications for paracrine and target – derived neurotrophic functions. *Am J Pathol*. 1999; 155: 1183-1193.
- 6 McAllister AK, Katz LC, I Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 1999; 22: 295-318.
- 7 Braun A, Lommatzsch M, Mannsfeldt A, Neuhaus – Steinmetz U, Fischer A, Schnoy N, Lewin G R, Renz H. Cellular sources of enhanced brain – derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. *Am J Resp Cell Mol Biol*. 1999; 21: 537-546.
- 8 Schulte - Herbrüggen O, Nassenstein C, Lommatzsch M, Quarrcoo D, Renz H, Braun A. Tumor necrosis factor – alpha and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes. *Journal of neuroimmunology*. 2005; 160: 204-209.
- 9 Bundesärztekammer, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, Kassenärztliche Bundesvereinigung. Nationale Versorgungs - Leitlinie Asthma 2005.
- 10 Schriftenreihe der Ärztlichen Zentralstelle Qualitätssicherung, München, Wien. Leitlinien Clearing Bericht "Asthma bronchiale". Zuckschwerdt Verlag 2001.
- 11 Weiland SK, Pearce N. Asthma prevalence in adults: good news? *Thorax*. 2004; 59: 637-638.
- 12 Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2003. Wiesbaden 2005; Fachserie 12.
- 13 Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. Review. *N Engl J Med*. 2001; 344: 350-62.
- 14 Haley KJ, Sunday ME, Wiggs BR, et al. Inflammatory cell distribution within and along asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 158: 565-72.
- 15 Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 154: 1505-10.
- 16 Vignola AM, Chanez P, Campbell AM et al. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157: 403-9.
- 17 Hamid QA, Minshall EM. Molecular pathology of allergic disease: I: Lower airway disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 105: 20-36.
- 18 Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax*. 1999; 54: 825-57.
- 19 McWilliam AS, Nelson DJ, Holt PG. The biology of airway dendritic cells. *Immunol Cell Biol*. 1995; 73: 405-13.

- 20 Noah TL, Becker S. Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Clin Immunol.* 2000; 97: 43-9.
- 21 Bacharier LB, Jabara H, Geha RS. Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998; 115: 257-69.
- 22 Siraganian RP. Biochemical events in basophil or mast cell activation and mediator release. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles & practice.* St. Louis: Mosby-Year Book 1998; 1: 204-27.
- 23 Broide DH. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108: 65-71.
- 24 Banchereau J, Briere F, Caux C. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 767-811.
- 25 Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet.* 2006; 368: 804-13.
- 26 Graziani-Bowering GM, Graham JM, Fillion LG. A quick, easy and inexpensive method for the isolation of human peripheral blood monocytes. *Journal of Immunological Methods.* 1997; 207: 157-168.
- 27 Pawankar R, Okuda M, Yssel H, Okumura K, Ra C. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest.* 1997; 99: 1492-9.
- 28 Pawankar R, Yamagishi S, Yagi T. Revisiting the roles of mast cells in allergic rhinitis and its relation to local IgE synthesis. *Am J Rhinol.* 2000; 14: 309-17.
- 29 Russi EW, Perruchoud AP, Yerger LD, Stevenson YS, Tabak J, Marchette B, Abraham WM. Late phase bronchial obstruction following nonimmunologic mast cell degranulation. *J Appl Physiol.* 1984; 57: 1182-1189.
- 30 Costa JJ, Galli SJ. Mast cells and basophils. *Clinical Immunology.* 1996; 408-430.
- 31 Mark DA, Donovan CE, De Sanctis GT, et al. B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) have complementary roles in mediating allergic pulmonary inflammation and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000; 22: 265-71.
- 32 Ritz SA, Gajewska BU, Stampfli MR, Jordana M. Determinants of the immune-inflammatory response in allergic airway inflammation: overview of antigen presentation and cellular activation. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106: 206-12.
- 33 Haczku A, Takeda K, Redai I, Hamelmann E, Cieslewicz G, Joetham A, Loader J, Lee JJ, Irvin C, Gelfand EW. Anti-CD86 (B7.2) treatment abolishes allergic airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159: 1638-43.
- 34 Hamid QA, Cameron LA. Recruitment of T cells to the lung in response to antigen challenge. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106: 227-34.
- 35 Simon HU, Blaser K. Immunologische Grundlagen des Asthma Bronchiale. *Internist.* 1999; 40: 849-854.
- 36 Zimmerman TS, Spiegelberg HL. Pneumococcus - induced serotonin release from human platelets. Identification of the participating plasma/serum factor as immunoglobulin. *J Clin Invest.* 1975; 56: 828-34.
- 37 Yaguchi A, Lobo FL, Vincent JL et al. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost.* 2004; 2: 2096-102.
- 38 Kon OM, Kay AB. T cells and chronic Asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999; 118: 133 - 135.

