

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik  
des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Leiter: Prof. Dr. H. Renz

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Philipps-Universität  
Marburg und dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort  
Marburg

## **Etablierung und Validierung eines Mausmodells für das chronische Asthma bronchiale**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg

von

**Thorsten Held**

aus Löhne/Westfalen

Marburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
Am 30.08.2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. med. Harald Renz

Korreferent: Prof. Dr. med. Ulrich Koehler

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	06
1.1. Definition und klinische Manifestation des Asthma bronchiale	06
1.2. Epidemiologie	07
1.3. Asthma als multifaktorielles Geschehen	09
1.4. Subtypen des Asthma bronchiale	12
1.5. Pathomechanismen allergischer Erkrankungen	13
1.6. Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale	16
1.7. Chronifizierung und Airway Remodelling des Asthma bronchiale	19
1.8. Auswirkungen auf die Lungenfunktion	21
1.9. Tiermodelle des akuten und chronischen Asthma bronchiale	23
1.9.1. Übertragbarkeit von Tiermodellen auf den Menschen	24
1.10. Ziele der Arbeit	28
<b>2. Material und Methoden</b>	30
2.1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung	30
2.2. Protokoll zur Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung	30
2.3. Gewinnung von Probenmaterial	32
2.3.1. Gewinnung von Serumproben	32
2.3.2. Gewinnung der Broncho-alveoläre Lavage (BAL)	32
2.4. Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinen mittels Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	33
2.5. Quantifizierung und Differenzierung der Leukozytensubpopulationen der BAL	34
2.6. Konzentrationsbestimmung von Zytokinen der BAL mittels Cytometric Bead Array (CBA)	35
2.7. Lungenhistologie	36
2.8. Quantifizierung und Differenzierung der Leukozytensubpopulationen in den Atemwegswänden	38
2.9. Immunhistologie	39
2.10. Bestimmung des Lungenvolumens	40
2.11. Lungenpräparation unter standardisierten Bedingungen für die Elektronenmikroskopie	40

2.12. Messung der Lungenfunktion	40
2.12.1. Aufbau der Messapparatur	40
2.12.2. Messablauf	42
2.12.3. Messung der AHR (Akuten Hyperreagibilität)	43
2.12.4. Messung der ABO (Akuten Broncho-Obstruktion)	44
2.13. Statistik	45
<b>3. Ergebnisse</b>	46
3.1. Kontrolle der erfolgten Sensibilisierung durch Ovalbumin (OVA)	46
3.2. Inflammationsprozesse in den Atemwegen	47
3.2.1. Intraluminale Inflammation/BAL	47
3.2.1.1. absolute Zellzahlen in der BAL	47
3.2.1.2. relative Verteilung der Leukozyten-Subtypen in der BAL	50
3.2.1.3. Zytokinkonzentrationen in der BAL	51
3.2.2. Inflammation in den Atemwegswänden	54
3.2.2.1. Absolute Zellzahl in den Atemwegswänden	54
3.2.2.2. Relative Verteilung der Entzündungszellen in den Atemwegswänden	56
3.2.2.3. Verteilung der Entzündungszellen auf die verschiedenen Kompartimente	57
3.3. Induktion von Mukusproduktion durch chronische OVA-Exposition in sensibilisierten Mäusen	60
3.4. Strukturelle Veränderungen der Atemwege im Rahmen von Remodellingvorgängen	63
3.5. Lungenfunktion als Indikator für einen asthmatischen Phänotyp	65
3.5.1. Akute Hyperreagibilität	66
3.5.2. Akute Bronchoobstruktion	67
3.5.3. Persistierende Bronchoobstruktion	69
3.6. Zustand der Tiere während der Expositionszeitraumes	70
3.6.1. Gesamtgewicht	70
3.6.2. Milzgewicht	70
3.7. Persistenz der Veränderungen	72
<b>4. Diskussion</b>	76
<b>5. Literaturangaben</b>	96

<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b>	105
<b>7. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen</b>	107
<b>8. Zusammenfassung</b>	109
<b>9. Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	110
<b>10. Lebenslauf</b>	111
<b>11. Verzeichnung der Veröffentlichungen</b>	112
<b>12. Erklärung</b>	113
<b>13. Danksagung</b>	114

## 1. Einleitung

### 1.1. Definition und klinische Manifestation des Asthma bronchiale

Das atopische Asthma bronchiale zählt zu den allergischen Erkrankungen der Atemwege mit chronischer Manifestation. Es wird, wie das atopische Ekzem und die allergische Rhinitis, als atopische Erkrankung klassifiziert. Darunter versteht man eine polygen vererbte, erhöhte Bereitschaft zur Entwicklung allergischer Reaktionen der Haut und der Schleimhäute. Beim Asthma bronchiale handelt es sich um eine Krankheit, die sich klinisch als rekurrende, zum Teil auch persistierende Atemwegobstruktion mit Dyspnoe und auskultatorischem Giemen manifestiert (Kroegel, 2002). Auslösbar ist diese Obstruktion sowohl durch Allergene, auf die das Individuum spezifisch mit der oben genannten Klinik reagiert, als auch auf unspezifische Reize, wie chemische ( $O_3$ ,  $SO_2$ ,  $NO_x$ ) und thermische (Kälte) Reize, aber auch auf Stress, Feuchtigkeit und Staub.

Das Asthma bronchiale wird dem Formenkreis der entzündlichen Atemwegserkrankungen zugeordnet. Histologisch liegt eine Inflammation der Atemwege vor, für die ein Vorhandensein von aktivierten eosinophilen Granulozyten und T-Helferzellen des Typs 2 (Th2) (Foster, 2002) charakteristisch ist. In der bronchoalveolären Lavage finden sich als zelluläre Bestandteile, neben eosinophilen Granulozyten und  $CD4^+$  T-Lymphozyten, auch Monozyten in den Lumina der Atemwege. Diese Zellen finden sich aber auch direkt im Gewebe der Atemwegswände. Zusätzlich liegt in vielen Fällen eine neurogene Entzündung, resultierend in einer gesteigerten Reagibilität der Atemwege auf unspezifische Stimuli, vor (Whitehead, 2003). Diese wird als akute Hyperreagibilität (AHR) bezeichnet. Die neurogene Komponente der Erkrankung stellt einen zentralen pathophysiologischen Aspekt dar, der noch nicht vollständig verstanden ist.

Die chronische Phase der Entzündung ist durch einen irreversiblen Umbau der Atemwege („*airway remodelling*“) und die Persistenz des entzündlichen Infiltrats gekennzeichnet (Vignola, 2000).

Die inhalative Sensibilisierung ist in den meisten Erkrankungsfällen verantwortlich für die Initiation des Asthma bronchiales. Jedoch spielen auch andere Faktoren,

wie die genetische Disposition, eine bedeutsame Rolle. Bei 80% der Patienten tritt die Manifestation vor dem 10. Lebensjahr auf. Nur beim so genannten „*intrinsic Asthma*“, auf welches in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird, ist der Zeitpunkt der Manifestation in der Regel wesentlich später.

Die Maximalform der allergischen Bronchoobstruktion stellt der „*Status asthmaticus*“ dar. Er kann definiert werden, als schweres Asthma über Stunden oder Tage ohne Unterbrechung mit vitaler Bedrohung für den Betroffenen oder klinisch-therapeutisch, als durch inhalative  $\beta$ 2-Mimetika nicht zu unterbrechende Bronchoobstruktion. Der Patient im „*Status asthmaticus*“ muss sofort in einer Klinik intensivmedizinisch betreut werden, um letale Folgen des Geschehens zu vermeiden (Herold, 2005).

