

Aus der  
Klinik für Anaesthesiologie  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Bernhard Zwißler

**Untersuchungen zur Erfassung neuroendokriner und  
immunologischer Veränderungen beim Menschen während  
und nach Langzeitaufenthalt auf der Internationalen  
Raumstation ISS**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Sandra Lena Matzel  
aus Münster

Jahr  
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Alexander Choukér

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Heike Künzel  
Prof. Dr. Michael Vogeser

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. Judith-Irina Buchheim

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2024

*Pour Quentin et Louise*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	Das menschliche Immunsystem	10
1.1.1	Angeborenes Immunsystem	11
1.1.1.1	Barrieren des angeborenen Immunsystems	11
1.1.1.2	Zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems	12
1.1.1.3	Rezeptoren des angeborenen Immunsystems	14
1.1.1.4	Humorale Faktoren des angeborenen Immunsystem	15
1.1.1.4.1	Entzündungsmediatoren	15
1.1.1.4.2	Komplementsystem	15
1.1.2	Adaptives Immunsystem	16
1.1.2.1	B-Zell vermittelte Immunabwehr	16
1.1.2.2	T-Zell vermittelte Immunabwehr	18
1.1.2.2.1	T-Lymphozyten	18
1.1.2.2.2	TH1-Zellen	19
1.1.2.2.3	TH2-Zellen	19
1.1.2.2.4	TH17-Zellen	20
1.1.2.2.5	Regulatorische T-Zellen	20
1.1.2.2.6	Zytotoxische T-Zellen	21
1.2	Stress	22
1.2.1	Was ist Stress?	22
1.2.2	Stressantwortsysteme	23
1.2.2.1	HPA-Achsen- und Sympathikusaktivierung	23
1.2.2.2	Endocannabinoidsystem	24
1.2.3	Stressexposition und seine Folgen	24
1.2.3.1	Akute Stressreaktion	25
1.2.3.2	Chronische Stressreaktion	26
1.3	Die Erforschung von Stress im All	29
1.3.1	ISS als Forschungsplattform	29
1.3.2	Erdgebundene Analogplattformen oder Alternativen zur Forschung auf der ISS	29
1.3.3	ISS als Langzeitstressmodell	30
1.3.4	Raumfahrt und die Rolle des Immunsystems	30

1.3.5	Gründe für die Durchführung von Studien auf der ISS	31
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>Methodik</b>	<b>34</b>
3.1	Ethik	34
3.2	Nomenklatur	34
3.3	Studiendesign	34
3.4	Zeitpunkte der Probengewinnung	35
3.5	Kurzfragebogen zur aktuellen Beanspruchung (KAB)	35
3.6	Speichelgewinnung und Cortisolmessung	36
3.7	Blutabnahme	36
3.7.1	Blutbild	36
3.7.2	Separation humaner Leukozyten	37
3.7.3	Durchflusszytometrische Analysen: Prinzip der Durchflusszytometrie	37
3.7.4	Bestimmung der intrazellulären Radikalproduktion der PMNL mit der Dihydrorhodamin 123-Methode	38
3.7.4.1	Stimulation der Radikalproduktion von PMNL	39
3.7.5	Durchflusszytometrischer Ansatz	39
3.7.6	Lymphozytenphänotypisierung: Zellulärer Immunstatus mittels Durchflusszytometrie	40
3.7.6.1	Lymphozytenphänotypisierung: Protokoll	41
3.7.7	Oberflächenadhäsionsmarker	41
3.7.8	Intrazelluläres Glutathion	41
3.7.9	Zytokinbestimmung	42
3.7.10	Endocannabinoidbestimmung	42
3.7.11	Endocannabinoidextraktion	43
3.8	Statistik und Software	43
<b>4</b>	<b>Material</b>	<b>44</b>
4.1	Verbrauchsmaterial	44
4.2	Geräte	44
4.3	Software	45

4.4 Chemikalien	46
4.5 Antikörper	47
4.6 Antigene	48
4.7 Assays	48
<b>5 Ergebnisse</b>	<b>49</b>
5.1 Stressanalyse	49
5.1.1 Stressanalyse mittels Fragebögen	49
5.1.2 Stressanalyse mittels biochemischer Marker	50
5.1.2.1 Cortisol im Speichel	50
5.1.2.2 Endocannabinoide im Blut	51
5.2 Blutbildanalyse	53
5.2.1 Leukozyten und ihre Subpopulationen	53
5.2.2 Differentialblutbild	54
5.2.3 Lymphozytentypisierung	55
5.2.4 Weitere Blutbildparameter	56
5.3 Durchflusszytometrische Analysen	60
5.3.1 Sauerstoffradikalproduktion der PMNL nach Raumfahrt	60
5.3.2 Gesamtglutathion	61
5.3.3 Expression von Adhäsionsmolekülen	62
5.4 Immunantwort nach <i>in vitro</i> Exposition gegenüber Pilzantigenen	64
5.4.1 TNF	64
5.4.2 IL-1 $\beta$	66
5.4.3 IL-2 und IFN- $\gamma$	68
5.5 Reduktion der antiinflammatorischen Kapazität	70
5.5.1 CD4+ T-Zell Subpopulationen	70
5.5.2 Regulatorische T-Zellen	71
5.5.3 Antiinflammatorische Zytokine	72
5.6 Verschiebungen der CD8+ T-Zell Subpopulationen	74
<b>6 Diskussion</b>	<b>76</b>
6.1 Stress-Antwort-Systeme unter chronischer Stressexposition	76
6.1.1 Stressreaktion	76

6.1.2	Sympathikus- und HPA-Achsenaktivierung	77
6.1.3	Endocannabinoidwirkung	78
6.2	Zytokinprofile unter chronischer Stressexposition	80
6.3	T-Zell-Erschöpfung unter chronischer Stressexposition	81
6.3.1	CD8+ T-Zellen	81
6.3.2	T-Zell Seneszenz	81
6.4	Akute Stressstimuli und vermehrte Leukozytenfreisetzung	83
6.4.1	Verschiebung der Leukozytenpopulationen	83
6.4.2	Vermehrte L-Selektinabspaltung durch Aktivierung	84
6.4.3	Antioxidative Mechanismen	85
6.4.4	Antioxidative Mechanismen und die Rolle der Endocannabinoide	86
6.5	Immunantwort gegenüber Pilzantigenen	87
6.5.1	Pilzinfektionen auf der ISS	87
6.5.2	Proinflammation bei Überempfindlichkeit gegenüber Pilzantigenen	88
6.5.3	Die Rolle der NK-Zellen in der antifungalen Immunantwort	89
6.5.4	Regulatorische T-Zellen und Immundysfunktion nach Raumfahrt	90
6.5.4.1	Regulatorische T-Zellen und die Entstehung von Allergien	90
6.5.4.2	Regulatorische T-Zellen und anti-inflammatorisch wirkende Zytokine	91
6.6	Stress, Immundysregulation und Inflammation	92
6.6.1	Akuter versus chronischer Stress	92
6.6.2	Immundysregulation	93
6.6.3	Proinflammation	95
<b>7</b>	<b>Limitationen und Ausblick</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>Appendix</b>	<b>102</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis	102
9.2	Abkürzungsverzeichnis	105
9.3	Literaturverzeichnis	107
9.4	Veröffentlichungen	117
9.5	Eidesstattliche Versicherung	119



## **Gender-Hinweis**

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit verzichtet auf das Verwenden genderspezifischer Sprache. Die männliche Form gilt in allen Fällen, in denen dies nicht explizit ausgeschlossen wird, für alle Geschlechter.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das menschliche Immunsystem

Der menschliche Organismus ist nahezu permanent einer immensen Zahl und Diversität von Mikroorganismen ausgesetzt. Als adäquate Unterstützung um uns gegen diese zahllosen Viren, Bakterien und Parasiten zur Wehr zu setzen, dienen sowohl natürliche Barrieren wie Häute, Schleimhäute, die Magensäure als auch das Immunsystem. Im Wesentlichen gibt es zwei verschiedene Arten der Immunantwort: eine unspezifische, angeborene (innate), evolutionsgeschichtlich ältere und eine erworbene, adaptive Immunantwort, die spezifisch gegen ein Pathogen gerichtet ist (1). Vor allem die B- und T-Lymphozyten dieses spezifischen Immunsystems und die von den B-Zellen produzierten Antikörper sind für die langanhaltende Immunität nach Antigenkontakt verantwortlich. Allerdings dauert die Entwicklung dieser Immunreaktion bis zu einigen Wochen (2, 3). Der innate Teil des Immunsystems ist in der Lage, eine große Anzahl molekularer Strukturen diverser Mikroorganismen zu erkennen, ohne vorher schon einmal mit demselben Antigen in Kontakt gekommen zu sein. So ist es möglich, dass ein bedeutender Teil der Pathogene schon innerhalb weniger Stunden durch physikalische Barrieren, Zellen und Moleküle des angeborenen Immunsystems eliminiert wird (4, 5).

Die Epithelzellen der Haut, Zellen der Schleimhäute und auch die Magensäure stellen als mechanische Barriere einen wesentlichen Schutz vor eindringenden Mikroorganismen und Pathogenen dar. Zellen des Atemweg- und Gastrointestinaltraktes, ebenso die Keratinozyten exprimieren bestimmte Peptide wie Defensine ( $\beta$ -Defensine) und Cathelicidin (LL-37), die eine adäquate antimikrobielle Aktivität gegen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen, Chlamydien und Viren aufweisen. Zusätzlich zu ihrer antimikrobiellen Rolle, sind diese Peptide auch in der Lage mit Rezeptoren von dendritischen Zellen (DZ) und Lymphozyten zu interagieren, sodass eine Aktivierung der adaptiven Immunachse folgt (6).

Erkennungsmoleküle des innaten Immunsystems werden auf zahlreichen Zellen exprimiert. So ist dieses System in der Lage, nach der Invasion eines Pathogens oder Toxins schnell zu reagieren und bildet somit die erste Linie der Immunantwort des Wirts.

Das adaptive Immunsystem hingegen besteht aus einer numerisch kleineren Anzahl an Zellen mit Spezifität für Pathogene oder Toxine. Diese Zellen müssen nach Begegnung mit dem

Antigen noch proliferieren um eine suffiziente, effektive Immunantwort generieren zu können. So lässt sich erklären, warum Antworten des adaptiven Immunsystems zeitlich nach der Initiierung der innaten Immunantwort eingeordnet werden können. Eine besondere Eigenschaft des adaptiven Immunsystems ist, lang lebende Zellen zu produzieren, die in einem Dauerruhezustand verweilen, jedoch jederzeit schnell, nach erneutem Kontakt mit einem bekannten Antigen, in der Lage sind, entsprechende Effektorfunktionen auszuüben. Das bietet dem adaptiven Immunsystem die Möglichkeit ein Gedächtnis zu entwickeln und erlaubt eine deutlich effektivere Antwort gegen spezifische Pathogene oder Toxine, auch oder gerade nach Zweitkontakt, sogar noch Jahrzehnte nach initialer Sensibilisierung (7).

### **1.1.1 Angeborenes Immunsystem**

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungseinheit gegen Infektionen oder Gewebeschädigungen dar. Eine Aktivierung der Zellen und Moleküle des innaten Immunsystems findet rapide nach Kontakt mit Mikroben oder anderen Gefahrensignalen statt. Die Geschwindigkeit dieser Antwort ist aufgrund schneller Teilungsraten v.a. bakterieller Erreger von entscheidender Bedeutung. Einst wurde angenommen, dass das angeborene Immunsystem lediglich für eine erste primitive Antwort verantwortlich zu sein scheint, bis das erworbene Immunsystem aktiviert wird und weitere wichtige Funktionen der Immunantwort übernimmt. Heutzutage ist allerdings klar, dass das angeborene Immunsystem hoch anspruchsvolle und komplexe Wächterfunktionen zur Aufrechterhaltung einer ausgeglichenen Gewebemöostase inne hat (8). In der Tat entstand das angeborene Immunsystem vor ca. 750 Millionen Jahren und ist uns über die Evolution bemerkenswert gut erhalten geblieben.

#### **1.1.1.1 Barrieren des angeborenen Immunsystems**

Wesentliche Komponenten der innaten Immunantwort stellen mechanische Barrieren dar. Physikalische Barrieren wie Reihen von Epithelzellen mit engem Zell-zu-Zell Kontakt (*tight junctions*, Cadherin vermittelte Zellinteraktionen und andere), eine Schicht aus Schleim bzw. Mukos, die das Epithel des respiratorischen, gastrointestinalen und urogenitalen Traktes überzieht und Flimmerepithelien mit Ziliarfunktion, sorgen für eine kontinuierliche Reinigung nach Kontamination mit inhalierten oder ingestierten Partikeln. Die innate Immunantwort umfasst ebenfalls lösliche Proteine und kleine bioaktive Moleküle, die in Körperflüssigkeiten

vorhanden sind wie z.B. Komplementproteine, Defensine und Fikoline oder die von aktivierten Zellen freigesetzt werden. Letztere schließen die Zytokine ein, die wiederum Funktionen weiterer Zellen regulieren als auch Chemokine, die Leukozyten anlocken und aktivieren. Auch freigesetzte Lipidmediatoren der Inflammation, reaktive Sauerstoffradikale und weitere bioaktive Amine und Enzyme tragen zur Gewebsinflammation bei. Auch membrangebundene Rezeptoren und zytoplasmatische Proteine, die für die Bindung molekularer Strukturen auf der Oberfläche eindringender Pathogene verantwortlich sind, werden dem innate Immunsystem zugeschrieben. Während einige Anteile der Immunabwehr dauerhaft aktiv sind (wie z.B. die mukoziliäre *Clearance*), müssen andere Teile durch die Interaktion von Immunzellen oder durch Proteine, die für das Pathogen spezifische chemische Strukturen aufweisen, erst aktiviert werden (8).

#### **1.1.1.2 Zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems**

Die zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems bestehen aus polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten (PMNL), Phagozyten (z.B. Makrophagen), antigenpräsentierenden Zellen (APZ z.B. dendritische Zellen) und Killerzellen (z.B. natürliche Killerzellen (NK-Zellen)). Auch Subpopulationen der B- und T-Zellen, die durch eine eingeschränkte Antigenrezeptordiversität gekennzeichnet sind, sind Teil der innate Immunantwort (z.B. invariante NK T-Zellen,  $\gamma/\delta$  T-Zellen, B-1 B-Zellen). Zudem sind Epithelzellen als integraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems zu nennen. Sie fungieren als physikalische Barriere, Produktionsort von Zytokinen und Chemokinen und sind in der Lage, Gefahrensignale zu erkennen und zu prozessieren. Wenngleich Epithelzellen als „inoffizielle Mitglieder“ des Immunsystems gezählt werden, machen sie den größten Anteil der Zellen immunologischer Organe aus und liefern somit einen substanziellen Beitrag zur Immunität (9).

Die Phagozyten gehören als Komponente des innate Immunsystems zur Gruppe der PMNL, die den größten Anteil unter den Leukozyten ausmachen und zu den Makrophagen, die sich aus den im Blut zirkulierenden peripheren Monozyten entwickeln und im entzündeten Gewebe eine Initiierung und Regulierung der Abwehrreaktion des Körpers veranlassen (10). Phagozyten in Kombination mit dem Komplementsystem schaffen es zwar extrazelluläre bakterielle Infektionen unter Kontrolle zu halten, jedoch gelingt es ihnen nicht, die sich intrazellulär vermehrenden Viren zu erreichen. Eine Verhinderung der systemischen Wirkung

von Viren und deren Replikation lässt sich nur durch den tatsächlichen Zelluntergang erreichen. Dies ist die Hauptaufgabe der zytotoxischen T-Zellen als Teil der adaptiven Immunantwort. Zytotoxische T-Zellen erkennen virusinfizierte Zellen über virale Peptide, die intrazellulär generiert und nach außen über den *major histocompatibility complex* (MHC) der Klasse I präsentiert werden. Angeregt geben sie so Toxine in eben diese befallenen Zellen ab (11, 12).

Beide Zellpopulationen, sowohl die PMNL als auch die Makrophagen erkennen Bakterien über eine Vielzahl von Oberflächenrezeptoren, sorgen für eine Eliminierung via Phagozytose und im Falle der PMNL für die Freisetzung der im Zytoplasma befindlichen Granula. Sie enthalten neben Bestandteilen wie sauren Hydrolasen und antimikrobiellen Enzymen auch eine Vielzahl von Defensinen, wodurch sie wirksam gegen die meisten Bakterien, Viren und Pilze vorgehen können. Speziell Makrophagen können durch die Freisetzung von einerseits Chemokinen weitere Abwehrzellen zum Infektionsherd locken und andererseits über Zytokine und vasoaktive Substanzen eine inflammatorische Antwort liefern. Diese Moleküle führen in erster Linie sowohl zu einer Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung auf der Seite der Infektion als auch zu einer Konformationsänderung der Adhäsionsrezeptoren an der Gefäßwand, um vermehrt Bindungsstellen für phagozytierende Zellen zu generieren. Als Beispiel für ein Chemokin sei hier N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), ein formyliertes Tripeptid, genannt, welches von den Bakterien am Ort der Infektion freigesetzt wird. Es bewirkt und verstärkt die Migration von phagozytierenden Zellen wie PMNL und Makrophagen, die hierfür einen speziellen G-Protein gekoppelten Rezeptor besitzen. Durch Bindung von fMLP wird im Verlauf die Freisetzung der Granula durch die nun angelockten phagozytierenden Zellen initiiert, Sauerstoffradikale werden gebildet und die Adhäsion der PMNL an das Gefäßendothel als Vorbereitung für eine Gewebemigration gesteuert. Die Freisetzung weiterer PMNL aus dem Knochenmark in das Gefäßsystem und deren Migration durch die Gefäßwand an den Ort der Infektion wird nun angeregt. Hier erzeugen sie Sauerstoffradikale wie Stickoxide (NO), Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), die über ihre oxidative Wirkung eine zerstörerische Wirkung auf Infektionserreger ausüben. Die NO-Synthase katalysiert die Bildung von Stickoxid. Um Superoxid-Anionen bereit zu stellen, besitzen PMNL transmembranassoziierte Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidasen, die aus mehreren Untereinheiten bestehen. Die Superoxiddismutase (SOD) wandelt Superoxid über eine Disproportionierungsreaktion in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff um. Da

während dieser chemischen Reaktionen der Sauerstoffverbrauch kurzzeitig zunimmt, wird der Prozess auch als oxidativer oder respiratorischer *burst* bezeichnet (8, 13).

### **1.1.1.3 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems**

Als innater Anteil der zytotoxischen T-Zellen sind die NK-Zellen, die ebenfalls mit toxischer Granula ausgestattet sind, zu nennen. Sie sind jedoch, anders als die zytotoxischen T-Zellen, immer und sofort für die Zerstörung virusinfizierter Zellen abrufbar. NK-Zellen regulieren ihre zytotoxische Aktivität über sowohl aktivierende als auch inhibierende Rezeptoren, die mit Molekülen des MHC der Klasse I der Zielzelloberfläche interagieren. Virusinfizierte Zellen werden von den zytotoxischen T-Zellen aufgrund einer Präsentation von Fremdartigenen auf ihrer Oberfläche mittels MHC I Rezeptoren erkannt und eliminiert. Eine Suppression der MHC-Expression, zur Verhinderung der Erkennung und Zerstörung durch zytotoxische T-Zellen, könnte eine Überlebensstrategie einiger Viren sein, jedoch sind NK-Zellen in der Lage auch diese Expressionsunterdrückung aufzuspüren und den Zelltod der Wirtszelle durch Apoptose einzuleiten (14).

Zu dem angeborenen Immunsystem gehört auch eine Familie von Rezeptoren, die spezifische Merkmale erkennen können und bei den meisten Krankheitserregern vorkommen. Die am besten beschriebenen Rezeptoren sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR) (15). Die Immundetektion von Krankheitserregern während einer Infektion erfolgt insbesondere über die Erkennung von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) (16). PAMP sind pathogen spezifische Moleküle (z.B. aus der Zellwand) und kommen im Menschen nicht vor. Ein besonders wichtiges PAMP sind Lipopolysaccharide (LPS), eine spezifische Klasse von Glykolipiden, die in den Zellwänden gramnegativer Bakterien lokalisiert sind (17). Die LPS werden hauptsächlich von TLR4 erkannt, der zusammen mit *Cluster of Differentiation (CD) 14* auf Makrophagen und *LPS binding protein* den LPS-Rezeptor bildet. Alle TLR Signalwege münden in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NFκB), der die Expression einer Vielzahl von Zytokin-kodierenden Genen kontrolliert und somit einen wesentlichen Beitrag zur angeborenen Immunantwort leistet (18).

#### **1.1.1.4 Humorale Faktoren des angeborenen Immunsystem**

Die Komponenten des innaten Immunsystems sind vielfältig. Sie beinhalten z.B. lösliche Erkennungsmoleküle wie neutralisierende Antikörper, Pentraxine (z.B. C-reaktives Protein) und das Komplementsystem.

##### **1.1.1.4.1 Entzündungsmediatoren**

Eines der wichtigsten Zytokine im Rahmen der Inflammation ist Tumornekrosefaktor (TNF), bekannt aus tierexperimentellen Untersuchungen mit *knock-out* Mäusen, als essenzieller Botenstoff bei lokalen Infektionen. Damit die Entzündung nicht sekundär generalisiert, wird von aktivierten Makrophagen und anderen Zelltypen TNF lokal sezerniert und somit die Blutgerinnung in umgebenden Blutgefäßen aktiviert. Falls es doch zu einer systemischen Freisetzung von TNF kommen sollte, z.B. im Rahmen einer Sepsis, folgt zeitnah eine generalisierte Vasodilatation mit Zerstörung epithelialer Barrieren und konsekutiver Flüssigkeitsverschiebung von intra- nach extravasal gefolgt von einer Verbrauchskoagulopathie und schließlich dem Multiorganversagen. TNF Rezeptor *knock-out* Mäuse sind zwar anfällig für Infektionen dahingegen aber resistent gegenüber dem Krankheitsbild des septischen Schocks (19). Die von den Phagozyten freigesetzten Interleukine (IL)-1 und -6 spielen eine Schlüsselrolle in der Akute-Phase-Reaktion, stimulieren Lymphozyten und induzieren damit die Antikörperproduktion. IL-1 induziert lokal eine Entzündungsreaktion, systemisch verursacht es Fieber und die Produktion von IL-6. Als Entzündungsmediator mobilisiert IL-8 durch chemotaktische Stimuli PMNL und unterstützt die Degranulation. IL-12 wird üblicherweise von phagozytierenden Zellen im Rahmen der Antwort auf mikrobielle Antigene produziert. Es induziert die Produktion weiterer Zytokine, hauptsächlich Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) durch NK-Zellen und T-Zellen, fungiert als Wachstumsfaktor für NK-Zellen und unterhält die T-Zell Differenzierung (20).

##### **1.1.1.4.2 Komplementsystem**

Das Komplementsystem stellt eine Kaskade von Enzymen dar, die bei der Abwehr von Infektionen zusammenwirken und es einer Aktivierung über mindestens einen der drei möglichen Wege bedarf. Der sogenannte klassische Weg, getriggert durch Antikörper der adaptiven Immunantwort; der Lektin Weg, eine innate Komponente, aktiviert durch an bakterielle Mannoserezeptoren bindende Serumproteine; und der alternative Weg, ebenfalls

Teil des angeborenen Immunsystems, der direkt über bakterielle Oberflächenantigene erfolgt (8).

### **1.1.2 Adaptives Immunsystem**

Dem adaptiven und innaten Immunsystem werden oftmals kontrastierende Eigenschaften zugeschrieben. Jedoch ist von einem Zusammenspiel zwischen dem innaten Immunsystem als erste Verteidigungslinie und dem adaptiven Immunsystem als zeitlich etwas verzögerte, sehr spezifische T- und B-Zell-vermittelte Immunantwort, auszugehen. Die Komponenten des innaten Immunsystems tragen natürlich auch zur Aktivierung der antigenspezifischen Immunantwort bei. Während das innate und adaptive Immunsystem sich in ihrer Aktivierungsmodalität grundlegend voneinander unterscheiden, ist ein Zusammenspiel und gegenseitiges Verstärken dennoch, v.a. für eine vollständige effektive und intakte Immunantwort, essenziell.

Die Mechanismen des adaptiven Immunsystems zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, gegen eine unbegrenzte Anzahl von Antigenen spezifische Rezeptoren auf den Oberflächen der T- und B-Lymphozyten zu exprimieren. Der Zusammenbau der Antigenrezeptoren erfolgt durch somatische Rekombination (genetische Umgruppierung an der DNA), ein Prozess, der die Organisation von Millionen verschiedener Antigenrezeptoren, jeder mit einzigartiger Spezifität für das entsprechende Antigen, erlaubt (21).

#### **1.1.2.1 B-Zell vermittelte Immunabwehr**

Die Namensgebung der B-Zellen leitet sich von der *Bursa fabricii*, einem primär lymphatischen Organ der Vögel, ab. 1956 berichten Bruce Glick und Timothy Chang, dass die *Bursa fabricii* eine wichtige Rolle in der Antikörperproduktion spielt. Die Erkenntnis, dass Antikörperantworten in bursektomierten Hühnern deutlich eingeschränkt war, trug wesentlich zum Verständnis der Rolle der *Bursa fabricii* für das Immunsystem bei. Heutzutage ist klar, dass humane B-Zellen ihren Ursprung im Knochenmark (engl. *bone marrow*) haben. Demzufolge musste die Nomenklatur der B-Zellen, die sich ursprünglich auf die Bursa bezog, nicht geändert werden (22).

B-Zellen entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Im Knochenmark durchlaufen die B-Zellen mehrere Entwicklungsschritte, während dieser sie ihre Antigenpezifität erlangen. Nachdem sie einen gewissen Reifegrad erlangt haben, verlassen

die B-Zellen das Knochenmark, zirkulieren im Blut und in den lymphatischen Organen (Thymus, Milz, Lymphknoten), um ihren Reifeprozess weitestgehend abzuschließen. Diese Entwicklungssequenz bis zum Verlassen des Knochenmarks fand bisher ohne jeglichen Antigenkontakt statt und wird als antigenunabhängige B-Zell Entwicklung bezeichnet.

Die wichtigste Funktion der B-Lymphozyten und Plasmazellen ist die Produktion von Antikörpern (auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet). Einerseits von membrangebundenen Antikörpern in Form der B-Zell-Rezeptoren, andererseits in löslicher Form, die im Serum und anderen Körperflüssigkeiten nachweisbar sind.

Es werden insgesamt die fünf Immunglobulinklassen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM unterschieden und ihnen jeweils verschiedene Aufgaben im menschlichen Körper zugeschrieben. IgA ist die vorherrschende Antikörperklasse in Körpersekreten wie Speichel und Tränenflüssigkeit und spielt eine entscheidende immunschützende Rolle. Schleimhäute werden v.a. durch Bindung und Neutralisation vor dem Eindringen von Mikroorganismen und Toxinen bewahrt (23). IgM Antikörper sind mit einer frühen Immunantwort assoziiert und werden oft für die Abklärung akuter Infektionen bestimmt. Die pentamere Struktur des IgM (fünf gleiche Untereinheiten) sorgt für eine besonders effiziente Opsonierung und damit Eliminierung der eindringenden Antigene. IgG ist die am häufigsten vertretene Antikörperklasse im Menschen und besitzt die längste Serumhalbwertszeit aller Immunglobuline. Basierend auf der Struktur und antigenetischen bzw. funktionellen Unterschieden, werden vier IgG Subklassen unterschieden (24). IgG ist als einziges Immunglobulin wesentlich plazentagängig und liefert so einen erheblichen Beitrag zur Immunität des Fötus (25). Über die Funktion des IgD ist bis dato noch nicht allzu viel bekannt und es ist auch nur in sehr geringer Konzentration im Blut nachweisbar. Jedoch weiß man, dass IgD mit bakteriellen Proteinen, wie dem Bindeprotein von *Moraxella catarrhalis* (gramnegatives Bakterium) interagieren kann. Eine derartige Bindung resultiert in einer B-Zellstimulation und -aktivierung (26). Obwohl IgE die niedrigste Konzentration aller Immunglobuline im Serum aufweist, gilt es als sehr potentes Immunglobulin. IgE ist assoziiert sowohl mit allergischen und Hypersensitivitätsreaktionen als auch mit parasitären Wurminfektionen. IgE bindet mit hoher Affinität Rezeptoren auf Mastzellen, Langerhans Zellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten (24). In der Therapie allergischer und asthmatischer Erkrankungen können spezifische anti-IgE-Antikörper, die einerseits freies IgE oder auch membrangebundene IgE Antikörper auf B-Zellen binden, eingesetzt werden (27).

Antikörper sind in der Lage lösliche Antigene zu erkennen, diese zu binden und verschiedene Effektorfunktionen zu induzieren. Eine wesentliche Wirkungsweise der Antikörper ist die Aktivierung des Komplementsystems, ein komplexes Proteinkaskadensystem, mit dem Ziel der Beseitigung von Pathogenen (siehe 1.1.1.4.2). Ein weiterer Mechanismus der sezernierten Antikörper zur Bekämpfung einer Infektion ist die Opsonierung, d.h. eine Markierung der Krankheitserreger, sodass diese im Folgenden von phagozytierenden Zellen (Makrophagen und PMNL) als fremd erkannt und eliminiert werden können. Als dritte wichtige Effektorfunktion sei die Neutralisation genannt. Durch die Bindung der Antikörper an die Pathogene kann z.B. ein Eindringen der Viren und Bakterien in Zellen des Wirts unterbunden werden.

Die zweite Phase der B-Zellentwicklung ereignet sich nach Antigenkontakt und wird dementsprechend als antigenabhängige Phase bezeichnet. Abhängig von den Antigenkontakten und diversen Zytokinstimuli entwickeln sich die B-Zellen zu Memoryzellen, die in Zukunft noch aktivierbar sind oder zu zeitnah antikörperproduzierenden Plasmazellen (28). Langlebige Plasmazellen sind die Träger des Antikörpergedächtnisses und damit eine einzigartige Komponente des adaptiven Immunsystems (29). Die adaptive humorale Immunität verläuft antikörperabhängig. Die Antikörper werden von Plasmazellen produziert, die sich wiederum nach Aktivierung über u.a. T-Zell Signalkaskaden aus B-Zellen entwickelt haben.

Genetische Mutationen, die die Komponenten der pre-B-Zellrezeptoren oder andere Signalkaskaden des ersten Abschnitts der B-Zellentwicklung beeinträchtigen, können zu schwerwiegenden Immundefizienzsyndromen wie Agammaglobulinämien (Antikörpermangelsyndrome) und dem Fehlen von B-Zellen führen (30).

## **1.1.2.2 T-Zell vermittelte Immunabwehr**

### **1.1.2.2.1 T-Lymphozyten**

Die Nomenklatur der T-Lymphozyten leitet sich vom Thymus ab, ein primär lymphatisches Organ und essenziell für die Entwicklung der T-Lymphozyten, die neben den B-Zellen, wesentlich für die Vermittlung der adaptiven Immunantwort verantwortlich sind (31).

T-Lymphozyten exprimieren einen klonalen Antigenrezeptor, den T-Zell-Rezeptor (TZR), zusammen mit dem CD3-Molekül auf ihrer Zellmembran. Die Antigenerkennung der T-

Lymphozyten erfolgt, im Vergleich zum Mechanismus der B-Lymphozyten, grundsätzlich unterschiedlich. T-Lymphozyten sind nicht in der Lage lösliche Antigene zu erkennen. Sie erkennen körperfremde Peptidfragmente nur dann, wenn deren Antigene auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen an MHC-Moleküle gebunden sind. T-Lymphozyten werden anhand der von ihnen erkannten Antigene und ihrer Effektorfunktionen in zwei Subpopulationen eingeteilt, die CD4+ T-Helferzellen (TH-Zellen) und die CD8+ zytotoxischen T-Zellen. CD4+ TH-Zellen erkennen Peptide, die an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden sind. MHC-Klasse-II-Moleküle werden normalerweise ausschließlich von APZ, also von dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten präsentiert (21, 32). CD8+ zytotoxische T-Zellen erkennen Peptide, die an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden sind. Die CD4+ Lymphozyten lassen sich wiederum am besten anhand ihrer produzierten Zytokine und entsprechenden Zytokinprofile in Subpopulationen einteilen. Somit kann eine resultierende T-Zellantwort über die freigesetzten Zytokine sichtbar gemacht und genauer charakterisiert werden.

#### 1.1.2.2.2 TH1-Zellen

Aktiviert CD4+ TH1-Zellen produzieren und sezernieren typischerweise inflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF. IFN- $\gamma$  ist für die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen verantwortlich (33). Diese benötigen IFN- $\gamma$  zur Stimulation und Unterstützung der zellulären Abwehr. In Bezug auf die B-Zell-Aktivität fördert IFN- $\gamma$  den Klassenwechsel (Wechsel der Antikörperklasse) ausgehend von IgM zu IgG und hemmt die Differenzierung von TH2- und TH17-Zellen (s. unten). IFN- $\gamma$  produzierende TH-Zellen sind allerdings auch mit bestimmten Autoimmunerkrankungen wie z.B. der Multiplen Sklerose assoziiert (34).

#### 1.1.2.2.3 TH2-Zellen

Aktiviert, CD4+ TH2-Zellen produzieren v.a. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Die bedeutendste Funktion ist die Interaktion mit B-Lymphozyten, da über Zytokine wichtige Signale für den Klassenwechsel von Antikörpern gegeben werden. IL-4 und IL-5 sind u.a. entscheidend für die Bildung von neutralisierenden Antikörpern, d.h. für den Klassenwechsel von IgM zu IgA und IgE (34). IL-6 verstärkt die durch v.a. IL-4 ausgelöste humorale Immunantwort. IL-13 initiiert v.a. die Sezernierung allergietypischer IgE Antikörper und ist somit ein wichtiger Mediator allergischer, inflammatorischer Prozesse. Erhöhte IL-13 Konzentration konnten z.B. in

bronchoalveolären Lavagen (BAL) bei Patienten mit allergischem Asthma nachgewiesen werden (35). IL-10 ist ein zentral anti-inflammatorisch wirkendes Zytokin und entscheidend an der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz beteiligt (36).

#### 1.1.2.2.4 TH17-Zellen

TH17-Zellen produzieren v.a. IL-17A, IL-17F und IL-22. Sie spielen eine wichtige Rolle bei sowohl der Produktion und Reifung als auch der Anlockung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Für ihre Differenzierung ist IL-6 und der *Transforming Growth Factor* beta (TGF- $\beta$ ) nötig. Eine Dysregulation oder Fehlfunktion geht v.a. mit einer verstärkten Anfälligkeit für Pilzinfektionen (z.B. *Candida* spp.) einher. Fehlgesteuerte TH17-Zellen zeigen sich, nachweislich in Tiermodellen, als relevant für die Entwicklung autoimmunologischer sowie chronisch, entzündlicher Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder der Multiplen Sklerose (34).

#### 1.1.2.2.5 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen sind CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3 regulatorische T-Lymphozyten und spielen eine wichtige Funktion bei der Entscheidung, ob eine Zelle von zytotoxischen T-Zellen als fremd eingestuft und eliminiert oder toleriert wird. Dabei modulieren regulatorische T-Zellen über zwei verschiedene Komponenten ihre Interaktion mit den zytotoxischen T-Zellen. 1. über den hemmend wirkenden *Cytotoxic t-lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) Rezeptor, über den eine Antigenpräsentation gegenüber zytotoxischer T-Zellen unterbunden wird und 2. über die Sekretion der Zytokine IL-2 und TGF- $\beta$ , die direkt hemmend auf die zytotoxischen T-Zellen wirken. Aufgrund der erwähnten Regulationsmechanismen der sogenannten peripheren T-Zell Toleranz, kann eine überschießende Reaktion der zytotoxischen T-Zellen auf körpereigene Zellen verhindert und so das Risiko für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und Allergien deutlich minimiert werden. Ein Mangel oder eine Funktionsstörung der regulatorischen T-Zellen ist entsprechend für die Entstehung von Allergien, Autoimmunerkrankungen und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen mitverantwortlich. Etwa 5-10% unserer CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind regulatorische T-Zellen. Sie sind wichtig für die inhibitorische Kontrolle und damit die Möglichkeit eine Immunantwort im menschlichen Organismus rechtzeitig zu beenden (34).