-
- 39 Teranm LM, Mochizuki M, Bartels J, Valencia EL, Nakajima T, Hirai K, Schroeder JM. Th1 and Th2 – type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20: 1044 – 1549.
- 40 Lommatzsch M, Julius P, Kuepper M, Garn H, Bratke K, Irmscher S, Luttmann W, Renz H, Braun A, Virchow JC. The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118: 91-7.
- 41 Kaliner MA, Pathogenesis of asthma. *Clinical Immunology.* 1996; 909-923.
- 42 Chou CC, Huang MS, Hsieh KH, Chiang BL. Reduced IL – 12 level correlates with decreased IFN – gamma secreting T cells but not natural killer cell activity in asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immun.* 1999; 82: 1081-1206.
- 43 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Immunologie.* Verlag Hans Huber 1996.
- 44 Finotto S, Galle PR, Neurath F. Zur Immunpathogenese des Asthma bronchiale. *Pneumonologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart* 2000; 54: 412-418.
- 45 Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ, Barnes PJ. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyperresponsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet.* 2000; 356: 2144-8.
- 46 Bousquet J, Chanez P, Lacoste LY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony – Lafontaine J, Godard P, Michel FB. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med.* 1990; 323: 1033-1039.
- 47 Grootendorst DC, van den Bos JW, Romeijn JJ, et al. Induced sputum in adolescents with severe stable asthma. Safety and the relationship of cell counts and eosinophil cationic protein to clinical severity. *Eur Respir J.* 1999; 13: 647-53.
- 48 Hughes JM, Rimmer SJ, Salome CM et al. Eosinophilia, interleukin-5, and tumour necrosis factor-alpha in asthmatic children. *Allergy* 2001; 56 :412-8.
- 49 Dent LA, Strath M, Mellor AL, Sanderson CJ. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med.* 1990; 172: 1425-1431.
- 50 Virchow JC, Lommatzsch M. Anti – cholinergic agents in asthma. *Therapeutic strategies Asthma : current treatments.* Atlas Medical Publishing. 2006; 79–91.
- 51 Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6: 603-14.
- 52 Vega JA, García-Suárez O, Hannestad J, Pérez-Pérez M, Germanà A. Neurotrophins and the immune system. *J Anat.* 2003; 203: 1-19.
- 53 Mayer S. Der Einfluß der Neurotrophine NGF und BDNF auf die Migration humaner eosinophiler und neutrophiler Granulozyten. *Dissertation* 2002.
- 54 Eschenbacher WL, Gravelyn TR. A technique for isolated airway segment lavage. *Chest.* 1987; 92: 105-109.
- 55 Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest.* 1987; 79: 319-326.
- 56 Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* 2005; 115: 3378-84.
- 57 Thomas PS. Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunol Cell Biol.* 2001; 79: 132– 140.

-
- 58 Udem BJ, Kajekar R, Hunter DD, Myers AC. Neural integration and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106: 213-20.
- 59 Udem BJ, Hunter DD, Liu M, Haak-Frendscho M, Oakragly A, Fischer A. Allergen-induced sensory neuroplasticity in airways. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999; 118: 150-3.
- 60 Blames, PJ. Neuronal control of human airways in health and disease. *Am Rev Resp Dis.* 1986; 134: 1289-1314.
- 61 Richardson, JB. Nerve supply to the lungs. *Am Rev Respir Dis.* 1979; 119: 785-802.
- 62 Zaagsma J, van der Heijden PJ, van der Schaar MW, Bank CM. Comparison of functional betaadrenoceptor heterogeneity in central and peripheral airway smooth muscle of guinea pig and man. *J Recept Res.* 1983; 3: 89-106.
- 63 Kalia M, Mesulam MM. Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: I. The cervical vagus and nodose ganglion. *J Comp Neurol.* 1980; 193: 435-65.
- 64 Verleden GM. Neuronal mechanisms and axon reflexes in asthma. Where are we? *Biochem Pharmacol.* 1996; 51: 1247-1257.
- 65 Mann SP. The Innervation of mammalian bronchial smooth muscle: the localisation of catecholamines and cholinesterases. *Histochem J.* 1971; 3: 319-31.
- 66 Iwamoto I, Nakagawa N, Yamazaki H, Kimura A, Tomioka H, Yoshida S. Mechanism for substance – P – induced activation of human neutrophils and eosinophils. *Regul Pept.* 1993; 46: 228-330.
- 67 Boichot E, Lagente V, Paubertbraquet M, Frossard N. Inhaled substance – P induces activation of alveolar macrophages and increases airway responses in the guinea pig. *Neuropeptides.* 1993; 25: 307-313.
- 68 Lundberg JM, Hemsén A, Larsson O, Rudehill A, Saria A, Fredholm BB. Neuropeptide Y receptor in pig spleen: binding characteristics, reduction of cyclic AMP formation and calcium antagonistinhibition of vasoconstriction. *Regul Pept.* 1988; 20: 125-39.
- 69 Widdicombe JG. Autonomic Regulation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158: 171-175.
- 70 Fischer A, Mundel P, Mayer B, Preissler U, Philippin B, Kummer W. Nitric oxide synthase in guinea pig lower airway innervation. *Neurosci Lett.* 1993; 149: 157-160.
- 71 Karlsson JA, Finney MJ, Persson CG, Post C. Substance P antagonists and the role of tachykinins in non-cholinergic bronchoconstriction. *Life Sci.* 1984; 35: 2681-91.
- 72 Lundberg JM, Modlin A. Neuropeptide Y in the airways. In Kaliner MA, Barnes PJ, Kunkel GHH, Baraniuk JN, editors. *Neuropeptides in Respiratory Medicine.* 1994; 161-172.
- 73 Li CG, Rand MJ. Evidence that part of the NANC relaxant response of the guinea-pig trachea to EFS is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1991; 102: 91-94.
- 74 Lundberg JM, Terenius L, Hokfelt T, Goldstein M. High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci Lett.* 1983; 42: 167-72.
- 75 Bowden JJ, Gibbins IL. Vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y coexist in non-noradrenergic sympathetic neurons to guinea pig trachea. *J Auton Nerv Syst.* 1992; 38: 1-19.