## **1.2. Epidemiologie**

Das Asthma bronchiale ist eine vor allem in den Industrienationen epidemiologisch bedeutende Erkrankung. Die Prävalenz in Europa liegt bei durchschnittlich 8,6% (European Lung White Book, 2003); in Deutschland bei Kindern etwa 10% und bei Erwachsenen etwa 5% (von Mutius, 1994; Sears, 1997). Damit gehört das Asthma zu den wichtigsten Volkskrankheiten.

Es existieren große regionale und nationale Unterschiede (von Mutius, 1992), so zum Beispiel zwischen den westeuropäischen und osteuropäischen Staaten. Es gibt Regionen, in denen die Häufigkeit der asthmatischen Symptome bei Kindern über 20% liegt (Weiland, 1999). Weltweit sind etwa 155 Millionen Menschen vom allergischen Asthma bronchiale betroffen (Asher, ISAAC, 1995).

Zwar ist die Mortalität der Krankheit mit 6000 Toten/Jahr und ungefähr 8/100.000 Todesfällen in Deutschland (Wettengel) nicht sehr hoch, die Erkrankung führt aber zum Teil zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität der Betroffenen. Dies führt zu erheblichen finanziellen Belastungen der Gesundheitssysteme. Die gesamtgesellschaftlichen Kosten des Asthmas, die sich aus direkten Kosten für Arzneimittel und Krankenhausaufenthalte und aus indirekten Ausgaben, zum Beispiel für Frühberentung und Arbeitsausfälle zusammen setzen, beliefen sich Mitte der 90er Jahre auf mehr als 5 Milliarden DM (Nowak, 1996).

In mehreren epidemiologische Studien wie ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) und ECHRS (European Community Respiratory Health Survey) wurde für die vergangenen 20-30 Jahre ein deutlicher Anstieg der Inzidenz und der Prävalenz des Asthma bronchiale in den industrialisierten Ländern festgestellt (ISAAC, 1998; ECHRS, 1996). Dieser starke Anstieg der Fallzahlen in einem relativ kurzen Zeitraum legt den Schluss nahe, dass eine genetische Prädisposition dem Anstieg nicht allein zu Grunde liegen kann, sondern, dass vielmehr äußere Faktoren die Manifestationsrate beeinflussen.

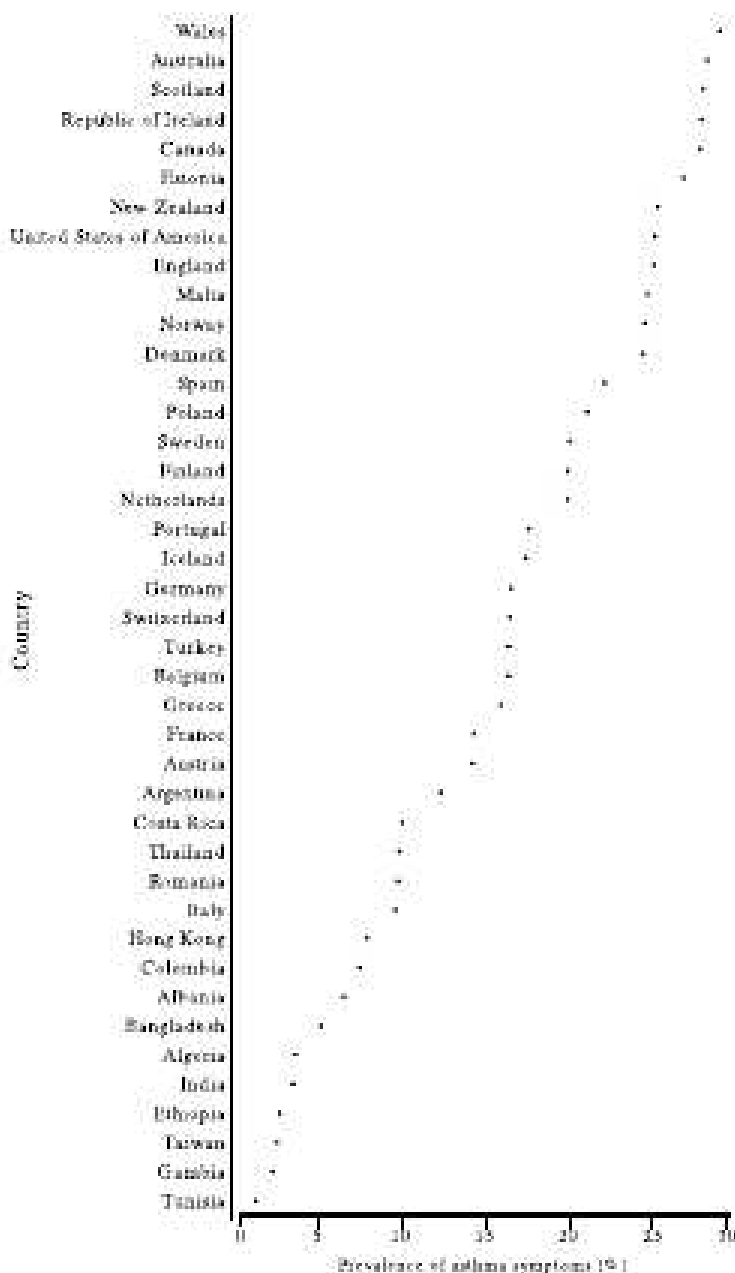


Abbildung 1.1: Prävalenz der Asthmatischen Symptome unter Erwachsenen (nach: Masoli The global burden of asthma: executive summary of the GINA, Allergy, 2004)



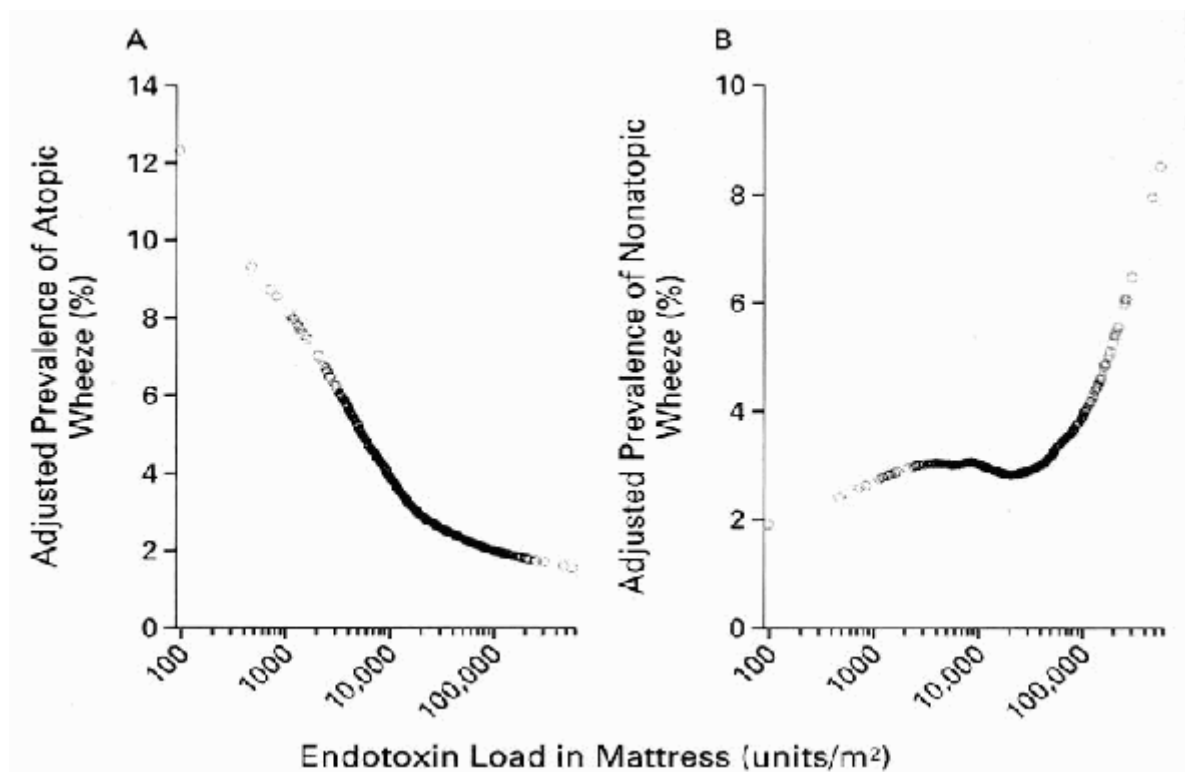
### **1.3. Asthma als multifaktorielles Geschehen**