#### 1.1.2.2.6 Zytotoxische T-Zellen

Zytotoxische T-Zellen exprimieren den Oberflächenmarker CD8 und sind v.a. auf die Erkennung virusinfizierter und maligne transformierter Zellen, deren Peptidfragmente über MHC-Klasse-I-Komplexe präsentiert werden, spezialisiert. Die Interaktion zwischen der Zielangriffszelle und der zytotoxischen T-Zelle setzt eine Kaskade in Gang, die letztendlich, über die Freisetzung von Perforinen (zytotoxischen Proteinen) und Zytokinen wie IL-2 und IFN- $\gamma$  zu einer Zerstörung der Zielzelle durch programmierten Zelltod (Apoptose) führt. Nachdem naive zytotoxische T-Zellen nach Erstkontakt mit einem Antigen aktiviert wurden, durchlaufen sie eine klonale Expansion und werden nun als CD8<sup>+</sup> Effektor T-Zellen bezeichnet. Nach einer erfolgreichen Eradikation des Virus wird der größte Teil der Population apoptotisch (37), sodass nur noch ca. 5-20% der ehemals aktivierten Zellen als virusspezifische CD8<sup>+</sup> Gedächtnis- (*Memory*) T-Zellen zurückbleiben (38).

Ergänzend zum Aktivierungsgrad erlauben Oberflächenmarker eine genauere Klassifizierung verschiedener CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen. Zur Unterteilung bzw. phänotypischen Klassifizierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen eignen sich folgende Oberflächenmarker besonders gut: CD27, CD28, CD45RA oder CD45RO. Naive T-Zellen exprimieren CD27, CD28 und CD45RA während bei Memory T-Zellen CD45RA nicht vorhanden ist. CD8<sup>+</sup> Effektor T-Zellen sind CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> während Effektor/Memoryzellen phänotypisch CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> erscheinen (39). Klinisch spielen zytotoxische T-Zellen besonders hinsichtlich der Entwicklung autoimmunologischer Erkrankungen wie Hashimoto Thyreoiditis, Insulin-abhängiger Diabetes mellitus, Multipler Sklerose oder der Hauterkrankung Vitiligo (eine Hypopigmentierung der Haut unter der ca. 2% der Weltbevölkerung leiden) eine zentrale Rolle (40-42).

## 1.2 Stress

### 1.2.1 Was ist Stress?

Der nordamerikanische Physiologe Walter Bradford Cannon bezeichnete 1929 die Fähigkeit der Erhaltung eines inneren Milieus bei sich gleichzeitig verändernder Umgebung als Homöostase (43). Der Mediziner Hans Selye benutzte den Begriff Stress erstmals im medizinischen Sinne um eine „nicht-spezifische Antwort des Körpers auf jegliche Anforderungen“ zu beschreiben. Der Begriff Stress hat seinen eigentlichen Ursprung in der Physik und bezieht sich dort auf die Wirkung von Druck oder Zug auf ein Material (44).

"Jeder weiß was Stress ist - und doch weiß es keiner" (45), konstatierte Hans Selye, der als Vater und Begründer der Stressforschung tituiert werden kann. Das Wort Stress findet sich im Sprachgebrauch zahlreicher Kulturkreise wieder und kann vielerlei Bedeutungen haben. Es gibt positiven und negativen, chronischen und akuten Stress.

In den letzten 50 Jahren hat sich das wissenschaftliche Credo hinsichtlich der Tatsache, dass Psyche und Organismus zwei funktionell getrennte Systeme darstellen, gewandelt und dabei wieder in den Vordergrund gestellt, dass alle Körpersysteme eher in einem Gleichgewicht stehen und untereinander kommunizieren. Im Zentrum der Forschungen gilt es genau diese Interaktion zwischen Nerven- und Immunsystem in Zukunft näher zu betrachten und neue wissenschaftliche Erkenntnisse hinsichtlich dieser bidirektionalen Kommunikation zu erlangen (46).

Obwohl das Wort Stress eher negative Assoziationen hervorruft, ist Stress doch ein bekannter und allgegenwärtiger Faktor unseres Lebens. Eine Vielzahl von Definitionen wurden bereits für das Konzept der Stressphysiologie beschrieben. Jede einzelne Definition fokussiert sich auf Aspekte hinsichtlich interner bzw. externer Herausforderungen, Störungen oder Reize, auf die Wahrnehmung des Organismus auf den Stimulus oder auf die physiologische Antwort des Organismus auf den Stimulus. Physische oder auch externe Stressoren bedrohen und bedrohten uns und unser Leben wie z.B. Hungersnöte, feindlich gestimmte Tiere und/oder Volksstämme, Kälte und andere Naturgewalten schon immer. Die psychischen Stressoren der industrialisierten Welt sind zunehmend auf dem Vormarsch und lösen die einst in der Steinzeit überwiegenden physischen Stressoren mehr und mehr ab. Bei diesen inneren Stressoren handelt es sich zwar um Reize, die von außen auf den Organismus einwirken aber erst durch die individuelle Bewertung zu einem Stressor werden (47).

Eine ganzheitlichere Definition besagt, dass Stress eine Konstellation von Ereignissen darstellt, bestehend aus einem Stimulus (Stressor), der zu einer Reaktion im Körper führt (Stresswahrnehmung), die wiederum eine Aktivierung der physiologischen *fight-or-flight* Reaktion bewirkt (Stressantwort). Es ist hierbei wichtig zu verstehen, dass ein Stressor den Körper oder das Gehirn nur über eine Induktion biologischer Veränderungen im Organismus beeinflussen kann. Demzufolge ist die physiologische Stressantwort entscheidend für den Einfluss der Stresseffekte auf die Gesundheit. Diese Antwort resultiert in einer Freisetzung von Neurotransmittern, Hormonen, Peptiden, oder anderen lokalen bzw. im System zirkulierenden Faktoren. Selbst Zytokine, Botenstoffe von denen ursprünglich vermutet wurde hauptsächlich Teil des Immunsystems zu sein, scheinen ebenfalls unter Einfluss von psychischem Stress systemisch freigesetzt zu werden (48).

## **1.2.2 Stressantwortssysteme**

### **1.2.2.1 HPA-Achsen- und Sympathikusaktivierung**

Bei der genaueren Betrachtung einer Antwort auf Stressimpulse müssen v.a. zwei verschiedene, aber interagierende Systeme genannt werden. Das sympatho-adrenomedulläre (SAM) und das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (*hypothalamic-pituitary-adrenal*, HPA) -Achsen System. Das SAM-System stimuliert das Nebennierenmark (NNM) Katecholamine (z.B. Adrenalin, Noradrenalin) freizusetzen. Parallel produziert der paraventriculäre Kern des Hypothalamus das *Corticotropin-releasing Hormon* (CRH), das wiederum die Hypophyse zur Freisetzung des adrenokortikotropen Hormons (ACTH) aktiviert. ACTH seinerseits reguliert über eine Aktivierung der NNR die Cortisolfreisetzung ins Blut (49). Die vermehrte Freisetzung sowohl der Glukokortikoide als auch der Katecholamine nach Stressexposition begünstigt die Entwicklung zahlreicher körperlicher Störungen des inneren Gleichgewichts, die sowohl psychisch als auch somatisch sein können. Diese werden unter 1.2.3 differenzierter betrachtet.

### **1.2.2.2 Endocannabinoidsystem**

Die Effekte von Marihuana oder der Wirksubstanz Tetrahydrocannabinol (THC) hinsichtlich immunregulatorischer Funktionen wurden schon lange vor der Entdeckung des Endocannabinoidsystems respektiv der Rezeptoren und Signalkaskaden beschrieben (50).

Die vom Körper gebildeten Endocannabinoide, die an spezifischen Rezeptoren wirken, spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Immunfunktionen und der Aufrechterhaltung einer Immunhomöostase. Immunzellen exprimieren vor allem den CB2 Rezeptor, sezernieren Endocannabinoide, sowie Enzyme für Synthese und Abbau (51).

Eine CB2 Rezeptoraktivierung durch Endocannabinoide zeigt anti-inflammatorische Effekte bei vielen unterschiedlichen Erkrankungen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, entzündlichen Lebererkrankungen und Arteriosklerose (52).

Endocannabinoide weisen komplexe regulatorische Effekte im Immunsystem auf und steuern u.a. die Immunregulation durch Suppression der Zellaktivierung, Inhibierung proinflammatorischer Zytokinproduktionen, NFκB-abhängige Apoptose und Modellierung der T-Zellfunktionen. Endocannabinoide wie N-arachidonylethanolamin (AEA) und 2-arachidonoylglycerol (2-AG) und ihre strukturverwandten Substanzen Palmitoylethanolamide (PEA) können somit als potente Immunmodulatoren angesehen werden (53).

Tierexperimente zeigen ebenfalls, dass sowohl Stress das Endocannabinoidsystem im zentralen Nervensystem (ZNS) und der Peripherie aktivieren kann als auch, dass das Endocannabinoidsystem selbst endokrine Antworten auf Stress modulieren kann. Die Interaktion zwischen der HPA-Achse und dem Endocannabinoidsystem scheint weiterhin komplex. Zahlreiche Studien demonstrieren bzgl. einer neuroendokrinen Antwort auf Stress, dass die endocannabinoide Signalwirkung sowohl eine Aktivierung als auch Terminierung der HPA-Achse erzielen kann.

Somit zeichnet sich das Endocannabinoidsystem als Antwort auf eine Stressexposition, sowohl in die aktivierende Richtung als auch eine Rückkehr in einen homöostatischen Zustand im Anschluss, durch eine bidirektionale Wirkungsweise aus (54).

### **1.2.3 Stressexposition und seine Folgen**

Jegliche intrinsischen und extrinsischen Stimuli, die eine biologische Antwort hervorrufen, können als Stress bezeichnet werden. Die darauffolgenden kompensatorischen Mechanismen

des Organismus werden aufgrund diverser Stressantwortsysteme generiert. Basierend auf Typus, Dauer und Schwere des wirkenden Stimulus kann Stress weitreichende Konsequenzen, angefangen bei Veränderungen der Homöostase bis hin zu lebensbedrohlichen Einflüssen auf den menschlichen Organismus, haben. Stress kann sowohl ein Trigger als auch aggravierender Faktor für viele Erkrankungen sein. Im Folgenden werden die wesentlichen Effekte von Stress auf verschiedene Organsysteme des menschlichen Organismus näher beleuchtet.

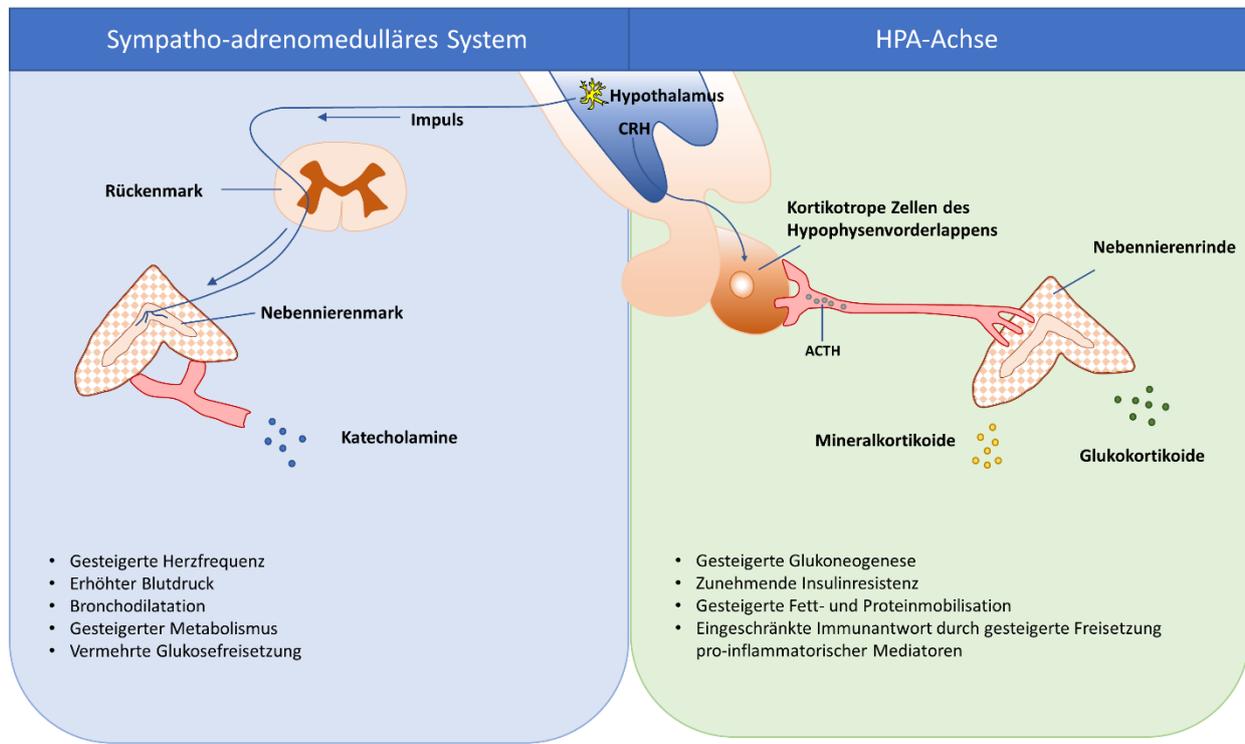
### **1.2.3.1 Akute Stressreaktion**

Nach Erleben eines akuten Stressereignisses kommt es zu einer Reihe von Veränderungen in diversen funktionellen Systemen des menschlichen Körpers, u.a. im Nerven-, kardiovaskulären-, endokrinen und Immunsystem. Diese Veränderungen werden als Stressantwort zusammengefasst und sind in der Regel zumindest kurzzeitig anpassungsfähig (55). Die folgenden zwei Faktoren sind dafür verantwortlich, dass diese generierte Stressantwort anpassungsfähig wird. Zuerst werden Stresshormone zur Freisetzung unmittelbar nutzbarer Energiereserven sezerniert. Und zweitens entsteht infolgedessen ein ganz neues Muster der Energieverteilung. Das Herzzeitvolumen wird nun in Richtung der Organe geleitet, die in stressigen Zeiten vornehmlich aktiv sind wie die Skelettmuskulatur und das Gehirn. Weniger überlebenssensitive Funktionen des Körpers wie die Verdauung, Produktion von Sexual- und Wachstumshormonen werden in dieser Zeit vorerst pausiert. Zusammengefasst werden Bereiche wie Nahrungsaufnahme, sexuelle Aktivität und Wachstum dem Überleben und der körperlichen Unversehrtheit v.a. in Krisenzeiten hintenangestellt.

Das autonome Nervensystem und das HPA-System sind die zwei Hauptsignalkaskaden, die im Falle einer Beeinflussung durch Stress, zur Immundysregulation beitragen. Nach Wahrnehmung einer Stresssituation durch das Gehirn, folgt die Aktivierung der HPA- und SAM-Achse, die mit einer Freisetzung der immunmodulatorischen Hormone ACTH, Cortisol, Wachstumshormonen, Prolaktin, Adrenalin und Noradrenalin reagieren (56). Zusammen sind die Katecholamine und das Cortisol über Lipolyse und die Umwandlung von Glykogen zu Glukose für eine deutliche Steigerung der verfügbaren Energiereserven verantwortlich (57).

Neben der erhöhten Verfügbarkeit und Umverteilung der Energiereserven sieht die Antwort auf akuten Stress auch eine Aktivierung des Immunsystems vor. Insbesondere Zellen des innaten Immunsystems (v.a. Makrophagen und NK-Zellen) migrieren aus dem lymphatischen

Gewebe inklusive der Milz über den Blutstrom (mit konsekutiver temporärer Leukozytose) an den Ort der Infektion und physischen Schädigung um dort ihre Funktionen auszuüben (48).



**Abbildung 1** Stressantwort über das sympatho-adrenomedulläre System und die HPA-Achse. Ausgehend vom Hypothalamus wird einerseits der Stressimpuls über das Rückenmark und das Nebennierenmark weitergeleitet. Dort führt die Katecholaminausschüttung zu einem Anstieg der Herzfrequenz, des Blutdrucks, einem gesteigerten Metabolismus, einer Bronchodilatation und einer vermehrten Glukosefreisetzung. Das im Hypothalamus gebildete CRH bewirkt eine ACTH-Freisetzung des Hypophysenvorderlappens ins Blut. ACTH löst eine Glukokortikoid- und Mineralokortikoidausschüttung an der Nebennierenrinde aus. Folgen sind eine gesteigerte Glukoneogenese, eine zunehmende Insulinresistenz, eine gesteigerte Fett- und Proteinmobilisation und eine eingeschränkte Immunantwort durch eine vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren. CRH *Corticotropin-releasing Hormone*; ACTH Adrenocorticotropes Hormon (Abbildung modifiziert nach Chronic stress, Inflammation, and Colon Cancer: A CRH System-Driven Molecular Crosstalk, Baritaki, S., J Clin Med 2019 (58)).

### 1.2.3.2 Chronische Stressreaktion

Bei wiederholter oder kontinuierlicher Aktivierung der Stressantwortssysteme durch akuten Stress besteht die Gefahr der nun mehr mangelnden Anpassungsfähigkeit und damit einhergehenden Chronifizierung der Stressantwort (55). Epidemiologische Studien über die letzten Jahrzehnte sind mehrheitlich zu dem Schluss gekommen, dass chronischer Stress

zusammen mit psychosozialen Faktoren zu einer erhöhten Inzidenz der koronaren Herzerkrankung führt (59). Die negativen Auswirkungen erhöhter emotionaler und physischer Belastung im Arbeitsumfeld wie Wechselschichtarbeit, Konflikte mit Kollegen und Positionen, die mit einem hohen Anspruchsniveau (Arbeitslast und Termindruck) und einem Minimalmaß an Kontrolle und Autonomie einhergehen, erhöhen einerseits das Risiko für einen Anstieg der Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP) und IL-6 (60) im Serum als auch das Risiko für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen (61). Des Weiteren kann eine lang anhaltende kardiovaskuläre Stimulation über das sympathische Nervensystem zu chronischem Blutdruckanstieg mit konsekutiver vaskulärer Hypertrophie (62) und längerfristig auch zu einer Hypertrophie des linken Ventrikels führen (63). Bei Persistenz besteht die Gefahr der Schädigung arterieller Gefäße mit möglicher Plaquebildung und zukünftig weitreichender klinischer Konsequenz. Studien zeigten, dass psychologischer Stress über eine alpha-adrenerge Stimulation eine Erhöhung der Herzfrequenz und damit einhergehend einen gesteigerten myokardialen Sauerstoffverbrauch bewirken kann, der wiederum ein erhöhtes Risiko für Myokardinfarkte bedingt (64).

Auch eine Beeinflussung und v.a. Suppression der Immunantwort in Form veränderter Zytokinprofile kann mit einem dauerhaft erhöhten Basisstresslevel in Verbindung gebracht werden. Zytokine, als Mediatoren vornehmlich produziert von Zellen des Immunsystems (3), können je nach Profil Immunantworten in unterschiedliche Richtungen lenken. Proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1, IL-2, IL-6 und IL-12), Interferone (z.B. IFN- $\gamma$ ) und TNF sind bekanntermaßen für die Vermittlung akuter inflammatorischer Geschehnisse verantwortlich. TH1 Zytokine sind für die Aufrechterhaltung der zellulären Immunität und Abwehr gegenüber v.a. intrazellulärer Pathogene über Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen verantwortlich. Die TH2 Zytokine bewirken eine Aktivierung der humoralen Immunität über B-Zellstimulierung mit Antikörperproduktion und Erkennung der extrazellulären Pathogene (65). In einer Metaanalyse zu den Ergebnissen aus 30 Jahren Forschung, fanden Segerstrom und Miller (46) u.a. heraus, dass intermediäre Stressoren wie universitäre Examensprüfungen einen TH2 Shift (ein Anstieg der TH2 vermittelten Zytokine im Vergleich zu TH1 Zytokinen) fördert. Eine TH2 Dominanz hat den Effekt einer zellulären Immunitätsunterdrückung zu Gunsten der humoralen Immunität und wird häufig sowohl mit autoantikörperbedingten Immunerkrankungen, entzündlichen Darmerkrankungen als auch mit allergischen Erkrankungen wie Asthma, atopischer Dermatitis oder Psoriasis in

Zusammenhang gebracht (66-69). Als Reaktion auf dauerhaft chronischen Stress wie z.B. die Langzeitpflege von Demenzpatienten berichten Segerstrom und Miller von einer Dysregulation der TH1-, TH2- und der proinflammatorischen Zytokinantwort, die zu einer Reduzierung der sowohl humoralen als auch zellulären T-Zellimmunität führt (46).

Stress kann auch für eine Dysregulation der zellulären und humoralen Immunantwort auf Pathogene z.B. Influenzaviren, verantwortlich gemacht werden (56). Von einer Assoziation zwischen psychischem Stress und einer erhöhten Infektanfälligkeit und damit gesteigerter Empfänglichkeit für Erkältungsviren wurde schon in den 90er Jahren berichtet (70).

Des Weiteren wurde schon mehrfach publiziert, dass chronischer Stress zu einer verzögerten Wundheilung, langsameren Erholung nach Operationen (71), verminderten Antikörperproduktion nach Impfungen und erhöhten Vulnerabilität gegenüber viralen Infektion bei verminderter NK-Zell Zytotoxizität führt (72).

Zahlreiche Publikationen (73-75) bestätigen die Erkenntnis, dass psychosozialer Stress die Reaktivierung latenter Viren begünstigt. Sowohl in Tierstudien als auch im Menschen konnte gezeigt werden, dass es durch Stressexposition, zu einer Herunterregulierung der T-Zell vermittelten Immunantwort gegen Viren kommt. Diese kann infolgedessen zu einer suffizienten Virusreaktivierung und -freisetzung führen.

Der Zusammenhang zwischen neuroendokriner Hormonfreisetzung, Immunregulation und Reaktivierung latenter HSV-Typ 1 Viren wurde erstmals in Tierversuchsstudien beschrieben. Mit HSV-Typ 1 infizierte Mäuse, die einem Stressor ausgesetzt waren, entwickelten im Vergleich zu nicht gestressten Mäusen, eine Reaktivierung der Herpes simplex Viren (76).

Ausgeprägte Stressexposition kann sogar auch eine Malignomentstehung durch entsprechende Suppression des Immunsystems bewirken. Eine verminderte Aktivität der zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen bedingt durch Stress, führt zur Wachstumsförderung von Tumorzellen, genetischer Instabilität und Tumorexpanion (65).

## **1.3 Die Erforschung von Stress im All**

### **1.3.1 ISS als Forschungsplattform**

Die ISS (*International Space Station*) die unseren Planeten in ca. 350-400 km Entfernung im sogenannten *low earth orbit* (niedrige Erdumlaufbahn) umkreist, bietet als einzigartige Forschungsplattform zahlreiche Untersuchungsmöglichkeiten zur longitudinalen, systematischen Forschung zur Gesundheit und Physiologie des Menschen. Mit Beginn der 2000er Jahre und der dauerhaften Besetzung der ISS durch Raumfahrer, wurden zahlreiche Forschungsprojekte zum besseren Verständnis optimaler Ernährungsformen, physiologischer Stressantwortsysteme, der Einflüsse dieser einzigartigen Umwelt mit Schwerelosigkeit und Langzeitisolation auf den Menschen und viele mehr, etabliert. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen helfen, einerseits die Gründe zahlreicher weitverbreiteter u.a. kardiovaskulärer Pathologien, als auch Erkrankungen, die mit Knochendemineralisierung und Dysfunktionen des Immunsystems einhergehen, zu verstehen und andererseits die Entwicklung neuer, medizinisch relevanter Technologien zu ermöglichen (77).

### **1.3.2 Erdgebundene Analogplattformen oder Alternativen zur Forschung auf der ISS**

Erdgebundene Studien zur Vorbereitung von bemannten Langzeitmissionen erlauben die Untersuchung von möglichen gesundheitsverändernden Effekten unter standardisierten Bedingungen. Terrestrische Analogstudien werden v.a. durchgeführt, um selektive Weltraumkonditionen nachzuahmen. Die Konsequenzen von verminderter Gravitationskraft können beispielsweise sehr gut in Langzeit-Bettliege(*bedrest*)-Studien mit 6° Kopftieflagerung simuliert oder unter Wasserimmersion nachempfunden werden. Der Faktor Langzeitisolation kann dagegen sehr gut auf Polarstationen wie z.B. in der Antarktis simuliert werden. Obwohl diese Analogstudien es erlauben, die physiologischen Adaptationsmechanismen hinsichtlich raumfahrtassoziierter Konditionen zumindest teilweise zu untersuchen und sehr hilfreich für die Etablierung neuer Methoden und Tests sind, werden echte Weltraummissionen mit ihren allumfassenden charakteristischen Auswirkungen weiterhin der Goldstandard hinsichtlich der Untersuchung humanphysiologischer Veränderungen für die sog. bemannte Raumfahrt sein (78).

### **1.3.3 ISS als Langzeitstressmodell**

Bedingungen unter denen Weltraumflüge stattfinden, können in vielerlei Hinsicht die Gesundheit des Menschen beeinträchtigen. Stressoren als Reize, die v.a. bei langen interplanetaren Missionen eine große Bedeutung spielen, gewinnen so im Hinblick auf eine mögliche Krankheitsentstehung bei Raumfahrern zunehmend an Bedeutung. In Zukunft gilt es zu klären, welche Art der Stressexposition auf Langzeitmissionen hauptsächlich für Raumfahrt-induzierte Veränderungen des Immunophänotyps und Funktionsstatus verantwortlich ist und wie sich diese Effekte auf genetischer, epigenetischer und transkriptioneller Ebene widerspiegeln. Z.B. der Zustand der sozialen und räumlichen Isolation als typisch chronischer Stressor wäre ein Erklärungsansatz. Auch anhaltende soziale und räumliche Isolierung, die, in der Aktivierung vielfältiger Stressantwortsysteme resultiert und Immunantworten triggern kann, kann so möglicherweise länger anhaltende physiologische Veränderungen bewirken (79).

### **1.3.4 Raumfahrt und die Rolle des Immunsystems**

Adaptationsmechanismen an die extremen Umgebungsbedingungen des Weltalls und die Auswirkungen auf das Immunsystem können weitreichende gesundheitliche Konsequenzen für Raumfahrer nach sich ziehen. Sowohl Schwerelosigkeit, chronischer Stress und prolongierte soziale und auch räumliche Isolation als auch der Stress der Readaptation an die Umgebung der Erde nach Rückkehr können einen Einfluss auf die Immunität des Menschen haben. Zahlreiche Studien wurden bereits durchgeführt, um die Effekte von Stress durch Weltraumflug auf das menschliche Immunsystem während und nach Aufenthalt im All zu untersuchen (80).

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Stressantwortsysteme im Weltall stellen eine Verbindung von Kognition, neuroendokrinen und autonomen Funktionen mit dem Immunsystem dar. Stress induziert eine Kaskade pathophysiologischer Events, die eine Freisetzung von Stresshormonen, eine Aktivierung des autonomen Nervensystems, eine Aktivierung des purinergen Systems und eine Veränderung der Mediatoren des Immunsystems, die für die Beeinflussung zerebraler Funktionen verantwortlich sind, induziert (81). Erkenntnisse vorheriger Untersuchungen bestätigen die Tatsache, dass das Immunsystem eine Vielzahl an Veränderungen während des Raumflugs wie z.B. Verschiebungen der Leukozytenpopulationen (82, 83), veränderte Monozyten- und

Granulozytenfunktionen (83) sowie Zytokinmuster (84) mit sich bringt. Des Weiteren wurde mehrfach von einer Reaktivierung von latenten Herpesviren während eines Kurzeintaufenthalts im All berichtet (85). Solche Veränderungen, sollten sie auch bei längeren interplanetaren Missionen auftreten, könnten zu Krankheiten, die mit Immunimbancen wie Hypersensitivitätsreaktionen, Allergien, Autoimmunerkrankungen, chronischen Infektionserkrankungen vergesellschaftet sind oder zu anderen entzündlichen Infektionsgeschehnissen führen, auch noch nach Rückkehr zur Erde (86, 87).

### **1.3.5 Gründe für die Durchführung von Studien auf der ISS**

Mit dem Start der ISS-Ära sind Langzeitaufenthalte im All mehr und mehr üblich geworden, sodass sich respektive auch die Zahl der Raumfahrer bzw. Probanden Jahr für Jahr erhöht. Jeder weitere Proband bietet die einzigartige Möglichkeit, Mechanismen und zugrundeliegende Ursachen der bereits gewonnen Erkenntnisse zu identifizieren und weiter zu vertiefen.

Raumflüge stellen allerdings auch ein nicht zu unterschätzendes, erhöhtes Erkrankungs- oder Verletzungsrisiko dar. Da das Immunsystem von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung einer Homöostase im menschlichen Körper und für die Abwehr von Infektionen ist, ist davon auszugehen, dass Immundysfunktionen eine Rolle für die Gesundheit des Raumfahrers spielen. Immunrelevante Erkrankungen könnten dabei auch den Missionserfolg in Frage stellen und werden von der NASA (*National Aeronautics and Space Administration*) als missionskritisch eingestuft.

Bereits bei den Apollo Missionen zum Mond wurde schon von Infektionen der Besatzung berichtet und Quarantänemaßnahmen implementiert, um das Risiko für Infektionen zu reduzieren (88). In systemischen Analysen bei amerikanischen ISS Astronauten berichten Crucian et al., dass 46% der 46 untersuchten ISS Astronauten, während einer 6-monatigen ISS-Mission nennenswerte immunassoziierte medizinische Ereignisse erlebten. Nennenswerte Ereignisse definieren sich als langanhaltend, wiederholt auftauchend oder auch therapieresistent. Infektionserkrankungen machten 29%, langanhaltende Hautausschläge 40% dieser Ereignisse aus (86).

Einerseits können diese raumfahrtassoziierten Pathologien wie z.B. Immundysfunktionen, andererseits aber auch Unfälle und unvorhersehbare gewöhnliche Erkrankungen (wie z.B. eine Cholezystitis oder Appendizitis) den Raumfahrer und seine Crew vor große

Herausforderungen stellen. Während akute medizinische Notfälle durch Rückführung von der ISS auf die Erde zeitnah innerhalb von Stunden betreut werden können, besteht diese Möglichkeit bei Missionen fernerer Ziele wie zum Mond und zum Mars nicht.

Aus diesem Grund und zum Schutz des Raumfahrers und Überleben auf Langzeitmissionen auf dem Weg zum Mond oder Mars ist es von den Raumfahrtagenturen als unerlässlich angesehen, die Anpassung des Menschen an kritische Stresssituationen und deren Einfluss auf das Immunsystem zu untersuchen und zu verstehen. Dies erfolgt sowohl auf der Erde in den sogenannten Analogwelten (siehe 1.3.2) als auch im Weltraum. Entsprechende systematische Untersuchungen werden helfen, eine optimale medizinische Betreuung zu ermöglichen und in Zukunft den Raumfahrer vor potenziellen negativen Einflüssen auf die Gesundheit während des Langzeitaufenthaltes im All besser zu schützen.

Da Stress einen Einfluss auf alle Zellen und Organsysteme des Körpers hat, ist es von fundamentaler Bedeutung diese Zusammenhänge und die resultierenden Adaptationsmechanismen eines jeden Individuums zu verstehen. Das neu erlangte Wissen aus diesen systemischen und hochstandardisierten Forschungsplattformen wird in Zukunft helfen, zahlreiche stressreiche und extreme Lebensformen auch aus dem Alltag besser einzuordnen und eine adäquatere Adaptation an extreme Situationen nicht nur von Raumfahrern auf Langzeitmissionen, sondern v.a. bei z.B. kritisch kranken Patienten auf Intensivstationen, Nacht- bzw. Schichtarbeitnehmer, Minenarbeiter, Expeditionsteams in der Antarktis u.v.m. zu realisieren.

## 2 Zielsetzung

Langzeitmissionen im Weltall induzieren komplexe und multidirektional ausgerichtete Stressantworten von neuronaler, endo-, para-, und autokriner Natur, die das menschliche Immunsystem beeinflussen. Stressreiche Lebensbedingungen im Weltall und Schwerelosigkeit potenzieren sich durch Veränderung der Schlafgewohnheiten mit aufgehobenem Tag-Nacht-Rhythmus, Isolation und vermehrter Arbeitsbelastung in ihrer Wirkung.

Ziel dieser Studie ist eine systematische Untersuchung der Konsequenzen von Stress auf Immunantworten aufgrund der Lebenssituation im Weltall.

Im Vordergrund der Untersuchungen stehen die systemische Erfassung

1. der psychischen Stressbelastung und der Veränderung des Glukokortikoid- und des Endocannabinoid-Systems sowie
2. phänotypische und immunfunktionelle Analysen

zur Beantwortung der Frage nach den Veränderungen des Leukozytenphänotyps, veränderter Zytokinprofile und isolationsbedingter T-Zellaktivierung.

## **3 Methodik**

### **3.1 Ethik**

Die vorliegende Studie wurde in Einklang mit der Deklaration von Helsinki des Weltärzteverbandes von 1975 (überarbeitet im Jahr 2013) durchgeführt. Das Protokoll wurde vom russischen Ethikkomitee des Instituts für Biomedizinische Probleme (*Institute of Biomedical Problems, IBMP*), Moskau, bewertet, unter dem Studientitel IMMUNO und der Protokollnummer MBI-29 gelistet. Das Protokoll wurde zudem durch das *medical board* der ESA (*European Space Agency*) und der russischen Raumfahrtbehörde ROSKOSMOS genehmigt. Alle Probanden gaben ihre Einwilligung nach Maßgabe der Helsinki-Deklaration.

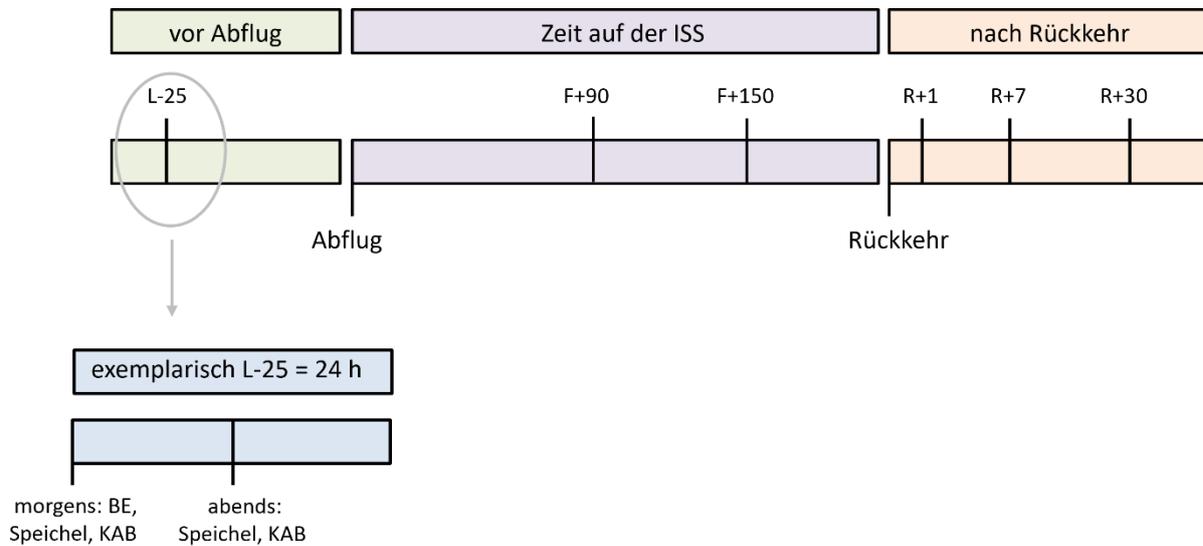
### **3.2 Nomenklatur**

Im Allgemeinen wird der Begriff Raumfahrer in dieser Arbeit verwendet. Russische Raumfahrer, die der russischen Raumfahrtagentur ROSKOSMOS unterstellt sind, werden als Kosmonauten bezeichnet, Raumfahrer, die der ESA oder NASA angehörig sind, als Astronauten. Für diese Studie wurden aufgrund der zu dieser Zeit aktiven Kosmonauten nur männliche Probanden rekrutiert. Werden Studien zitiert, wird jeweils die untersuchte Gruppe (Astronaut oder Kosmonaut) genannt.

### **3.3 Studiendesign**

Die Durchführung der IMMUNO Studie fand vor Ort in einer Kleinstadt (genannt „Star City“) in der Nähe von Moskau, in der Kosmonauten auf ihren Aufenthalt auf der ISS vorbereitet und trainiert werden, statt. Die Auswahl der Kosmonauten ist Aufgabe des staatlichen russischen Raumfahrtkonzerns ROSKOSMOS. Zwölf männliche Kosmonauten, mit einem Durchschnittsalter von 42 Jahren, wurden nach sorgfältiger Aufklärung in unsere Studie IMMUNO eingeschlossen und waren bereit, sich vor, während und nach Ihrem Aufenthalt auf der ISS zahlreichen Tests und Untersuchungen anhand eines festgelegten Protokolls zu unterziehen. Ausschnitte dieses Protokolls, die relevante Abschnitte dieser Dissertation betreffen, werden im Folgenden differenzierter beleuchtet.