-
- 76 Kostreva DR, Zuperku EJ, Hess GL, Coon RL, Kampine JP. Pulmonary afferent activity recorded from sympathetic nerves. *J Appl Physiol.* 1975; 39: 37-40.
- 77 Saria A, Martling CR, Yan Z, Theodorsson-Norheim E, Gamse R, Lundberg JM. Release of multiple tachykinins from capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung by bradykinin, histamine, dimethylphenyl piperazinium, and vagal nerve stimulation. *Am Rev Respir Dis.* 1988; 137: 1330-5.
- 78 Inoue H, Koto H, Takata S, Aizawa H, Ikeda T. Excitatory role of axon reflex in bradykinin – induced contraction of guinea pig tracheal smooth muscle. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 146: 1548-1552.
- 79 Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodelling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 1720-1745.
- 80 Blyth DI, Pedrick MS, Savage TJ, Bright H, Beesley JE, Sanjar S. Induction, duration, and resolution of airway goblet cell hyperplasia in a murine model of atopic asthma: effect of concurrent infection with respiratory syncytial virus and response to dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998; 19: 38-54.
- 81 Hogan SP, Mould A, Kikutani H, Ramsay AJ, Foster PS. Aeroallergen-induced eosinophilic inflammation, lung damage, and airways hyperreactivity in mice can occur independently of IL-4 and allergen-specific immunoglobulins. *J Clin Invest.* 1997; 99: 1329-1339.
- 82 Kay AB. Pathology of mild, severe, and fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154: 66-69.
- 83 Lambrecht BN, Salomon B, Klatzmann D, Pauwels RA. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J Immunol.* 1998; 160: 4090-4097.
- 84 Bayas A, Kruse N, Moribadi NF, Weber F, Hummel V, Wohleben G, et al. Modulation of cytokine mRNA expression of brain – derived neurotrophic factor and nerve growth factor in human immune cells. *Neurosci Lett.* 2003; 335: 155 – 158.
- 85 Baumgarten CR, Witzel A, Kleine-Tebbe J, Kunkel G. Substance P enhances antigen-evoked mediator release from human nasal mucosa. *Peptides.* 1996; 17: 25-30.
- 86 Kaltreider HB, Ichikawa S, Byrd PK, Ingram DA, Kishiyama JL, Sreedharan SP, Warnock ML, Beck JM, Goetzl EJ. Upregulation of neuropeptides and neuropeptide receptors in a murine model of immune inflammation in lung parenchyma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997; 16: 133-144.
- 87 Barnes PJ. Neuroeffector mechanisms: The interface between inflammation and neuronal responses. *J Allergy Clin Immunol.* 1996; 98: 73-81.
- 88 Cheung D, van der Veen H, den Hartigh J, Dijkman JH, Sterk PJ. Effects of inhaled substance P on airway responsiveness to methacholine in asthmatic subjects in vivo. *J Appl Physiol.* 1994; 77: 1325-1332.
- 89 Germonpre PR, Joos GF, Pauwels RA. Modulation by 5-HT_{1A} receptors of the 5-HT₂ receptor-mediated tachykinin-induced contraction of the rat trachea in vitro. *Br J Pharmacol.* 1998; 123: 1571-1578.
- 90 Joos GF, Germonpre PR, Pauwels RA. Neural mechanisms in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2000; 30: 60-65.
- 91 Barnes PJ, Adcock IM. How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med.* 2003; 139: 359-70.

-
- 92 Hamburger V. The history of the discovery of the nerve growth factor. *J Neurobiol.* 1993; 24: 893-7.
 - 93 Levi – Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 1987; 237: 1154 – 1162.
 - 94 Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982; 1: 549 – 553.
 - 95 Rosenthal A, Goeddel DV, Nguyen T, Martin E, Burton LE, Shih A, Laramée GR, Wurm F, Mason A, Nikolics K, Winslow JW. Primary structure and biological activity of human brain - derived neurotrophic factor. *Endocrinology.* 1991; 129: 1289 – 1294.
 - 96 Maisonpierre PC, Le Beau MM, Espinosa R, Ip NY, Belluscio L, de la Monte SM, Squinto S, Furth ME, Yancopoulos GD. Human and rat brain derived neurotrophic factor and neurotrophin 3: gene structures, distributions and chromosomal localisations. *Genomics.* 1991; 10: 558-568.
 - 97 Cohen S. Purification of a nerve growth factor promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1960; 64: 302-311.
 - 98 Levi-Montalcini R, Booker B. Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1960; 46: 384-391.
 - 99 Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Essential role of nerve growth factor in the survival and maintenance of dissociated sensory and sympathetic embryonic nerve cells in vitro. *Dev Biol.* 1963; 7: 653-659.
 - 100 Levi Montalcini R, Dal Toso R, della Valle F, Skaper SD, Leon A. Update of the NGF saga. *J Neurol Sci.* 1995; 130: 119-127.
 - 101 Klein R, Bandtlow CE. Neurotrophe Faktoren. *Klinische Neurobiologie Spektrum Verlag* 1997; 39-60.
 - 102 Aloe L, Bracci – Lauderio L, Bonini S, Manni L. The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy.* 1997; 55: 883 – 894.
 - 103 Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol.* 1994; 25: 1386-1403.
 - 104 Tam SY, Tsai M, Yamaguchi M, Yano K, Butterfield JH, Galli SJ. Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC – 1 human mast cell line and in human mast cells. *Blood.* 1997; 90: 1807-1820.
 - 105 Nassenstein C. Die Bedeutung von Neurotrophinen für die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale. *Dissertation* 2000.
 - 106 Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R. Activated human T cells, B cells and monocytes produce brain – derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation ? *J Exp Med.* 1999; 189: 865 – 870.
 - 107 Otten U, März P, Heese K, Hock C, Kunz D, Rose-John S. Cytokines and neurotrophins interact in normal and diseased states. *Ann NY Acad Sci.* 2000; 917: 322-30.
 - 108 Stanisiz AM, Stanisiz JA. Nerve growth factor and neuroimmune interactions in inflammatory diseases. *Ann NY Acad Sci.* 2000; 917: 268-72.
 - 109 Aalto K, Korhonen L, Lahdenne P, Pelkonen P, Lindholm D. Nerve growth factor in serum of children with systemic lupus erythematosus is correlated with disease activity. *Cytokine.* 2002; 20: 136-9.