Das allergische Asthma bronchiale muss als multifaktorielle Erkrankung angesehen werden, zu dessen Entstehung sowohl endogene, also genetische, als auch exogene Faktoren beitragen. Man kann davon ausgehen, dass exogene Faktoren zu einer Dysregulation immunologischer Faktoren führen und somit die multifaktorielle Ätiologie des Asthmas unterstützen. In den letzten Jahren wurde eine Reihe dieser exogenen Risikofaktoren entdeckt, welche entscheidend eine Entstehung der allergischen Erkrankungen beeinflussen.

Zur Untersuchung unterschiedlicher Lebensbedingungen und deren Einflüsse auf die Ausbildung von allergischen Erkrankungen bot die Situation direkt nach der deutschen Wiedervereinigung unvergleichlich gute Möglichkeiten, da zwei eng miteinander verwandte Populationen in unmittelbarer geographischer Nähe vollkommen unterschiedlichen soziokulturellen und ökologischen Bedingungen ausgesetzt waren (von Mutius, 1992). Durch diese und andere Studien konnte eine Vielzahl von exogenen Faktoren detektiert werden, die möglicherweise die Entstehung einer allergisch-asthmatischen Krankheit begünstigen. Neben der Wohnsituation (von Ehrenstein, 1998; Ramsey 2004) und dem damit verbundenen soziokulturellen Umfeld scheinen die Allergenbelastung (Sporik, 1990), die Ernährungsgewohnheiten (Bjorksten, 1998; Davies, 2003), Umweltgifte (Beard, 2003) und bestimmte frühkindliche virale und bakterielle Infektionen (Sears, 1997; Illi, 2001) sowie der Einfluss des maternalen Immunsystems (Herz, 2000) eine wichtige Rolle bei der Entstehung allergischer Erkrankungen zu spielen.

Im Rahmen der Hygiene-Hypothese (Strachan, 1997) wird für bakterielle Infektionen eine eher protektive Rolle angenommen. So geht der Anstieg der Prävalenz des allergischen Asthma bronchiale einher mit ständig verbesserten hygienischen Verhältnissen und damit mit einer verringerten Häufigkeit von frühkindlichen Infektionen (Matricardi, 2000; Renz, 2002; Lemanske, 2004). Umgekehrt wirken sich rezidivierende bakterielle Infektionen der Atemwege, wie sie zum Beispiel vermehrt in Kindertagesstätten auftreten, reduzierend auf das Langzeitrisiko aus, an einer Allergie oder einem allergischen Asthma zu

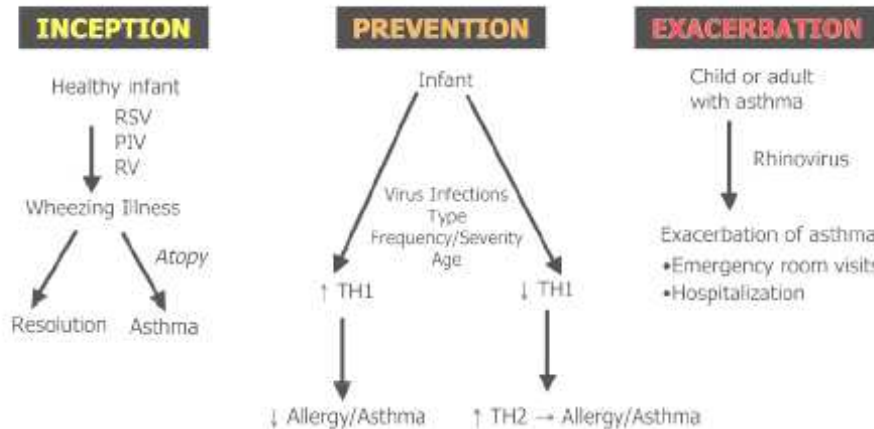
erkranken (Juntti, 2003; Braun-Fahrlander, 2002). Eine Erklärung hierfür ist die Induktion einer Th1 (T-Helferzellen Typ1) dominierten Abwehrlage in der frühen Kindheit, welche die Entwicklung zu einem Th2(T-Helferzellen Typ2)-Milieu zu inhibieren scheint.



**Abbildung 1.2: Bakterielle Endotoxine beeinflussen die Ausprägung atopischer Symptome (aus: Braun-Fahrlander C. Environmental Exposure to Endotoxin and it's Relation to Asthma in School-Age Children. New England Journal of Medicine, 2002)**

Im Gegensatz dazu scheinen vermehrte Infektionen viralen Ursprungs, zum Beispiel mit Rhinoviren und Respiratory Syncytial Viren (RSV) (Openshaw, 2003; Williams, 2004), positiv mit der Entstehung eines atopischen Phänotyps zu korrelieren. Auch bei der Exazerbation eines Asthma bronchiales spielen Infekte der Atemwege eine große Rolle.

# Relationship of Viral Infections to Asthma Pathogenesis



**Abbildung 1.3: Einfluss viraler Atemwegsinfektionen auf das allergische Asthma bronchiale (nach: Lemanske RF Viral infections and asthma inception. J Allergy Clin Immunol 2004)**

Neben einem komplexen Spektrum exogener Faktoren muss bei der Diskussion der Ätiologie des allergischen Asthma bronchiale die genetische Prädisposition mit einbezogen werden. Genetische Studien haben eine Reihe von Kandidatengenomen identifiziert (Tattersfield, 2002), die für Faktoren kodieren, die innerhalb der allergischen Entzündungsreaktion, der Atemwegshyperreagibilität und der Regulation des Serumspiegels an Immunglobulin E (IgE) eine wesentliche Rolle spielen (Hakonarson, 2001; Hoffjan, 2002). Allerdings konnte bisher aufgrund der Komplexität der Interaktion dieser Faktoren innerhalb des Krankheitsgeschehens eine direkte Kausalität zwischen den einzelnen genetischen Variationen und dem Krankheitsphänotyp nicht nachgewiesen werden. So kodieren zum Beispiel die Adam-Gene auf Chromosom 20 für membranständige Metalloproteasen, welche entscheidende asthmarelevante Funktionen übernehmen (Kumagai, 2002; Cohn, 2004).