### 3.4 Zeitpunkte der Probengewinnung



**Abbildung 2** Abnahmezeitpunkte der Proben im Überblick.

BE=Blutentnahme, KAB=Kurzfragebogen zur aktuellen Beanspruchung

L-25 (Launch minus 25 Tage): ca. 25 Tage vor Abflug

F+90 (in-Flight plus 90 Tage): ca. 90 Tage nach Ankunft auf der ISS

F+150 (in-Flight plus 150 Tage): ca. 150 Tage nach Ankunft auf der ISS

R+1 (Return plus 1 Tage): 1 Tag nach Rückkehr auf die Erde

R+7 (Return plus 7 Tage): ca. 7 Tage nach Rückkehr auf die Erde

R+30 (Return plus 30 Tage): ca. 30 Tage nach Rückkehr auf die Erde

### 3.5 Kurzfragebogen zur aktuellen Beanspruchung (KAB)

Dieser standardisierte Fragebogen wurde zu allen Zeitpunkten zeitgleich zur Speichelsammlung ausgefüllt. Bei Schwierigkeiten bzgl. der Definition eines Schlaf-Wach-Rhythmus, wurde so verfahren, dass der Abendfragebogen ca. zwölf Stunden nach Bearbeitung des Morgenfragebogens ausgefüllt wurde. Der Test besteht aus jeweils sechs polar angeordneten positiven und negativen Adjektiven, die eine sechsstufige Ratingskala begrenzen und das momentane Befinden beschreiben. Insgesamt sind ein bis sechs Punkte zu erreichen. Sechs Punkte bedeutet eine maximale subjektive Anspannung, ein Punkt entspricht einer minimalen subjektiven Beanspruchung. Durch die geringe Bearbeitungsdauer von einer halben Minute ist es möglich, den Test in kurzen Zeitabständen mehrfach vorzulegen (89).

### **3.6 Speichelgewinnung und Cortisolmessung**

Speichel wurde sowohl während als auch vor und nach Aufenthalt auf der ISS morgens und abends vor dem Zähneputzen und der Aufnahme von Nahrung, während der Bearbeitung des KAB, gesammelt. Der im Röhrchen enthaltene Schwamm (Sarstedt, Deutschland) wurde, nachdem er für ca. 30-45 Sekunden gekaut wurde, zuerst bei Raumtemperatur, anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Cortisol im Speichel wurde im Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München mittels eines Elektrochemilumineszenz (ECL)-Immunoassays (Roche Diagnostics, Deutschland) gemessen.

### **3.7 Blutabnahme**

Das Blut wurde mithilfe von Butterfly-Kanülen und Monovetten der Fa. Sarstedt (Deutschland) unter sterilen Bedingungen aus einer gestauten Unterarmvene entnommen. Dabei wurden Monovetten mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und Lithium-Heparin Zusatz verwendet. Aus der ersten 9 ml EDTA Monovette wurden 3 x 500 µl Vollblut für die Bestimmung der Endocannabinoide aliquotiert und zeitnah bei -20 °C tiefgefroren. Außerdem wurden 3 ml in ein EDTA Vacutainer für die Plasmagewinnung überführt, dieser für 5 min bei 2500 Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute, rpm*) zentrifugiert, der Überstand in vorbeschriftete Kryokonservierungsröhrchen überführt und diese bei -20 °C tiefgefroren. Die restlichen in der Monovette verbleibenden ml wurden zur Erstellung eines Blutbildes nach München transportiert. Aus der zweiten 4,5 ml Lithium-Heparin Monovette wurden 2 ml Blut in ein Regiergefäß überführt und diese gekühlt ebenfalls zur weiteren Verarbeitung nach München überführt. Die dritte 9 ml Lithium-heparinisierte Monovette wurde nach Abnahme sofort sorgfältig verpackt und in München an ein externes Labor zur Bestimmung diverser Parameter innerhalb von 24 Stunden übergeben. Während des ISS Aufenthaltes haben sich die Kosmonauten gegenseitig Blut abgenommen, dieses zentrifugiert und unmittelbar im Anschluss im MELFI (*Minus Eighty Degree Laboratory Freezer For ISS*) bei -100 °C tiefgefroren.

#### **3.7.1 Blutbild**

Hämoglobin, Hämatokrit, mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), Erythrozyten, Retikulozyten und Thrombozyten wurden mittels automatischer laserbasierter Hämatologie-

Systeme (Advia 120, Siemens, Deutschland) innerhalb von 12h nach Abnahme im Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München analysiert. Blutausstriche für ein Differentialblutbild, der prozentualen Aufteilung der Leukozyten, wurden sowohl an Bord der ISS als auch auf der Erde vor Abflug und nach Landung auf der Erde nach Standard durchgeführt und ebenfalls im Institut für Laboratoriumsmedizin am Klinikum der Universität München ausgewertet.

### **3.7.2 Separation humaner Leukozyten**

Die Isolierung der Leukozyten erfolgte aus Lithium-Heparin antikoagulierte Vollblut von gesunden auserwählten Kosmonauten. Leukozytenreiches Plasma (LRP) wurden über einen kontinuierlichen Ficoll-Gradienten gewonnen. In einem 13 ml Röhrchen (Sarstedt, Deutschland) wurden in einem 1:1 Mischungsverhältnis 2 ml von dem aus Star City mitgebrachten heparinisiertem Vollblut über 2 ml Histopaque mit einer Dichte von 1,077 g/ml (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) geschichtet. Im Anschluss an eine 30-minütige Phase, in der die Erythrozyten das Ficoll durchdrangen und ein Sediment am Boden des Röhrchens bildeten, wurden jeweils die obersten 500 µl des leukozytenreichen Plasmas gewonnen. Das LRP wurde bis zur Analyse bei Raumtemperatur gelagert.

### **3.7.3 Durchflusszytometrische Analysen: Prinzip der Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie stellt eine gute Methode dar, eine hohe Anzahl von Zellen in geringer Zeit in Bezug auf verschiedene zelluläre Parameter (Volumen, Fluoreszenz, Absorption) zu erfassen. Hierbei passieren die Zellen einer Suspension nach hydrodynamischer Fokussierung einzeln einen Laserstrahl (90). Durch zwei Linsen, eine in Richtung des Laserstrahls und die andere im rechten Winkel dazu positioniert, wird das an der Oberfläche der Zellen und Zellorganellen gestreute Licht gesammelt und nach Passage diverser Filter durch Fotoröhren und -dioden in einen elektrischen Impuls verwandelt, der mit der Intensität des Lichtsignals korreliert. Das axial in Richtung des Laserstrahls gestreute Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) ist proportional zur Zellgröße, während sich das orthogonal gestreute Licht (*Side Scatter*, SSC) proportional zur Zellgranularität darstellt (91). Somit lassen sich differente morphologische Charakteristika der zu untersuchenden Zellen, wie Zellgröße, Gestalt und die Anordnung der inneren zellulären Strukturen bewerten.

Erweitert wird das Spektrum der mittels Durchflusszytometrie detektierbaren Parameter durch die Möglichkeit der spezifischen Färbung verschiedener Komponenten mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen. Die dem Argonlaser (Anregungswellenlänge 488 nm) zugeordneten drei Fluoreszenzdetektoren (FL1, FL2 und FL3) sind in der Lage Grünfluoreszenz (500-560 nm), Orangefluoreszenz (543-627 nm) und Rotfluoreszenz (>630 nm) aufzunehmen (92).

Die vorliegenden Messungen wurden mit dem Durchflusszytometer FACScan der Fa. BD (USA) durchgeführt. Es wurden standardisiert 10.000 Events pro Analyse gezählt und parallel sowohl die aus Oxidation von Dihydrorhodamin (DHR) zu Rhodamin resultierende Grünfluoreszenz (FL1) und Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht für jede Zelle bestimmt. Die graphische Darstellung erfolgt als *Dotplot* und Histogramm. Beim *Dotplot*-Diagramm werden zwei Parameter gegeneinander aufgetragen und bei jeder Schnittstelle der beiden Werte ein Punkt angezeigt. Die SSC/FSC-Darstellung ermöglicht die Differenzierung einzelner Leukozytensubpopulationen (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) aufgrund deren Größe und Granularität und erfolgte mit linearer Verstärkung. Die Fluoreszenzintensität im FL1/SSC-*Dotplot* wurde logarithmisch verstärkt und auf einer linearen Skala mit 1024 Kanälen im Histogramm dargestellt. Durch Definition und Aktivierung eines Gates um die Granulozyten wurde die von der DHR-Oxidation und damit der Sauerstoffradikal-Produktion abhängigen Grünfluoreszenz lebender Granulozyten graphisch dargestellt.

### **3.7.4 Bestimmung der intrazellulären Radikalproduktion der PMNL mit der Dihydrorhodamin 123-Methode**

Als Indikator für den oxidativen *Burst*, sprich der Sauerstoffradikalproduktion, der PMNL wurde DHR 123 gewählt. Die membranassoziierte NADPH-Oxidase katalysiert im oxidativen Metabolismus neutrophiler Granulozyten die Bildung von Superoxidanionen aus Sauerstoff. Die hochreaktiven Superoxidanionen, die selbst toxisch für die Zelle sein können, werden durch die Superoxid-Dismutase zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziert. Für die quantitative Bestimmung der Sauerstoffradikalproduktion eignet sich dieser Fluoreszenzassay. Das frei permeable und nicht fluoreszierende DHR diffundiert bei Inkubation mit leukozytenreichem Plasma in die Mitochondrien der PMNL und wird dort während des oxidativen *Bursts* durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und die damit einhergehende pH-Veränderung zu Rhodamin oxidiert. Dieses fluoresziert grün bei einem Absorptionsmaximum von 488 nm. Die Zunahme

der Fluoreszenz als quantitatives Maß für die Produktion der Sauerstoffradikale wird durchflusszytometrisch bestimmt (93).

### 3.7.4.1 Stimulation der Radikalproduktion von PMNL

Um die Stimulierbarkeit der neutrophilen Granulozyten quantifizieren zu können, wurden die isolierten PMNL als Positivkontrolle mit zwei verschiedenen Substanzen inkubiert. Dies war erstens das chemotaktische Peptid fMLP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) als membranvermittelter Stimulus und zweitens das synthetische Derivat des Diacylglycerins Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) als Aktivator der Signaltransduktion über die Proteinkinase C und damit indirekt auch als Induktor der für die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies wichtigen NADPH-Oxidase.

### 3.7.5 Durchflusszytometrischer Ansatz

5 ml Falcon-Röhrchen wurden mit 1 ml Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Apotheke des Klinikum der LMU München, Deutschland) vorgefüllt und im Folgenden bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 37°C im Wasserbad (Thermo Haake, Deutschland) platziert. 20 µl leukozytenreiches Plasma und 10 µl DHR ( $1,1 \times 10^6$  M) wurden jedem Röhrchen zugesetzt und für zehn min inkubiert, bevor die Stimulanzien 10 µl fMLP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) ( $10^{-7}$  M) und 10 µl PMA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) ( $10^{-7}$  M) für weitere fünfzehn Minuten im Wasserbad hinzupipettiert wurden. Gestoppt wurde die Stimulation durch Überführung der Proben auf Eis. Unmittelbar danach wurde die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt und die Proben blieben bis zum Abschluss der Messungen auf Eis gelagert. Tabelle 1 gibt einen detaillierten Überblick über die einzelnen Handlungsschritte.

min	Tube 1	Tube 2	Tube 3	°C
00:00	1 ml HBSS	1 ml HBSS	1 ml HBSS	37
00:10	20 µl LRP, 10 µl DHR	20 µl LRP, 10 µl DHR	20 µl LRP, 10 µl DHR	
00:20		10 µl fMLP	10 µl PMA	
00:35	auf Eis			

Tabelle 1 Pipettierschema des durchflusszytometrischen Ansatzes

### 3.7.6 Lymphozytenphäotypisierung: Zellulärer Immunstatus mittels

#### Durchflusszytometrie

Der zelluläre Immunstatus gibt Auskunft über die absoluten und proportionalen Verhältnisse der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut und dient somit der Erweiterung der zellulären Differenzierung des großen Blutbildes. Viele Erkrankungen stehen in direktem Zusammenhang mit Störungen im Immunsystem und gehen mit Verschiebungen der Lymphozytensubpopulationen einher (94). So kann bei Kosmonauten eine mögliche Infektanfälligkeit diagnostiziert werden.

Im Gegensatz zu den anderen Untergruppen der Granulozyten, die mittels der Färbung nach Pappenheim und anschließender Mikroskopie klar zugeordnet werden können, lassen sich die Lymphozyten so einfach nicht näher differenzieren. Hierzu dient die Durchflusszytometrie, mittels der sich durch Einsatz spezifischer Antikörper (s.u.) ihre funktionellen Merkmale darstellen und quantifizieren lassen (95). Folgende Lymphozytensubpopulationen wurden unterschieden:

<b>CD-Antigen</b>	<b>Expriemierende Zelle</b>
CD3+	T-Lymphozyten
CD3+CD4+	T-Helferzellen
CD3+CD8+	T-Suppressorzellen, zytotoxische T-Zellen
CD3-CD19+	B-Lymphozyten
CD3-CD16+CD57+	Natürliche Killerzellen
CD3+CD4+CD28+ und CD80+CD68+	Kostimulatorische Lymphozyten
CD3+CD8+CD45RA+CD28+	Naïve CD8+ T-Zellen
CD3+CD8+CD45RO+CD28+	CD8+ Memory T-Zellen
CD3+CD8+CD28-	CD8+ Effektor T-Zellen
CD3+CD4+CD45RA+	Naïve CD4+ T-Zellen
CD3+CD4+CD45RO+	CD4+ Memory T-Zellen
CD3+CD4+CD25+	Regulatorische T-Zellen
CD3+CD95+	Fas-Rezeptor positive T-Lymphozyten

**Tabelle 2** Subgruppen der Lymphozyten und ihre Oberflächenmarker

Die einzelnen Subpopulationen lassen sich getrennt mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern bestimmen, die gegen spezifische Antigene auf der Zelloberfläche gerichtet sind,

den sog. *Cluster of Differentiation*. Die eigentliche Messung erfolgt mittels Laserlicht des Durchflusszytometers, wobei gleichzeitig auch Eigenschaften, Zellgröße (FCS) und Granularität (SCC) miterfasst wurden (91). Die Auswertung erfolgt dann mittels laborinterner immunologischer Gating Strategien. Für diese Analysen kam ein BD FACSCanto (BD, USA) in der 8-Farb-Option mit drei Lasern zum Einsatz. Somit konnten mehrere Fluoreszenzfarbstoffe parallel genutzt werden.

#### **3.7.6.1 Lymphozytenphäotypisierung: Protokoll**

Den Probanden wurde nach dem oben beschriebenen Protokoll Lithium-heparinisertes Vollblut abgenommen. 50 µl des Blutes wurden mit entsprechenden Antikörpern gegen die Oberflächenproteine für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Eine Lyse der Erythrozyten wurde mit dem Lysepuffer (BD Bioscience, USA) erzielt. Nach einer Inkubation für drei Minuten im Dunkeln wurde die Analyse mit dem BD FACSCanto (BD, USA) extern von der Fa. Immumed (Deutschland) durchgeführt.

#### **3.7.7 Oberflächenadhäsionsmarker**

Leukozytenreiches Plasma wurde anhand des bereits beschriebenen Protokolls gewonnen und mit Antikörpern für die entsprechenden Oberflächenmoleküle  $\beta$ 2-integrin (CD18, IB4) und L-Selektin (CD62L, D200) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) (96) markiert und gefärbt. Eine durchflusszytometrische Messung, wie bereits beschrieben, wurde angeschlossen.

#### **3.7.8 Intrazelluläres Glutathion**

Die Beurteilung des Glutathion(GSH)haushalts erfolgt durch Bestimmung des intrazellulären GSH-Spiegels in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) aus Lithium-heparinisiertem Vollblut. PBMC wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und Histopaque gewonnen, im Anschluss in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS-Puffer, Deutschland) gewaschen und in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) resuspendiert. Es folgt eine Markierung mit Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)-markierten monoklonalen Antikörpern (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) zur Identifizierung der CD4 oder CD8 positiven T-Lymphozyten und Inkubation für 5 min bei RT mit dem Farbstoff Mercury Orange

(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland). Intrazelluläre GSH-Konzentrationen wurden durchflusszytometrisch mit dem BD FACSCalibur (BD, USA) bestimmt.

### **3.7.9 Zytokinbestimmung**

Zur Bestimmung der Zytokine und Erstellung der Profile im Hinblick auf die Charakterisierung einer durch T-Lymphozyten getriggerten antigenabhängigen zellulären Immunantwort entwickelten Feuerecker et al. eine dem *delayed-type hypersensitivity* (DTH) Hauttest angepasste *in vitro* Methode (97). 500 µl des gewonnenen heparinisierten Vollbluts wurden mit der gleichen Menge an RPMI-Medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) und den entsprechenden Antigenen (*pokeweed mitogen* (PWM), Pilzmischung (*Candida albicans* Wildtyp (RayBiotech, USA) und *Trichophyton* Spezies (Allergopharma GmbH & Co. KG, Deutschland)) und *Aspergillus fumigatus* (RayBiotech, USA)) zur Stimulierung für 48h bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das PWM stimulierte Plasma wurde als Positivkontrolle für diesen Test gesehen. Nach der jeweiligen Inkubationsperiode wurden die Überstände abpipettiert und bei -20°C bis zur jeweiligen Bestimmung der Zytokine tiefgefroren. Die Analyse der folgenden Zytokine IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF und TGF-β erfolgte zeitgleich laut Herstellerprotokoll und unter standardisierten Bedingungen mittels Multiplex Kits der Firma Biorad (USA). Die Zytokinkonzentrationen in der Probe wurden anhand von Standardkurven, die automatisch von der Bio-Plex Software (Bio-Rad, USA) berechnet werden, ermittelt. Die Analyse der Zytokine aus EDTA-Plasma wurde ebenfalls anhand identischer Methoden durchgeführt.

### **3.7.10 Endocannabinoidbestimmung**

Zur Analyse der Endocannabinoide Anandamid (ANA) und 2-AG der oben erwähnten Probanden aus humanem Vollblut wurde die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie in Kombination mit der Tandem-Massenspektrometrie (*high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry*, HPLC-MS/MS) verwendet (98, 99). Speziell ANA und 2-AG wurden aufgrund ihres günstigen Antwortprofils bzgl. einer prompten Antwort auf akuten Stress, cannabinomimetischen Aktivität und einer Messbarkeit und Präsenz im humanen Plasma gewählt (100). Die Endocannabinoidmessungen, einschließlich der Probenaufarbeitung und Dateninterpretation ist von uns, der Klinik für Anaesthesiologie

der LMU München in Kooperation mit dem Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie in Kreischa (bei Dresden, Deutschland) vorgenommen worden.

### **3.7.11 Endocannabinoidextraktion**

Venöses Vollblut wurde unmittelbar nach der Abnahme aliquotiert und bis zur Analyse zuerst in Star City bei -30 °C anschließend in München bei -80 °C gelagert. Das Intervall zwischen Blutentnahme und Tieffrieren wurde auf unter 10 min gehalten, da gezeigt wurde, dass die Endocannabinoidgenerierung auch *ex vivo* weiter voranschreitet.

Die Endocannabinoidkonzentrationen bleiben im gefrorenen Zustand für min. 6 Monate stabil. Zur Extraktion von AEA und 2-AG wurden jeweils 20 µl des internen Standard-Mix (Cayman Chemical, USA) und 1 ml tert-Butyl Methyl Ether (tBME) (Merck KGaA, Deutschland) zu den bereits 500 µl-Aliquots des heparinisierten Vollbluts pipettiert. Nach einer einminütigen Phase bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (IKA Labortechnik, Deutschland), wurden die Proben für 5 min bei 13900 rpm (Eppendorf AG, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß (Sarstedt, Deutschland) überführt, unter Stickstoff eingedampft und mit jeweils 80 µl Acetonitril (Merck KGaA, Deutschland) und Puffer wiederaufgenommen. Nach erneuter 10-minütiger Inkubation auf dem Schüttler und 5-minütiger Zentrifugation bei 16000xg konnte nun der sich klar abzugrenzende Überstand in *high performance liquid chromatography* (HPLC)-Röhrchen (CS – Chromatographieservice GmbH, Deutschland) überführt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert werden.

## **3.8 Statistik und Software**

Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen wurde mittels der Software SPSS 24 (IBM, USA) und SigmaPlot 13.0 (Systat Software inc., USA) vorgenommen. Die Daten wurden hinsichtlich einer Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov Test analysiert. Eine Box-Cox Transformation der Daten wurde nur im Falle einer nicht-Normalverteilung der Residuen durchgeführt. Diese Daten wurden dann mit einem *linear mixed effects* (LME) *Model* analysiert. Zeitpunkte wurden als feste und die Probanden als zufällige Effekte angesehen. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Bei der Erstellung des Modells erfuhren wir Unterstützung durch Herrn Dr. Bernd Johannes vom Deutschen Luft- und Raumfahrtzentrum (DLR), Köln-Bonn (Deutschland).

## 4 Material

### 4.1 Verbrauchsmaterial

Cutasept F Lösung 250 ml	Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
S-Monovette® 9 ml, K2 EDTA-Gel	Sarstadt, Nümbrecht, Deutschland
Safety-Multifly®-Kanüle 21G	Sarstadt, Nümbrecht, Deutschland
Nunc™ Cryogenic Tubes 1,0 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
S-Monovette® 9 ml, Lithium-Heparin	Sarstadt, Nümbrecht, Deutschland
Transferpipette 1 ml	Sarstadt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstadt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen für Multipette®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
SafeSeal Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Salivette® Cortisol	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
BD Discardit II Spritzen 5 ml	BD Bioscience, San Jose, USA
Urin-Monovette® 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
BD Vacutainer® PPT™ 5 ml, K2EDTA	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
BD Falcon™ Röhrchen, Polypropylen	BD Bioscience, San Jose, USA
Röhre 13 ml, 100 x 16 mm, Polypropylen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 4,9 ml, K3 EDTA	Sarstadt, Nümbrecht, Deutschland
KH-Flasche G03-Polypropylen	CS – Chromatographie Service GmbH, Deutschland
Schraubkappe G9-rot 1,0 mm	CS – Chromatographie Service GmbH, Deutschland

### 4.2 Geräte

FACScan™ Durchflusszytometer	BD Immuncytometry Systems, San Jose, USA
FACSCanto™ Durchflusszytometer	BD Immuncytometry Systems, San Jose, USA
FACSCalibur™ Durchflusszytometer	BD Immuncytometry Systems, San Jose, USA
Haraeus Multifuge 3S-R in München	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eppendorf Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

PowerSpin MX Centrifuge	Unico, Suite E Dayton, USA
Rotofix 32 Zentrifuge	Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Eppendorf Reference® Pipette 0,1 - 2,5 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference® Pipette 2 - 20 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference® Pipette 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipette® 1 µl - 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schüttelwasserbad SWB25	Thermo Haake, Karlsruhe, Deutschland
Milli-Q® Wasserdestillierungsanlage	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Coulter Counter T540	Coulter Electronics, Krefeld, Deutschland
Vortex VF2	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mac Monitor 17"	Apple, Cork, Irland
FACStation™ MAC G4	Apple, Cork, Irland
Advia 120	Siemens, Erlangen, Deutschland
Kältefalle CT 02-50 SR	Martin Christ, Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Hartz, Deutschland
Rotations-Vakuum-Konzentrator	Martin Christ, Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Hartz, Deutschland
RVC 2-25 CD plus	Osterode am Hartz, Deutschland
<i>LC-MS/MS-technology</i>	LC-system: Agilent Technologies 1200 series, Böblingen, Deutschland mass spectrometer: Q-Trap 5500, AB Sciex, Darmstadt, Deutschland
<i>Chromatographic separation</i>	Hypersil Gold C18-column (100 × 2.1 mm, 3 µm; ThermoFisher Scientific, Langerwehe, Deutschland Zorbax Eclipse XDB-C8-fingertight guard cartridge 2.1 × 12.5 mm, 5 µm; Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
<i>Bio-Plex Suspension Array System 100</i>	Fa. Bio-Rad, Laboratories, Hercules (CA), USA

### 4.3 Software

BDCellQuest Pro 4.0 für Durchflusszytometrie	BD, San Jose, USA
---	-------------------

SPSS 19.0 Statistiksoftware	SPSS Inc., Chicago, USA
EndNote X9	Clarivate, Philadelphia, USA
SigmaPlot 13.0	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland
<i>Bio-Plex Data Pro Software</i>	Fa. Bio-Rad, Laboratories, Hercules, USA

#### 4.4 Chemikalien

Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
HBSS ( <i>Hank's balanced salt solution ohne Phenolrot, pH 7,4</i> )	Hergestellt von der Apotheke des Klinikums der LMU München, Deutschland
BD Pharm Lyse™	BD Bioscience, San Diego, USA
PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DMF (N,N-Dimethylformamiddiethylacetal)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
fMLP (N-formyl-Met-Leu-Phe)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DHR (Dihydrorhodamin 123)	MoBiTec, Göttingen, Deutschland
BD FACFlow™ Sheath Fluid	BD Bioscience, San Jose, USA
BSA ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
PBS-Puffer ( <i>Phosphate-buffered saline-Puffer</i> )	Hergestellt von der Apotheke des Klinikums der LMU München, Deutschland
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
ACN (Acetonitril)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumformiat Lösung, 10 M in H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumacetat 5 mM	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
tBME (tertiär-Butyl-Methylether)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
AEA (Arachidonoyl Ethanolamide)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Arachidonoyl Ethanolamide-d4	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
2-Arachidonoyl Glycerol	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA

2-Arachidonoyl Glycerol-d5  
Interner Standard-Mix  
Mercury Orange

Cayman Chemical, Ann Arbor, USA  
Cayman Chemical, Ann Arbor, USA  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München,  
Deutschland

#### 4.5 Antikörper

Multitest 3/8/45/4	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Multitest 3/16/56/45/19	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD3-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD8-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD45RA-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD57-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD95-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD8-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD25-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD28-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD45RO-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD80-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD45-PerCP	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD3 APC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD4-APC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD8-APC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD86-APC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD4-PerCP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
anti-CD8-PerCP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
IB4 Antikörper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
D200 Antikörper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

## 4.6 Antigene

<i>Candida albicans</i> (Wild)	RayBiotech, Norcross, USA
<i>Trichophyton</i> Spezies	Allergopharma GmbH & Co. KG, Reinbek, Deutschland
<i>Aspergillus fumigatus</i>	RayBiotech, Norcross, USA

## 4.7 Assays

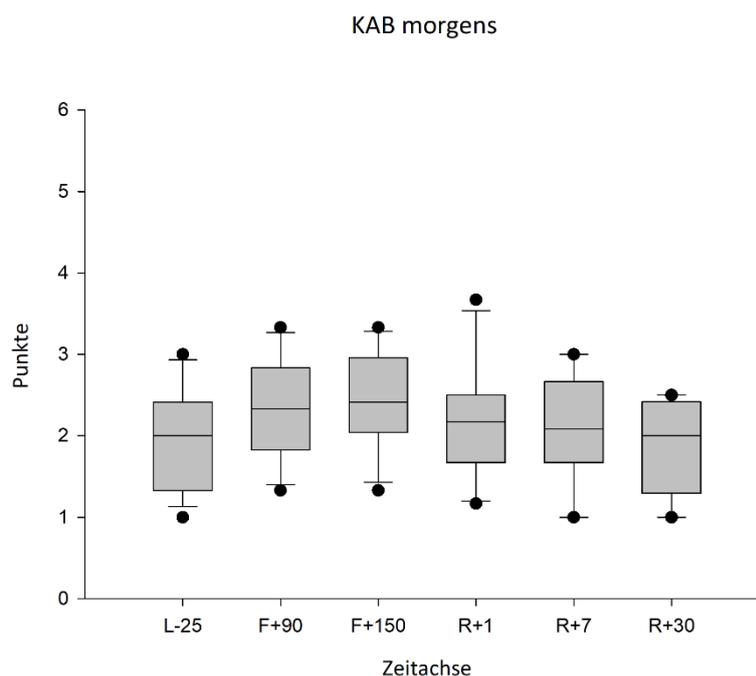
Multiplex Cytokine Assay	Bio-Rad, Hercules, USA
Elektrochemilumineszenz-Immunoassays Elecsys 2010	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Stressanalyse

#### 5.1.1 Stressanalyse mittels Fragebögen

Ob eine Exposition gegenüber dieser speziellen Umgebung an Bord der ISS von den Kosmonauten als stressvoll wahrgenommen wurde ermittelten wir anhand von Fragebögen. Das subjektive Stresslevel wurde mittels KAB sowohl am Morgen als auch am Abend quantifiziert. Die im Mittel errechneten Werte vor Abflug zum Zeitpunkt L-25 ergaben 2,01 ( $\pm 0,66$ ) morgens und 2,39 ( $\pm 0,63$ ) am Abend. Über den zeitlichen Verlauf gesehen stiegen die Werte zum Zeitpunkt der Isolation auf der ISS moderat an, zeigten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen der Tageszeit oder den Missionszeitpunkten (Abbildung 3).



**Abbildung 3** Boxplot der Punkte nach Auswertung der Fragebögen zur aktuellen Beanspruchung am Morgen.  $n=12$ . L-25 (Launch minus 25 Tage): ca. 25 Tage vor Abflug. F+90 (in-Flight plus 90 Tage): ca. 90 Tage nach Ankunft auf der ISS. F+150 (in-Flight plus 150 Tage): ca. 150 Tage nach Ankunft auf der ISS. R+1 (Return plus 1 Tage): 1 Tag nach Rückkehr auf die Erde. R+7 (Return plus 7 Tage): ca. 7 Tage nach Rückkehr auf die Erde. R+30 (Return plus 30 Tage): ca. 30 Tage nach Rückkehr auf die Erde.

## 5.1.2 Stressanalyse mittels biochemischer Marker

### 5.1.2.1 Cortisol im Speichel

Bei der Quantifizierung der biologischen Antwort auf Stress bedienten wir uns zusätzlich objektiver Testmethoden. Ähnliche Resultate wie bei dem Fragebogen wurden bei der Bestimmung der Cortisolwerte im Speichel erzielt. Zirkadiane Unterschiede mit leicht erhöhten Cortisolwerten am Morgen und niedrigeren Werten am Abend wurden ermittelt, jedoch waren keine Signifikanzen über den zeitlichen Verlauf erkennbar (Abbildung 4). Die Abendkonzentrationen des Cortisols zeigten einen leichten Anstieg am Flugtag F+90, der allerdings statistisch ebenfalls nicht signifikant war (Abbildung 5).

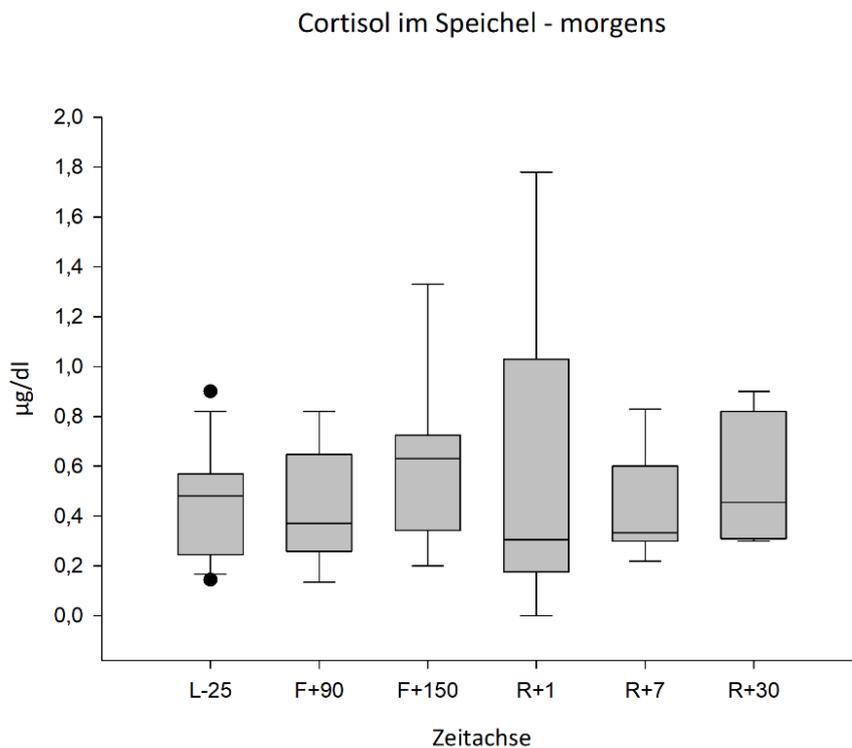
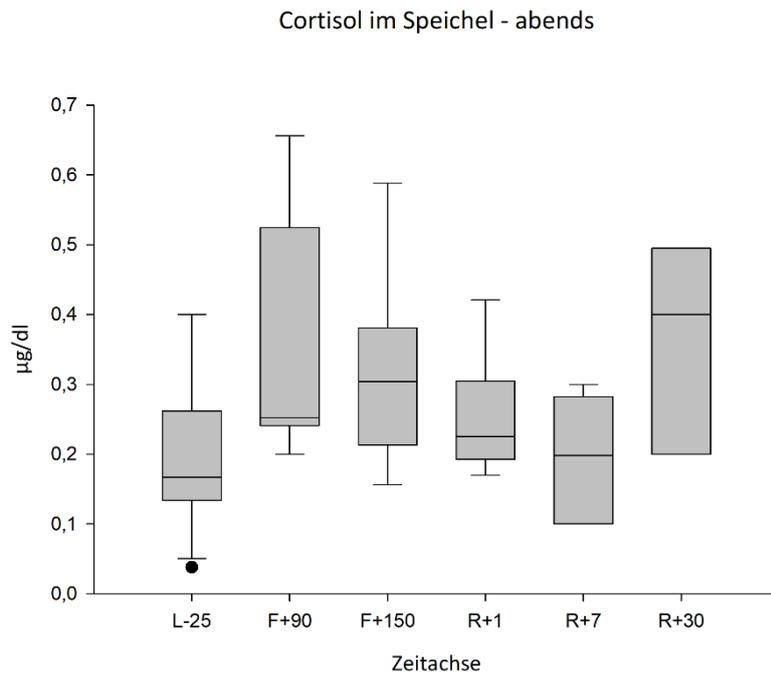


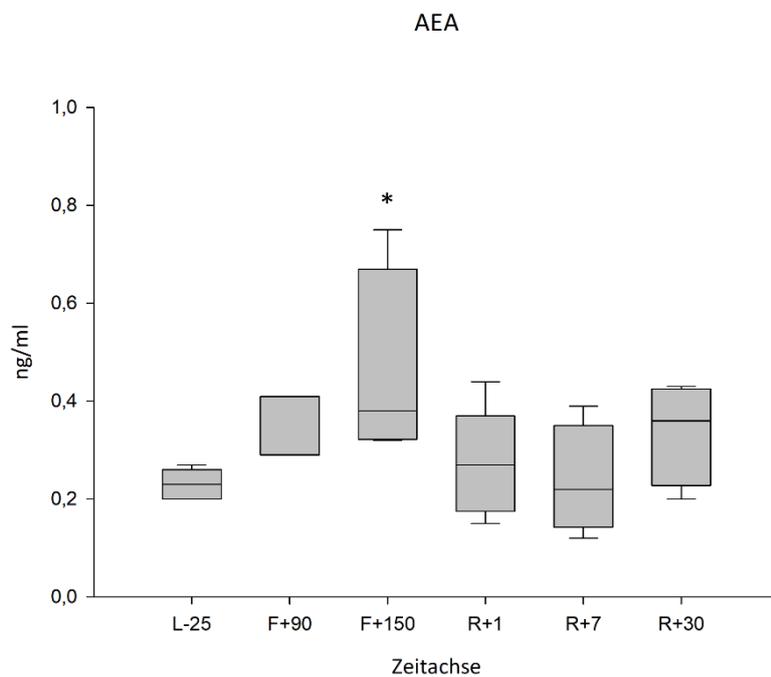
Abbildung 4 Boxplot der Cortisolkonzentration am Morgen im Speichel in µg/dl. n=11



**Abbildung 5** Boxplot der Cortisolkonzentration am Abend im Speichel in µg/dl. n=10.

### 5.1.2.2 Endocannabinoide im Blut

Die Konzentrationen der Endocannabinoide AEA und 2-AG wurden als weiterer objektiver Stressparameter bestimmt. AEA war am zweiten Abnahmezeitpunkt auf der ISS F+150 im Vergleich zu der Abnahme auf der Erde signifikant erhöht (Abbildung 6).