-
- 110 Johansson M, Norrgård O, Forsgren S. Study of expression patterns and levels of neurotrophins and neurotrophin receptors in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2007; 13: 398-409.
- 111 Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. *Pharmakologie und Toxikologie* BI Wissenschaftsverlag 1992.
- 112 Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammation. *N Engl J Med.* 1997; 336: 1066–1071.
- 113 Barnes PJ, Adcock IM. NF- κ B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 1997; 18: 46–50.
- 114 Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 752–756.
- 115 Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS. Characterization of the mechanisms involved in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol.* 1996; 15: 943–953.
- 116 Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson JÅ, van der Saag P. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol.* 1995; 9: 401–412.
- 117 Linden M, Brattsand R. Effects of a corticosteroid, budesonide, on alveolar macrophages and blood monocyte secretion of cytokines: differential sensitivity of GM-CSF, IL-1b and IL-6. *Pulm Pharmacol.* 1994; 7: 43–47.
- 118 Fuller R W, Kelsey CR, Cole PJ, Dollery CT, Macdermott J. Dexamethasone inhibits the production of thromboxane B2 and leukotriene B4 by human alveolar and peritoneal macrophages in culture. *Clin Sci.* 1984; 67: 693–696.
- 119 Bracci Laudiero L, Aloe L, Levi Montalcini R, Buttinelli C, Schilter D, Gillessen S, Otten U. Multiple Sclerosis patients express increased levels of beta-nerve growth factor in cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett.* 1992; 147: 9-12.
- 120 Bergstrand H, Björnson A, Blaschke E, Brattsand R, Eklund A, Larsson K, Linden M. Effects of an inhaled corticosteroid, budesonide, on alveolar macrophage function in smokers. *Thorax.* 1990; 45: 362–368.
- 121 Bracci Laudiero L, Aloe L, Levi Montalcini R, Galeazzi M, Schilter D, Scully JL, Otten U. Increased levels of NGF in sera of systemic lupus erythematosus patients. *Neuroreport.* 1993; 4: 563-565.
- 122 Falcini F, Matucci Cerinic M, Lombardi A, Generini S, Pignone A, Tirassa P, Ermini M, Lepore L, Partsch G, Aloe L. Increased circulating nerve growth factor is directly correlated with disease activity in juvenile chronic arthritis. *Annals of the Rheumatic diseases.* 1996; 55: 745-748.
- 123 Aloe L, Tuveri MA, Carcassi U, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis. *Arthritis Rheumatism.* 1992; 35: 351-355.
- 124 Di Mola FF, Friess H, Zhu ZW, Koliopanos A, Bley T, Di Sebastiano P, Innocenti P, Zimmermann A, Buchler MW. Nerve growth factor and Trk high affinity receptor (TrkA) gene expression in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2000; 46: 670-679.
- 125 Lommatzsch M, Schloetcke K, Klotz J, Schuhbaeck K, Zingler D, Zingler C, Schulte-Herbruggen O, Gill H, Schuff-Werner P, Virchow JC. Brain - derived neurotrophic factor in platelets and airflow limitation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171: 115-20.

-
- 126 Bonini S, Lambiase A, Angelucci F, Magrini L, Manni L, Aloe L. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 10955-10960.
- 127 Virchow JC, Julius P, Lommatzsch M, Luttmann W, Renz H, Braun A. Neurotrophins are increased in bronchoalveolar Lavage fluid after segmental allergen provocation. *Am J Crit Care Med*. 1998; 158: 2002-2005.
- 128 Braun A, Appel E, Baruch R, Herz U, Botchkarev V, Paus R, Brodie C, Renz H. Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur J Immunol*. 1998; 28: 3240-3251.
- 129 Mannion RJ, Costigan M, Decostered I, Amaya F, MA QP, Holstege JC, Ji RR, Acheson A, Lindsay RM, Wilkinson GA, Woolf CJ. Neurotrophins: Peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 9385-9390.
- 130 Shu XQ, Llinas A, Mendell LM. Effects of trkB and trkC neurotrophin receptor agonists on thermal nociception: A behavioural and electrophysiological study. *Pain*. 1999; 80: 463-470.
- 131 Joos G, Pauwels R, van der Straeten M. Effect of inhaled substance P and neurokinin A on the airways of normal and asthmatic subjects. *Thorax*. 1987; 42: 779-83.
- 132 Tortorolo L, Langer A, Polidori G et al. Neurotrophin overexpression in lower airways of infants with respiratory syncytial virus infection. *Am J Resp Crit Care Med*. 2005; 172: 233-237.
- 133 Donnerer J, Schuligoi R, Stein C. Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience*. 1992; 49: 693-698.
- 134 Woolf CJ, Safieh Garabedian B, Ma QP, Crilly P, Winter J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience*. 1994; 62: 327-331.
- 135 Gonzalez M, Collins WF. Modulation of motoneuron excitability by brain derived neurotrophic factor. *J Neurophysiol*. 1997; 77: 502-506.
- 136 Lommatzsch M, Braun A, Renz H. Neurotrophins in allergic airway dysfunction: what the mouse model is teaching us. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 992: 241-249.
- 137 Owen WF, Rothenberg ME, Silberstein DS, Gasson JC, Stevens RL, Austen KF, Soberman RJ. Regulation of human eosinophil viability, density and function by granulocyte / macrophage colony stimulating factor in the presence of 3T3 fibroblasts. *J Exp Med*. 1987; 166: 129-141.
- 138 Cho HJ, Kim SY, Park MJ, Kim DS, Kim JK, Chu MY. Expression of mRNA for brain-derived neurotrophic factor in the dorsal root ganglion following peripheral inflammation. *Brain Res*. 1997; 749: 358-362.
- 139 Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol*. 1992; 119: 45-54.
- 140 Lindsay RM, Harmor AJ. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature*. 1989; 337: 362-364.
- 141 Vedder H, Affolter HU, Otten U. Nerve growth factor (NGF) regulates tachykinin gene expression and biosynthesis in rat sensory neurons during early postnatal development. *Neuropeptides*. 1993; 24: 351-537.