#### 1.4. Subtypen des Asthma bronchiale

In der Fachliteratur lässt sich eine Vielzahl von Möglichkeiten finden, asthmatische Beschwerden einzuordnen. Grundsätzlich kann man das Asthma bronchiale aber je nach vorhandener oder nicht vorhandener allergischer Diathese in zwei Formen einteilen:

- a) das extrinsische oder allergische Asthma
- b) das intrinsische oder nicht allergische Asthma.

Bei mehr als 80% der Asthmapatienten sind spezifische Antikörper (Ak) gegen Inhalations- und/oder Nahrungsmittelallergene nachweisbar (Romanet-Manet, 2002). Zu den häufigsten Aeroallergenen gehören Hausstaubmilbenkot, Katzenepithelien und Birken- sowie Gräserpollen. Diese lassen sich durch positive Hauttests vom Soforttyp oder durch Ak-Suchtests nachweisen. Ferner lassen sich bei diesen Patienten die asthmatischen Symptome durch Allergenexposition provozieren. In diesen Fällen handelt es sich um die allergische Variante des Krankheitsbildes.

Es gibt aber auch Asthmatiker, welche eine normale IgE-Konzentration im Serum aufweisen und bei denen der Hauttest negativ ausfällt. Bei diesen Patienten spricht man von einem nicht-allergischen oder intrinsischen Asthma bronchiale, wie zum Beispiel beim, durch nicht steroidale Antiphlogistika induzierten, „*Analgetika-Asthma*“.

Weiterhin gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten der Einteilung, die durch Auslöser, Zeitpunkt, Schwere oder vorherrschende Art der Symptome charakterisiert werden. Viele dieser Bezeichnungen der Subtypen der Erkrankung sind rein deskriptiv und können zum Teil sowohl dem allergischen als auch dem nicht allergischen Asthma zugeordnet werden. Ein Beispiel dafür ist das „*nokturale Asthma*“, welches sowohl eine allergische als auch ein nicht allergische Komponente beinhalten kann.

Intrinsisches und extrinsisches Asthma unterscheiden sich vor allem in der Krankheitsursache und den Auslösemechanismen, die weitere Pathogenese ist ansonsten sehr ähnlich. Bei beiden Formen ist die Erkrankung durch eine neurogene Komponente und ein entzündliches Infiltrat der Atemwege, welches durch eosinophile Granulozyten und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten dominiert wird, gekennzeichnet. Eine IgE vermittelte Soforttypreaktion ist somit nicht notwendig, scheint aber förderlich zu sein.

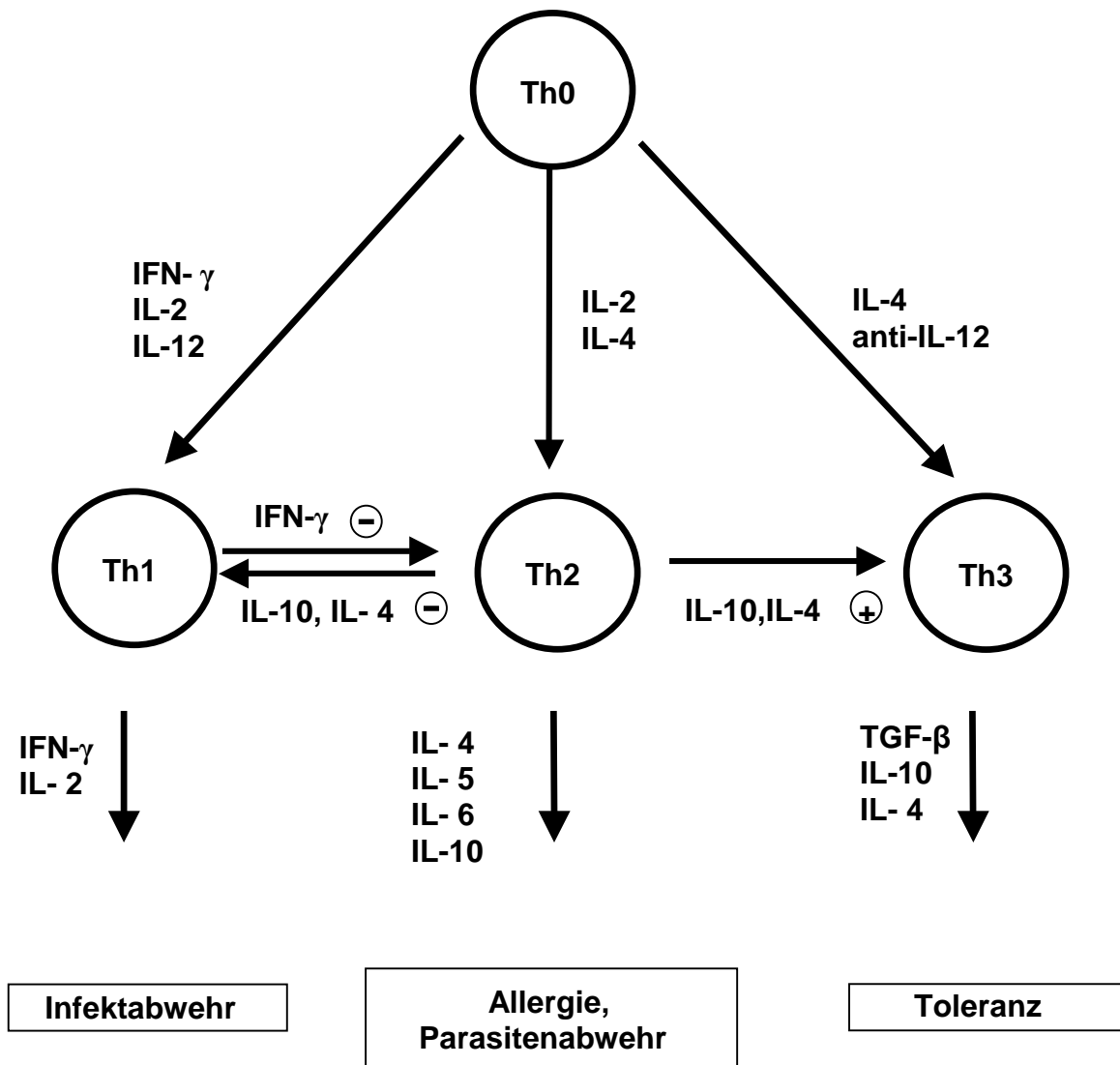
### **1.5. Pathomechanismen allergischer Erkrankungen**

Den allergischen Erkrankungen liegt eine fehlgeleitete Immunreaktion gegenüber, in der Regel ungefährlichen, Antigenen zu Grunde. Generell kann man die Entstehung dieser Krankheiten in zwei verschiedene Phasen unterteilen, die Sensibilisierungs- und die Effektorphase. Die Sensibilisierung ist Beginn und Ursprung für eine Reihe pathophysiologischer Reaktionen, an deren Ende die volle Ausprägung einer allergischen Erkrankung stehen kann. Durch diesen Vorgang wird aus einem ubiquitär vorkommenden Antigen ein Allergen, auf welches der Körper spezifisch reagiert.

Zum grundlegenden Verständnis allergischer Vorgänge hat vor allem die Unterscheidung der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in drei Unterklassen beigetragen. Die Klassen unterscheiden sich durch die von ihnen sezernierten Zytokine.