**Abbildung 6** Boxplot der AEA-Konzentration im Vollblut in ng/ml. n=5. \*= $p < 0,05$  Signifikanter Anstieg der AEA-Level zum Zeitpunkt F+150 im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten.

Bei der Untersuchung des Endocannabinoids 2-AG war ein Anstieg der Konzentration im Median zum ersten (F+90) und zum zweiten Zeitpunkt der Blutabnahme am Flugtag F+150 zu verzeichnen. Diese Erhöhungen waren allerdings statistisch nicht signifikant (Abbildung 7).

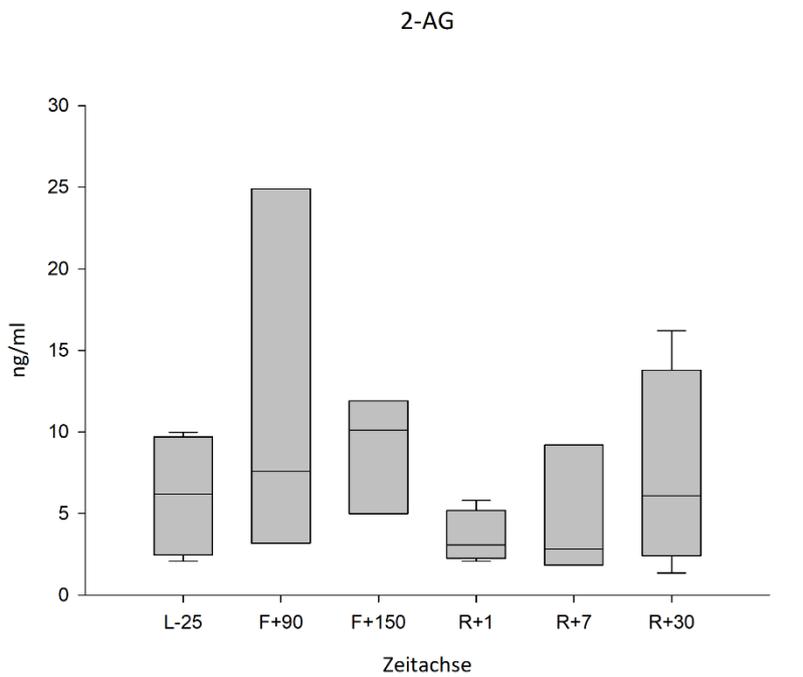
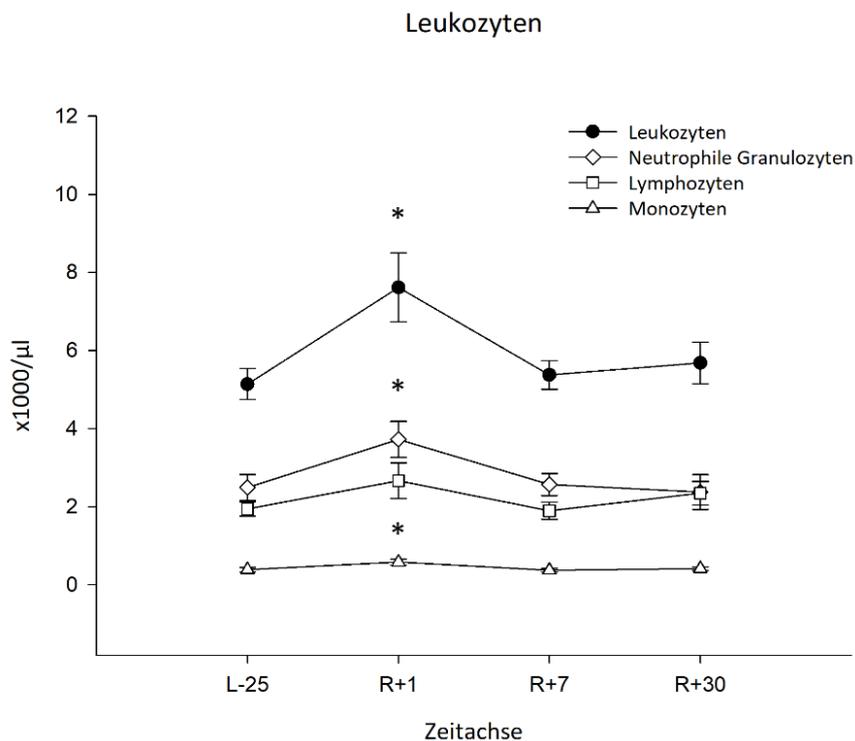


Abbildung 7 Boxplot der 2-AG Konzentration im Vollblut in ng/ml. n=4.

## 5.2 Blutbildanalyse

### 5.2.1 Leukozyten und ihre Subpopulationen

Die Zahl der Leukozyten war unmittelbar nach der Landung zum Zeitpunkt R+1 signifikant erhöht. Der Mittelwert lag zu diesem Zeitpunkt bei  $7,62 (\pm 3,07) \times 1000/\mu\text{l}$  und zum Zeitpunkt L-25 vor Abflug bei  $5,25 (\pm 1,60) \times 1000/\mu\text{l}$ . Wenn man die Subpopulationen betrachtet, erkennt man sowohl eine signifikante Zunahme der Monozyten als auch der neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt der Rückkehr. Lediglich die Absolutwerte der Lymphozyten zeigten keine Veränderung über die Beobachtungsperiode und blieben weitestgehend konstant (Abbildung 8).

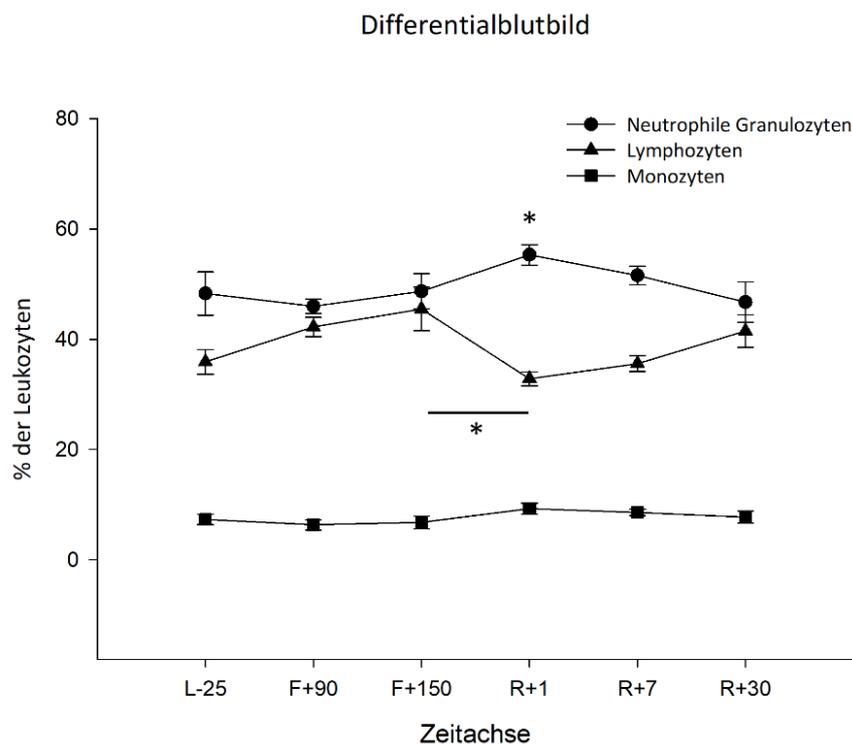


**Abbildung 8** Absolute Leukozytenzahl und Subpopulationen in  $\mu\text{l} \times 1000$  in Vollblut als Mittelwertdarstellung mit Standarderror.  $n=11$ .  $*=p<0,05$  Signifikanter Anstieg der Leukozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt R+1 im Vergleich zum Zeitpunkt L-25.

## 5.2.2 Differentialblutbild

An Bord der ISS war es aufgrund technischer Limitationen nicht möglich, ein Blutbild mit der absoluten Leukozytenzahl inkl. Subpopulationen erstellen zu lassen. Daher bedienten wir uns der Methode des Blutausstriches, um ein Differentialblutbild mit der prozentualen Verteilung der Leukozytensubpopulationen zu erhalten. Prozentual war eine Zunahme der PMNL (statistisch signifikant) und Monozyten zum Zeitpunkt R+1 zu verzeichnen (Abbildung 9). Die Ergebnisse sind kongruent zu den erstellten maschinellen Blutbildern auf der Erde.

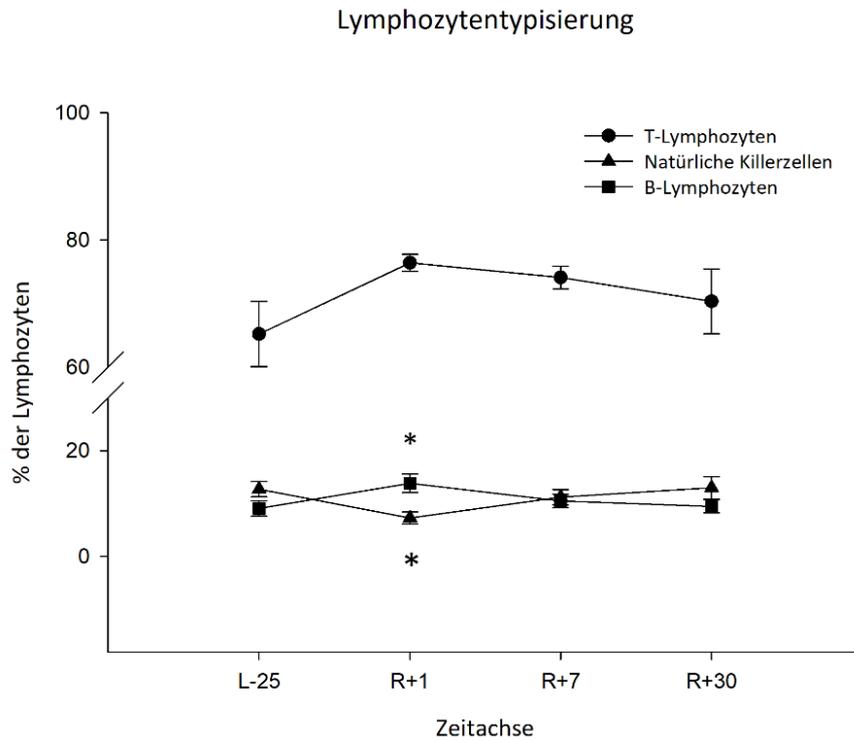
Interessanterweise war die relative Lymphozytenpopulation zum späteren Zeitpunkt F+150 auf der ISS signifikant erhöht und kehrte zu weitestgehend normalen Ausgangswerten nach Rückkehr auf der Erde zurück (Abbildung 9).



**Abbildung 9** Prozentualer Anteil der neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten an den Leukozyten als Mittelwertdarstellung mit Standarderror analysiert im Blutausstrich. n=11. \*= $p < 0,05$  Signifikanter Anstieg der neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt R+1 und der Lymphozyten zum Zeitpunkt F+150.

### 5.2.3 Lymphozyttypisierung

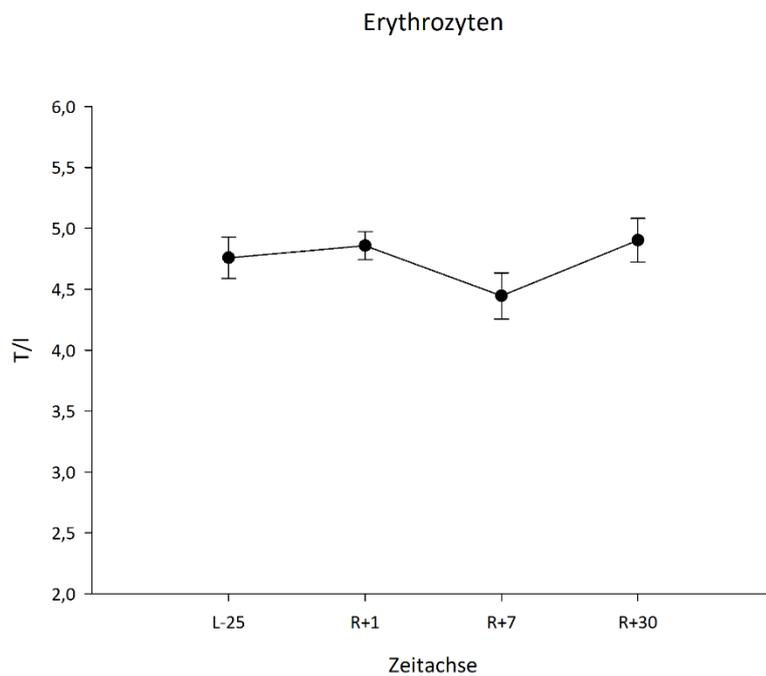
Wenn man die Lymphozytensubpopulationen nach Rückkehr genauer betrachtet, ist ein Anstieg der B-Lymphozyten zu verzeichnen, während die T-Lymphozyten keine Veränderung zeigten. Die NK-Zellen zeigten einen signifikanten Abfall um mehr als 50% von 12,71 ( $\pm 5,02$ ) % zum Zeitpunkt vor Abflug auf 7,28 ( $\pm 3,8$ ) % am ersten Blutabnahmetag nach Rückkehr (Abbildung 10).



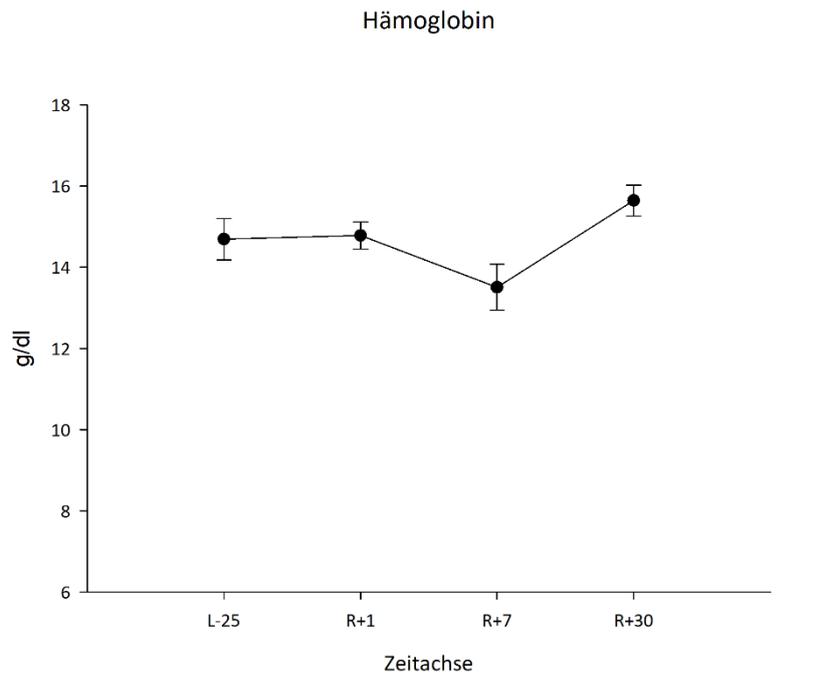
**Abbildung 10** Anteil der Lymphozytensubpopulation in % als Mittelwert mit Standardfehler an den Gesamtl lymphozyten in %. n=12. \*= $p < 0,05$  Signifikanter Anstieg der T-Lymphozyten bzw. Abfall der NK-Zellen am ersten Tag nach Rückkehr im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten.

#### 5.2.4 Weitere Blutbildparameter

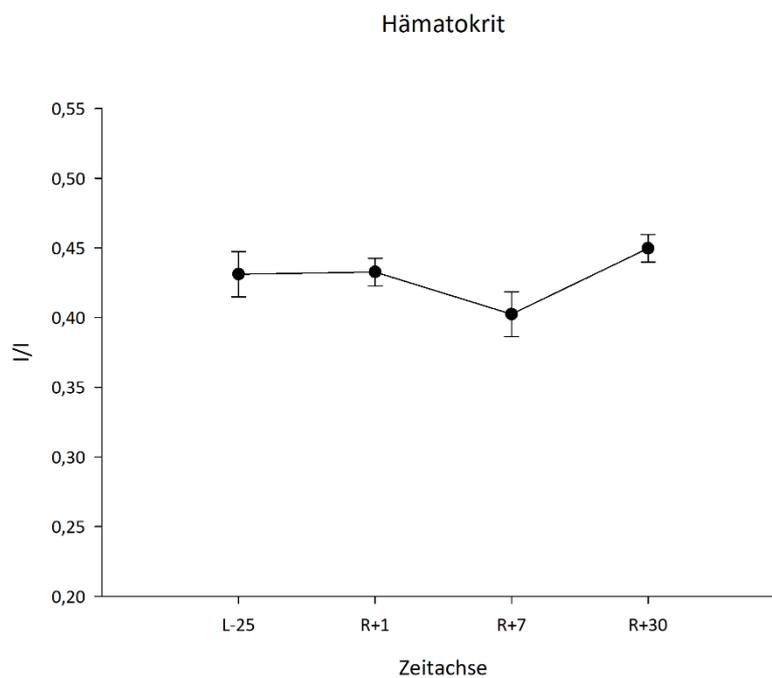
Bei der Analyse der Erythrozyten (Abbildung 11), des Hämoglobins (Abbildung 12), des Hämatokrits (Abbildung 13), des mittleren korpuskulären Volumens (MCV, Abbildung 14), des mittleren korpuskulären Hämoglobins (MCH, Abbildung 15), der mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration (MCHC, Abbildung 16) und der Thrombozyten (Abbildung 17) ergaben sich über den zeitlichen Verlauf keine Änderungen. Die Mittelwerte blieben weitestgehend stabil.



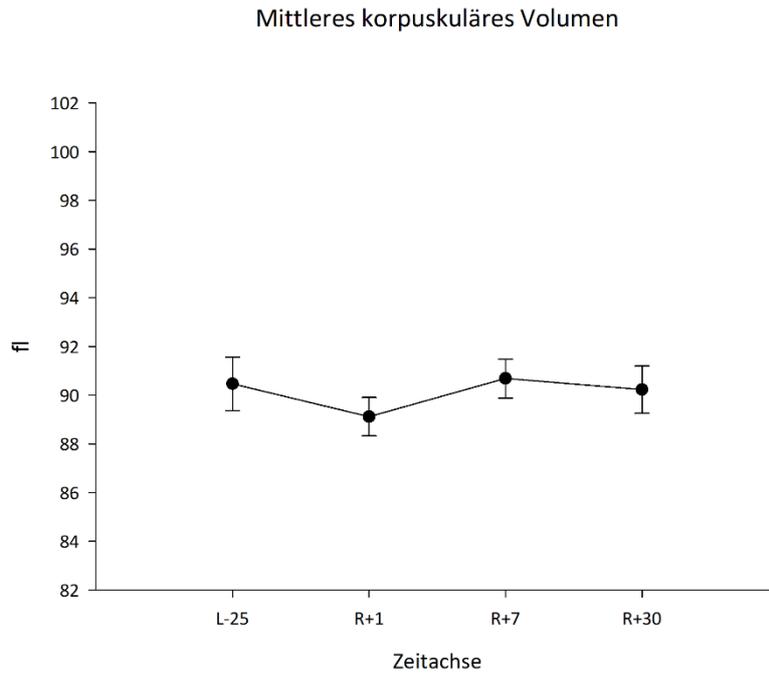
**Abbildung 11** Verlauf der Erythrozytenzahl-Mittelwerte mit Standardfehler aus EDTA-Vollblut in T/l aller Probanden im Liniendiagramm. n=12.



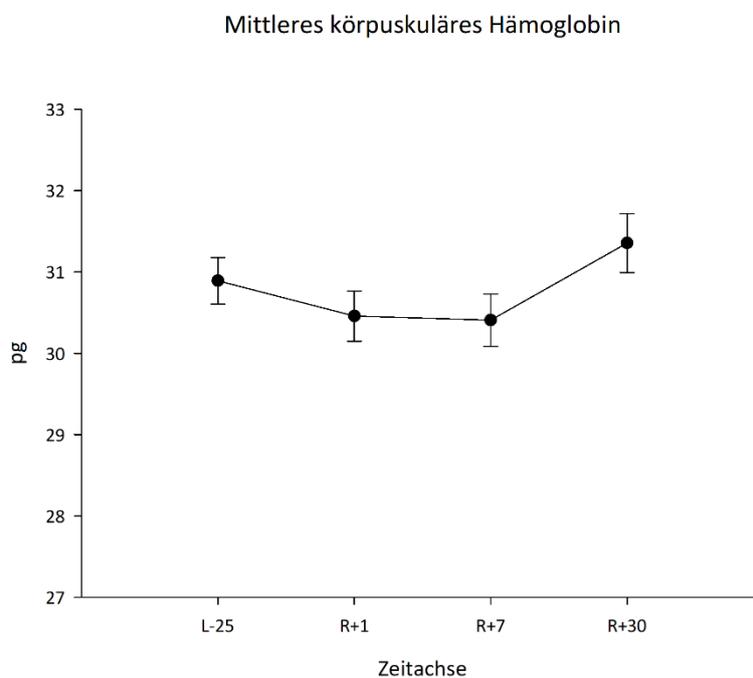
**Abbildung 12** Verlauf der Hämoglobinmittelwerte mit Standardfehler aus EDTA-Vollblut in g/dl aller Probanden im Liniendiagramm. n=12.



**Abbildung 13** Verlauf der Hämatokritmittelwerte mit Standardfehler aus EDTA-Vollblut in l/l aller Probanden im Liniendiagramm. n=12.

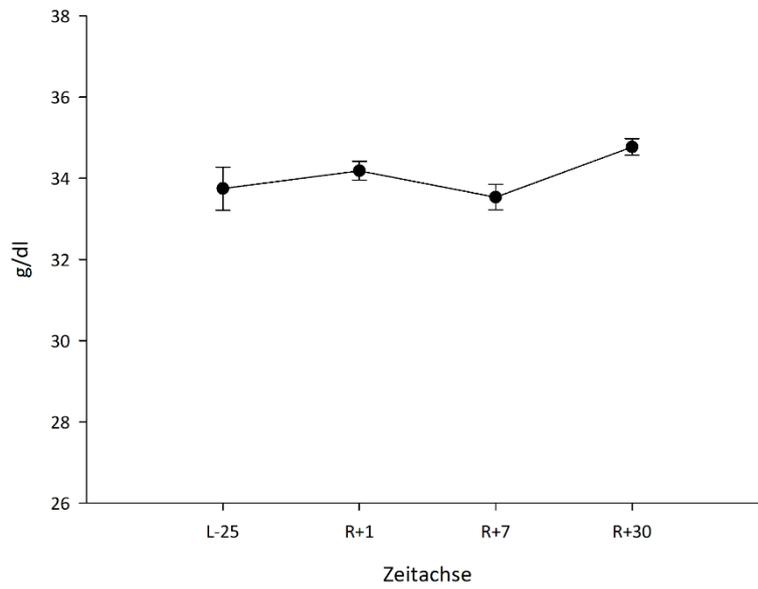


**Abbildung 14** Verlauf der Mittelwerte des mittleren korpuskulären Volumens mit Standardfehler aus EDTA-Vollblut in Femtoliter (fl,  $\mu\text{m}^3$ ) aller Probanden im Liniendiagramm. n=12.



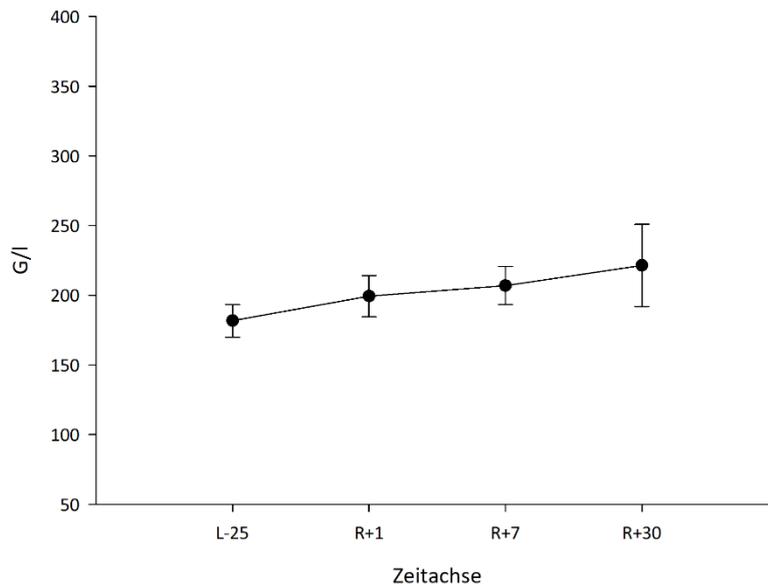
**Abbildung 15** Verlauf der Mittelwerte des mittleren korpuskulären Hämoglobins mit Standardfehler aus EDTA-Vollblut in Pikogramm (pg) aller Probanden im Liniendiagramm. n=12.

### Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration



**Abbildung 16** Verlauf der Mittelwerte der mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration mit Standardfehler aus EDTA-Vollblut in g/dl aller Probanden im Liniendiagramm. n=12.

### Thrombozyten

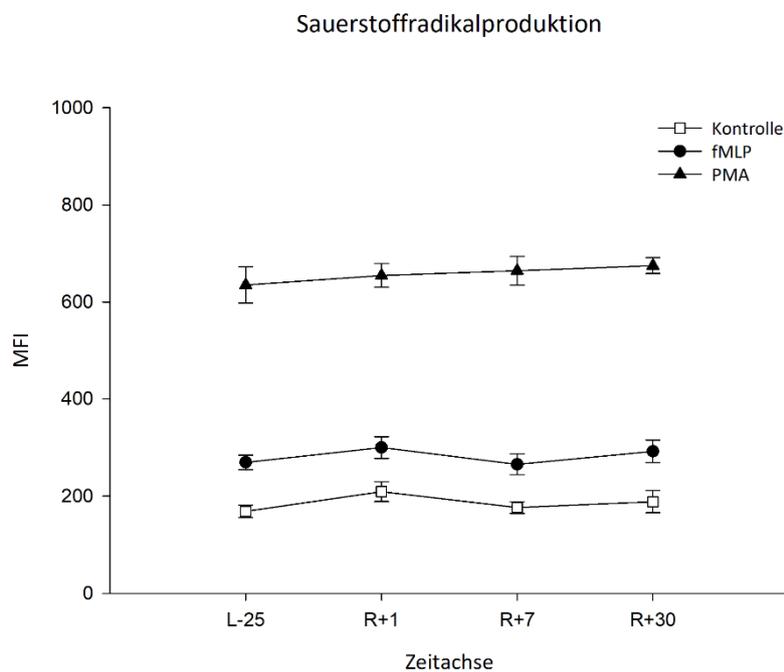


**Abbildung 17** Verlauf der Thrombozytenzahl-Mittelwerte mit Standardfehler aus EDTA-Vollblut in G/l aller Probanden im Liniendiagramm. n=12.

## 5.3 Durchflusszytometrische Analysen

### 5.3.1 Sauerstoffradikalproduktion der PMNL nach Raumfahrt

Nachdem sich herausgestellt hat, dass die PMNL sowohl in relativer als auch in absoluter Zahl nach Rückkehr angestiegen sind, ist es nun wichtig sich auch den Aktivierungsstatus anzuschauen. Wir untersuchten die Fähigkeit der PMNL reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren. Nach Aufenthalt im All blieb die Sauerstoffradikalproduktion sowohl auf PMA als starken Stimulus als auch auf fMLP als physiologischen Stimulus stabil (Abbildung 18).



**Abbildung 18** Sauerstoffradikalproduktion polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten nach Stimulierung mit fMLP und PMA und ohne Stimulanz als Kontrolle. Durchschnittliche Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*, MFI) als Indikator für die Sauerstoffradikalproduktion. Darstellung der Mittelwerte mit Standardfehler. n=12.

### 5.3.2 Gesamtglutathion

Ähnliche Resultate erzielten wir bei der Analyse des Antioxidants Glutathion, dessen Freisetzung über mehrere Zeitpunkte und Zellreihen stabil blieb (Abbildung 19 bis 21).

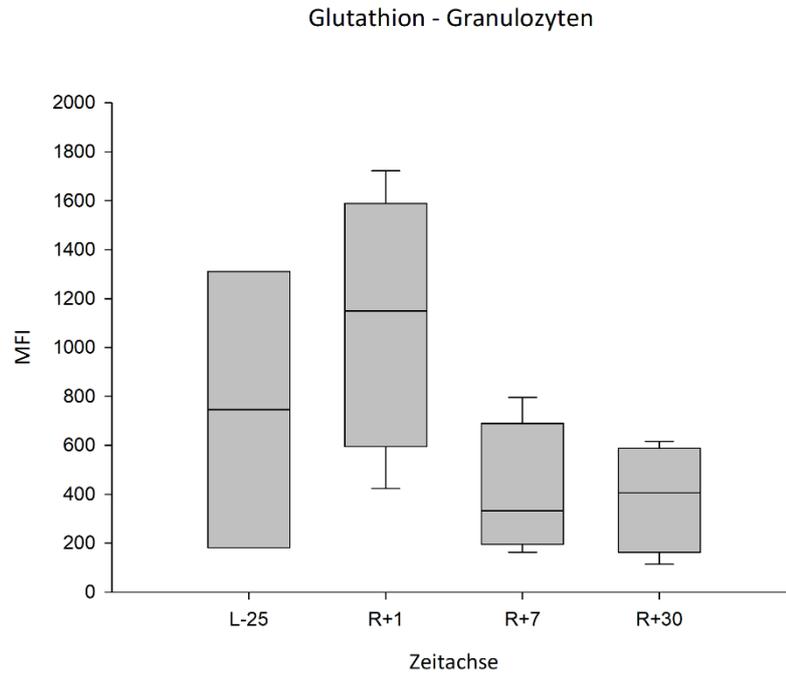


Abbildung 19 Boxplot des Glutathiongehalts von Granulozyten in MFI ohne Stimulus. n=4.

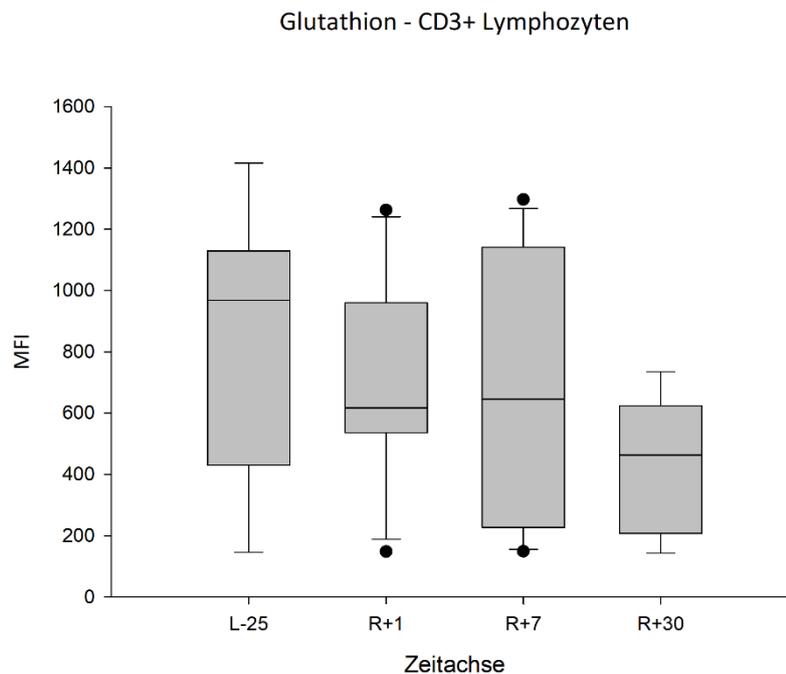
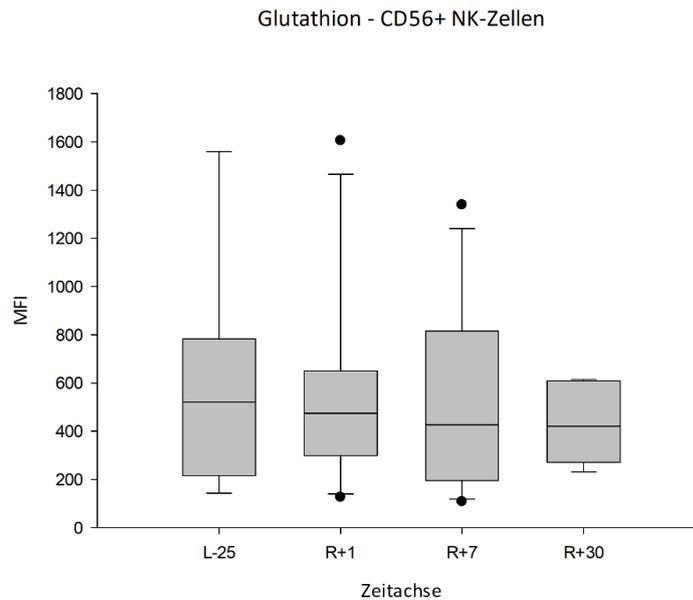


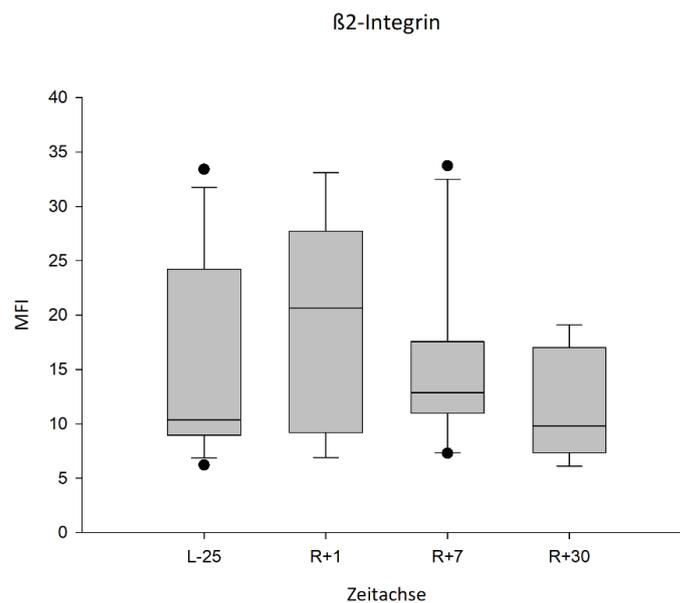
Abbildung 20 Boxplot des Glutathiongehalts von CD3+ T-Lymphozyten in MFI ohne Stimulus. n=11.



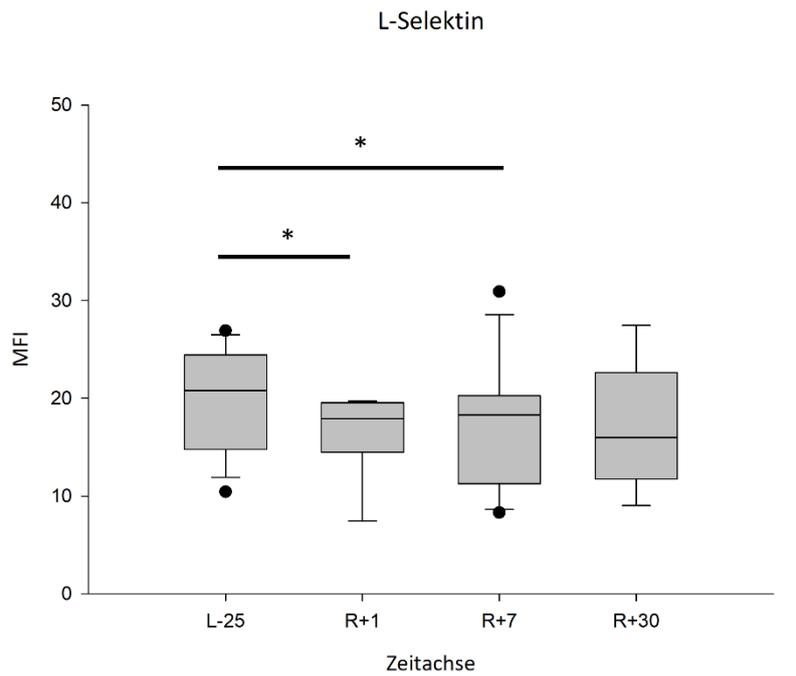
**Abbildung 21** Boxplot des Glutathiongehalts von CD56+ NK-Zellen in MFI ohne Stimulus. n=11.