-
- 142 Tauber SC, Stadelmann C, Spreer A, et al. Increased expression of BDNF and proliferation of dentate granule cells after bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005; 64: 806-815.
- 143 Winter J. Brain derived neurotrophic factor, but not nerve growth factor, regulates capsaicin sensitivity of rat vagal ganglion neurones. *Neurosci Lett.* 1998; 241: 21-24.
- 144 Helke CJ, Adryan KM, Fedorowicz J et al. Axonal transport of neurotrophins by visceral afferent and efferent neurons of the vagus nerve of the rat. *J Comp Neurol.* 1998; 393: 102-117.
- 145 Aloe L, Levi Montalcini R. Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor. *Brain Res.* 1977; 133: 358-366.
- 146 Horigome K, Bullock ED, Johnson EM Jr. Effects of nerve growth factor on rat peritoneal mast cells. Survival promotion and immediate-early gene induction. *J Biol Chem.* 1994; 269: 2695-2702.
- 147 Susaki Y, Shimizu S, Katakura K et al. Functional properties of murine macrophages promoted by nerve growth factor. *Blood.* 1996; 88: 4630-4637.
- 148 Kannan Y, Matsuda H, Ushio H, Kawamoto K, Shimada Y. Murine granulocyte - macrophage and mast cell colony formation promoted by nerve growth factor. *Int Arch Allergy Immunol.* 1993; 102: 362-367.
- 149 Matsuda H, Kannan Y, Ushio H et al. Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells. *J Exp Med.* 1991; 174: 7-14.
- 150 Welker P, Grabbe J, Grutzkau A, Henz BM. Effects of nerve growth factor (NGF) and other fibroblast-derived growth factors on immature human mast cells (HMC-1). *Immunology.* 1998; 94: 310-317.
- 151 Hamada A, Watanabe N, Ohtomo H, Matsuda H. Nerve growth factor enhances survival and cytotoxic activity of human eosinophils. *Br J Haematol.* 1996; 93: 299-302.
- 152 Otten U, Ehrhard P, Peck R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86: 10059-63.
- 153 Thorpe LW, Perez Polo JR. The influence of nerve growth factor on the in vitro proliferative response of rat spleen lymphocytes. *J Neurosci Res.* 1987; 18: 134-139.
- 154 Brodie C, Gelfand EW. Regulation of immunoglobulin production by nerve growth factor: comparison with anti-CD40. *J Neuroimmunol.* 1994; 52: 87-96.
- 155 Braun A, Lommatzsch M, Neuhaus-Steinmetz U, Quarcoo D, Glaab T, McGregor GP, Fischer A, Renz H. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) contributes to neuronal dysfunction in a model of allergic airway inflammation. *Br J Pharmacol.* 2004; 141: 431-440.
- 156 Nemoto K, Fukamachi K, Nemoto F et al. Gene expression of neurotrophins and their receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Com.* 1998; 245: 284-288.
- 157 Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R et al. Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol.* 1995; 147: 309-324.
- 158 Chiaretti A, Antonelli A, Piastra M et al. Expression of neurotrophic factors in cerebrospinal fluid and plasma of children with viral and bacterial meningoencephalitis. *Acta Paediatr.* 2004; 93: 1178-1184.