Das charakteristische Zytokinprofil der T-Helferzellen vom Typ I (Th1-Zellen) ist gekennzeichnet durch Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-2 (IL-2) und tissue necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), während T-Helferzellen vom Typ II (Th2-Zellen) durch die Expression von IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13 charakterisiert sind (Herz, 2000). T-Helferzellen vom Typ III (Th3-Zellen) produzieren hauptsächlich tissue growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-4 und IL-10. Diese unterschiedlichen T-Zell-Populationen entwickeln sich aus undifferenzierten CD4<sup>+</sup> Th0-Zellen.

Von einem allergischen Phänotypen spricht man bei Ausprägung eines Th2-Milieus. Hierbei muss man aber beachten, dass es nicht ausschließlich zu einer Bildung von T-Zellen dieser Subpopulation kommt. Es handelt sich eher um ein Überwiegen dieses Zelltyps im reagierenden Gewebe.



**Abbildung 1.4: Differenzierung der T-Helfer Zellpopulationen (nach Herz U.: Die Rolle von bakteriellen Infektionen in der Immunpathogenese allergischer Erkrankungen)**

Die Entwicklung einer Th2 dominierten Immunantwort ist abhängig von der Antigenpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen (APZ) eines bestimmten Subtyps, den dendritischen Zellen vom Typ 2 (DC2), diese können anhand eines spezielles Zytokinmusters identifiziert werden (IL-10, IL-18, Prostaglandin-E<sub>2</sub>). Bei der Ausbildung einer bestimmten T-Helfersubpopulation spielen der Typ des Antigens, die Antigenkonzentration, die Rezeptordichte an T-Zell-Rezeptoren (TCR) und major histocompatibility complex-Rezeptoren (MHC-II-R) auf der Oberfläche von APZ und T-Zelle, das initiale Mikromilieu und die Expositionsroute eine wichtige Rolle. Es wird angenommen, dass vor allem geringe Antigenkonzentrationen und von Mastzellen, eosinophilen Granulozyten und Th2-Zellen selbst ausgeschüttetes IL-

4 zu der Ausprägung einer Th2-Dominanz führen. Untereinander kommt es bei den T-Helferzellen zu komplexen Regulationsmechanismen, die auf gegenseitiger Hemmung bzw. Stimulation basieren (O'Garra, 2004).

Von APZ, wie zum Beispiel dendritischen Zellen oder Alveolarmakrophagen, werden in den Atemwegen Allergene aufgenommen. Diese werden intrazellulär prozessiert und in Form von Peptidfragmenten über Histokompatibilitätsantigene der Klasse II (MHC-II), an ihrer Oberfläche, den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, präsentiert. Dieser Komplex aus MHC-II Molekül plus Allergenpeptid wird vom antigenspezifischen TCR der nativen CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen erkannt und führt, bei gleichzeitiger Kostimulation über den CD28/CD86 Weg, zur Aktivierung und Differenzierung der T-Zelle (Lee, 2004). Die von der aktivierten Th2-Zelle sezernierten Zytokine haben ihrerseits eine Auswirkung auf die Entstehung einer allergischen Entzündung. So induzieren IL-4 und IL-13 aus Th2-Zellen, aktivierten Makrophagen und anderen Zellen bei B-Lymphozyten die Expression von MHC-II Molekülen und einen Immunglobulin-Klassen-Switch von Immunglobulin M (IgM) zu Immunglobulin E (IgE) und Immunglobulin G4 (IgG4) beim Menschen (Temelkovski, 1997) und Immunglobulin G2<sub>a</sub> (IgG2a) bei der Maus. IL-5 ist ein zentraler Faktor in der Regulation der Funktion von eosinophilen Granulozyten, da es für die Differenzierung der Granulozytenvorstufen im Knochenmark und deren Rekrutierung in das Zielgewebe essentiell ist.

Generell führt die Sensibilisierung beim Allergiker zu einer Persistenz einer Th2-dominierten Abwehrlage, welche mit einem Th2-Zytokinmuster zusammenhängt (Anderson, 2001).

## 1.6. Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale

Das allergische Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Lungenerkrankung, die auf einer allergischen Reaktion vom Soforttyp basiert. Beim extrinsischen Asthma bronchiale gibt es, wie bei anderen allergischen Erkrankungen auch, eine Vielzahl von auslösenden Faktoren. Dabei muss zwischen Allergenen und Triggerfaktoren unterschieden werden. Die häufigsten Allergene sind Inhalationsallergene, wie Hausstaubmilbenkot, Schimmelpilze, Haare und Hautschuppen von Haustieren, sowie latexhaltige Artikel. Triggerfaktoren können von Person zu Person unterschiedlich sein, hierzu zählen: Anstrengung, Kälte, Nässe, Rauch oder auch starke Emotionen.

Weitere relevante Mechanismen für die Entstehung eines Asthmaanfalls sind Infektionen der oberen und unteren Atemwege. So zeigt eine Reihe tierexperimenteller Arbeiten, dass virale Infektionen zu einer Exazerbation eines etablierten allergischen Phänotyps führen können (O'Donnell, 1998; Suzuki, 1998). Auf Grund dessen werden Infektionen zu Triggerfaktoren und nicht zu den Allergenen gezählt.

Beim Asthma bronchiale handelt es sich um eine Entzündung des Soforttyps und wird nach Coombs und Gell als Typ I Reaktion eingestuft, die aus einer Frühphase und einer Spätphase besteht. Hat sich bei einem Individuum durch einen Sensibilisierungsprozess ein atopischer Phänotyp ausgebildet, kommt es innerhalb weniger Minuten nach Allergenkontakt, durch die Kreuzvernetzung von an hochaffine Fcε-Rezeptoren gebundene IgE-Antikörpern, zu einer Aktivierung von Mastzellen in den Atemwegen. Diese erste mastzellabhängige Reaktion wird Frühreaktion genannt und kennzeichnet die allergische Reaktion vom Soforttyp. Die aktivierten Mastzellen degranulieren und setzen eine Reihe von Mediatoren, wie Histamin und Serotonin frei (Bousquet, 2000). Dadurch werden ein Plasmaaustritt aus den umliegenden Gefäßen mit resultierendem Ödem und eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur induziert. Darüber hinaus werden von den Mastzellen Prostaglandine (PGD<sub>2</sub>) und Leukotriene (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>) ausgeschüttet, welche die Symptomatik verstärken und chemotaktische Signale für neutrophile und eosinophile Granulozyten und Lymphozyten darstellen.