### 5.3.3 Expression von Adhäsionsmolekülen

Wir untersuchten die Expression der Adhäsionsmoleküle  $\beta$ 2-Integrin (CD18) und L-Selektin (CD62L) auf der Oberfläche der PMNL. Die Expression von  $\beta$ 2-Integrin war bereits vor Raumfahrt erhöht und blieb auf dem Level bis 30 Tage nach Flug ohne signifikante Änderungen (Abbildung 22). Auf der anderen Seite wurde eine Reduzierung der Expression des Zelloberflächenmarkers L-Selektin kurz nach Rückkehr (R+1) detektiert (Abbildung 23).



**Abbildung 22** Boxplot der Expression des Adhäsionsmoleküls  $\beta$ 2-Integrin auf der Oberfläche polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten in MFI. n=12.

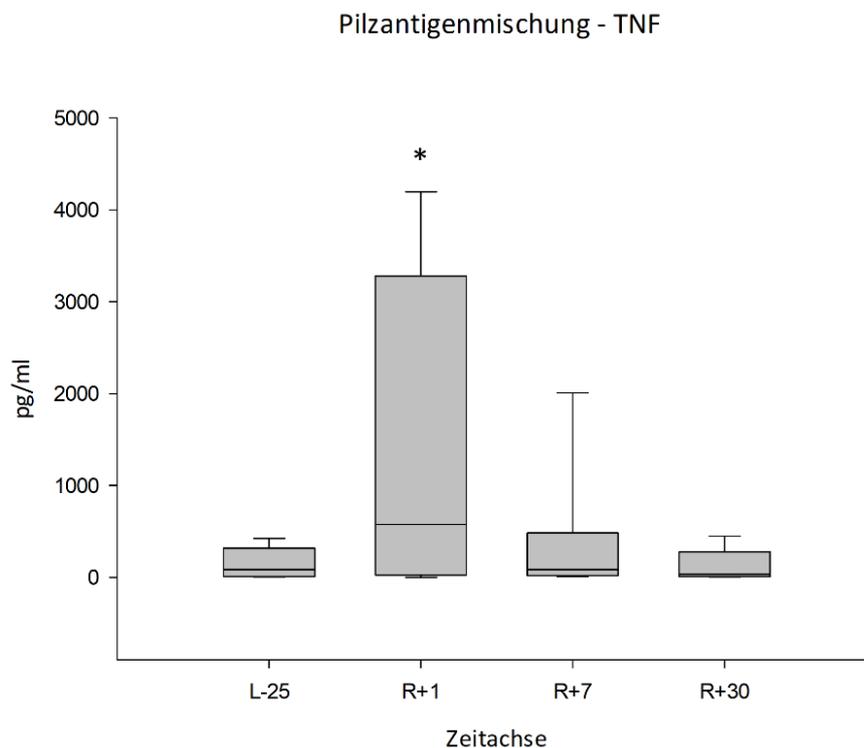


**Abbildung 23** Boxplot der Expression des Adhäsionsmoleküls CD62L auf der Oberfläche polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten in MFI. n=12. \*=p<0,05 Signifikante Reduktion der Expression zu den Zeitpunkten R+1 und R+7 nach Rückkehr im Vergleich zu dem Zeitpunkt L-25 vor Abflug.

## 5.4 Immunantwort nach *in vitro* Exposition gegenüber Pilzantigenen

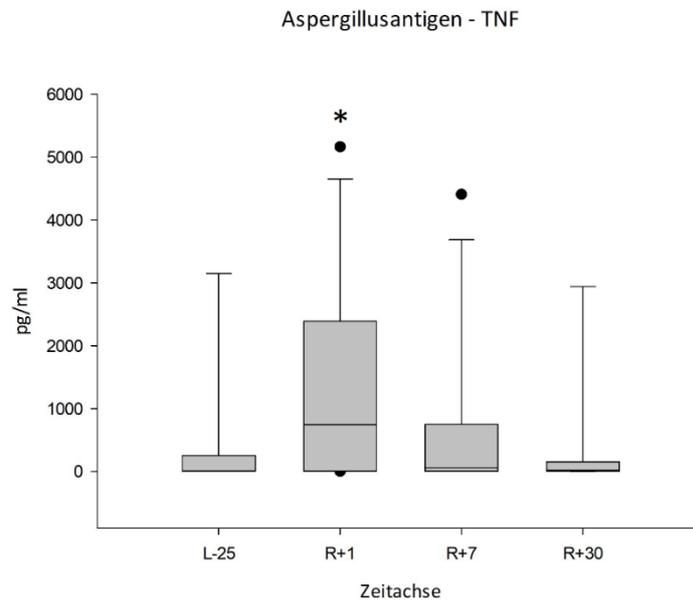
### 5.4.1 TNF

Um eine gezielte Zytokinantwort auf eine Infektion genauer zu untersuchen, inkubierten wir Vollblut mit diversen Antigenen für 48h. Nach Inkubation des Vollbluts mit einer Pilzantigenmischung und *Aspergillus*antigen, untersuchten wir den Überstand auf die Zytokine TNF, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  und auch IL-1 $\beta$  und IL-1ra. Besonders auffällig war die Sekretion von TNF nach vorheriger Inkubation mit der Pilzantigenmischung zum ersten Abnahmezeitpunkt direkt nach der Rückkehr R+1. Diese war signifikant im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten um ein Vielfaches erhöht. Zum Zeitpunkt R+7 konnten wir ebenfalls erhöhte Werte von TNF, wenn auch nicht statistisch signifikant, beobachten (Abbildung 24 und 26).

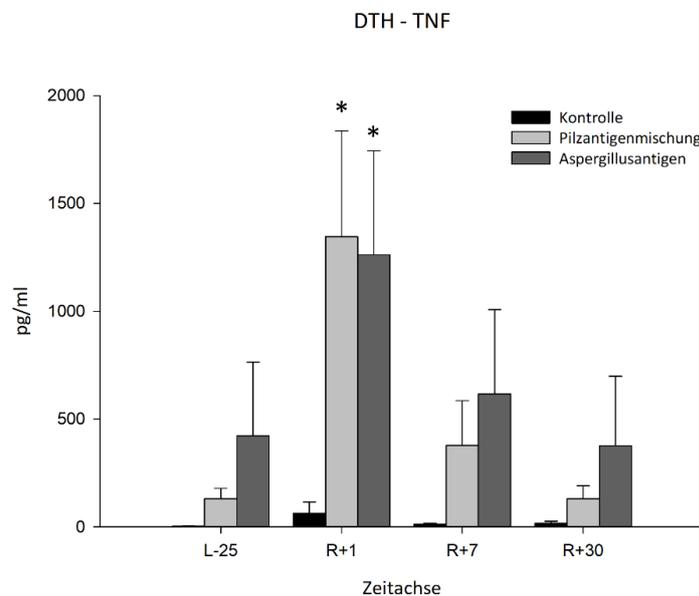


**Abbildung 24** Boxplot der Konzentration des Zytokins TNF in pg/ml nach Stimulation mit der Pilzantigenmischung für 48h *in vitro*. n=12. \*=p<0,05 Signifikanter Anstieg der TNF-Freisetzung nach Stimulation mit der Pilzantigenmischung am ersten Tag nach Rückkehr im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten.

Ähnliche Resultate bzgl. der TNF-Produktion wurden nach Inkubation mit dem *Aspergillus*antigen erzielt. Auch hier ist ein deutlicher Anstieg der TNF-Konzentration zum Zeitpunkt R+1 erkennbar (Abbildung 25 und 26).



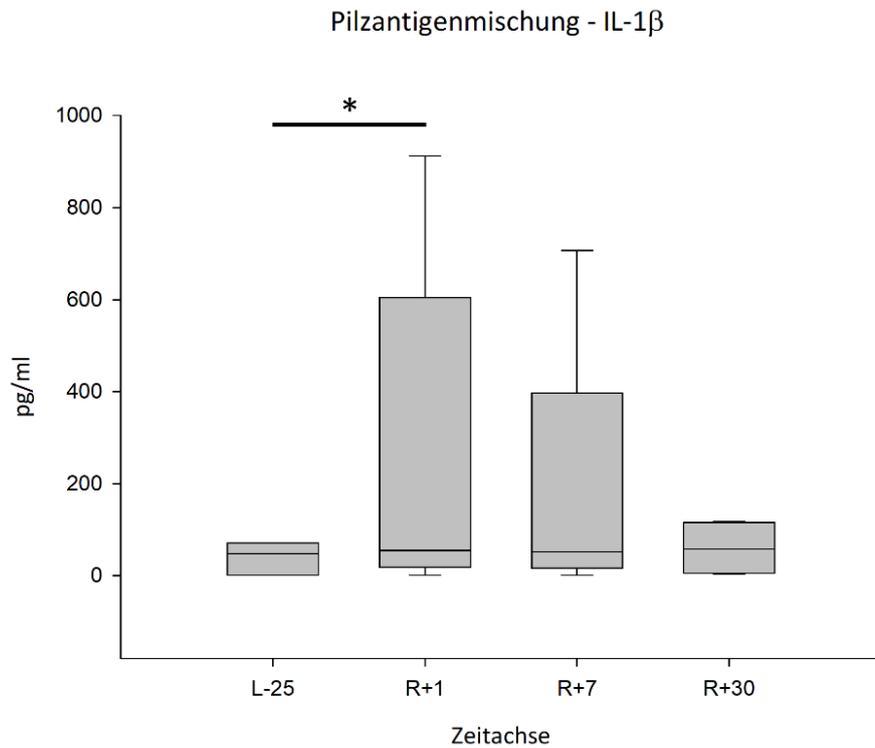
**Abbildung 25** Boxplot der Konzentration des Zytokins TNF in pg/ml nach Stimulation mit *Aspergillus*antigen für 48h *in vitro*. n=11. \*=p<0,05 Signifikanter Anstieg der TNF-Freisetzung nach *Aspergillus*antigenstimulation am ersten Tag nach Rückkehr im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten.



**Abbildung 26** TNF-Konzentration in pg/ml im Vergleich nach Stimulierung mit der Pilzantigenmischung und *Aspergillus*antigen und ohne Stimulanz für 48h *in vitro*. Darstellung der Mittelwerte mit Standarderror. n=12 für Kontrolle und Pilzantigenmischung, n=11 für *Aspergillus*antigen. \*=p<0,05. Signifikanter Anstieg der TNF-Konzentration nach Stimulation mit der Pilzantigenmischung und *Aspergillus*antigen zum Zeitpunkt R+1.

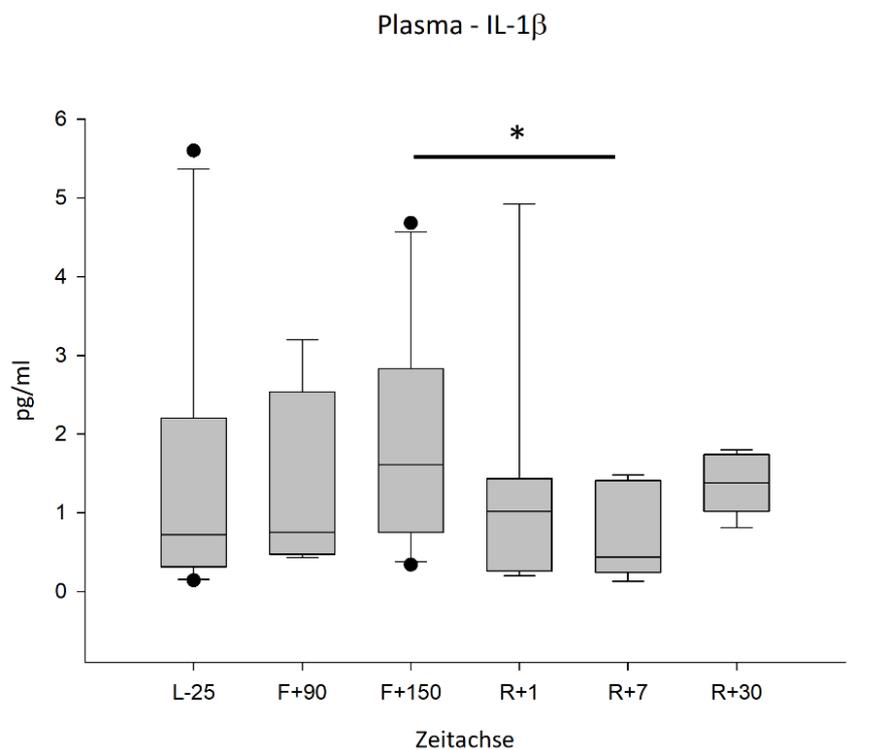
### 5.4.2 IL-1 $\beta$

Auch die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  nach Stimulation mit der Pilzantigenmischung war zum Zeitpunkt R+1 im Vergleich zum Zeitpunkt vor Aufenthalt auf der ISS signifikant erhöht (Abbildung 27).



**Abbildung 27** Boxplot der Konzentration des Zytokins IL-1 $\beta$  in pg/ml nach Stimulation mit der Pilzantigenmischung für 48h *in vitro*. n=5. \*=p<0,05 Signifikanter Anstieg der IL-1 $\beta$  Freisetzung nach Stimulation mit der Pilzantigenmischung zum Zeitpunkt R+1 im Vergleich zum Zeitpunkt L-25 vor Abflug.

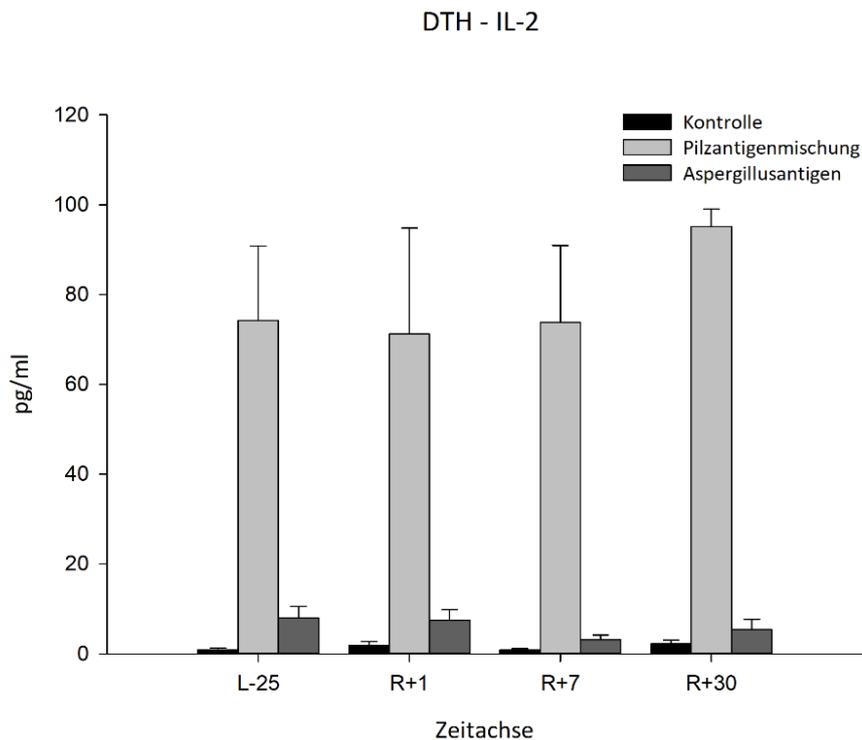
Wenn man diese Ergebnisse mit den gemessenen Plasma Zytokinkonzentrationen vergleicht, sieht man, dass IL-1 $\beta$  während des F+150 Abnahmezeitpunktes auf der ISS signifikant erhöht war, jedoch auf Basiswerte nach Flug abfiel (Abbildung 28).



**Abbildung 28** Boxplot der IL-1 $\beta$  Konzentration in pg/ml im Plasma ohne Ausreißer. n=10. \*=p<0,05 Signifikante Reduktion der IL-1 $\beta$  Konzentration zum Zeitpunkt R+7 im Vergleich zum Zeitpunkt F+150 während Flug.

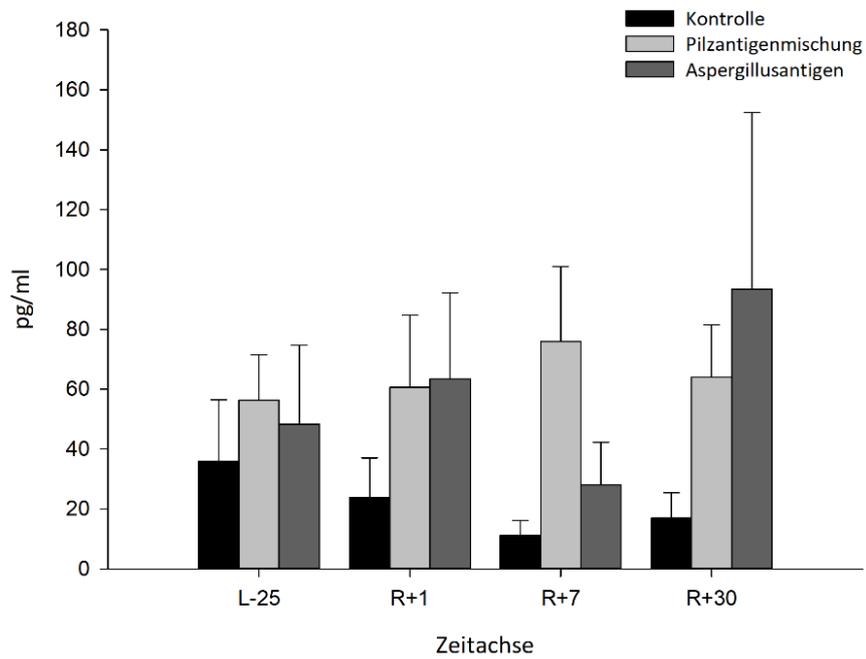
### 5.4.3 IL-2 und IFN- $\gamma$

Hinsichtlich weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-2 (Abbildung 29), IL-6 (nicht abgebildet) und IFN- $\gamma$  (Abbildung 30) konnten keine signifikanten Unterschiede zu den Basiswerten festgestellt werden. In der Kontrollgruppe ohne Antigenstimulation waren keine Veränderungen der TNF, IL-2 und IFN- $\gamma$  über alle Beobachtungszeitpunkte der Studie detektierbar.



**Abbildung 29** IL-2 Konzentration in pg/ml im Vergleich nach Stimulierung mit der Pilzantigenmischung und *Aspergillus*antigenen und ohne Stimulanz für 48h *in vitro*. Darstellung der Mittelwerte mit Standarderror. n=11 für Kontrolle, n=10 für Pilzantigenmischung, n=8

### DTH - IFN- $\gamma$



**Abbildung 30** IFN- $\gamma$  Konzentration in pg/ml im Vergleich nach Stimulierung mit der Pilzantigenmischung und *Aspergillus*antigen und ohne Stimulanz für 48h *in vitro*. Darstellung der Mittelwerte mit Standarderror. n=11 für Kontrolle, n=10 für Pilzantigenmischung, n=8 für *Aspergillus*antigen.

## 5.5 Reduktion der antiinflammatorischen Kapazität

### 5.5.1 CD4+ T-Zell Subpopulationen

Nachdem wir eine erhöhte Leukozytenzahl und eine vermehrte proinflammatorische Zytokinantwort nach Aufenthalt auf der ISS beobachten konnten, analysierten wir T-Zell Subpopulationen, mit besonderem Augenmerk auf die CD4+ T-Zell Populationen. Wir konnten keinen Unterschied der CD4+ T-Zell Subpopulationen für CD4+ Memory T-Zellen (CD3+CD4+RO+) (Abbildung 31) und CD4+ naiven T-Zellen (CD3+CD4+RA+) (Abbildung 32) erkennen.

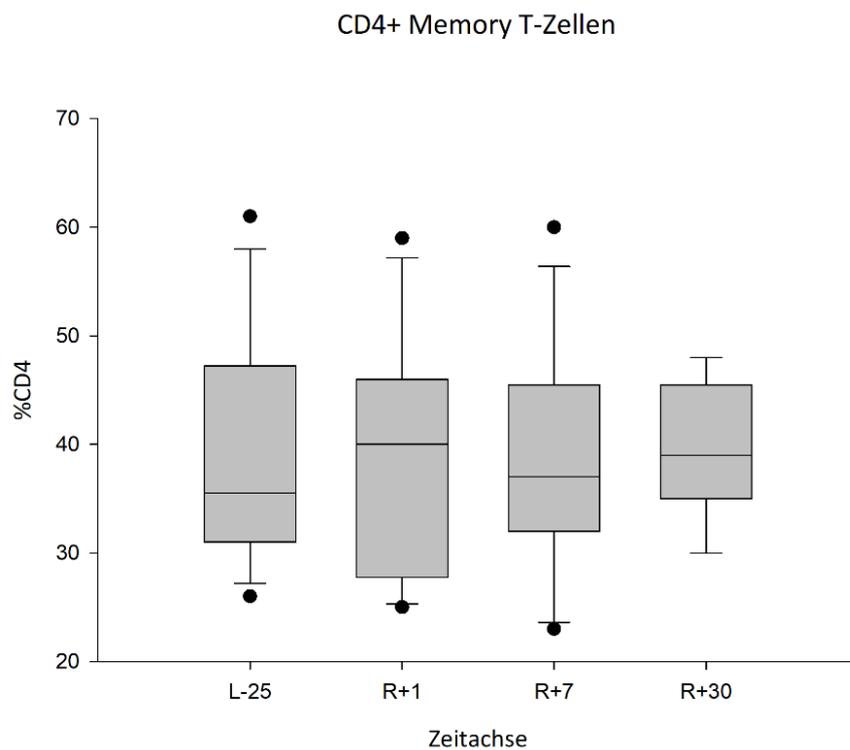


Abbildung 31 Anteil der CD4+ Memory T-Zellen an allen CD4+ Zellen in % als Boxplot. n=12.

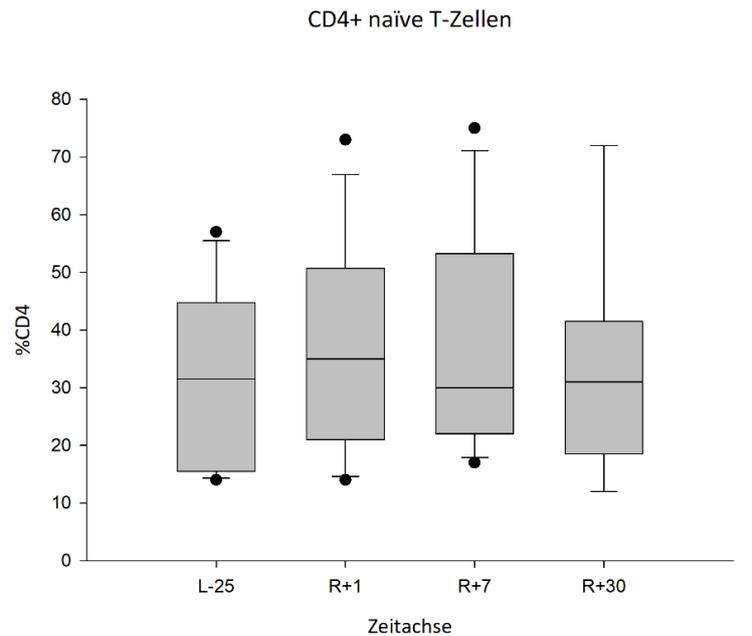


Abbildung 32 Anteil der CD4+ naiven T-Zellen an allen CD4+ Zellen in % als Boxplot. n=12.

### 5.5.2 Regulatorische T-Zellen

Die antiinflammatorisch wirkenden T-Zellen (regulatorische T-Zellen) (CD3+CD4+CD25+CD127<sup>low</sup>) waren signifikant um ca. 30% reduziert nach der Mission zum Zeitpunkt R+7 (Abbildung 33).

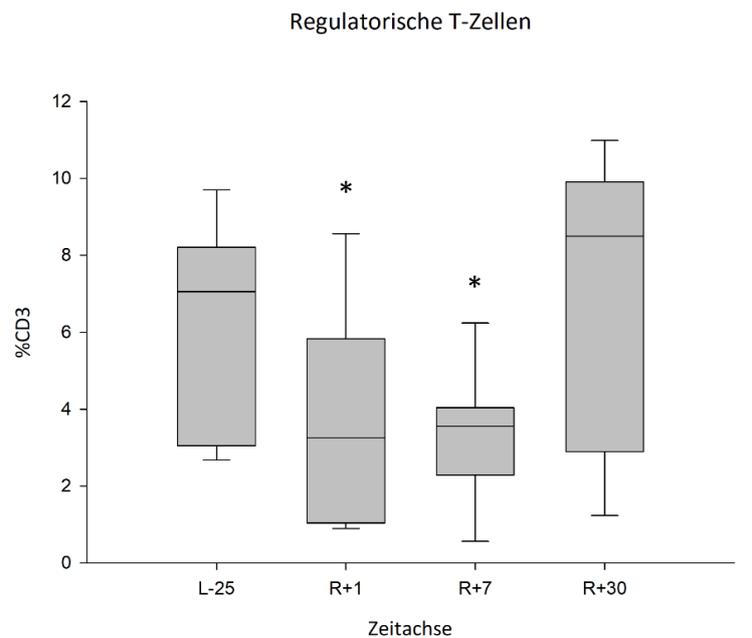
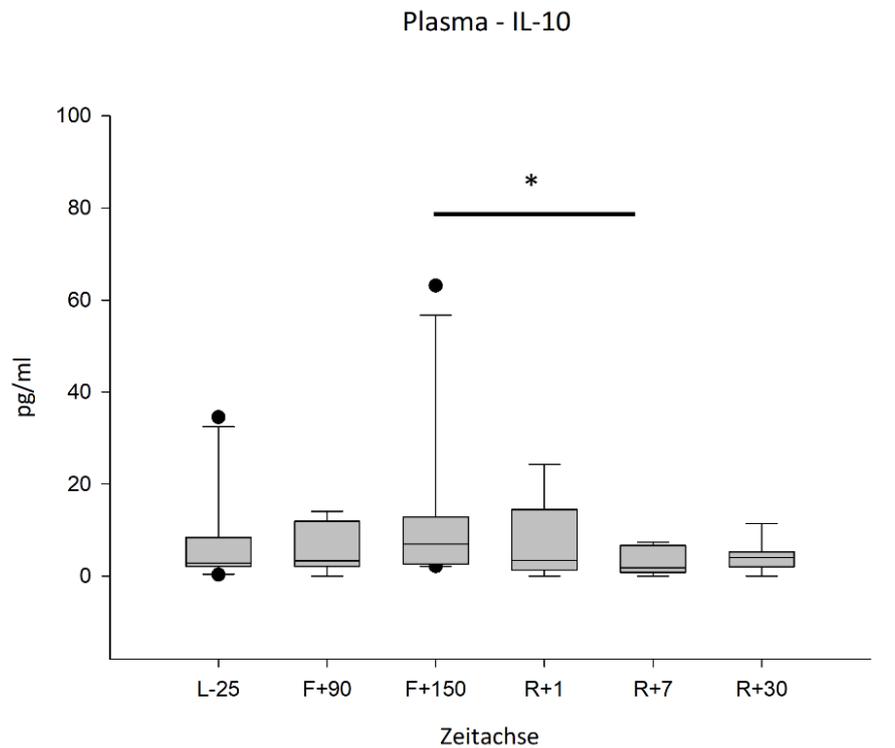


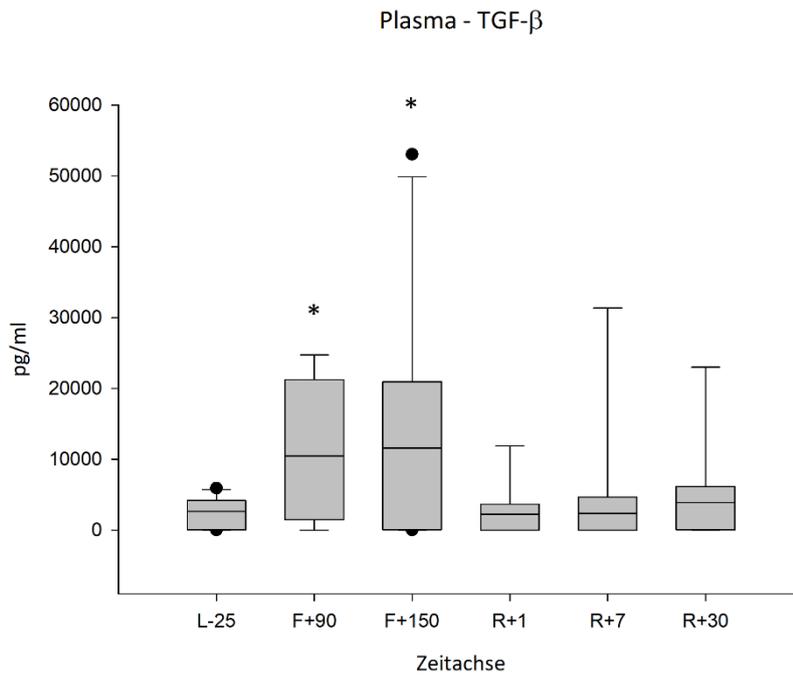
Abbildung 33 Anteil der CD3+CD4+CD25+CD127<sup>low</sup> regulatorischen T-Zellen an allen CD3+ Zellen in % als Boxplot. n=8. \*p<0,05 Signifikante Reduktion der regulatorischen T-Zellen zum Zeitpunkt R+1 und R+7 im Vergleich zum Zeitpunkt L-25.

### 5.5.3 Antiinflammatorische Zytokine

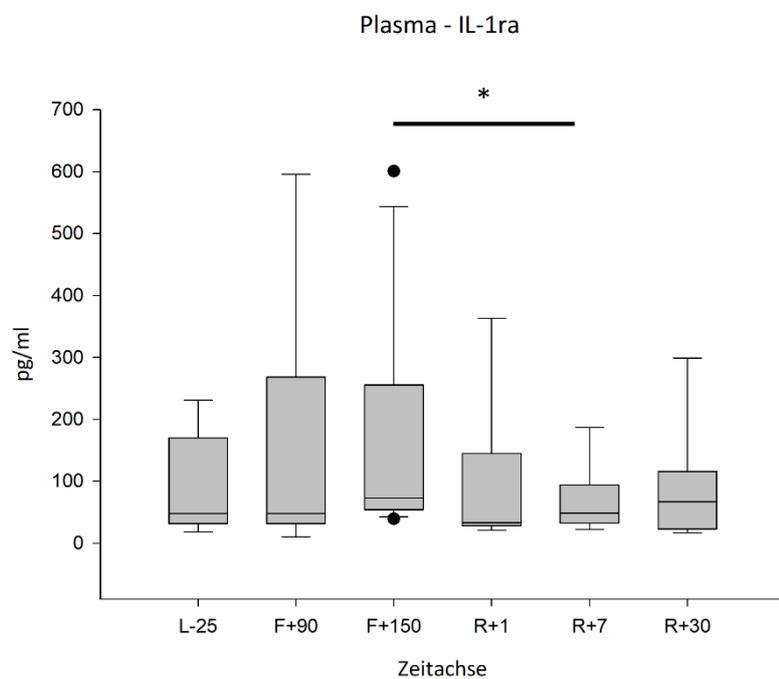
Regulatorische Zytokine IL-10 (Abbildung 34) und TGF- $\beta$  (Abbildung 35) und auch antiinflammatorische Zytokine IL-1ra (Abbildung 36) waren reduziert nach Raumfahrt aber deutlich erhöht während der Zeit auf der ISS was für einen proinflammatorischen Immunstatus in Zusammenhang mit einer deutlich reduzierten antiinflammatorischen Kapazität spricht.



**Abbildung 34** Boxplot der IL-10 Konzentration in pg/ml im Plasma. n=11. \*=p<0,05 Signifikante Reduktion der IL-10 Konzentration zum Zeitpunkt R+7 im Vergleich zu dem zweiten Zeitpunkt während des Fluges F+150.



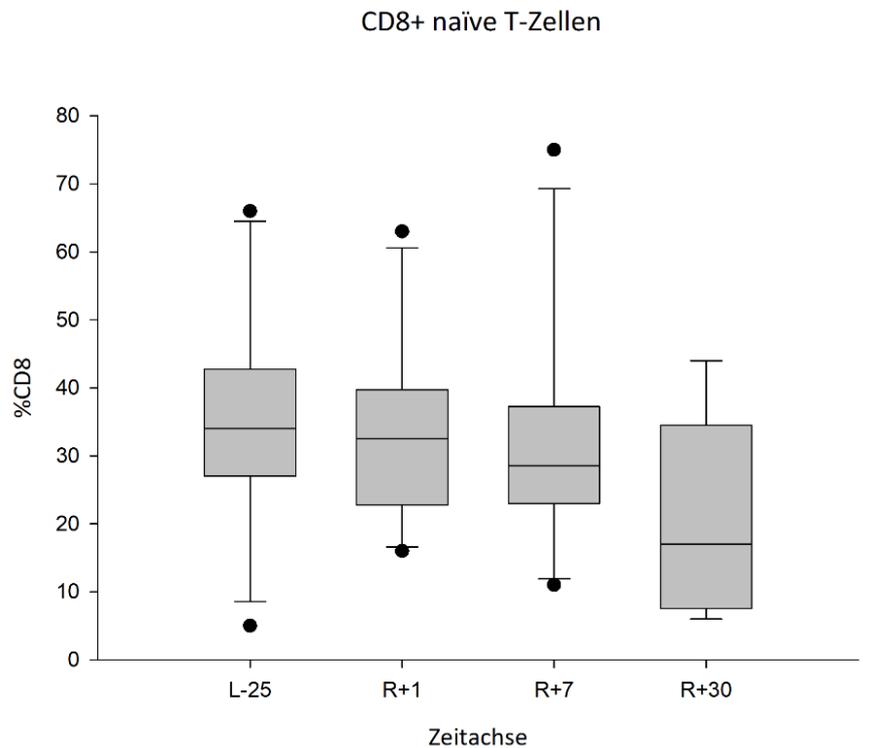
**Abbildung 35** Boxplot der TGF-β Konzentration in pg/ml im Plasma. n=10. \*=p<0,05 Signifikanter Anstieg der TGF-β Konzentration bei beiden Zeitpunkten auf der ISS im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten.



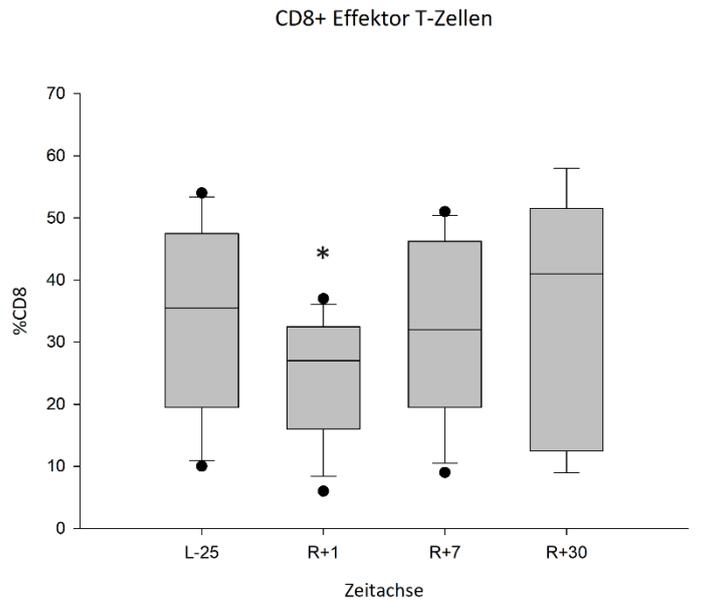
**Abbildung 36** Boxplot der IL-1ra Konzentration in pg/ml im Plasma. n=11. \*=p<0,05 Signifikante Reduktion der IL-1ra Konzentration zum Zeitpunkt R+7 im Vergleich zu dem zweiten Zeitpunkt während des Fluges F+150.

## 5.6 Verschiebungen der CD8+ T-Zell Subpopulationen

Nach Phänotypisierung der CD8+ Zellsubtypen zeigte sich, dass die CD8+ naiven T-Zellen (CD3+CD8+CD45RA+CD28+) weitestgehend unverändert blieben (Abbildung 37), während die CD8+ Effektor T-Zellen (CD3+CD8+CD28-) (Abbildung 38) direkt nach Wiederkehr auf die Erde signifikant abfielen, allerdings schnell (R+7) wieder auf ihr Ausgangsniveau zurückkehrten.