-
- 159 Zhu ZW, Friess H, Wang L, Zimmermann A, Büchler MW. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is upregulated and associated with pain in chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci.* 2001; 46: 1633-9.
- 160 Noga O et al. The influence of inhalative corticosteroids on circulating nerve growth factor, brain derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in allergic asthmatics. *Clin Exp Allergy.* 2001; 31: 1906-1912.
- 161 Raap U, Werfel T, Goltz C, Deneka N, Langer K, Bruder M, Kapp A, Schmid-Ott G, Wedi B. Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with disease severity in the intrinsic type of atopic dermatitis. *Allergy.* 2006; 61: 1416-8.
- 162 Oddiah D, Anand P, McMahon SB, Rattray M. Rapid increase of NGF, BDNF and NT-3 mRNAs in inflamed bladder. *Neuroreport.* 1998; 9: 1455-8.
- 163 Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24: 677-736.
- 164 Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost.* 2002; 87: 728-34.
- 165 Yamamoto H, Gurney ME. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci.* 1990; 10: 3469-78.
- 166 Pliego-Rivero FB, Bayatti N, Giannakoulopoulos X, Glover V, Bradford HF, Stern G et al. Brain-derived neurotrophic factor in human platelets. *Biochem Pharmacol.* 1997; 54: 207-9.
- 167 Begolka WS, Miller SD. Cytokines as intrinsic and exogenous regulators of pathogenesis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Res Immunol.* 1998; 149: 771–781.
- 168 Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA. Brain – derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature.* 1992; 360: 757-759.
- 169 Yan Q, Elliott J, Snider WD. Brain – derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy – induced cell death. *Nature.* 1992; 360: 753-755.
- 170 Gravel C, Götz R, Lorrain A, Sendtner M. Adenoviral gene transfer of ciliary neurotrophic factor and brain – derived neurotrophic factor leads to long – term survival of axotomized motor neurons. *Nat Med.* 1997; 3: 765-769.
- 171 Kobayashi NR, Fan DP, Giehl KM, Bedard AM, Wiegand SJ, Tetzlaff W. BDNF and NT – 4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP – 43 and T α 1-tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *J Neurosci.* 1997; 17: 9583-9595.
- 172 Mc Tigue DM, Horner PJ, Stokes BT, Gage FH. Neurotrophin 3 and brain – derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurosci.* 1998; 18: 5354 – 5365.
- 173 Cho HJ, Kim SY, Zhou XF, Rush RA. Increased brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation. *Brai Res.* 1997; 764: 269-272.
- 174 Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff - Werner P, Virchow JC. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging.* 2005; 26: 115-23.

-
- 175 Reinshagen M, Rohm H, Steinkamp M, Lieb K, Geerling I, Von Herbay A, Flämig G, Eysselein VE, Adler G. Protective role of neurotrophins in experimental inflammation of the rat gut. *Gastroenterology*. 2000; 119: 368-76.
- 176 Lommatzsch M, Klotz J, Virchow JC. Postnatal dexamethasone for lung disease of prematurity. *N Engl J Med*. 2004; 350: 2715-8.
- 177 Barnes PJ, Pedersen S, Busse WW. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids; New developments. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157: 1-53.
- 178 Friess H, Zhu ZW, di Mola FF, Kulli C, Graber HU, Andren – Sandberg A, Zimmermann A, Kore M, Reinshagen M, Büchler MW. Nerve growth factor and its high – affinity receptor in chronic pancreatitis. *Ann Surg*. 1999; 230: 615-624.
- 179 Di Sebastiano P, Fink T, Weihe E, Friess H, Innocenti P, Beger HG, Büchler MW. Immune cell infiltration and growth – associated protein 43 expression correlate with pain in chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 1997; 112: 1648-1655.
- 180 Lommatzsch M, Niewerth A, Klotz J, Schulte – Herbrüggen O, Zingler C, Schuff – Werner P, Virchow JC. Platelet and plasma BDNF in lower respiratory tract infections of the adult. *Respiratory medicine*. 2007; 101: 1493-1499.
- 181 Raap U, Goltz C, Deneka N, Bruder M, Renz H, Kapp A, Wedi B. Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115: 1268-75.
- 182 Vellucci SV, Parrott RF, Mimmack ML. Down-regulation of BDNF mRNA, with no effect on trkB or glucocorticoid receptor mRNAs, in the porcine hippocampus after acute dexamethasone treatment. *Res Vet Sci*. 2001; 70: 157-62.
- 183 Schaaf MJ, De Kloet ER, Vreugdenhil E. Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation. *Stress*. 2000; 3: 201-8.
- 184 Chao HM, Sakai RR, Ma LY, McEwen BS. Adrenal steroid regulation of neurotrophic factor expression in the rat hippocampus. *Endocrinology*. 1998; 139: 3112-8.
- 185 Amsterdam A, Tajima K, Sasson R. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol*. 2002; 64: 843-850.
- 186 Tonra JR, Curtis R, Wong V, Cliffer KD, Park JS, Timmes A, Nguyen T, Lindsay RM, Acheson A, DiStefano PS. Axotomy upregulates the anterograde transport and expression of brain – derived neurotrophic factor by sensory neurons. *J Neurosci*. 1998; 18: 4374-4383.
- 187 Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat*. 1999; 194: 1-14.
- 188 Görge D. Regulation der NGF- und BDNF-Produktion und - Freisetzung bei eosinophilen Granulozyten von Allergikern und Nichtallergikern durch Dexa - methason und Theophyllin. Dissertation 2006.
- 189 Prakash YS, Iyanoye A, Ay B, Mantilla CB, Pabelick CM. Neurotrophin effects on intracellular Ca²⁺ and force in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006; 291: 447-456.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7 – Aminoactinomycin
AHR	Atemwegshyperreagibilität
APC	Antigen Presenting Cell
BAL	Bronchoalveolar Lavage
BDNF	Brain – derived neurotrophic factor
BOOP	Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CGRP	Calcitonine – gene related peptide
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
Cy-5	Cytochrom-5
DM II	Diabetes Mellitus Typ II
ELISA	Enzyme – linked – immunosorbent assay
ETOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FEV1	Forced Expiratory Volume in 1 second
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
FVC	Forcierte Vitalkapazität
HWI	Harnwegsinfekt
Ig	Immunglobulin
I κ B	Inhibitor Kappa B
IL	Interleukin
IL-1 ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
LPS	Lipopolysaccharid
LTB4	Leukotrien B4
MHC	Major-Histocompatibility – Complex
mRNA	Messenger Ribonucleotid Acid
MS	Multiple Sklerose
NA	Noradrenalin
NANC	non – adrenerg, non – cholinerg