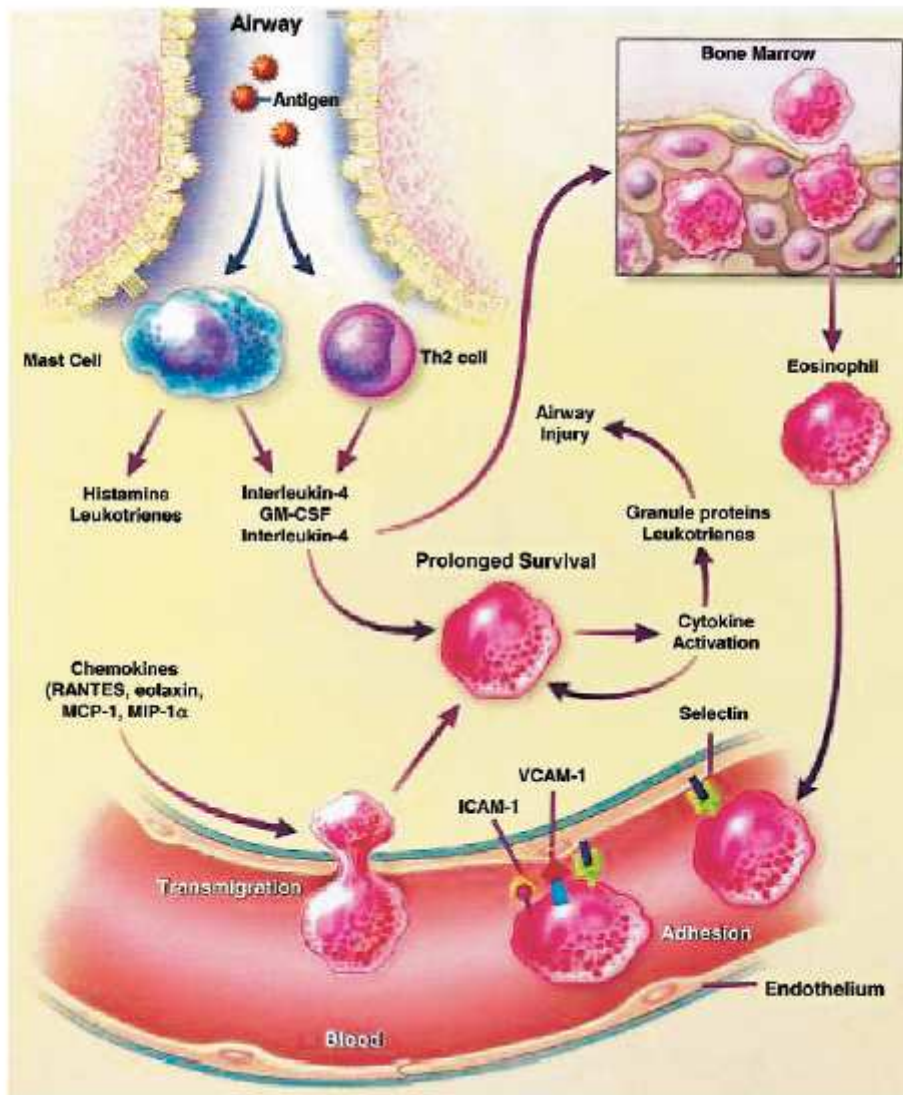


Abbildung 1.5: Die akute Entzündungssituation beim allergischen Asthma (nach: Lemanske RF. Asthma. J Allergy Clin Immunol 2003).

Ein bis zwei Stunden nach Allergenexposition kommt es zu einer Akkumulation von Entzündungszellen in den Atemwegen und einer Infiltration in das Gewebe. Durch diese Zellen kommt es zu einem zweiten Anfluten von Mediatoren, welche zum einen die vorherigen Symptome verstärken, aber zum anderen zu einer stärkeren Störung des bronchialen Milieus führen. Dies ist die asthmatische Spätreaktion, die nach 4 bis 6 Stunden ihr Maximum erreicht (Kroegel,2002). Schon die Frühphase der Reaktion führt zu den bekannten Asthmasymptomen,

wie Dyskrie, Mukushypersekretion und Bronchokonstriktion, ohne dass eine vermehrte Anzahl von Entzündungszellen angetroffen werden muss. Daraus resultiert eine Beeinträchtigung des Widerstandes in den Atemwegen. Von eosinophilen Granulozyten freigesetzte basische Proteine und Sauerstoffradikale zerstören Strukturzellen der Atemwege und damit deren Abwehrfunktionen als Barriere und die Funktion der mukociliaren Clearance. Diese beschädigten Strukturzellen schütten als Reaktion auf die Verletzung weitere Mediatoren aus, die zu einer verstärkten Entzündungsreaktion führen. Darauf folgende Reparaturmechanismen stellen den Beginn des Remodellings und somit der Chronifizierung dar (McMillan, 2004).

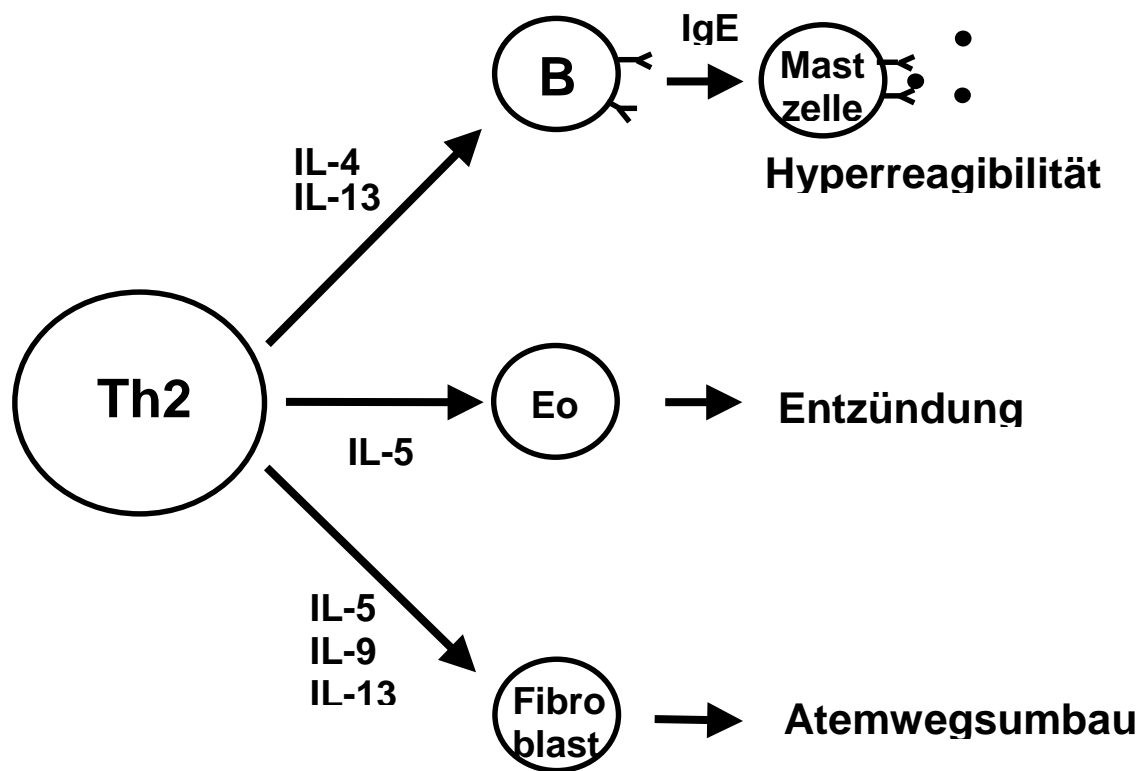


Abbildung 1.6: Pathophysiologische Funktion der Th2-Lymphozyten beim allergischen Asthma bronchiale (nach: Herz U. Clin Exp Allergy 1998)

All diese Mechanismen führen zur Ausprägung des asthmatischen Phänotyp mit rekurrender bis persistierender Atemwegsobstruktion und zu einer bronchialen Hyperreagibilität.

Als Langzeitschäden bei Asthmatikern kann man emphysematöse Veränderungen der Alveolen interpretieren.