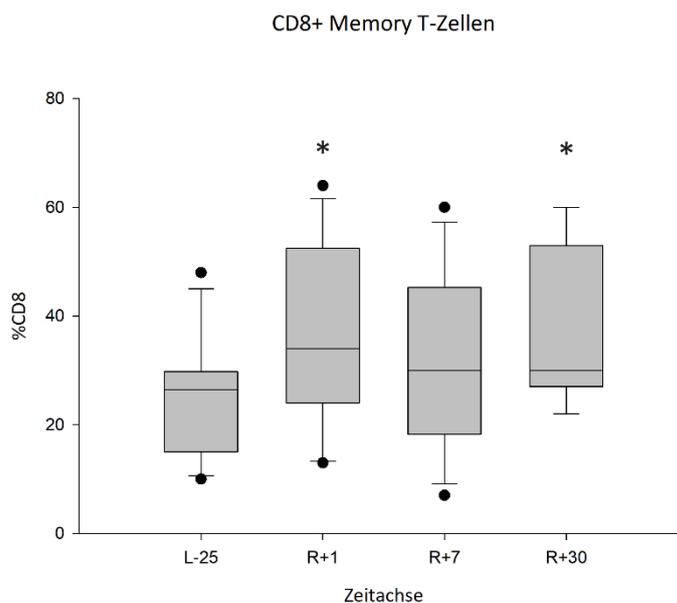


**Abbildung 37** Anteil der CD8+ naiven T-Zellen an allen CD8+ Zellen in % als Boxplot. n=12.



**Abbildung 38** Anteil der CD8+ Effektor T-Zellen an allen CD8+ Zellen in % als Boxplot. n=12. \*=p<0,05 Signifikanter Abfall des prozentualen Anteils der CD8+ Effektorzellen an allen CD8+ Zellen zum Zeitpunkt R+1 im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten.

Zudem beobachteten wir einen Anstieg des Repertoires der CD8+ Memory T-Zellen (CD3+CD8+CD45RO+CD28+) (Abbildung 39). Dieser Anstieg blieb bis 30 Tage nach Wiederkehr bestehen, dem letzten Abnahmezeitpunkt der Studie, was auch für eine prolongierte Veränderung im CD8+ T-Zell Kompartiment spricht. Ergebnisse zum Zeitpunkt R+7 ergaben aufgrund interindividueller Schwankungen keine statistische Signifikanz.



**Abbildung 39** Anteil der CD8+ Memory T-Zellen an allen CD8+ Zellen in % als Boxplot. n=12. \*=p<0,05 Signifikante Zunahme des prozentualen Anteils der CD8+ Memory T-Zellen an allen CD8+ T-Zellen zum Zeitpunkt R+1 und R+30 im Vergleich zu dem Zeitpunkt L-25.

## 6 Diskussion

### 6.1 Stress-Antwort-Systeme unter chronischer Stressexposition

#### 6.1.1 Stressreaktion

Tagtäglich stehen wir vor neuen Herausforderungen. Ob alltägliche Probleme im Beruf oder unvorhersehbare Ereignisse privat, Beispiele gibt es viele. Unser Körper bietet uns jedoch einen adäquaten Schutz vor drohenden Gefahren. In den meisten Fällen sind Menschen in der Lage, diese Belastungen oder Situationen, ohne negative Folgen für die Gesundheit zu bewältigen. Aufgrund verschiedener Netzwerke und Organe, die im Körper zusammenspielen ist so eine rasche Adaptation an Stresssituationen und Herausforderungen möglich. Diese stellen schlussendlich auch unser Überleben sicher.

Unser Gehirn ist ein wesentlicher Bestandteil des Stressantwortsystems. Einige zerebrale Regionen sind für die Integration und Analyse sensorischer und emotionaler Signale verantwortlich (z.B. die Amygdala für das Erleben von Stress und Angst), andere für Planungs- und Denkprozesse (präfrontaler Kortex) und wieder andere (sympathisches Nervensystem, Hypothalamus) für die Aktivierung weiterer zerebraler Strukturen und Organe (Hypophyse, Nebenniere), die über komplexe Rückkopplungskreisläufe, für die Freisetzung der Stresshormone notwendig sind. Interaktionen der Hirnregionen und Hormonkreisläufe untereinander ermöglichen so eine Bewertung der Stressreaktion und Wiedererkennung bestimmter Stressoren, sodass folglich ein besserer Umgang mit stressigen Situationen möglich ist (101).

Der 29-jährige Hans Selye publizierte 1936 seine ersten wissenschaftlichen Erkenntnisse zum „Generellen Adaptationssyndrom“ (45) in der Zeitschrift *Nature*, dessen Ergebnisse auf Experimenten mit Ratten beruhten, die einem starken Stressor ausgesetzt waren. Allerdings entstand die Idee einer „unspezifischen körperlichen Antwort“ nach Beobachtungen von Patienten, die er als Medizinstudent und junger Mediziner machte (102). Selyes letzte Stressdefinition stammt aus dem Jahr 1974 und beschreibt Stress als „unspezifische Reaktion des Körpers auf jegliche Anforderung an diesen“ (103).

Der Begriff der sogenannten *fight-or-flight* Reaktion (siehe 1.2.1) wurde hingegen von dem amerikanischen Physiologen Walter Cannon geprägt und beschreibt eine Stressreaktion als unmittelbare physische und psychische Anpassung an Gefahrensituationen (43). Die erlebte Stressreaktion setzt nun eine Kaskade in Gang. Es kommt zur maximalen Mobilisierung aller Ressourcen, um diese Herausforderung zu meistern und damit ein Überleben in lebensbedrohlichen Situationen zu gewährleisten.

### **6.1.2 Sympathikus- und HPA-Achsenaktivierung**

Die durch Stress aktivierte Amygdala gibt diese Information mit Einbeziehung des präfrontalen Cortex an den Hypothalamus weiter, der eine innerhalb von Sekunden ablaufende Stressantwort über sympathische Nervenbahnen des Rückenmarks an die Nebenniere übermittelt. Das NNM reagiert mit der Freisetzung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin. Die Stresshormone wirken einerseits vegetativ und führen über eine Tachykardie, Hypertonie und Tachypnoe zu einer optimalen Verteilung der Sauerstoff-, Glukose- und Fettreserven und bewirken andererseits im ZNS eine Steigerung der Aufmerksamkeits- und Gedächtnisleistung (104).

Parallel wird eine zweite endokrine Stressantwort über die HPA-Achse mit der Freisetzung von Cortisol eingeleitet. Die Amygdala sendet im Rahmen einer Gefahrensituation Signale an den Hypothalamus. Durch das Erleben von Angst und Stress werden dadurch im Hypothalamus CRH und Vasopressin freigesetzt und bewirken an der Hypophyse eine ACTH-Sekretion. ACTH selbst induziert die Freisetzung von Cortisol an der NNR (49).

In dieser Studie befragten wir Kosmonauten mittels KAB über ihr persönliches Stressempfinden zu definierten Zeitpunkten. Kein Kosmonaut berichtet von erlebtem, akuten Stress. Ein Erklärungsansatz dafür könnte sein, dass die Fragebögen aus Angst vor Kritik und Diskreditierung ggf. nicht immer wahrheitsgetreu ausgefüllt wurden. Einen Hinweis dafür geben die Cortisolkonzentrationen im Speichel, die als objektiver Stressparameter mindestens leicht erhöhte Werte bei den beiden Zeitpunkten F+90 und F+150 auf der ISS im Vergleich zu dem Zeitpunkt vor Beginn der Mission aufzeigten. Eine Signifikanz war allerdings mit dieser Fallzahl nicht nachweisbar.

### **6.1.3 Endocannabinoidwirkung**

Die Auswirkungen von akutem Stress auf das Endocannabinoidsystem wurden schon in zahlreichen Publikationen beschrieben (105, 106). Wir untersuchten hingegen die Folgen chronischer Stressexposition und fanden heraus, dass Langzeitaufenthalte auf der ISS bei gesunden Kosmonauten zu einem signifikanten Anstieg der Plasmakonzentration des Endocannabinoids AEA führen. Dieser Anstieg ist als Reaktion auf länger andauernde Stressimpulse zu werten. Zusätzlich konnte ein Anstieg des Endocannabinoids 2-AG während der Zeit auf der ISS verzeichnet werden. Allerdings ist dieser Anstieg nicht signifikant.

Wenn ein Organismus einer Stresssituation ausgesetzt ist, kommen komplexe biologische Mechanismen zum Erhalt der individuellen physiologischen Homöostase ins Spiel. Während eine schnelle Aktivierung der HPA-Achse entscheidend für die Aufrechterhaltung lebenswichtiger Organfunktionen während der Stresseinwirkung ist, ist es mindestens genauso wichtig, die Glukokortikoid-vermittelte Antwort nach Beendigung des Stimulus, aufzuheben. Dafür sind die Endocannabinoide verantwortlich. Über die Signalwege des Endocannabinoidsystems wird eine Terminierung der HPA-Achsenaktivierung, v.a. nach Stressexposition eingeleitet und so ein großer Beitrag zur Wiederherstellung und Erhalt einer Homöostase geleistet (107). Neben der Regulierung wichtiger Stress-Adaptationsprozesse, sind Endocannabinoide v.a. auch für die Aufrechterhaltung weiterer immunologischer und kardiovaskulärer Funktionen, dem Knochenmetabolismus und der Schlafregulierung verantwortlich (108-110).

Eine Langzeitmission an Bord der ISS resultiert bei den für unsere Studie eingeschlossenen Kosmonauten in einer chronischen Aktivierung des Endocannabinoidsystems, möglicherweise aufgrund der Wirkung zahlreicher Stressoren auf den Körper. Die Identifizierung welcher Stressor genau (ob die Schwerelosigkeit, die Langzeitisolation, der aufgehobene Tag-Nacht-Rhythmus etc.) nun welche pathophysiologische Veränderung hervorruft, ist mit diesem Modell nicht möglich. Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen hinter der Wirkung der Endocannabinoide auf das Immunsystem sind bis dato auch noch nicht entschlüsselt. Somit lässt sich nicht pauschal eine bestimmte Wirkung oder Ursache des Anstiegs oder Abfalls einer bestimmten Endocannabinoidkonzentration, eben aufgrund der Komplexität multipler interagierender neuronaler und hormoneller Schaltkreise, ableiten. Festzuhalten ist aber, dass Endocannabinoide Einfluss auf Apoptose, Hemmung der Zellproliferation (v.a. bei

Mammakarzinomzellen), Suppression der Zytokin- und Chemokinproduktion und Aktivierung der regulatorischen T-Zellen nehmen (111). Es gibt zudem Hinweise darauf, dass Endocannabinoiden, besonders unter Stress, eine protektive Wirkung auf das Immunsystem zugeschrieben werden kann. Zellbiologische Untersuchungen zeigen, dass Immunzellen chemotaktisch zum Ort der Inflammation gelockt und anschließend aktiviert werden, ohne dass eine gleichzeitige Überaktivierung provoziert wird (112, 113). Allerdings berichten andere Autoren von erhöhten ANA und 2-AG Spiegeln bei Patienten, die unter Atherosklerose und/oder der koronaren Herzerkrankung litten (114, 115). Daraus lässt sich ableiten, dass ein aktiviertes Endocannabinoidsystem möglicherweise als ursächlich für die Entstehung oder den Progress der koronaren Herzerkrankung und einer damit verbundenen höheren Mortalität, bei chronisch stressexponierten Individuen, angesehen werden kann (116).

Wenn man den Blick auf die multiplen Wirkungen der Endocannabinoide sowohl auf das Immunsystem als auch auf das kardiovaskuläre System lenkt, könnte man annehmen, dass die beobachtete, erhöhte Endocannabinoidaktivität bei chronisch gestressten Individuen, z.B. während des Aufenthaltes auf der ISS, auch Langzeitkonsequenzen mit sich bringt. Des Weiteren könnte eine Konzentrationsbestimmung der Endocannabinoide vor Abflug einen Hinweis auf die individuelle Stressresistenz und eine Objektivierung des Ausmaßes der Immunprotektion bieten und dabei behilflich sein, besonders stressensitive Individuen im Vorfeld herauszufiltern (117). Diese Beobachtungen könnten von zunehmender Bedeutung für Raumfahrer zukünftiger interplanetarer Missionen mit limitiertem Zugang zu medizinischer Versorgung hinsichtlich der Risikoprofilierung und Etablierung immunprotektiver Strategien sein.

Unsere erhobenen Daten deuten darauf hin, dass das Endocannabinoid AEA als guter Parameter für die Quantifizierung einer chronischen Stressantwort angesehen werden kann, und dass dieser AEA-Anstieg nicht notwendigerweise positiv mit dem subjektiven Stressempfinden korreliert.

Eine interessante Beobachtung war, dass sich die Endocannabinoidspiegel direkt nach der Landung auf der Erde wieder normalisierten. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Endocannabinoidfreisetzung nur durch ein komplexes Zusammenspiel diverser Stresstrigger, nicht aber durch Momente der akuten Stressbelastung, wie die Landung zurück

auf der Erde, ausgelöst wird. Diese Erkenntnis korreliert gut mit dem Wissen, dass sich akuter und chronischer Stress ganz unterschiedlich auf das Immunsystem auswirken (118).

Ein weiterer Aspekt, der auch diskutiert werden sollte, ist die Tatsache, dass zu dem Zeitpunkt, an dem der signifikante Endocannabinoidanstieg detektiert wurde, also während der Zeit auf der ISS, die Kosmonauten selbst sowohl für die Blutabnahme als auch für die weitere korrekte Prozessierung und Lagerung der Proben verantwortlich waren. Es ist bereits bekannt, dass die Endocannabinoidsynthese auch *ex vivo* fortschreitet und es so, im Falle einer nicht sachgerechten unmittelbaren Zentrifugation und Lagerung, zu falsch hohen Werten kommen kann (98, 119). Ein einmaliger lagerungsbedingter Endocannabinoidanstieg wäre denkbar, ist aber unwahrscheinlich. Ein zweizeitiger lagerungsbedingter Endocannabinoidanstieg scheint auch unwahrscheinlich, da dieser nur bei einem der zwei Blutabnahmezeitpunkte zu verzeichnen war.

## **6.2 Zytokinprofile unter chronischer Stressexposition**

Ein typisches Muster von chronischem Stress ist die Verschiebung der T-Zellantwort in Richtung T-Helfer Zell Typ 2 Antwort mit Abnahme der Produktion proinflammatorischer Zytokine (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ) und einer Zunahme der antiinflammatorischen Zytokine (IL-10, TGF- $\beta$ ) (120, 121). In einer Studie von Marucha et al. 1989 (122) wird bestätigt, dass chronische Stressexposition die Wundheilung negativ beeinflusst und einen möglichen Einfluss auf die Immunhomöostase hat. Elf Zahnmedizinstudenten erhielten jeweils zwei Stanzbiopsien ihres Gaumens (die erste während der Sommerferien, die zweite drei Tage vor einer wichtigen Prüfung). Es zeigte sich, dass die Wundheilung während der Prüfungsperiode im Durchschnitt drei Tage länger dauerte und die Produktion von IL-1 $\beta$  um 68% abnahm und als möglicher Nachweis eines zugrundeliegenden immunologischen Mechanismus dienen könnte. Marshall et al. benutzen ein von Kiecolt-Glaser et al. (123) etabliertes Modell zur Demonstrierung einer erhöhten IL-10 Produktion begleitet von einer supprimierten IFN- $\gamma$  Freisetzung bei gesunden Medizinstudenten während der Examensphase (121). Diese Beobachtungen lassen sich durch die Aktivierung der HPA-Achse gefolgt von einer vermehrten Plasmacortisolfreisetzung als wichtiger neuroendokriner Mediator der veränderten stressinduzierten Zytokinprofile, erklären.

Auch in unserer Studie beobachteten wir während der Zeit auf der ISS eine deutliche Zunahme der antiinflammatorischen Zytokine IL-10, IL-1ra und TGF- $\beta$ . Da diese Werte nicht mit den subjektiven Wahrnehmungen der Kosmonauten korrelieren, ist davon auszugehen, dass die Kosmonauten den durchweg ausgesetzten chronischen Stress, nicht als solchen wahrnehmen oder nicht offen darlegen wollten.

## **6.3 T-Zell-Erschöpfung unter chronischer Stressexposition**

### **6.3.1 CD8+ T-Zellen**

Auch die phänotypische Verteilung der CD8+ T-Zellen war durch die Auswirkungen prolongierter Aufenthalte im All verändert. Wir beobachteten eine Verschiebung des CD8+ T-Zell-Repertoires in Richtung CD8+ Memory-T-Zellen, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes anhielt. Die Verteilung CD4+ naiver T-Zellen und CD4+ Memory-T-Zellen blieb unterdessen weitestgehend unverändert.

Während einer akuten Infektion oder nach einer Impfung proliferieren und differenzieren sich naive CD8+ T-Zellen zu CD8+ Effektor T-Zellen, die ihre Zielzellen gezielt töten, um persistierende Infektionen zu kontrollieren. Die Differenzierung zu T-Effektorzellen zeichnet sich durch den Erwerb charakteristischer Effektormerkmale, wie der Fähigkeit zur Produktion von Zytokinen und zytotoxischen Mediatoren, aus. Nach erfolgreicher Infektabwehr und dem Abklingen der Infektion, stirbt auch der größte Teil der aktivierten T-Zellen durch aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD). Einige wenige bleiben jedoch zurück und differenzieren sich weiter zu CD8+ Memory T-Zellen. Sie erwerben eine stammzellartige Überlebensfähigkeit, ohne fortwährende Stimulation durch Antigene und sind in der Lage, innerhalb kürzester Zeit eine Immunantwort zu wiederholen (124).

### **6.3.2 T-Zell Seneszenz**

Im Gegensatz zur Entstehung funktioneller CD8+ Effektor- und Memory T-Zellen nach akuten Infektionen oder Impfungen, kann sich das T-Zell-Gedächtnis bei anhaltender Antigenexposition im Rahmen chronischer Infektionen nicht effizient weiterentwickeln und erschöpft sich mit der Zeit. Die sogenannten „erschöpften“ seneszenten T-Zellen unterscheiden sich funktionell von den CD8+ Effektor- und Memory T-Zellen und sind v.a.

durch den Verlust ihrer Effektorfunktionen gekennzeichnet. Des Weiteren haben sie auch die Fähigkeit in eine Art Ruhezustand überzugehen verloren.

Obwohl die ersten Studien eine T-Zell Erschöpfung in Zusammenhang mit Infektionen des lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) beschreiben, ist heutzutage klar, dass CD8+ seneszente T-Zellen eine entscheidende Rolle bei vielen anderen chronischen Viruserkrankungen verursacht durch das Humane Immundefizienz-Virus (HIV), durch das Hepatitis-C-Virus, durch das Hepatitis-B-Virus und auch bei Autoimmunerkrankungen spielen (125).

Auch die bereits erwähnten Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10 werden mit einer zunehmenden T-Zellerschöpfung in Verbindung gebracht. V.a. bei chronischen Virusinfektionen steht eine vermehrte TGF- $\beta$  Expression in direktem Zusammenhang mit einer vermehrten Erschöpfung CD8+ T-Zellen (126, 127). Publikationen zeigen, dass eine Blockade des Zytokins IL-10, im Rahmen chronischer Infektionen und Tumorerkrankungen, den Erschöpfungszustand der T-Zellen verhindern oder gar umkehren kann (128-130).

Sollten die beobachteten Veränderungen, wie eine vermehrte Freisetzung von IL-10 und TGF- $\beta$  und eine Verschiebung der CD8+ T-Zellen in Richtung Memory T-Zellen, dennoch dauerhaft anhalten wie z.B. durch prolongierte Aufenthalte im All bei einem Flug zum Mars, könnten sie ebenfalls zu der Entwicklung immunassoziierter Erkrankungen wie z.B. chronischen Entzündungserkrankungen und Autoimmunerkrankungen führen (131).

Die hier erhobenen Daten lassen vermuten, dass eine höhere Anzahl CD8+ Memory T-Zellen sehr wahrscheinlich mit einer vermehrten Konversion zu seneszenten T-Zellen einhergeht. Allerdings bedarf es, um in Zukunft weitere Aussagen über den konkreten Reife- und Erschöpfungsgrad der CD8+ Memory T-Zellen treffen zu können, einer differenzierten durchflusszytometrischen Identifizierung dieser Zellen. Marker könnten z.B. die Rezeptoren des *programmed cell death protein 1* (PD-1) oder CTLA-4 darstellen, die bereits für die Identifizierung terminal differenzierter CD8+ T-Zellen bekannt sind (132). Auch der Marker CD95 (Fas) wurde in Kombination mit CD28 verwendet, um seneszente T-Zellen zu identifizieren (133). Der intrazelluläre Marker T-bet könnte sich ebenfalls als hilfreich erweisen, allerdings ist bekannt, dass zytosolische und nukleäre Rezeptoren mittels durchflusszytometrischer Analyse schwerer zu erfassen sind (134).

## **6.4 Akute Stresstimuli und vermehrte Leukozytenfreisetzung**

Das Immunsystem reagiert auf akuten Stress, dem Konzept des immun-neuroendokrinen Zusammenspiels zufolge, über Aktivierung des sympathischen Nervensystems und der HPA-Achse mit vermehrter Freisetzung von Leukozyten aus dem Knochenmark und einer damit einhergehenden erhöhten Blutzirkulation (82, 135, 136). Der von Crucian et al. (137) beschriebene absolute Anstieg der Leukozyten und PMNL nach Langzeitaufenthalt kann durch die in dieser Studie erhobenen Daten bestätigt werden. Diese Beobachtung ist am ehesten auf eine stressinduzierte Freisetzung der PMNL ins Blutsystem zu verstehen. Stowe et al. publizierten 1999 dieses Phänomen nach Kurzeitaufenthalt im All. Parallel konnten sie einen Anstieg der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin und des Stresshormons Cortisols im Urin verzeichnen (83). 2008 verglich die Arbeitsgruppe die Daten einer 16-tägigen Bedreststudie mit den Daten nach Kurzeitaufenthalt im All und fand heraus, dass sich sowohl ein Anstieg der Stresshormone als auch ein Anstieg der Leukozyten und PMNL bei beiden Modellen abzeichnete. Demnach lässt sich vermuten, dass eine veränderte Verteilung der Leukozyten im peripheren Blut am ehesten dem Stress und nicht der fehlenden Erdanziehungskraft zuzuschreiben ist (138).

### **6.4.1 Verschiebung der Leukozytenpopulationen**

Neutrophile Granulozyten, die mehr als zwei Drittel der peripheren Leukozyten ausmachen, sind als Bestandteil des angeborenen Immunsystems die ersten Zellen am Ort einer Infektion. Als phagozytierende Zellen spielen sie eine wichtige Rolle bei der Abwehr mikrobieller Erreger und der Abstimmung von Entzündungsprozessen. Passagere funktionelle Defekte der neutrophilen Granulozyten, oft durch Virusinfektionen, Mangelernährung und Immunsuppressiva hervorgerufen, gehen mit mangelnder Migrationsfähigkeit, eingeschränkter Aktivierbarkeit und verminderter Kompetenz hinsichtlich der Eliminierung von Pathogenen einher. Klinisch manifestieren sich diese Defekte in Wundheilungsstörungen, langwierigen Infektionen und einer erhöhten Infektanfälligkeit.

Die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen Stressexposition und den nach Raumfahrt erfassten immunologischen Veränderungen besteht, deckt sich mit dem Wissen, dass adrenerge und Glukokortikoidrezeptoren sowohl auf Lymphozyten als auch auf PMNL exprimiert werden (139, 140). Die absolute Leukozytenzahl und ihre Differenzierung im

peripheren Blut liefert wichtige Erkenntnisse über den aktuellen zellulären Immunstatus und kann so Hinweise auf reaktive Veränderungen, die im Rahmen viraler oder bakterieller Infekte entstehen können, geben (135, 141). Verschiebungen der Leukozytenpopulationen, ob stressinduziert oder viral/bakteriell bedingt, können sich entsprechend gravierend auf die Fähigkeit des Immunsystems, immunologische Herausforderungen zu integrieren, auswirken (142).

Die beobachteten Veränderungen der Verteilung der Leukozytenpopulationen im peripheren Blutausschlag unmittelbar nach Landung auf der Erde, sind größtenteils vergleichbar mit vorherigen Berichten nach Kurzaufenthalten (143) und einer Pilotstudie nach Langzeitaufenthalt (137). Direkt nach der Landung haben wir einen absoluten Anstieg der Gesamtleukozytenzahl, der neutrophilen Granulozyten, der Monozyten und B-Lymphozyten vernommen. Dieses Phänomen kann gut durch die Landung an sich, als Modell akuter Stressexposition durch rasante Gravitationsänderungen mit außerordentlichen Vibrationskräften, die auf den Körper einwirken, erklärt werden. Hinzu kommen auch Aspekte des psychischen Stresses, einerseits durch existenzielle Ängste aufgrund potenzieller Gefahren und andererseits durch die enormen mentalen Anforderungen während der Landephase, die berücksichtigt werden müssen.

#### **6.4.2 Vermehrte L-Selektinabspaltung durch Aktivierung**

Mit dieser Studie konnte eine vermehrte Aktivierung der neutrophilen Granulozyten unmittelbar nach Rückkehr auf der Erde nachgewiesen werden. Einen deutlichen Hinweis dafür liefert die messbare Reduzierung des Oberflächenmarkers L-Selektin zum Zeitpunkt R+1. Diese Reduzierung lässt sich durch eine vermehrte proteolytische Abspaltung des L-Selektins von der Zelloberfläche erklären, die innerhalb weniger Minuten nach Aktivierung der Granulozyten induziert wird. Die Aktivierung der PMNL geht ebenfalls mit einer deutlich veränderten Rezirkulationskapazität einher. Es kommt, aufgrund einer Rekrutierung durch Aktivierung, zu einer vermehrten Rezirkulation von Zellen wie PMNL ins Blut, die eigentlich unter physiologischen Bedingungen nicht rezirkulieren würden (144-146). Laborchemisch lässt sich dieser pathophysiologische Anpassungsprozess, durch einen Anstieg der PMNL zum Blutabnahmezeitpunkt unmittelbar nach Landung auf der Erde, nachweisen.

In der Untersuchung von Stowe et al. (83), die sich hauptsächlich auf die immunologischen Veränderungen nach einem Kurzaufenthalt im All konzentriert hat, zeigte sich interessanterweise eine vermehrte L-Selektinexpression auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten. Die Autoren werten die L-Selektin-vermittelte, gesteigerte chemotaktische Aktivität kurz nach Landung als Zeichen einer gesteigerten Aktivität neutrophiler Granulozyten. Die gesteigerte Aktivität wird als Zeichen einer hypermetabolischen Phase der Granulozyten, möglicherweise aufgrund der Freisetzung vermehrter Stresshormone während der Landung oder kurz nach der Rückkehr, gewertet.

Unterschiede hinsichtlich unserer Beobachtungen lassen sich eventuell durch andere kumulative Bedingungen und Effekte, die nur bei Langzeitaufenthalten im All in Erscheinung treten und einen Einfluss auf das Immunsystem haben, erklären. Möglicherweise kann auch der Zeitpunkt der Blutabnahme eine Rolle spielen. Kurokawa et al. (147) beobachteten bei Probanden, unmittelbar nach einer Sportübung, zunächst einen zehnpromtigen Abfall der L-Selektin Expression. Nach einer Erholungsphase stieg die L-Selektin Expression jedoch wieder um 20% an. Diese zeitliche Abhängigkeit könnte ebenfalls eine Erklärung für die divergierenden Beobachtungen der immunologischen Veränderungen hinsichtlich der unmittelbaren Phase nach Landung auf der Erde sein. Die Blutentnahmen in dieser Studie fanden jedoch morgens am Tag nach der Landung, also nach einer Nachtruhe statt. Somit ist entweder die nachgewiesene Abspaltung akut nach der Landung noch ausgeprägter und wir detektierten residuale Veränderungen innerhalb der Erholungsphase, oder diese ist tatsächlich ein längerfristiger Effekt, der durch den Weltraumaufenthalt entstanden ist. Dies lässt sich durch unsere Untersuchungen nicht abschließend klären.

### **6.4.3 Antioxidative Mechanismen**

Als Teil der innate Immunantwort liefert der oxidative *Burst*, im Rahmen der Phagozytose, mit der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies in den Phagolysosomen und ebenso perizellulär bei neutrophilen Granulozyten, einen wesentlichen Beitrag zur Infektabwehr (148-150). So können bereits phagozytierte Erreger und zusätzlich extrazellulär befindliche Mikroorganismen effektiv bekämpft werden. Unter den gegebenen Umständen der Studie ist es demnach von erheblicher Bedeutung, antioxidative Mechanismen zum Schutz vor einer überschießenden Sauerstoffradikalfreisetzung im Rahmen des oxidativen *Bursts* zu

betrachten. Im gesunden Organismus agieren zahlreiche antioxidative Systeme, um den, durch die Oxidationsmittel verursachten Schaden, zu limitieren. Zum antioxidativen Schutz der Zellen, dient das Tripeptid Glutathion (bestehend aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin), als wichtige reduzierende Verbindung reaktiver Sauerstoffverbindungen. Über den gesamten Beobachtungszeitraum der Kosmonauten, zeigte sich eine stabile ROS-Freisetzung. Auch die Menge der Glutathionfreisetzung, eines der wichtigsten antioxidativ wirkenden Substanzen im Körper des Menschen, blieb unter physiologischer Stimulation über die Zeit vor und nach der ISS mit allen stressauslösenden Aspekten, stabil und erhalten.

#### **6.4.4 Antioxidative Mechanismen und die Rolle der Endocannabinoide**

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass das Endocannabinoidsystem auch eine wichtige Rolle bei der Modulierung der ROS-Produktion in verschiedenen Zellarten und bei der Aufrechterhaltung einer zellulären Redox-Homöostase spielt. Anandamide z.B. sorgen für eine verminderte Neurotoxizität in Anwesenheit von oxidativen Stress (151). Zudem schützen der CB1 Rezeptor und CB2 Rezeptor Agonist WIN-55,212-2 und das pflanzliche Derivat THC Astrozyten vor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierter Apoptose. Die protektive Wirkung konnte durch den selektiven CB1 Rezeptor Blocker SR141716 aufgehoben werden, sodass auf eine CB1 Rezeptor vermittelte anti-apoptotische und/oder anti-oxidative Wirkung geschlossen werden kann.

Wir konnten bei der ROS-Produktion durch PMNL zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied erkennen. Allerdings war es, aufgrund operationeller Limitationen, nicht möglich durchflusszytometrische Messungen an Bord der ISS, zum Zeitpunkt der maximalen Endocannabinoidfreisetzung, durchzuführen und diese Ergebnisse mit den Endocannabinoiddaten zu korrelieren. Man könnte aber vermuten, dass die während des Aufenthaltes auf der ISS detektierten erhöhten AEA-Level zu einer verminderten ROS und ggf. gesteigerten anti-oxidativ wirksamen Glutathionfreisetzung führen würden. Einen Hinweis dafür liefert der, statistisch nicht signifikante, erhöhte Glutathiongehalt der PMNL unmittelbar nach Landung auf der Erde.

Was uns bleibt, ist die Erkenntnis, dass Endocannabinoide eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Redox-Hämostase spielen, ihre Wirkung aber u.a. abhängig vom Zelltyp sowohl zell-protektiv als auch pro-apoptotisch sein kann.

## 6.5 Immunantwort gegenüber Pilzantigenen

### 6.5.1 Pilzinfektionen auf der ISS

Pilzinfektionen sind alltäglich und variieren von milden, oberflächlichen Hauterscheinungen bis hin zu lebensbedrohlichen, invasiven Infektionen. Die meisten Pilze sind opportunistische Erreger, d.h. sie verursachen erst klinische Symptome unter immunsupprimierten Bedingungen wie HIV-Infektionen, Krebserkrankungen, Chemotherapien, Transplantationen oder sonstiger Erkrankungen, die die Einnahme von Immunsuppressiva nötig machen (152). Es gibt zahlreiche Argumente für die Rechtfertigung einer bemannten Raumstation. Einer der Gründe ist mit Sicherheit die Gewinnung von Erkenntnissen in Anbetracht bevorstehender interplanetarer Missionen. Eine Realisierung derartiger Projekte ist nur möglich, wenn sowohl die Sicherung der Umgebung als auch der Gesundheit der Raumfahrer oberste Priorität hat. Auch Situationen, in denen das Immunsystem nicht unbedingt immunsupprimiert aber immundysreguliert ist, wie nach und während eines Langzeitaufenthaltes im All (siehe 6.6), gilt es somit, zum Schutz der Raumfahrer zu vermeiden. Verursacht wird die Mehrheit invasiver Infektionen immunsupprimierter Individuen durch *Candida*, *Aspergillus* oder *Cryptococcus* Spezies. V.a. systemische *Candida albicans* Infektionen, häufig auf dem Boden einer Immunsuppression, sind aufgrund seiner hohen Mortalitätsrate von ca. 40% besonders gefürchtet (153). Der Mangel an Impfungen, diagnostischen Möglichkeiten, antifungaler Therapien, sowie die zeitgleiche Zunahme therapieresistenter Stämme werden zunehmend eine Herausforderung v.a. auf Intensivstationen aber auch auf geplanten Langzeitmissionen. Ein besseres Verständnis der menschlichen antifungalen Immunantwort ist ein wesentliches Element in der Entwicklung und Verbesserung präventiver Strategien (152).

Novikova et al. (154) berichten von einer sowohl bakteriellen als auch fungalen Besiedelung, z.T. durch opportunistische Erreger, v.a. der Oberflächen im Innenraum verschiedener Module der ISS. Pilze konnten in 24% aller genommenen Proben nachgewiesen werden. Hier dominierte, neben *Candida* v.a. die *Aspergillus* Spezies, die beide als klassisch opportunistische Pilze, zu schwerwiegenden systemischen Infektionen führen können.

Die Arbeitsgruppe um Sugita et al. (155) berichten zudem von einer deutlichen Zunahme der Hautkolonialisierung mit dem lipophilen Pilz *Malassezia* während der Zeit auf der ISS. Die Schwerelosigkeit scheint ein wesentlicher Faktor in der Entstehung von Veränderungen des

Hautmikrobioms, vornehmlich aufgrund Änderungen der Hautbeschaffenheit (trocken oder fettig) zu sein. Astronauten entwickelten eine eher fettige Haut auf der ISS, die mit einer vielfach gesteigerten *Malassezia* Kolonialisierung der Haut einherging. *Malassezia* ist klassischerweise v.a. unter immunsupprimierten Bedingungen und Stress an der Entwicklung der seborrhoischen Dermatitis beteiligt (156).

Kenntnisse über Zusammenhänge zwischen Stress, vermehrter Exposition gegenüber Pilzantigenen, sei es Pilze die vornehmlich die Haut kolonialisieren oder opportunistische Erreger, und den daraus resultierenden Immunantworten sind, mit dem Ziel entsprechende Konsequenzen hinsichtlich präventiver Maßnahmen oder therapeutischer Optionen ableiten zu können, v.a. bzgl. längerer interplanetarer Missionen, von besonderer Bedeutung.

### **6.5.2 Proinflammation bei Überempfindlichkeit gegenüber Pilzantigenen**

Kurz nach der Ankunft zum Zeitpunkt R+1, inkubierten wir das gewonnene Vollblut der Kosmonauten mit diversen Antigenen. Es zeigte sich eine deutliche Überaktivierung gegenüber der Pilzantigenmischung, die sich in Form einer vermehrten Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 $\beta$  darstellte. Dieser Anstieg war bis zum nächsten Blutabnahmezeitpunkt am siebten Tag nach Rückkehr (R+7) zu verzeichnen. Der im Plasma gemessene Interleukinspiegel fiel nach Landung wieder rasch ab, nachdem zuvor ein signifikanter Anstieg während des Fluges vernommen werden konnte. Der im Plasma bestimmte TNF-Spiegel ließ über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Veränderung erkennen. Der IL-1 $\beta$  Zytokinabfall und die unveränderte TNF-Konzentration im Plasma, lassen vermuten, dass die gemessene Überaktivierungsantwort gegenüber Pilzantigenen nicht zwingend durch grundsätzlich erhöhte Plasmalevel der Zytokine zu erklären ist.

Buchheim et al. untersuchten bereits den Einfluss von Endocannabinoid-Agonisten auf die Immunantwort unter Exposition gegenüber Pilzantigenen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass v.a. das proinflammatorische Zytokin IL-6 und das Zytokin IL-2, das als Proliferationsfaktor für T-Zellen angesehen werden kann, unter CB2 Rezeptor Stimulation supprimiert waren (157). Mit diesem Wissen könnte man vermuten, dass der detektierte Endocannabinoidanstieg zu einer verminderten Antwort gegenüber Pilzantigenen am zweiten Blutabnahmezeitpunkt während der Zeit auf der ISS führen wird, die allerdings in einer Überaktivierung unmittelbar

nach einer stressvollen Phase, nämlich der Landung auf der Erde, bei normalisierten AEA-Spiegeln endet.