e-NANC	excitatorisch non – adrenerg, non – cholinerg
i-NANC	inhibitorisch non – adrenerg, non – cholinerg
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NGF	Nerve growth factor
NKA	Neurokinin A
NOS	Nitric oxide Synthase
NT	Neurotrophin
NTR	Neurotrophinrezeptor
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate – buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PGF _{2a}	Prostaglandin F _{2a}
PHM	Peptid Histidin Methionin
PMT	Photomultiplier – Tubes
RSV	Respiratory Syncytial Virus
SLPI	Secretory leucocyte protease Inhibitor
SP	Substance P
SPSS	Statistical package for social sciences
SSC	Sideward Scatter
STAT	Signal transducers and activators or transcription
TH	T – Helferzelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Trk	Tyrosinkinase
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
WS	Work Solution

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Hector, die Griechen zurückdrängend	1
Abb.2	Das Konzept der allergischen Entzündung der Atemwege	6
Abb.3	Parasympathische Ganglien als neuronale Drehscheibe der Atemwege	11
Abb.4	Kontrolle der neuronalen Neuropeptid – Synthese durch Neurotrophine	15
Abb.5	BDNF – Synthese durch humane PBMC und aufgereinigte Zellsubpopulationen	16
Abb.6	BDNF – Freisetzung aus Monocyten unter TNF- α Stimulation	17
Abb.7	Dichte und Verteilung der Zellen im menschlichen Blut	21
Abb.8	Überschichten des Blutes	24
Abb.9	Aufpipettieren der Monocyten	24
Abb.10	Neubauer Zählkammer	25
Abb.11	Neubauer Zählkammer Zählweise	25
Abb.12	Durchflusszytometrie (FACS)	34
Abb.13	Punktewolkendarstellung der PBMC	38
Abb.14	Bestimmung der Monocyten (CD14 ⁺) und toten Zellen (7-AAD positiv)	38
Abb.15	Das ELISA - Prinzip	40
Abb.16	Schema eines Boxplots	43
Abb.17	BDNF – Freisetzung: Kontrolle versus TNF- α – Stimulation	48
Abb.18	BDNF – Freisetzung bei Kontrollprobanden und Patienten	49
Abb.19	BDNF – Freisetzung in Ethanol – haltigem Medium	50
Abb.20	Einfluss von Dexamethason auf die BDNF – Sekretion bei Kontrollprobanden	51
Abb.21	Einfluss von Prednisolon auf die BDNF – Sekretion bei Kontrollprobanden	52
Abb.22	Einfluss von Fluticason auf die BDNF – Sekretion bei Kontrollprobanden	53
Abb.23	Einfluss der Glukokortikosteroide auf die BDNF – Sekretion (Probanden)	54
Abb.24	Einfluss von Dexamethason auf die BDNF – Sekretion bei Patienten	55
Abb.25	Einfluss von Prednisolon auf die BDNF – Sekretion bei Patienten	56

Abb.26 Einfluss von Fluticason auf die BDNF – Sekretion bei Patienten	57
Abb.27 Einfluss der Glukokortikosteroide auf die BDNF – Sekretion (Patienten)	58
Abb.28 BDNF – Quellen im Menschen	61
Abb.29 Konzept zur Bedeutung von BDNF in Entzündungsprozessen	63
Abb.30 Wirkung von Glukokortikosteroiden auf die Genexpression	65
Abb.31 Die zelluläre Bandbreite der Glukokortikosteroid-Wirkungen	66
Abb.32 Die Janusköpfigkeit der BDNF – Suppression durch Glukokortikosteroide	69

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Für Dexamethason – Zellkulturen vorbereitete Kulturmediumansätze	29
Tabelle 2 Für Prednisolon – Zellkulturen vorbereitete Kulturmediumansätze	30
Tabelle 3 Für Fluticason – Zellkulturen vorbereitete Kulturmediumansätze	30
Tabelle 4 Darstellung der Versuchsansätze	32
Tabelle 5 Beispielhafte Darstellung der Korrekturberechnung toter Zellen	39
Tabelle 6 Probandencharakteristika	44
Tabelle 7 Patientencharakteristika	45
Tabelle 8 Anteil der toten Zellen der Probandengruppe	46
Tabelle 9 Anteil der toten Zellen der Patientengruppe	47
Tabelle 10 Korrelation BDNF – Sekretion und CRP / Leukocyten	49

7.4 Publikationsverzeichnis von Jens Klotz

1. Lommatzsch M, **Klotz J**, Virchow JC.
Postnatal dexamethasone for lung disease of prematurity.
N Engl J Med. 2004; 350: 2715-2718.
(Impact Factor 2005: 44.0)

2. Lommatzsch M, Schloetke K, **Klotz J**, Zingler D, Zingler C, Schulte - Herbruggen O, Gill H, Schuff-Werner P, Virchow JC.
Brain – derived Neurotrophic Factor in Platelets and Airflow Limitation in Asthma.
Am J Respir Crit Care Med. 2005; 171: 115-120.
(Impact Factor 2005: 8.7)

3. Lommatzsch M, Niewerth A, **Klotz J**, Schulte-Herbrüggen O, Zingler C, Schuff - Werner P, Virchow JC.
Platelet and plasma BDNF in lower respiratory tract infections of the adult.
Respir Med. 2007; 101: 1493-9.
(Impact Factor 2005: 1.7)

7.5 Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Johann Christian Virchow für das in mich gesetzte Vertrauen und die Übertragung dieser interessanten wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Mir standen uneingeschränkt die nötigen Arbeitsmittel zur Verfügung.