### **1.7. Chronifizierung und *Airway Remodelling* des Asthma bronchiale**

Beim gegenwärtigen Kenntnisstand lässt sich die dem Asthma zu Grunde liegende asthmatische Entzündung in drei grundlegende Phasen einteilen:

- a) Sensibilisierungsphase
- b) Allergische Inflammationsphase
- c) Chronifizierung und *Airway Remodelling*

Unter dem Begriff Atemwegsumbau oder *Airway Remodelling* versteht man einen fortlaufenden Reparatursprozess, der aus einer wiederholten Schädigung der betroffenen Strukturen resultiert (Kumagai, 2002). Diese strukturellen Veränderungen der Atemwege lassen sich bei Asthmapatienten entlang des gesamten Bronchialsystems und in allen Schichten der Atemwegswand nachweisen (Jeffery, 2001). Zu den Folgen dieser Wiederherstellungsprozesse in den Atemwegen zählen eine Verdickung der Atemwegswand, eine Fibrosierung des subepithelialen Bindegewebes, eine erhöhte Mukussekretion durch ein vermehrtes Auftreten Mukus produzierender Becherzellen, eine Hyperplasie von Myofibrozyten, eine Hypertrophie und Hyperplasie von Myozyten sowie eine Hypertrophie der Atemwegsepithelzellen und eine gesteigerte Angiogenese (Wilson 2001; Mc Donald, 2001; Aikawa, 1992). Die Persistenz von entzündlichen Prozessen (wie oben beschrieben) ist mit einer fortwährenden Ausschüttung von Sauerstoffmetaboliten, Enzymen und basischen Proteinen, vor allem von eosinophilen Granulozyten, Monozyten und Strukturzellen verbunden (Temelkovski, 1998). Dies führt zu einer vermehrten Schädigung von Bronchialepithel- und glatten Muskelzellen, woraufhin es zu einer zusätzlichen Beeinträchtigung der Arbeit des Flimmerzellapparats und der Abwehr- und Barrierefunktionen des Epithels kommt.

Eine folgende subepitheliale Fibrosierung mit Ablagerung von kollagenen Fasern der Typen I, II und III und ein verminderter Abbau von extrazellulärer Matrix

(Vignola, 2002) durch die sich die Basalmembran verdickt (James, 2002), schließt sich an. Zusätzlich scheinen die Epithelschäden und der Einfluss basischer Proteine der eosinophilen Granulozyten mit einer akuten Hyperreagibilität in Zusammenhang zu stehen. Deren zentrale Bedeutung für den Asthmaverlauf liegt unter anderem darin, das Spektrum der obstruierenden Faktoren auf unspezifische Reize, wie Kälte, Umwelttoxene, aber auch spezielle Chemikalien, wie zum Beispiel Metacholin (MCh), zu erweitern.

Weiterhin kommt es zu einer Hyperplasie im Bereich der Epithelzellen, die in einer Vermehrung und Vergrößerung von Mukus produzierenden Becherzellen besteht (Epstein, 2004). Das wiederum geht mit einer vermehrten Schleimproduktion einher. Eine zusätzliche Mukushypersekretion durch bronchiale Drüsen und eine zusätzliche Dyskrenie erhöhen durch Verlegung der Lumina den Atemwegswiderstand und können dadurch die Atemfunktion beeinflussen (Foster, 2000).

In den tiefer gelegenen Schichten der Atemwegswand kommt es durch Mediatoren, hier Wachstumsfaktoren, wie epidermal growth factor (EGF), zu einer Verdickung der glatten Muskelschicht. Eine vermehrte Arbeit durch bronchokonstriktische Episoden verstärkt diesen Prozess in Form einer trainingsbedingten Muskelzunahme. Bei der Verdickung, vor allem in den kleinen Atemwegen (Tashkin, 2002), handelt es sich, neben einer Hypertrophie, auch um eine Hyperplasie der glatten Muskelzellen (Stewart, 2001). Zu einem Teil bilden die glatten Muskelzellen einen hyperkontraktilen Phänotyp aus, was zu einer zusätzlichen Verstärkung der Atemwegsobstruktion und Erhöhung des Atemwegswiderstandes führt. Es kann zu einem vollständigen Verhalt des Atemflusses durch diese Verlegung kommen (Tashkin, 2002).

Zudem findet sich eine Proliferation von Blutgefäßen der Atemwege (Carroll, 1997) und eine vermehrte Ausschüttung von Neurotransmittern (Nocker, 2002) der bisher nicht vollständig aufgeklärte Mechanismen zu Grunde liegen. Hierdurch kommt es zu einer weiteren Anreicherung von Mediatoren und Abfallprodukten, wie von Epithelzellen produzierte Interleukine und von eosinophilen Granulozyten ausgeschüttete Mediatoren, wie Sauerstoffmetabolite, Zytokine und Enzyme. Zusätzlich dazu kommt es zu einer weiteren Penetration

von Entzündungszellen. Es kann zu einer Verstärkung des entzündlichen Prozesses und einer weiteren Zerstörung des bronchiale Epithels kommen. Durch eine verstärkte Vaskularisierung und eine vermehrte Durchlässigkeit der Gefäßwände kommt es zu einem Austritt von Flüssigkeit ins Gewebe, woraus ein Ödem resultiert, welches einen weiteren obstruierenden Faktor darstellen kann.

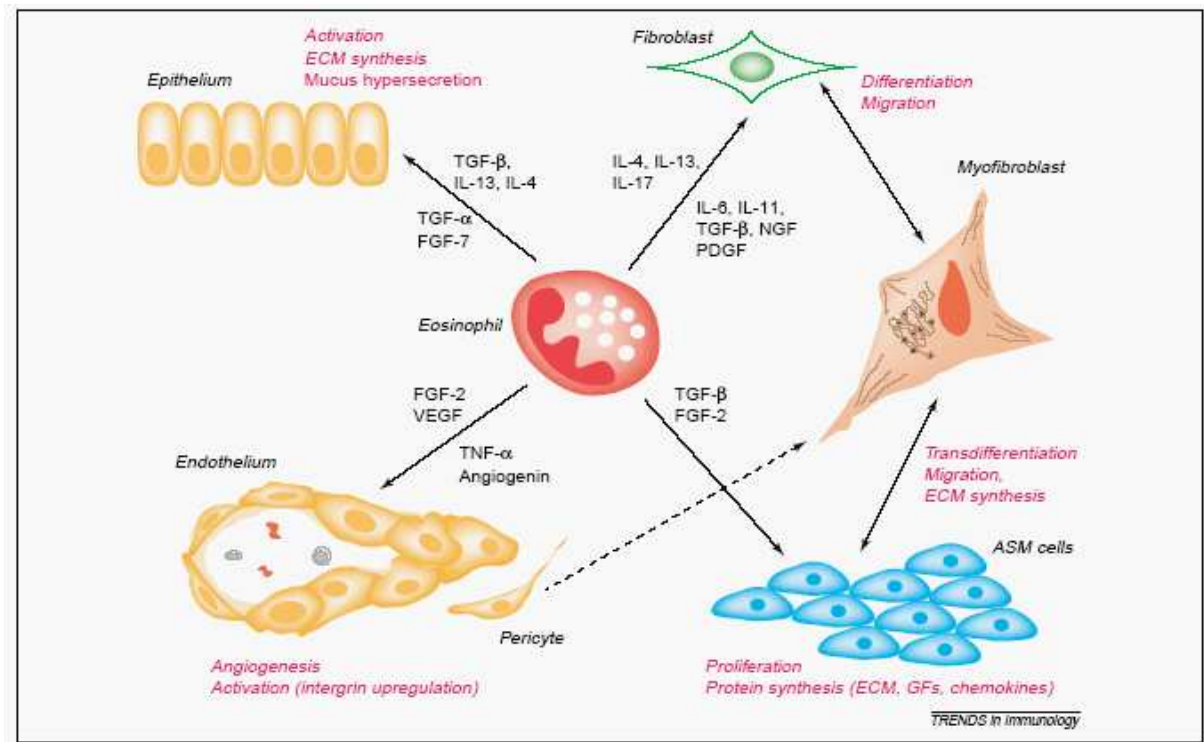


Abb. 1.7: Die Rolle von Eosinophilen auf die Chronifizierung beim Asthma bronchiale (aus: Kay. Trends in Immunology. 2004)