### **6.5.3 Die Rolle der NK-Zellen in der antifungalen Immunantwort**

Des Weiteren konnte eine signifikante Reduktion der NK-Zellen zum Zeitpunkt R+1 vernommen werden. NK-Zellen haben ihren Ursprung im Knochenmark, repräsentieren ca. 15% der Lymphozyten im peripheren Blut und stellen somit eine wesentliche Komponente des angeborenen Immunsystems dar. Diverse *in vitro* Untersuchungen bestätigen die Tatsache, dass NK-Zellen eine wichtige Rolle bei der antifungalen Immunantwort spielen. Einerseits können NK-Zellen den Pilzen direkt über lösliche zytotoxische Moleküle Schaden zufügen, andererseits produzieren sie verschiedene Zytokine und Interferone, die für die Modulierung der Immunantwort gegenüber Pilzantigenbestandteilen von großer Bedeutung sind (158). Als Beispiel für ein antifungales Schlüsselzytokin sei das von den NK-Zellen gebildete IFN- $\gamma$  genannt (159). In Tierexperimenten konnte diese These bekräftigt werden. So zeigten Park et al. in einem Mausmodell, dass bei an invasiver Aspergillose leidenden Mäusen, die Depletion von NK-Zellen in einer Reduktion der IFN- $\gamma$  Spiegel in den Lungen resultiert (160). Wir hingegen beobachteten keine signifikanten Unterschiede der IFN- $\gamma$  Freisetzung über den kompletten Beobachtungszeitraum, sowohl nach Stimulation mit Pilzantigenen als auch im Plasma der Probanden. Eine mögliche Erklärung dafür sei, dass die quantitative Reduktion der NK-Zellen gerade noch keine funktionelle Einschränkung im Sinne einer verminderten IFN- $\gamma$  Produktion zur Folge haben muss. Es werden weitere Untersuchungen nötig sein, um einen Schwellenwert der NK-Zellen, bei dessen Unterschreitung auch mit einer verminderten IFN- $\gamma$  Freisetzung zu rechnen ist, definieren zu können.

Eine normale Anzahl und ein uneingeschränkter Funktionsstatus zirkulierender NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung einer intakten, innaten Immunität (161). Eine Reduktion der zirkulierenden peripheren NK-Zellen oder der NK-Zellaktivität wird mit der Entstehung und dem Fortschreiten von Tumorerkrankungen, akuten und chronischen Infektionen, diversen Immundefizienzsyndromen und einigen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht (162). Aufgrund der Relevanz der NK-Zellen in der Aufrechterhaltung einer intakten angeborenen Immunität könnten NK-Zellen einen frühen und wichtigen Marker für eine erhöhte Anfälligkeit assoziierter Erkrankungen und einem damit verbundenen

erhöhtem klinischen Risiko durch langanhaltende raumfahrtassoziierte Stressexposition, darstellen.

#### **6.5.4 Regulatorische T-Zellen und Immundysfunktion nach Raumfahrt**

Regulatorische T-Zellen machen ca. 4-7% aller CD4+ T-Zellen im menschlichen Körper aus. Die wesentlichen Proteine, die für die Vermittlung der Immuntoleranz und Identität CD4+ regulatorischer T-Zellen charakteristisch sind, sind u.a. das *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA4), der Interleukin-2-Rezeptor (CD25) und das *forkhead-box-protein P3* (FOXP3). Die Schlüsselrolle des Transkriptionsfaktors FOXP3 besteht in der Suppression ungerichteter Immunantworten und der Aufrechterhaltung einer Immuntoleranz. Über den Oberflächenrezeptor CTLA4 wird die Antigenpräsentation gegenüber T-Effektor-Zellen direkt inhibiert. Auch die  $\alpha$ -Kette des Interleukin-2-Rezeptor (CD25) nimmt eine wichtige Funktion ein (163).

Zusätzlich zu der verstärkten Antwort auf Pilzantigene, konnten wir eine Reduktion der antiinflammatorisch wirkenden T-Zellen (regulatorische T-Zellen) nach Rückkehr zur Erde beobachten. Diese Beobachtung lässt eine eingeschränkte T-Zellfunktion im Hinblick auf eine adäquate Hemmung eines aktivierten Immunsystems und eine ausreichende Limitierung der Autoimmunität vermuten (163). Die klinische Bedeutung der regulatorischen T-Zellen wird, nach Betrachtung der entscheidenden zwei Wirkmechanismen, offensichtlich. Einerseits kontrollieren sie adaptive Immunantworten durch Interaktionen mit T-Effektorzellen so, dass eine Abwehrreaktion gegenüber Tumorzellen und sowohl intra- als auch extrazellulären Erregern erreicht werden kann. Andererseits werden Autoimmunerkrankungen v.a. durch überschießende Abwehrreaktionen gegenüber Autoantigenen unterbunden.

##### **6.5.4.1 Regulatorische T-Zellen und die Entstehung von Allergien**

Auch bei der Entstehung von Allergien spielen regulatorische T-Zellen eine entscheidende Rolle. Ein Ungleichgewicht zwischen der Typ 2 Immunantwort und regulatorischen T-Zellen ist ein wichtiger Faktor in der Pathogenese allergischer Erkrankungen. Regulatorische T-Zellen hemmen direkt Typ 2 Immunzellen wie TH2-Zellen und IgE produzierende B-Zellen. Des Weiteren zeigen regulatorische T-Zellen über die Freisetzung der inhibitorischen Zytokine IL-10, TGF- $\beta$  und IL-35 direkt immunsuppressive Eigenschaften. Durch Blockade der

Degranulation von Mastzellen, können regulatorische T-Zellen direkten Einfluss auf die immunologischen Auswirkungen einer allergischen Reaktion über das angeborene Immunsystem nehmen. Allerdings ist auch bekannt, dass bei chronisch allergisch erkrankten Patienten, die Kontrollmechanismen autoimmunologischer Prozesse durch regulatorische T-Zellen nicht greifen und stattdessen eher ein pathologisch, proinflammatorisches Milieu getriggert wird (164). Aber nicht nur Allergien, auch autoimmunologische Erkrankungen und Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen sind die direkte Konsequenz einer dysregulierten Immunantwort. Die klinische Manifestation von Allergien zeigt sich v.a. in allergischer Rhinitis, allergischem Asthma, Nahrungsmittelallergien, atopischen Dermatitis und Anaphylaxien. Die Prävalenz allergischer Erkrankungen hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen, betrifft heutzutage ca. 30 % der Bevölkerung in industrialisierten Ländern (165) und gewinnt so zunehmend an Bedeutung auch für zukünftige Raumfahrer und Ihren Missionen.

#### **6.5.4.2 Regulatorische T-Zellen und anti-inflammatorisch wirkende Zytokine**

Die Veränderungen der Plasmazytokine spiegeln den durch die regulatorischen T-Zellen verursachten enthemmten Immunzustand nach Landung auf der Erde wider. Wir beobachteten einen Anstieg der antiinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-1ra, IL-10 und TGF- $\beta$  während des Fluges und einen signifikanten Abfall zum Zeitpunkt der ersten Blutabnahme auf der Erde.

In einem Mausmodell konnte die Arbeitsgruppe um Sakaguchi 1995 zeigen, dass CD25-depletierte CD4+ T-Zellen zu Autoimmunerkrankungen aber auch zu einer gesteigerten Aktivität gegenüber Fremddantigenen führte, während der Transfer CD25+ T-Zellen in thymektomierte neonatale Mäuse (Tag 3 nach Geburt) die Entwicklung autoimmunassoziierter Organschäden verhinderte (166). Zusätzlich exprimieren regulatorische T-Zellen große Mengen der immunsuppressiven Mediatoren IL-10 (167) und TGF- $\beta$  (168). Obwohl zahlreiche *in vitro* Modelle zeigten, dass regulatorische T-Zellen auch ohne die Mediatoren IL-10 und TGF- $\beta$  immunsupprimierende Wirkungen aufweisen, ist heutzutage bekannt, dass IL-10 einen großen Einfluss v.a. auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs hat. Auch im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass IL-10 mit der Limitierung entzündlicher Prozesse an intestinalen und pulmonalen Schleimhäuten in Verbindung gebracht wird (169). Nicht nur regulatorische T-Zellen, auch v.a. aktivierte CD8+ T-Zellen und

CD4+ Effektor-T-Zellen (TH1, TH2 und TH17 Zellen) sind in der Lage, IL-10 freizusetzen (170). Demnach repräsentiert die IL-10 Freisetzung auch einen adäquaten Feedbackmechanismus zur Terminierung und Limitierung eigen initiiertes Effektorfunktionen. TGF- $\beta$  reguliert sowohl Zellen der adaptiven Immunität wie T-Zellen, aber auch Zellen des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen und ist v.a. für eine Inhibierung immunologischer Antworten über a) die Terminierung inflammatorischer Prozesse und b) über die Unterhaltung regulatorischer T-Zell-Funktionen verantwortlich (168).

Bei einer Reduktion des Repertoires der regulatorischen T-Zellen, wie nach Raumfahrt beobachtet wurde, kann die nun resultierende fehlende Suppression und Terminierung des aktivierten Immunsystems, einer Störung des homöostatischen Äquilibriums zwischen regulatorischen Inhibitor- und Effektorfunktionen wesentlich beitragen. Das Immunsystem gerät aus dem Gleichgewicht und es können, wie bereits erwähnt, Autoimmunerkrankungen, Allergien oder unkontrollierte Entzündungsreaktionen entstehen.

## **6.6 Stress, Immundysregulation und Inflammation**

### **6.6.1 Akuter versus chronischer Stress**

Die Auswirkungen zahlreicher raumfahrtassoziierter Faktoren auf den menschlichen Organismus kann von unterschiedlichen Seiten betrachtet werden. Die Gegenüberstellung „akuter versus chronischer Stress“ und der Vergleich „Stress während versus Stress nach Langzeitaufenthalt im All“ ermöglichen eine kritische Auseinandersetzung hinsichtlich der Konsequenzen eines langen Aufenthaltes auf der ISS auf das Immunsystem.

Eine ausgeprägte akute Stressreaktion infolge eines potenziell lebensgefährlichen Ereignisses, wie z.B. die Reise zurück zur Erde, bedingt zusätzlich und unabhängig vom derzeitigen individuellen Immunstatus des Raumfahrers (z.B. der Veränderung des Immunphänotyps durch chronische Stressexposition) die Mobilisierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Mehrere Studien zeigen, dass akuter Stress auch einen immunprotektiven Effekt haben kann. Akuter Stress, der mit einer Aktivierung des Immunsystems einhergeht, verbessert z.B. die Migrationsfähigkeit, Ausreifung und Funktion der Lymphozyten und führt somit zu einer Verstärkung der innate und adaptiven Immunantwort (171). Besonders wichtig ist aber zu erwähnen, dass eine akute Stressexposition, im Falle einer fehl gerichteten

Antwort gegenüber Selbstantigenen, z.B. nach längerer Aktivierung durch chronischen Stress, auch immunpathologische Konsequenzen nach sich ziehen kann.

Akuter Stress beschleunigt sowohl die Terminierung einer Infektion (172) als auch die Wundheilung (173) und führt zu einer Verstärkung der zellulären und humoralen Immunität (174-176). Als Mediatoren fungieren v.a. durch Stresshormone freigesetzte Immunzellen (177, 178). Durch den Mechanismus der Umverteilung der Leukozyten wird eine ausreichende Anzahl von Zellen am Ort der Infektion bereitgestellt (177). Durch die Aktivierung adrenerger Rezeptoren führt die akute stressinduzierte Stimulation des SAM-Systems zu einer Erhöhung der Anzahl und Funktion immunregulatorischer Zellen mit dem Ziel die Abwehrfähigkeit des Körpers zu erhöhen (179).

Chronische Stressexposition führt zu einer Aktivierung ähnlicher Mechanismen nur über eine längere Periode und zeichnet sich v.a. durch eine sowohl stark beeinträchtigte Wundheilung (122, 180) als auch Immunantwort nach Impfung (56, 181, 182) aus. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass chronischer Stress die Empfänglichkeit für virale (183, 184) und bakterielle (185) Infektionen erhöht.

### **6.6.2 Immundysregulation**

In der Literatur ist erstmalig eine Immunsuppression bei Astronauten nach Rückkehr von der Apollo und Skylab Mission beschrieben (186). Schon diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass raumfahrtassoziierte Faktoren wie Schwerelosigkeit oder Langzeitisolation, einen möglichen Einfluss auf die Immunbalance haben. Mehr als 50% der Apollo Astronauten litten nach ihrer Mission an Infektionen der Haut, des Urogenitaltrakts, der Atemwege oder des Magen-Darm-Trakts (187). Blutabnahmen vom Astronauten nach Aufenthalt im All bestätigen eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten und eine verminderte oder gleichbleibende Anzahl an Lymphozyten (83, 188).

Auch DTH-Antworten, vermittelt über CD4+ TH1 Zellen und Makrophagen, waren während einer Weltraummission im Vergleich zu der Situation vor Abflug, deutlich reduziert (189). Verminderte DTH-Antworten lassen die Vermutung zu, dass proinflammatorische T-Helferzellfunktionen beeinträchtigt sind und eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen darstellen können. Auch die Arbeitsgruppe um Chang et al. (190) berichten von einer  $\mu\text{g}$

assoziierten Beeinträchtigung der T-Zellaktivierung. Bestätigt wurde diese Hypothese, nachdem humane periphere Lymphozyten im Blut während des Fluges mit ConA (einem T-Zell Mitogen) inkubiert wurden und sich eine deutliche Suppression der T-Zellaktivität im Vergleich zu der Kontrollgruppe auf der Erde gezeigt hat.

Wenn es möglich wäre, eine Antwort nach Stimulation durch Antigene, z.B. *Candida*antigen während der Zeit auf der ISS zu messen, dann wäre möglicherweise eine Reduktion der Zytokine nach Antigenkontakt zu erwarten. Buchheim et al. (157) beschreiben eine Suppression der T-Zell-aktivierenden Interleukine IL-2 und IL-6 durch CB-2 Rezeptoraktivierung nach Stimulation mit *Candida*antigen. Die bereits präsentierte und diskutierte reduzierte T-Zell vermittelte Immunantwort nach Rückkehr könnte eine mögliche Erklärung für eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber möglichen Pilzinfektionen sein (157). Die technischen Gegebenheiten an Bord der ISS limitieren aktuell die Implementierung derartiger Untersuchungen.

Wie zuvor schon diskutiert, kommt es während und auch nach der Zeit auf der ISS zu einer Aktivierung und Dysregulation diverser endogener Stressantwortsysteme. Prologierte Exposition gegenüber dieser speziellen Umgebung (z.B. auf interplanetaren Missionen zum Mond oder Mars) führt nicht nur zu immunologischer Adaptation, sondern ebenfalls zu Verschiebungen der Immunantworten mit deutlich erhöhtem gesundheitlichem Risiko für die Besatzung. Klinische Symptome, die mit einem dys- oder fehlreguliertem Immunsystem assoziiert sind, können nicht nur zu einer großen Varianz an Infektionen (der Haut, der Atemwege, der Harnwege), verursacht durch Bakterien, Viren oder Pilzen führen, sondern auch in Hypersensitivitätsreaktionen oder einer erhöhten Inzidenz von Allergien enden. Ein wie unter 6.6.3 erwähnter proinflammatorischer Status nach der Zeit auf der ISS, mit einer reduzierten Plasmakonzentration des Zytokins IL-10 im Vergleich zur Konzentration während der Zeit auf der ISS, könnte ein Hinweis auf eine verminderte Immuntoleranz sein. IL-10 spielt als regulatorisches Zytokin eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Immuntoleranz und Limitierung der Inflammation im Gewebe als Bestandteil der innaten und auch adaptiven Immunantwort (36). Eine aufgehobene Immuntoleranz durch z.B. verminderte IL-10 Spiegel kann zu Allergien, Asthma, Tumoren, chronischen Infektionen u.v.m. führen (191, 192), die für die Besatzung entweder bei Rückkehr auf der Erde oder auch bei längeren Missionen noch während des Raumfluges von klinisch relevanter Bedeutung werden können.

### **6.6.3 Proinflammation**

Die Daten der regulatorischen und CD8+ T-Zellen zusammen mit den Ergebnissen der funktionellen Analysen geben einen Hinweis darauf, dass ein spezieller Pool an Stressoren eine hyperinflammatorische Situation und einen damit verbundenen proinflammatorischen Immunphänotyp triggert. Dieser Status bleibt, auf der Grundlage unserer Analysen, für mindestens einen Monat nach Rückkehr bestehen. Es wäre in Zukunft wertvoll den Beobachtungszeitraum nach Rückkehr auszudehnen, um genau die genannten Langzeiteffekte, wie die Verschiebung des Repertoires der T-Zellen, besser abbilden zu können. Diese Erkenntnisse könnten dabei behilflich sein, das individuelle Risiko von Raumfahrern hinsichtlich der Entwicklung immunassoziierter Pathologien besser einschätzen zu können. Sowohl präventive Untersuchungen als auch prolongierte Beobachtungen nach Raumfahrt könnten unsere Daten untermauern und auf lange Sicht für besseren Schutz bzw. Erhalt der Gesundheit der Besatzung im Weltraum sorgen.

## 7 Limitationen und Ausblick

Die Herausforderungen, die die Forschung im Weltall am Menschen mit sich bringt, sind vielfältig und erfordern Berücksichtigung bei der Bewertung der Ergebnisse. Diese Forschung ist v.a. mit vielen Limitationen vergesellschaftet: limitierte Kontrolle über die vor Ort Durchführung der Experimente, limitierte Möglichkeiten von Messwiederholungen, eine sehr begrenzte und nicht beliebig erweiterbare Anzahl an Probanden und eingeschränkte operationelle Möglichkeiten auch auf der Erde, da die Proben hauptsächlich in Russland prozessiert wurden. Trotz dieser Limitationen ist es vielen Arbeitsgruppen bisher erfolgreich gelungen, Forschungsprojekte in Zusammenarbeit mit verschiedenen Raumfahrtagenturen zu etablieren, valide Daten zu publizieren und wichtige Erkenntnisse zu erlangen.

Die bedeutendste Limitation dieser Studie ergibt sich aus der geringen Fallzahl. Aufgrund operationeller und zeitlicher Beschränkungen hinsichtlich der Finalisierung der Studie konnte nur eine bestimmte Anzahl an Kosmonauten eingeschlossen werden. Die Kosmonauten verbrachten in der Regel mehrere Monate auf der ISS, sodass die Beobachtungsperiode eines Probanden schon fast ein Jahr in Anspruch genommen hat. Natürlich wurden auch Kosmonauten parallel rekrutiert, um eine möglichst große Fallzahl erzielen zu können. Es war nicht möglich, jeden Probanden zu allen vorgesehenen Zeitpunkten einzuschließen. Quarantänemaßnahmen und weitere verpflichtende Termine haben dies zeitweise nicht zugelassen.

Des Weiteren ist von großer Bedeutung, dass nur Männer in diese Studie eingeschlossen werden konnten. Einerseits wurden keine Frauen von der russischen Raumfahrtagentur als Kosmonautinnen gewählt, sodass auch die theoretische Möglichkeit der Rekrutierung weiblicher Probandinnen in diesem Zeitraum nicht gegeben war. Andererseits wäre so die Fallzahl pro Geschlecht noch geringer ausgefallen, sodass dies ggf. zu Schwierigkeiten hinsichtlich der statistischen Aussagekraft geführt hätte.

Bzgl. operationeller Prozesse sei zu erwähnen, dass die Blutentnahme und Verarbeitung der Proben auf der ISS von den Kosmonauten selbst durchgeführt wurden. Etwaige Abweichungen vom Protokoll bzgl. Handhabung oder Lagerung bestehen theoretisch. Zudem ist die Probenmenge, die während des Raumfluges gewonnen wurde, stark limitiert. Somit ist es kaum möglich Wiederholungsmessungen, falls diese notwendig sein sollten, durchzuführen.

Ein Leben auf der ISS unterscheidet sich auch z.B. durch andere Ernährungsgewohnheiten und einen komplett unterschiedlichen Tag-Nacht-Rhythmus von dem Leben auf der Erde. Somit ist eine komplette Standardisierung bzgl. der Konditionen der Blutabnahmen vor und nach Weltraumflug im Vergleich zur Abnahme auf der ISS nicht möglich.

Eine Komponente der Erhebung waren psychologische Fragebögen hinsichtlich der aktuellen Beanspruchung. Auch hier besteht die Möglichkeit, dass diese aus Sorge vor Diskreditierung, nicht wahrheitsgetreu beantwortet wurden, v.a. da die Kosmonauten zumeist auch wieder für Folgemissionen ausgewählt werden wollten.

In Zukunft wäre es wünschenswert v.a. mehr Kosmonauten in die Studie einschließen zu können. Dies würde die statistische Aussagekraft natürlich erhöhen und es könnten noch bessere Aussagen hinsichtlich zukünftiger Langzeitmissionen getätigt werden. Um auch das gesundheitliche Profil von Frauen mit einzubeziehen, wäre es sinnvoll Frauen und Männer getrennt voneinander zu untersuchen und zu analysieren.

So könnten neue, sowohl für die Zukunft der Raumfahrt als auch für die Grundlagenforschung wertvolle Daten erhoben werden, die im Gesamtkontext einerseits bei der Planung interplanetarer Missionen und andererseits für zahlreiche Fachbereiche auf der Erde von großer Bedeutung sein werden.

## 8 Zusammenfassung

Langzeitaufenthalte im All sind mit einer Reihe von Stressoren wie Schwerelosigkeit, soziale Isolation sowie psychische und physische Mehrbelastung verbunden, die einen Einfluss auf die Gesundheit und insbesondere auf das Immunsystem eines Raumfahrers haben. Ob einzelne Stressoren oder die Kombination mehrerer entscheidend für die Entwicklung immunologischer Ungleichgewichte sind, bleibt unklar. Auch mögliche Langzeitkonsequenzen für Raumfahrer sind zum heutigen Zeitpunkt noch nicht absehbar. Diese könnten jedoch v.a. im Hinblick auf die Planung interplanetarer Missionen, aber auch zur Etablierung individuell angepasster Präventiv- bzw. Therapiekonzepte für Langzeitmissionen von Bedeutung sein.

Wir untersuchten in dieser Studie, im Vergleich zu vielen bereits publizierten Daten über Kurzaufenthalte, die Auswirkungen eines Langzeitaufenthaltes im All auf der ISS auf die Immunfunktion der Kosmonauten. Zwölf Kosmonauten wurden in die IMMUNO Studie eingeschlossen und verbrachten im Durchschnitt 159 Tage im Weltall. Daten wurden sowohl vor und nach Aufenthalt als auch während der Zeit auf der ISS erhoben.

Während hinsichtlich des klassischen Stressparameters Cortisol im Speichel und über Fragebögen zum subjektiven Stressempfinden keine signifikanten Veränderungen erfasst wurden, ist als Antwort auf Stress eine Aktivierung des Endocannabinoidsystems mit signifikantem Anstieg des Endocannabinoids AEA in der zweiten Missionshälfte auf der ISS quantifizierbar.

Zum Zeitpunkt der Rückkehr, d.h. unmittelbar nach Landung auf der Erde, zeigten sich einige signifikante Veränderungen diverser Stress- und Inflammationsparameter. Dieser Zeitpunkt scheint mit einer besonders großen Stressbelastung, v.a. aufgrund der Gravitationsänderungen und auch der psychischen Beanspruchung während der Rückflugphase, in Zusammenhang zu stehen.

Als Inflammationsparameter war eine deutliche Zunahme der Gesamtleukozyten am Tag 1 nach Landung auf der Erde zu verzeichnen. Damit verbunden wurde auch ein deutlicher Anstieg der neutrophilen Granulozyten, Monozyten und B-Zellen erfasst. Die NK-Zellen fielen signifikant ab. Diese beobachteten stressbedingten Veränderungen der Leukozyten inkl. der Subpopulationen decken sich mit dem Wissen aus Publikationen über Kurzaufenthalte im All. Somit ist davon auszugehen, dass diese Beobachtungen am ehesten durch Faktoren, die

mit der Landung in Zusammenhang stehen, begründet sind als durch eine längere Missionsdauer auf der ISS.

Die Absolutwerte der Lymphozyten blieben in der Blutbildanalyse über den Beobachtungszeitraum weitestgehend konstant. Die Analyse der Blutaussstriche zeigte allerdings eine signifikante Erhöhung des Lymphozytenanteils während der Zeit im All und eine Rückkehr dieser Zellen zum Ausgangsniveau unmittelbar nach Landung auf der Erde. Diese Beobachtung spricht dafür, dass hier eher der Faktor Langzeitaufenthalt einen Einfluss auf die prozentuale Verteilung der Lymphozyten hat.

Weitere Blutbildparameter wie Erythrozyten, Thrombozyten, Hämoglobin und Hämatokrit wiesen keine signifikanten Veränderungen über den Verlauf der Studie auf.

Funktionelle Analysen, die nur vor und nach der Zeit auf der ISS durchgeführt wurden, zeigten unveränderte Glutathionwerte und eine stabile ROS-Freisetzung durch neutrophile Granulozyten vor und nach Stimulation. Nach Rückkehr zur Erde war allerdings, durch eine stressbedingte Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, eine durchflusszytometrisch signifikant messbare Abspaltung des L-Selektins von deren Oberfläche zu verzeichnen.

Die *in vitro* Stimulation des Vollbluts mit Pilzantigenen führte zu einer deutlichen Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 $\beta$  ebenfalls unmittelbar nach Rückkehr zur Erde. In dieser Situation ist von einer deutlichen Überaktivierung durch Pilzantigene auszugehen. Während der im Plasma bestimmte TNF-Spiegel unverändert blieb, bildete sich eine signifikante IL-1 $\beta$ -Reduktion zum Zeitpunkt eine Woche nach der Landung auf der Erde im Vergleich zum zweiten Blutabnahmezeitpunkt auf der ISS ab. Die Überaktivierungsantwort gegenüber Pilzantigenen steht somit nicht in direktem Zusammenhang zu der im Plasma gemessenen Zytokinantwort. Weitere proinflammatorische Zytokine wie IL-2, IL-6 und IFN- $\gamma$  zeigten keine signifikanten Änderungen nach Pilzantigenexposition.

Parallel konnte eine signifikante Reduktion der antiinflammatorisch wirkenden CD4+CD25+CD27<sup>low</sup> regulatorischen T-Zellen direkt nach der Mission erfasst werden. Diese Veränderung war nach einem Monat wieder aufgehoben und die regulatorischen T-Zellen kehrten auf ihr Ausgangsniveau zurück. Auch die im Plasma bestimmten antiinflammatorischen Zytokine IL1ra, TGF- $\beta$  und IL-10 waren direkt nach der Landung

signifikant reduziert und spiegeln so die durch die regulatorischen T-Zellen inhibierte antiinflammatorische Kapazität wider.

Wir beobachteten außerdem eine prozentuale Zunahme der CD8+ Memory T-Zellen in der gesamten CD8+ T-Zellpopulation. Dieser Zustand hielt für mindestens einen Monat nach Rückkehr an. Bei kontinuierlicher Stressexposition könnte sich eine zunehmende T-Zell-Erschöpfung einstellen, die wiederum die Entwicklung immunassoziierter Erkrankungen begünstigt. Eine Verlängerung des Beobachtungszeitraums könnte in diesem Fall hilfreich sein, längerfristige immunologische Veränderungen besser zu erfassen.

Seit dem Menschen ins Weltall fliegen, beschäftigt sich die Wissenschaft mit der Frage nach den Konsequenzen für die Gesundheit der Raumfahrer und den humanphysiologischen oder auch -pathologischen Veränderungen. Die Bedeutung der Erforschung dieser Auswirkungen wird noch ersichtlicher, wenn man sich die zunehmende Anzahl von Menschen, die ins Weltall fliegen, vergegenwärtigt. Einerseits die touristische Raumfahrt die über private Unternehmen ermöglicht wird, andererseits aber auch professionell und beruflich zur bekannten ISS oder auch zum Mond oder Mars. V.a. die zukünftig angestrebten Missionen zum Mond und Mars werden bezüglich ihrer Dauer der Reise und Entfernung zur Erde, kurzzeitige ISS-Missionen deutlich übertreffen. Daher ist es wichtig, die weltraumassozierten immunologischen Veränderungen - hier mit Fokus auf allergische und autoimmunologische Geschehnisse - zu erkennen und zu verstehen, um ggf. Gegenmaßnahmen einleiten und Hilfe anbieten zu können. Ziel ist es in Zukunft spezifische Biomarker zu etablieren, die auch während des Raumfluges leicht zu messen sind und dementsprechend mit Gegenmaßnahmen oder Hilfe reagiert werden kann. Zudem werden auch die vor einer Mission erhobenen Daten zur Risikostratifizierung von Bedeutung sein, um geeignete Kandidaten für Langzeitflüge hinsichtlich der individuellen physischen Konstitution besser betreuen und auch auswählen zu können.

Kritiker mögen behaupten, dass der einzige Nutzen der Raumfahrtforschung am Menschen darin besteht, Erkenntnisse zu generieren, die lediglich für wenige Raumfahrer von Interesse sind. Diese Daten werden entgegen dieser Behauptung in Zukunft jedoch nicht nur für eine kleine Gruppe an Raumfahrern von Bedeutung sein, sondern auch bei dem Verständnis fundamentaler wissenschaftlicher Fragestellungen Hilfe leisten. Die wissenschaftlichen Daten helfen uns dabei, einerseits die ganze Bandbreite der Anpassungsprozesse einzuordnen und

zu verstehen, aber andererseits zeigen sie uns auch die Herausforderungen und möglichen Grenzen in extremen Umwelten zu leben auf.

## 9 Appendix

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Stressantwort über das sympatho-adrenomedulläre System und die HPA-Achse. Ausgehend vom Hypothalamus wird einerseits der Stressimpuls über das Rückenmark and das Nebennierenmark weitergeleitet. Dort führt die Katecholaminausschüttung zu einem Anstieg der Herzfrequenz, des Blutdrucks, einem gesteigerten Metabolismus, einer Bronchodilatation und einer vermehrten Glukosefreisetzung. Das im Hypothalamus gebildete CRH bewirkt eine ACTH-Freisetzung des Hypophysenvorderlappens ins Blut. ACTH löst eine Glukokortikoid- und Mineralokortikoidausschüttung an der Nebennierenrinde aus. Folgen sind eine gesteigerte Glukoneogenese, eine zunehmende Insulinresistenz, eine gesteigerte Fett- und Proteinmobilisation und eine eingeschränkte Immunantwort durch eine vermehrte Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren. CRH <i>Corticotropin-releasing Hormone</i> ; ACTH Adrenocorticotropes Hormon (Abbildung modifiziert nach Chronic stress, Inflammation, and Colon Cancer: A CRH System-Driven Molecular Crosstalk, Baritaki, S., J Clin Med 2019 (58)).	26
Abbildung 2 Abnahmezeitpunkte der Proben im Überblick.	35
Abbildung 3 Boxplot der Punkte nach Auswertung der Fragebögen zur aktuellen Beanspruchung am Morgen. n=12. L-25 (Launch minus 25 Tage): ca. 25 Tage vor Abflug. F+90 (in-Flight plus 90 Tage): ca. 90 Tage nach Ankunft auf der ISS. F+150 (in-Flight plus 150 Tage): ca. 150 Tage nach Ankunft auf der ISS. R+1 (Return plus 1 Tage): 1 Tag nach Rückkehr auf die Erde. R+7 (Return plus 7 Tage): ca. 7 Tage nach Rückkehr auf die Erde. R+30 (Return plus 30 Tage): ca. 30 Tage nach Rückkehr auf die Erde.	49
Abbildung 4 Boxplot der Cortisolkonzentration am Morgen im Speichel in µg/dl. n=11	50
Abbildung 5 Boxplot der Cortisolkonzentration am Abend im Speichel in µg/dl. n=10	51
Abbildung 6 Boxplot der AEA-Konzentration im Vollblut in ng/ml. n=5. *=p<0,05 Signifikanter Anstieg der AEA-Level zum Zeitpunkt F+150 im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten..	51
Abbildung 7 Boxplot der 2-AG Konzentration im Vollblut in ng/ml. n=4.	52
Abbildung 8 Absolute Leukozytenzahl und Subpopulationen in µl x 1000 in Vollblut als Mittelwertdarstellung mit Standarderror. n=11. *=p<0,05 Signifikanter Anstieg der Leukozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt R+1 im Vergleich zum Zeitpunkt L-25.	53
Abbildung 9 Prozentualer Anteil der neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten an den Leukozyten als Mittelwertdarstellung mit Standarderror analysiert im Blutausstrich. n=11. *=p<0,05 Signifikanter Anstieg der neutrophilen Granulozyten zum Zeitpunkt R+1 und der Lymphozyten zum Zeitpunkt F+150.	54
Abbildung 10 Anteil der Lymphozytensubpopulation in % als Mittelwert mit Standardfehler an den Gesamtlmphozyten in %. n=12. *=p<0,05 Signifikanter Anstieg der T-Lymphozyten bzw. Abfall der NK-Zellen am ersten Tag nach Rückkehr im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten.	55
Abbildung 11 Verlauf der Erythrozytenzahl-Mittelwerte mit Standardfehler aus EDTA-Vollblut in T/l aller Probanden im Liniendiagramm. n=12.	56
Abbildung 12 Verlauf der Hämoglobinmittelwerte mit Standardfehler aus EDTA-Vollblut in g/dl aller Probanden im Liniendiagramm. n=12.	57

Abbildung 13 Verlauf der Hämatokritmittelwerte mit Standardfehler aus EDTA-Vollblut in l/l aller Probanden im Liniendiagramm. n=12. ....	57
Abbildung 14 Verlauf der Mittelwerte des mittleren korpuskulären Volumens mit Standardfehler aus EDTA-Vollblut in Femtoliter (fl, $\mu\text{m}^3$ ) aller Probanden im Liniendiagramm. n=12.....	58
Abbildung 15 Verlauf der Mittelwerte des mittleren korpuskulären Hämoglobins mit Standardfehler aus EDTA-Vollblut in Pikogramm ( $\mu\text{g}$ ) aller Probanden im Liniendiagramm. n=12. ....	58
Abbildung 16 Verlauf der Mittelwerte der mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration mit Standardfehler aus EDTA-Vollblut in g/dl aller Probanden im Liniendiagramm. n=12. ....	59
Abbildung 17 Verlauf der Thrombozytenzahl-Mittelwerte mit Standardfehler aus EDTA-Vollblut in G/l aller Probanden im Liniendiagramm. n=12.....	59
Abbildung 18 Sauerstoffradikalproduktion polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten nach Stimulierung mit fMLP und PMA und ohne Stimulanz als Kontrolle. Durchschnittliche Fluoreszenzintensität ( <i>mean fluorescence intensity</i> , MFI) als Indikator für die Sauerstoffradikalproduktion. Darstellung der Mittelwerte mit Standardfehler. n=12.....	60
Abbildung 19 Boxplot des Glutathiongehalts von Granulozyten in MFI ohne Stimulus. n=4. ..	61
Abbildung 20 Boxplot des Glutathiongehalts von CD3+ T-Lymphozyten in MFI ohne Stimulus. n=11. ....	61
Abbildung 21 Boxplot des Glutathiongehalts von CD56+ NK-Zellen in MFI ohne Stimulus. n=11. ....	62
Abbildung 22 Boxplot der Expression des Adhäsionsmoleküls $\beta$ 2-Integrin auf der Oberfläche polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten in MFI. n=12. ....	62
Abbildung 23 Boxplot der Expression des Adhäsionsmoleküls CD62L auf der Oberfläche polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten in MFI. n=12. *=p<0,05 Signifikante Reduktion der Expression zu den Zeitpunkten R+1 und R+7 nach Rückkehr im Vergleich zu dem Zeitpunkt L-25 vor Abflug.....	63
Abbildung 24 Boxplot der Konzentration des Zytokins TNF in pg/ml nach Stimulation mit der Pilzantigenmischung für 48h <i>in vitro</i> . n=12. *=p<0,05 Signifikanter Anstieg der TNF-Freisetzung nach Stimulation mit der Pilzantigenmischung am ersten Tag nach Rückkehr im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten.....	64
Abbildung 25 Boxplot der Konzentration des Zytokins TNF in pg/ml nach Stimulation mit <i>Aspergillus</i> antigen für 48h <i>in vitro</i> . n=11. *=p<0,05 Signifikanter Anstieg der TNF-Freisetzung nach <i>Aspergillus</i> antigenstimulation am ersten Tag nach Rückkehr im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten.....	65
Abbildung 26 TNF-Konzentration in pg/ml im Vergleich nach Stimulierung mit der Pilzantigenmischung und <i>Aspergillus</i> antigen und ohne Stimulanz für 48h <i>in vitro</i> . Darstellung der Mittelwerte mit Standarderror. n=12 für Kontrolle und Pilzantigenmischung, n=11 für <i>Aspergillus</i> antigen. *=p<0,05. Signifikanter Anstieg der TNF-Konzentration nach Stimulation mit der Pilzantigenmischung und <i>Aspergillus</i> antigen zum Zeitpunkt R+1. ....	65
Abbildung 27 Boxplot der Konzentration des Zytokins IL-1 $\beta$ in pg/ml nach Stimulation mit der Pilzantigenmischung für 48h <i>in vitro</i> . n=5. *=p<0,05 Signifikanter Anstieg der IL-1 $\beta$ Freisetzung nach Stimulation mit der Pilzantigenmischung zum Zeitpunkt R+1 im Vergleich zum Zeitpunkt L-25 vor Abflug. ....	66