Besonders bin ich dafür dankbar, mit Priv. – Doz. Dr. Marek Lommatzsch einen außergewöhnlich wissenschaftlich talentierten Mentor für die Betreuung meiner Promotion gefunden zu haben. Mit unermüdlichem Enthusiasmus stand er mir auch außerhalb seiner Arbeitszeit zur Verfügung, er unterstützte mich tatkräftig in der Umsetzung eigener Ideen. Gelegentliche erheiternde private Abende mit ihm und seiner Frau sind mir unvergessen.

Weiterhin möchte ich mich bei O. Schulte – Herbrüggen und Mitarbeitern bedanken, auf deren wissenschaftliche Vorarbeit diese Promotion aufbaut.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, die mit großem Interesse die Entstehung meiner Promotionsarbeit verfolgt haben. Leider ist es meinem Vater nicht mehr vergönnt, deren Abschluss zu erleben.

Ich bedanke mich ganz besonders bei meiner Freundin Vera, die im Laufe der letzten Zeit selbst bei schönstem Wetter auf gemeinsame Stunden verzichtet hat.

7.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und verfasst habe. Ich habe keine unerlaubten oder ungenannten Hilfsmittel verwendet.

Aachen, Januar 2009

Jens Klotz

Aus der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. VIRCHOW

**Über den Einfluss der
Glukokortikosteroide
Dexamethason, Prednisolon und Fluticason
auf die BDNF – Sekretion mononukleärer Zellen
des Menschen**

Eine klinisch-experimentelle Studie

**THESEN
ZUR
Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor medicinae
[Dr. med.]**

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock



von
Jens Klotz aus Aachen
Rostock 2009

Thesen zur Dissertation

1. Der Brain – derived neurotrophic factor (BDNF) gehört zur Gruppe der Neurotrophine. Neurotrophine wurden ursprünglich als Regulatoren des Überlebens und der Differenzierung von Neuronen beschrieben. Später erkannte man in Ihnen auch Faktoren, die die funktionelle Differenzierung und Aktivität erwachsener Neurone beeinflussen können.
2. Immunzellen produzieren Neurotrophine und reagieren selbst auf Neurotrophine. Neurotrophine wie BDNF scheinen daher eine vermittelnde Rolle zwischen Immun – und Nervensystem zu spielen.
3. Asthma bronchiale ist eine Krankheit, deren typische variable und reversible Atemwegsobstruktion auf einer chronischen Atemwegsentszündung sowie einer bronchialen Hyperreagibilität der Atemwege beruht. Deren Ursache wird vor allem in einer anhaltenden Veränderung der neuronalen Aktivität in den Atemwegen gesehen.
4. Tierexperimentelle und klinische Studien weisen darauf hin, dass BDNF eine wichtige pathogenetische Rolle bei der Entstehung der bronchialen Hyperreagibilität und der Atemwegsobstruktion beim allergischen Asthma spielt. Eine Hemmung der vermehrten BDNF – Sekretion wäre daher therapeutisch wünschenswert.
5. Inhalative Glukokortikosteroide sind sehr wirksam in der Asthma – Therapie und stellen das Mittel der 1. Wahl in dieser Erkrankung dar. Ein Einfluss der Glukokortikosteroide auf die BDNF – Sekretion ist daher denkbar. Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, den Einfluss verschiedener Glukokortikosteroide auf die BDNF – Freisetzung humaner Immunzellen erstmals zu untersuchen.
6. Monocyten stellen eine Hauptquelle von BDNF im peripheren Blut dar. In der vorliegenden Studie wurden daher monocytenangereicherte mononucleäre Zellen aus dem Blut von 30 gesunden Probanden und von 23 an einer

akuten entzündlichen Erkrankung leidenden Patienten gewonnen. In umfangreichen Zellkulturen wurde die Wirkung der Glukokortikosteroide Dexamethason, Prednisolon und Fluticason auf die BDNF – Freisetzung untersucht.

7. Die Sekretion von BDNF (sowohl basal als auch nach TNF- α – Stimulation) durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes unterschied sich nicht signifikant zwischen Patienten mit akuten entzündlichen Erkrankungen und gesunden Probanden, wiewohl sich ein Trend zu einer höheren BDNF – Sekretion bei Patienten mit akuten entzündlichen Erkrankungen fand.
8. Dexamethason, Prednisolon und Fluticason hemmten dosisabhängig die BDNF – Sekretion mononukleärer Zellen des peripheren Blutes. Im Vergleich der Glukokortikosteroide untereinander zeigte Fluticason die stärkste Suppression der BDNF – Sekretion. Die beobachteten Effekte der Glukokortikosteroide auf die BDNF – Sekretion mononukleärer Zellen waren bei Patienten mit akuten entzündlichen Erkrankungen und bei gesunden Probanden ähnlich.
9. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Teil der positiven Wirkungen von Steroiden in entzündlichen Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale auf einer Hemmung von BDNF und einer nachfolgenden Dämpfung der neuronalen Hypersensitivität und Hyperreagibilität beruht. Da BDNF in Entzündungsprozessen jedoch auch neuroprotektive Funktionen hat, ist eine Glukokortikosteroid-Therapie bezüglich der neuronalen Integrität mit Risiken behaftet. Es sind daher weitere Studien vonnöten, die die genauen Auswirkungen einer Glukokortikosteroid-Therapie auf die Funktionalität und Integrität BDNF – abhängiger neuronaler Strukturen in entzündlichen Erkrankungen beleuchten.