Abbildung 28	Boxplot der IL-1 $\beta$ Konzentration in pg/ml im Plasma ohne Ausreißer. n=10. *=p<0,05 Signifikante Reduktion der IL-1 $\beta$ Konzentration zum Zeitpunkt R+7 im Vergleich zum Zeitpunkt F+150 während Flug.....	67
Abbildung 29	IL-2 Konzentration in pg/ml im Vergleich nach Stimulierung mit der Pilzantigenmischung und <i>Aspergillus</i> antigen und ohne Stimulanz für 48h <i>in vitro</i> . Darstellung der Mittelwerte mit Standarderror. n=11 für Kontrolle, n=10 für Pilzantigenmischung, n=8.....	68
Abbildung 30	IFN- $\gamma$ Konzentration in pg/ml im Vergleich nach Stimulierung mit der Pilzantigenmischung und <i>Aspergillus</i> antigen und ohne Stimulanz für 48h <i>in vitro</i> . Darstellung der Mittelwerte mit Standarderror. n=11 für Kontrolle, n=10 für Pilzantigenmischung, n=8 für <i>Aspergillus</i> antigen.....	69
Abbildung 31	Anteil der CD4+ Memory T-Zellen an allen CD4+ Zellen in % als Boxplot. n=12.	70
Abbildung 32	Anteil der CD4+ naiven T-Zellen an allen CD4+ Zellen in % als Boxplot. n=12....	71
Abbildung 33	Anteil der CD3+CD4+CD25+CD127low regulatorischen T-Zellen an allen CD3+ Zellen in % als Boxplot. n=8. *=p<0,05 Signifikante Reduktion der regulatorischen T-Zellen zum Zeitpunkt R+1 und R+7 im Vergleich zum Zeitpunkt L-25.....	71
Abbildung 34	Boxplot der IL-10 Konzentration in pg/ml im Plasma. n=11. *=p<0,05 Signifikante Reduktion der IL-10 Konzentration zum Zeitpunkt R+7 im Vergleich zu dem zweiten Zeitpunkt während des Fluges F+150.....	72
Abbildung 35	Boxplot der TGF- $\beta$ Konzentration in pg/ml im Plasma. n=10. *=p<0,05 Signifikanter Anstieg der TGF- $\beta$ Konzentration bei beiden Zeitpunkten auf der ISS im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten.....	73
Abbildung 36	Boxplot der IL-1ra Konzentration in pg/ml im Plasma. n=11. *=p<0,05 Signifikante Reduktion der IL-1ra Konzentration zum Zeitpunkt R+7 im Vergleich zu dem zweiten Zeitpunkt während des Fluges F+150.....	73
Abbildung 37	Anteil der CD8+ naiven T-Zellen an allen CD8+ Zellen in % als Boxplot. n=12....	74
Abbildung 38	Anteil der CD8+ Effektor T-Zellen an allen CD8+ Zellen in % als Boxplot. n=12. *=p<0,05 Signifikanter Abfall des prozentualen Anteils der CD8+ Effektorzellen an allen CD8+ Zellen zum Zeitpunkt R+1 im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten.....	75
Abbildung 39	Anteil der CD8+ Memory T-Zellen an allen CD8+ Zellen in % als Boxplot. n=12. *=p<0,05 Signifikante Zunahme des prozentualen Anteils der CD8+ Memory T-Zellen an allen CD8+ T-Zellen zum Zeitpunkt R+1 und R+30 im Vergleich zu dem Zeitpunkt L-25... 75	75

## 9.2 Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-arachidonoylglycerol
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
AEA	N-arachidonoylethanolamin
ANA	Anandamid
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CB	Cannabinoid
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CMV	Cytomegalievirus
CRH	<i>Corticotropin-releasing Hormon</i>
CRP	C-reaktives Protein
DTH	<i>Delayed Type Hypersensitivity</i>
DZ	Dendritische Zellen
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESA	European Space Agency
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
fl	Femtoliter
Fl	<i>fluorescence</i>
fMLP	<i>N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GSH	Glutathion
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HF	Herzfrequenz
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektometrie/Massenspektometrie
IBMP	<i>Institute for Biomedical Problems</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	<i>interferon-gamma induced protein 10 kD</i>
ISS	<i>International Space Station</i>
KAB	Kurzfragebogen zur aktuellen Beanspruchung
LPS	Lipopolysaccharide
MELFI	<i>Minus Eighty Degree Laboratory Freezer For ISS</i>
MCH	mittleres korpuskuläres Hämoglobin

MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MRS	Dihydropyridinderivat
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NASA	<i>National Aeronautics and Space Administration</i>
NFκB	<i>nuclear factor-kappaB</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NNM	Nebennierenmark
NO	Stickstoffmonoxid
NS	Nervensystem
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	mononukleären Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferter Salzlösung
PEA	Palmitoylethanolamide
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
pg	Pikogramm
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PMNL	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SOD	Superoxiddismutase
spp.	Spezies
SSC	<i>side scatter</i>
tBME	tert-Butyl Methyl Ether
TCR	<i>T cell Receptor</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
THC	Tetrahydrocannabinol
TH-Zellen	T Helferzellen
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zellen
USA	<i>United States of America</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

### 9.3 Literaturverzeichnis

1. Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*. 2006;124(4):815-22.
2. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(2):108-17.
3. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(1):37-49.
4. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
5. Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe*. 2011;9(5):355-61.
6. Tosi MF. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(2):241-9; quiz 50.
7. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S3-23.
8. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*. 2004;40(12):845-59.
9. Hato T, Dagher PC. How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(8):1459-69.
10. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:593-623.
11. Drenth JP, van der Meer JW. The inflammasome--a linebacker of innate defense. *N Engl J Med*. 2006;355(7):730-2.
12. Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(1):31-40.
13. Elsbach P, Weiss J. Oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of microbicidal activity of neutrophils. *Immunol Lett*. 1985;11(3-4):159-63.
14. Robinette ML, Colonna M. Innate lymphoid cells and the MHC. *HLA*. 2016;87(1):5-11.
15. Kabelitz D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(1):39-45.
16. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989;54 Pt 1:1-13.
17. Galanos C, Luderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, Brade L, et al. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem*. 1985;148(1):1-5.
18. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013;12:86.
19. Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*. 1997;112(6 Suppl):321S-9S.
20. Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:437-57.
21. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S33-40.
22. Ribatti D, Crivellato E, Vacca A. The contribution of Bruce Glick to the definition of the role played by the bursa of Fabricius in the development of the B cell lineage. *Clin Exp Immunol*. 2006;145(1):1-4.
23. Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol*. 2006;208(2):270-82.

24. Schroeder HW, Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S41-52.
25. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:985646.
26. Riesbeck K, Nordstrom T. Structure and immunological action of the human pathogen *Moraxella catarrhalis* IgD-binding protein. *Crit Rev Immunol.* 2006;26(4):353-76.
27. Chang TW, Wu PC, Hsu CL, Hung AF. Anti-IgE antibodies for the treatment of IgE-mediated allergic diseases. *Adv Immunol.* 2007;93:63-119.
28. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 2008;112(5):1570-80.
29. Shlomchik MJ, Weisel F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev.* 2012;247(1):52-63.
30. Smith T, Cunningham-Rundles C. Primary B-cell immunodeficiencies. *Hum Immunol.* 2019;80(6):351-62.
31. Thapa P, Farber DL. The Role of the Thymus in the Immune Response. *Thorac Surg Clin.* 2019;29(2):123-31.
32. Hoffmann M, Dutton RW. Immune response restoration with macrophage culture supernatants. *Science.* 1971;172(3987):1047-8.
33. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-73.
34. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine.* 2015;74(1):5-17.
35. Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature.* 1993;362(6417):248-50.
36. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:71-109.
37. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Riviere I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol.* 2002;20(1):70-5.
38. Kaech SM, Hemby S, Kersh E, Ahmed R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell.* 2002;111(6):837-51.
39. Sobao Y, Tomiyama H, Nakamura S, Sekihara H, Tanaka K, Takiguchi M. Visual demonstration of hepatitis C virus-specific memory CD8(+) T-cell expansion in patients with acute hepatitis C. *Hepatology.* 2001;33(1):287-94.
40. Brazillet MP, Batteux F, Abehsira-Amar O, Nicoletti F, Charreire J. Induction of experimental autoimmune thyroiditis by heat-denatured porcine thyroglobulin: a Tc1-mediated disease. *Eur J Immunol.* 1999;29(4):1342-52.
41. Hartmann A, Bocker EB, Becker JC. Hypopigmentary skin disorders: current treatment options and future directions. *Drugs.* 2004;64(1):89-107.
42. Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* 2002;25(6):313-9.
43. Cannon WB. *Bodily Changes In Pain, Hunger, Fear And Rage.* D Appleton & Co New York. 1929.
44. Tan SY, Yip A. Hans Selye (1907-1982): Founder of the stress theory. *Singapore Med J.* 2018;59(4):170-1.

45. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 1998;10(2):230-1.
46. Segerstrom SC, Miller GE. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychol Bull.* 2004;130(4):601-30.
47. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5(7):374-81.
48. Dhabhar FS, McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun.* 1997;11(4):286-306.
49. Godoy LD, Rossignoli MT, Delfino-Pereira P, Garcia-Cairasco N, de Lima Umeoka EH. A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. *Front Behav Neurosci.* 2018;12:127.
50. Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, et al. The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol.* 2003;74(4):486-96.
51. Sido JM, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Production of endocannabinoids by activated T cells and B cells modulates inflammation associated with delayed-type hypersensitivity. *Eur J Immunol.* 2016;46(6):1472-9.
52. Pacher P, Mechoulam R. Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog Lipid Res.* 2011;50(2):193-211.
53. Pandey R, Mousawy K, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacol Res.* 2009;60(2):85-92.
54. Morena M, Patel S, Bains JS, Hill MN. Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System. *Neuropsychopharmacology.* 2016;41(1):80-102.
55. Selye H. *The stress of life* 1956.
56. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(3):243-51.
57. Brindley DN, Rolland Y. Possible connections between stress, diabetes, obesity, hypertension and altered lipoprotein metabolism that may result in atherosclerosis. *Clin Sci (Lond).* 1989;77(5):453-61.
58. Baritaki S, de Bree E, Chatzaki E, Pothoulakis C. Chronic Stress, Inflammation, and Colon Cancer: A CRH System-Driven Molecular Crosstalk. *J Clin Med.* 2019;8(10).
59. von Kanel R. Psychosocial stress and cardiovascular risk : current opinion. *Swiss Med Wkly.* 2012;142:w13502.
60. von Kanel R, Bellingrath S, Kudielka BM. Association between burnout and circulating levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in schoolteachers. *J Psychosom Res.* 2008;65(1):51-9.
61. Kivimaki M, Kawachi I. Work Stress as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rep.* 2015;17(9):630.
62. Henry JP. Catecholamines, blood pressure, drugs, and social roles. *Psychopharmacol Bull.* 1975;11(2):49-50.
63. Ruilope LM, Schmieder RE. Left ventricular hypertrophy and clinical outcomes in hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2008;21(5):500-8.
64. Paine NJ, Bosch JA, Van Zanten JJ. Inflammation and vascular responses to acute mental stress: implications for the triggering of myocardial infarction. *Curr Pharm Des.* 2012;18(11):1494-501.
65. Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol.* 2004;5(10):617-25.

66. Arndt J, Smith N, Tausk F. Stress and atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2008;8(4):312-7.
67. Palumbo ML, Prochnik A, Wald MR, Genaro AM. Chronic Stress and Glucocorticoid Receptor Resistance in Asthma. *Clin Ther.* 2020;42(6):993-1006.
68. Schneiderman N, Ironson G, Siegel SD. Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. *Annu Rev Clin Psychol.* 2005;1:607-28.
69. Yang H, Zheng J. Influence of stress on the development of psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 2020;45(3):284-8.
70. Cohen S, Tyrrell DA, Smith AP. Psychological stress and susceptibility to the common cold. *N Engl J Med.* 1991;325(9):606-12.
71. Kiecolt-Glaser JK, Page GG, Marucha PT, MacCallum RC, Glaser R. Psychological influences on surgical recovery. Perspectives from psychoneuroimmunology. *Am Psychol.* 1998;53(11):1209-18.
72. Kiecolt-Glaser JK, McGuire L, Robles TF, Glaser R. Psychoneuroimmunology: psychological influences on immune function and health. *J Consult Clin Psychol.* 2002;70(3):537-47.
73. Rooney BV, Crucian BE, Pierson DL, Laudenslager ML, Mehta SK. Herpes Virus Reactivation in Astronauts During Spaceflight and Its Application on Earth. *Front Microbiol.* 2019;10:16.
74. Sausen DG, Bhutta MS, Gallo ES, Dahari H, Borenstein R. Stress-Induced Epstein-Barr Virus Reactivation. *Biomolecules.* 2021;11(9).
75. Stowe RP, Pierson DL, Feeback DL, Barrett AD. Stress-induced reactivation of Epstein-Barr virus in astronauts. *Neuroimmunomodulation.* 2000;8(2):51-8.
76. Padgett DA, Sheridan JF, Dorne J, Berntson GG, Candelora J, Glaser R. Social stress and the reactivation of latent herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(12):7231-5.
77. Rinaldi A. Research in space: in search of meaning: Life science research aboard the International Space Station has come under scrutiny for its costs and apparent lack of returns. *EMBO Rep.* 2016;17(8):1098-102.
78. Pagel JI, Chouker A. Effects of isolation and confinement on humans-implications for manned space explorations. *J Appl Physiol (1985).* 2016;120(12):1449-57.
79. Crucian BE, Makedonas G, Sams CF, Pierson DL, Simpson R, Stowe RP, et al. Countermeasures-based Improvements in Stress, Immune System Dysregulation and Latent Herpesvirus Reactivation onboard the International Space Station - Relevance for Deep Space Missions and Terrestrial Medicine. *Neurosci Biobehav Rev.* 2020;115:68-76.
80. Gueguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M, Bueb JL, Tschirhart E, Legrand-Frossi C, et al. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? *J Leukoc Biol.* 2009;86(5):1027-38.
81. Crucian BE, Chouker A, Simpson RJ, Mehta S, Marshall G, Smith SM, et al. Immune System Dysregulation During Spaceflight: Potential Countermeasures for Deep Space Exploration Missions. *Front Immunol.* 2018;9:1437.
82. Meehan R, Whitson P, Sams C. The role of psychoneuroendocrine factors on spaceflight-induced immunological alterations. *J Leukoc Biol.* 1993;54(3):236-44.
83. Stowe RP, Sams CF, Mehta SK, Kaur I, Jones ML, Feeback DL, et al. Leukocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *J Leukoc Biol.* 1999;65(2):179-86.
84. Crucian BE, Cabbage ML, Sams CF. Altered cytokine production by specific human peripheral blood cell subsets immediately following space flight. *J Interferon Cytokine Res.* 2000;20(6):547-56.

85. Mehta SK, Laudenslager ML, Stowe RP, Crucian BE, Feiveson AH, Sams CF, et al. Latent virus reactivation in astronauts on the international space station. *NPJ Microgravity*. 2017;3:11.
86. Crucian B, Babiak-Vazquez A, Johnston S, Pierson DL, Ott CM, Sams C. Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight. *Int J Gen Med*. 2016;9:383-91.
87. Crucian B, Sams C. Immune system dysregulation during spaceflight: clinical risk for exploration-class missions. *J Leukoc Biol*. 2009;86(5):1017-8.
88. Brooks GF. Health surveillance of Lunar Receiving Laboratory personnel during the Apollo 11 quarantine period. *Am J Public Health Nations Health*. 1970;60(10):1956-9.
89. Müller B BH. Kurzfragebogen zur aktuellen Beanspruchung (KAB). Weinheim Beltz Test. 1993.
90. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem*. 2000;46(8 Pt 2):1221-9.
91. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(2):163-76.
92. Jaroszeski MJ, Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol*. 1999;11(1):37-53.
93. Rothe G, Valet G. Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes. *Methods Enzymol*. 1994;233:539-48.
94. Bleesing JJ, Fleisher TA. Immunophenotyping. *Semin Hematol*. 2001;38(2):100-10.
95. Njemini R, Onyema OO, Renmans W, Bautmans I, De Waele M, Mets T. Shortcomings in the application of multicolour flow cytometry in lymphocyte subsets enumeration. *Scand J Immunol*. 2014;79(2):75-89.
96. Thiel M, Chambers JD, Chouker A, Fischer S, Zourelidis C, Bardenheuer HJ, et al. Effect of adenosine on the expression of beta(2) integrins and L-selectin of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *J Leukoc Biol*. 1996;59(5):671-82.
97. Feuerecker M, Mayer W, Kaufmann I, Gruber M, Muckenthaler F, Yi B, et al. A corticoid-sensitive cytokine release assay for monitoring stress-mediated immune modulation. *Clin Exp Immunol*. 2013;172(2):290-9.
98. Vogeser M, Hauer D, Christina Azad S, Huber E, Storr M, Schelling G. Release of anandamide from blood cells. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(4):488-91.
99. Vogeser M, Schelling G. Pitfalls in measuring the endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol in biological samples. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(8):1023-5.
100. Balvers MG, Verhoeckx KC, Witkamp RF. Development and validation of a quantitative method for the determination of 12 endocannabinoids and related compounds in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009;877(14-15):1583-90.
101. Timmermans W, Xiong H, Hoogenraad CC, Krugers HJ. Stress and excitatory synapses: from health to disease. *Neuroscience*. 2013;248:626-36.
102. Szabo S, Yoshida M, Filakovszky J, Juhasz G. "Stress" is 80 Years Old: From Hans Selye Original Paper in 1936 to Recent Advances in GI Ulceration. *Curr Pharm Des*. 2017;23(27):4029-41.
103. Selye H. Stress without Distress. In: Serban G, editor. *Psychopathology of Human Adaptation*. Boston, MA: Springer US; 1976. p. 137-46.
104. Schwabe L, Hermans EJ, Joels M, Roozendaal B. Mechanisms of memory under stress. *Neuron*. 2022;110(9):1450-67.

105. Dlugos A, Childs E, Stuhr KL, Hillard CJ, de Wit H. Acute stress increases circulating anandamide and other N-acylethanolamines in healthy humans. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(11):2416-27.
106. Gorzalka BB, Hill MN. Integration of endocannabinoid signaling into the neural network regulating stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Curr Top Behav Neurosci*. 2009;1:289-306.
107. Steiner MA, Wotjak CT. Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Brain Res*. 2008;170:397-432.
108. Campolongo P, Roozendaal B, Trezza V, Cuomo V, Astarita G, Fu J, et al. Fat-induced satiety factor oleoylethanolamide enhances memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(19):8027-31.
109. Feuerecker M, Hauer D, Toth R, Demetz F, Holzl J, Thiel M, et al. Effects of exercise stress on the endocannabinoid system in humans under field conditions. *Eur J Appl Physiol*. 2012;112(7):2777-81.
110. Richard D, Guesdon B, Timofeeva E. The brain endocannabinoid system in the regulation of energy balance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009;23(1):17-32.
111. Braun A, Engel T, Aguilar-Pimentel JA, Zimmer A, Jakob T, Behrendt H, et al. Beneficial effects of cannabinoids (CB) in a murine model of allergen-induced airway inflammation: role of CB1/CB2 receptors. *Immunobiology*. 2011;216(4):466-76.
112. Jorda MA, Verbakel SE, Valk PJ, Vankan-Berkhoudt YV, Maccarrone M, Finazzi-Agro A, et al. Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Blood*. 2002;99(8):2786-93.
113. Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, et al. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci*. 2003;23(4):1398-405.
114. Sugamura K, Sugiyama S, Nozaki T, Matsuzawa Y, Izumiya Y, Miyata K, et al. Activated endocannabinoid system in coronary artery disease and antiinflammatory effects of cannabinoid 1 receptor blockade on macrophages. *Circulation*. 2009;119(1):28-36.
115. Weis F, Beiras-Fernandez A, Hauer D, Hornuss C, Sodian R, Kreth S, et al. Effect of anaesthesia and cardiopulmonary bypass on blood endocannabinoid concentrations during cardiac surgery. *Br J Anaesth*. 2010;105(2):139-44.
116. Boscarino JA. Psychobiologic predictors of disease mortality after psychological trauma: implications for research and clinical surveillance. *J Nerv Ment Dis*. 2008;196(2):100-7.
117. Strewe C, Feuerecker M, Nichiporuk I, Kaufmann I, Hauer D, Morukov B, et al. Effects of parabolic flight and spaceflight on the endocannabinoid system in humans. *Rev Neurosci*. 2012;23(5-6):673-80.
118. Moynihan JA. Mechanisms of stress-induced modulation of immunity. *Brain Behav Immun*. 2003;17 Suppl 1:S11-6.
119. Schmidt A, Brune K, Hinz B. Determination of the endocannabinoid anandamide in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*. 2006;20(4):336-42.
120. Kang DH, Fox C. Th1 and Th2 cytokine responses to academic stress. *Res Nurs Health*. 2001;24(4):245-57.
121. Marshall GD, Jr., Agarwal SK, Lloyd C, Cohen L, Henninger EM, Morris GJ. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain Behav Immun*. 1998;12(4):297-307.
122. Marucha PT, Kiecolt-Glaser JK, Favagehi M. Mucosal wound healing is impaired by examination stress. *Psychosom Med*. 1998;60(3):362-5.

123. Kiecolt-Glaser JK, Garner W, Speicher C, Penn GM, Holliday J, Glaser R. Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. *Psychosom Med.* 1984;46(1):7-14.
124. Gerritsen B, Pandit A. The memory of a killer T cell: models of CD8(+) T cell differentiation. *Immunol Cell Biol.* 2016;94(3):236-41.
125. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492-9.
126. Kekow J, Wachsman W, McCutchan JA, Gross WL, Zachariah M, Carson DA, et al. Transforming growth factor-beta and suppression of humoral immune responses in HIV infection. *J Clin Invest.* 1991;87(3):1010-6.
127. Tinoco R, Alcalde V, Yang Y, Sauer K, Zuniga EI. Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8+ T cell deletion and viral persistence in vivo. *Immunity.* 2009;31(1):145-57.
128. Brooks DG, Ha SJ, Elsaesser H, Sharpe AH, Freeman GJ, Oldstone MB. IL-10 and PD-L1 operate through distinct pathways to suppress T-cell activity during persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(51):20428-33.
129. Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, Teyton L, McGavern DB, Oldstone MB. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med.* 2006;12(11):1301-9.
130. Zarour HM. Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016;22(8):1856-64.
131. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev.* 2007;128(1):92-105.
132. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006;443(7109):350-4.
133. Todo-Bom A, Mota-Pinto A, Alves V, Santos-Rosa M. Aging and asthma - changes in CD45RA, CD29 and CD95 T cells subsets. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2012;40(1):14-9.
134. Dolfi DV, Mansfield KD, Polley AM, Doyle SA, Freeman GJ, Pircher H, et al. Increased T-bet is associated with senescence of influenza virus-specific CD8 T cells in aged humans. *J Leukoc Biol.* 2013;93(6):825-36.
135. Dhabhar FS, Miller AH, McEwen BS, Spencer RL. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J Immunol.* 1996;157(4):1638-44.
136. Stowe RP, Sams CF, Pierson DL. Effects of mission duration on neuroimmune responses in astronauts. *Aviat Space Environ Med.* 2003;74(12):1281-4.
137. Crucian B, Stowe RP, Mehta S, Quiriarte H, Pierson D, Sams C. Alterations in adaptive immunity persist during long-duration spaceflight. *NPJ Microgravity.* 2015;1:15013.
138. Stowe RP, Yetman DL, Storm WF, Sams CF, Pierson DL. Neuroendocrine and immune responses to 16-day bed rest with realistic launch and landing G profiles. *Aviat Space Environ Med.* 2008;79(2):117-22.
139. Besedovsky HO, Del Rey AE, Sorkin E. What do the immune system and the brain know about each other? *Immunol Today.* 1983;4(12):342-6.
140. Christou NV, McLean AP, Meakins JL. Host defense in blunt trauma: interrelationships of kinetics of anergy and depressed neutrophil function, nutritional status, and sepsis. *J Trauma.* 1980;20(10):833-41.
141. Dhabhar FS, Miller AH, McEwen BS, Spencer RL. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J Immunol.* 1995;154(10):5511-27.

142. Dhabhar FS, McEwen BS. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *J Immunol*. 1996;156(7):2608-15.
143. Crucian BE, Stowe RP, Pierson DL, Sams CF. Immune system dysregulation following short- vs long-duration spaceflight. *Aviat Space Environ Med*. 2008;79(9):835-43.
144. Dunon D, Piali L, Imhof BA. To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8(5):714-23.
145. Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:155-77.
146. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:827-72.
147. Kurokawa Y, Shinkai S, Torii J, Hino S, Shek PN. Exercise-induced changes in the expression of surface adhesion molecules on circulating granulocytes and lymphocytes subpopulations. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1995;71(2-3):245-52.
148. Bian Z, Guo Y, Ha B, Zen K, Liu Y. Regulation of the inflammatory response: enhancing neutrophil infiltration under chronic inflammatory conditions. *J Immunol*. 2012;188(2):844-53.
149. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-75.
150. Liu X, Ma B, Malik AB, Tang H, Yang T, Sun B, et al. Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases. *Nat Immunol*. 2012;13(5):457-64.
151. Mnich K, Finn DP, Dowd E, Gorman AM. Inhibition by anandamide of 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells. *Int J Cell Biol*. 2010;2010:818497.
152. Pathakumari B, Liang G, Liu W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother*. 2020;130:110550.
153. Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. *Microb Pathog*. 2018;117:128-38.
154. Novikova N, De Boever P, Poddubko S, Deshevaya E, Polikarpov N, Rakova N, et al. Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station. *Res Microbiol*. 2006;157(1):5-12.
155. Sugita T, Yamazaki T, Makimura K, Cho O, Yamada S, Ohshima H, et al. Comprehensive analysis of the skin fungal microbiota of astronauts during a half-year stay at the International Space Station. *Med Mycol*. 2016;54(3):232-9.
156. James AG, Abraham KH, Cox DS, Moore AE, Pople JE. Metabolic analysis of the cutaneous fungi *Malassezia globosa* and *M. restricta* for insights on scalp condition and dandruff. *Int J Cosmet Sci*. 2013;35(2):169-75.
157. Buchheim JI, Hoskyns S, Moser D, Han B, Deindl E, Horl M, et al. Oxidative burst and Dectin-1-triggered phagocytosis affected by norepinephrine and endocannabinoids: implications for fungal clearance under stress. *Int Immunol*. 2018;30(2):79-89.
158. Schmidt S, Tramsen L, Lehrnbecher T. Natural Killer Cells in Antifungal Immunity. *Front Immunol*. 2017;8:1623.
159. Mah AY, Cooper MA. Metabolic Regulation of Natural Killer Cell IFN-gamma Production. *Crit Rev Immunol*. 2016;36(2):131-47.
160. Park SJ, Hughes MA, Burdick M, Strieter RM, Mehrad B. Early NK cell-derived IFN- $\gamma$  is essential to host defense in neutropenic invasive aspergillosis. *J Immunol*. 2009;182(7):4306-12.
161. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011;331(6013):44-9.

162. Mandal A, Viswanathan C. Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2015;8(2):47-55.
163. Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol.* 2011;23(6):424-30.
164. Noval Rivas M, Chatila TA. Regulatory T cells in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(3):639-52.
165. Palomares O, Yaman G, Azkur AK, Akkoc T, Akdis M, Akdis CA. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol.* 2010;40(5):1232-40.
166. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.
167. Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, Liang Y, Pils MC, Heinrich JM, et al. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity.* 2011;34(4):566-78.
168. Wan YY, Flavell RA. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev.* 2007;220:199-213.
169. Groux H, Cottrez F. The complex role of interleukin-10 in autoimmunity. *J Autoimmun.* 2003;20(4):281-5.
170. Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity.* 2008;28(4):468-76.
171. Dhabhar FS. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation.* 2009;16(5):300-17.
172. Campisi J, Leem TH, Fleshner M. Acute stress decreases inflammation at the site of infection. A role for nitric oxide. *Physiol Behav.* 2002;77(2-3):291-9.
173. Kinsey SG, Prendergast BJ, Nelson RJ. Photoperiod and stress affect wound healing in Siberian hamsters. *Physiol Behav.* 2003;78(2):205-11.
174. Dhabhar FS, McEwen BS. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(3):1059-64.
175. Silberman DM, Wald MR, Genaro AM. Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity. *J Neuroimmunol.* 2003;144(1-2):53-60.
176. Saint-Mezard P, Chavagnac C, Bosset S, Ionescu M, Peyron E, Kaiserlian D, et al. Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. *J Immunol.* 2003;171(8):4073-80.
177. Dhabhar FS. Stress, leukocyte trafficking, and the augmentation of skin immune function. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;992:205-17.
178. Engler H, Dawils L, Hoves S, Kurth S, Stevenson JR, Schauenstein K, et al. Effects of social stress on blood leukocyte distribution: the role of alpha- and beta-adrenergic mechanisms. *J Neuroimmunol.* 2004;156(1-2):153-62.
179. Brosschot JF, Benschop RJ, Godaert GL, de Smet MB, Olf M, Heijnen CJ, et al. Effects of experimental psychological stress on distribution and function of peripheral blood cells. *Psychosom Med.* 1992;54(4):394-406.
180. Glaser R, Rabin B, Chesney M, Cohen S, Natelson B. Stress-induced immunomodulation: implications for infectious diseases? *JAMA.* 1999;281(24):2268-70.

181. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, Bonneau RH, Malarkey W, Kennedy S, Hughes J. Stress-induced modulation of the immune response to recombinant hepatitis B vaccine. *Psychosom Med.* 1992;54(1):22-9.
182. Kiecolt-Glaser JK, Glaser R. Chronic stress and mortality among older adults. *JAMA.* 1999;282(23):2259-60.
183. Bonneau RH, Sheridan JF, Feng NG, Glaser R. Stress-induced effects on cell-mediated innate and adaptive memory components of the murine immune response to herpes simplex virus infection. *Brain Behav Immun.* 1991;5(3):274-95.
184. Cohen S, Frank E, Doyle WJ, Skoner DP, Rabin BS, Gwaltney JM, Jr. Types of stressors that increase susceptibility to the common cold in healthy adults. *Health Psychol.* 1998;17(3):214-23.
185. Rojas IG, Padgett DA, Sheridan JF, Marucha PT. Stress-induced susceptibility to bacterial infection during cutaneous wound healing. *Brain Behav Immun.* 2002;16(1):74-84.
186. Kimzey SL, Johnson PC, Ritzman SE, Mengel CE. Hematology and immunology studies: the second manned Skylab mission. *Aviat Space Environ Med.* 1976;47(4):383-90.
187. Hawkins W, Ziegleschmid J. *Biomedical Results of Apollo (NASA SP 368).* 1975.
188. Taylor GR, Dardano JR. Human cellular immune responsiveness following space flight. *Aviat Space Environ Med.* 1983;54(12 Pt 2):S55-9.
189. Taylor GR, Janney RP. In vivo testing confirms a blunting of the human cell-mediated immune mechanism during space flight. *J Leukoc Biol.* 1992;51(2):129-32.
190. Chang TT, Walther I, Li CF, Boonyaratanakornkit J, Galleri G, Meloni MA, et al. The Rel/NF-kappaB pathway and transcription of immediate early genes in T cell activation are inhibited by microgravity. *J Leukoc Biol.* 2012;92(6):1133-45.
191. Breiteneder H, Diamant Z, Eiwegger T, Fokkens WJ, Traidl-Hoffmann C, Nadeau K, et al. Future research trends in understanding the mechanisms underlying allergic diseases for improved patient care. *Allergy.* 2019;74(12):2293-311.
192. Agache I, Akdis CA. Precision medicine and phenotypes, endotypes, genotypes, regiotypes, and theratypes of allergic diseases. *J Clin Invest.* 2019;129(4):1493-503.

## 9.4 Veröffentlichungen

### Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Buchheim JI, Matzel S, Rykova M, Vassilieva G, Ponomarev S, Nichiporuk I, et al. Stress Related Shift Toward Inflammaging in Cosmonauts After Long-Duration Space Flight. *Front Physiol.* 2019;10:85.

### Veröffentlichungen, die thematisch mit dieser Dissertation assoziiert sind:

Buchheim JI, Ghislin S, Ouzren N, Albuissou E, Vanet A, Matzel S, et al. Plasticity of the human IgM repertoire in response to long-term spaceflight. *FASEB J.* 2020;34(12):16144-62.

Moser D, Sun SJ, Li N, Biere K, Hoerl M, Matzel S, et al. Cells Flow and Immune Cell Priming under alternating g-forces in Parabolic Flight. *Sci Rep.* 2019;9(1):11276.

Strewe C, Zeller R, Feuerecker M, Hoerl M, Matzel S, Kumprej I, et al. PlanHab Study: Consequences of combined normobaric hypoxia and bed rest on adenosine kinetics. *Sci Rep.* 2018;8(1):1762.

Feuerecker M, van Oosterhout WPJ, Feuerecker B, Matzel S, Schelling G, Rehm M, et al. Headache under simulated microgravity is related to endocrine, fluid distribution, and tight junction changes. *Pain.* 2016;157(5):1072-8.

Yi B, Matzel S, Feuerecker M, Horl M, Ladinig C, Abeln V, et al. The impact of chronic stress burden of 520-d isolation and confinement on the physiological response to subsequent acute stress challenge. *Behav Brain Res.* 2015;281:111-5.

Strewe C, Muckenthaler F, Feuerecker M, Yi B, Rykova M, Kaufmann I, et al. Functional changes in neutrophils and psychoneuroendocrine responses during 105 days of confinement. *J Appl Physiol (1985).* 2015;118(9):1122-7.

Yi B, Rykova M, Jager G, Feuerecker M, Horl M, Matzel S, et al. Influences of large sets of environmental exposures on immune responses in healthy adult men. *Sci Rep.* 2015;5:13367.

Feuerecker M, Feuerecker B, Matzel S, Long M, Strewe C, Kaufmann I, et al. Five days of head-down-tilt bed rest induces noninflammatory shedding of L-selectin. *J Appl Physiol* (1985). 2013;115(2):235-42.

Chouker A, Feuerecker B, Matzel S, Kaufmann I, Strewe C, Hoerl M, et al. Psychoneuroendocrine alterations during 5 days of head-down tilt bed rest and artificial gravity interventions. *Eur J Appl Physiol.* 2013;113(8):2057-65.

## 9.5 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

***Untersuchungen zur Erfassung neuroendokriner und immunologischer Veränderungen beim Menschen während und nach Langzeitaufenthalt auf der Internationalen Raumstation ISS***

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form an einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Münster, den 20.05.2024

Sandra Lena Matzel

## 9.6 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler, Direktor der Klinik für Anaesthesiologie der LMU München, für die Möglichkeit der Promotion unter seiner Leitung, bedanken.

Mein großer Dank gilt Herr Prof. Dr. med. Alexander Choukér für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung und die ausgezeichnete Unterstützung bei der Durchführung und Durchsicht der Arbeit.

Frau PD Dr. med. Judith-Irina Buchheim möchte ich besonders für die hilfsbereite Unterstützung bei der Erstellung der Dissertation danken. Sie stand mir jederzeit bei Fragen zur Verfügung und gab mir wertvolle Anregungen und Verbesserungsvorschläge.

Des Weiteren danke ich Frau Marion Hörl und Frau Katharina Biere, die mich sowohl bei der Probensammlung als auch bei der Probenanalytik tatkräftig unterstützten und mir jederzeit beratend zur Seite standen.

Der Fa. Immumed, unter der Leitung von Herrn Wolfgang Meyer, danke ich für die Hilfe bei den Analysen auch zu ungünstigen Zeiten.

Allen teilnehmenden Kosmonauten spreche ich meinen Dank für die professionelle Zusammenarbeit aus.

Meiner Familie und meinem Freund danke ich für die vielen Zusprüche und die unendliche Unterstützung.