## 1.8. Auswirkungen auf die Lungenfunktion

Konsequenz all dieser Effekte ist die Ausbildung des asthmatischen Phänotyps. Die Manifestation dieses Phänotyps äußert sich klinisch, wie schon oben erläutert, in einer anfallsweise auftretenden Atemnot, bedingt durch eine Bronchokonstriktion. Diese Konstriktion ist zum Teil nicht komplett reversibel. Als zuverlässiger diagnostischer Parameter für die Quantifizierung beim Menschen hat sich der Tiffeneau-Test, die forcierten expiratorischen 1-Sekunden-Kapazität herausgestellt. Durch diesen Test ist es dem Patienten möglich den Grad der Obstruktion auf einfache Art und Weise auch selbst zu ermitteln. Im Tierversuch wird der halbmaximale expiratorische Atemfluss ( $EF_{50}$ ) als Indikator für

Atemwegsveränderungen herangezogen, da dieser obstruktiven Veränderungen der Atemwege gegenüber ähnlich sensibel ist (Calhoun, 2003).

Die Pathogenese der Bronchokonstruktion im Anfall des Asthma bronchiales wird im Wesentlichen bestimmt durch Anspannung der glatten Atemwegsmuskulatur, ein interstitielles Ödem sowie eine Verlegung der Atemwege durch Mukus mit konsekutiver Verringerung des Atemwegsdurchmessers. Eine Verdickung der Atemwegswände bewirkt eine persistierende Einengung des Durchmessers in den respiratorischen Organen (Jeffrey, 2001). All dies führt zu einer Verminderung der Stomstärke der Luft in den Atemwegen bei gleicher Kraftanstrengung während der Respiration, was den  $EF_{50}$  zu einem Aussagekräftigen Parameter bei der Untersuchung einer Bronchoobstruktion macht. Der  $EF_{50}$  wird schon in anderen etablierten murinen Modellen der allergischen Entzündung der Atemwege als entscheidender Parameter für den Vergleich lungenphysiologischer Aspekte verwendet (Glaab, 2001; Neuhaus-Steinmetz, 2000).

Es gibt unterschiedliche Ursachen für eine Erhöhung des Atemwegswiderstandes. So resultiert dieser entweder durch Allergenkontakt und wird durch die Freisetzung verschiedener Mediatoren veranlasst oder sie zeigt sich durch Triggerfaktoren als Überempfindlichkeitsreaktion des neuromuskulären Apparates der Atemwege. Die lungenphysiologischen Ursachen für die Entwicklung dieser Atemwegsüberempfindlichkeit auf unspezifische Reize (akute Hyperreagibilität/AHR) sind noch nicht genau bekannt. Bei der Reaktion auf spezifische Reize bzw. auf Allergen (akute Bronchoobstruktion/ABO) handelt es sich um eine durch Allgenerkennung und Mastzelldegeneration basierende allergische Reaktion vom Soforttyp nach Coombs und Gell.

Bei dieser Arbeit haben wir versucht sowohl die Reagibilität auf unspezifische, als auch auf spezifische Reize bei den Versuchstieren zu erzielen und lungenfunktionell darzustellen. Als unspezifischen Triggerfaktor haben wir MCh, ein Acetylcholin-Derivat verwendet, der sich schon in anderen Arbeiten zu murinen Mausmodellen bewährt hat.

## **1.9. Tiermodelle des akuten und chronischen Asthma bronchiale**

Im Hinblick auf die dringend notwendige Möglichkeit prophylaktischer und therapeutischer Maßnahmen ist es essentiell, mehr über die Pathogenese der Chronifizierung des Asthma bronchiale zu erfahren. Viele pathophysiologische Zusammenhänge sind bislang nur unzureichend erforscht. Sie spielen aber eine entscheidende Bedeutung bei der Entwicklung neuer Medikamente und Behandlungsstrategien. Tierversuche sind von Nöten, da mit ihnen die Mechanismen der Erkrankung besser nachvollzogen werden und um direkt funktionelle Geschehnisse der Erkrankung manipulieren zu können. Vor allem ist es so möglich eine Chronologie der Asthmapathologie zu erstellen.

Gerade bei dem Versuch der Darstellung von Unterschieden zwischen akutem Inflamationsprozess und der Chronifizierung der asthmatischen Beschwerden ist dieser Aspekt wichtig. Auch zur Entwicklung und Testung von Medikamenten ist die Existenz von Tiermodellen derzeit noch unerlässlich.

Unter Berücksichtigung lungenphysiologischer und immunologischer Gesichtspunkte bietet die Maus als Modell eine Reihe von Vorteilen, wie zum Beispiel das Vorhandensein von Techniken zur Untersuchung immunpathologischer Zusammenhänge beim Asthma bronchiale und anderer Erkrankungen, wie die Head-out-body-Plethysmographie und das Vorhandensein von Kits zur Erstellung von ELISAs. Weitere Vorteile sind die Haltung der Tiere unter Kontrolle der Umweltbedingungen und die Möglichkeit der Untersuchung von Knock-Out- und transgenen Mäusen.

Seit einigen Jahren besteht ein etabliertes Modell, bei dem eine mehrfache kurzzeitige Exposition eines Allergens als Aerosol, welches durch die Atemwege aufgenommen wird, zu einer akuten allergischen Entzündung der Atemwege führt (Renz, 1992). Diese Inflammation wird aber nicht durch eine Langzeitprovokation hervorgerufen und hat nur einen akuten Charakter. Die Arbeitsgruppen, die sich mit einer chronischen Inflammation auseinandersetzten, konnten zwar eine

Chronifizierung der Entzündung mit verlängerter Dauer des inflammatorischen Infiltrats und vor allem auch mit Umbauvorgängen der Atemwege beobachten (Hogan, 1997; Temelkowski, 1998; Palmans, 2000; Kenyon, 2003), aber die Beschreibung einer Ausdehnung der Entzündung in periphere Abschnitte des Bronchialbaumes liegt bisher nicht vor.

Wir gehen davon aus, dass die Begrenzung der inflammatorischen Prozesse auf den proximalen Teil der Atemwege nur eine unzureichende Darstellung eines asthmatischen Phänotyps sein kann und dass eine Ausbreitung auch in die distalen Areale der Atemwege ein bedeutender Bestandteil der Chronifizierung der Erkrankung ist. Um also dem humanen asthmatischen Phänotyp näher zu kommen, müsste es gelingen, eine Inflammation aller Anteile der Atemwege, sowohl distal als auch proximal zu erreichen und darüber hinaus strukturelle Veränderungen in Form eines „*Airway Remodelling*“ durch längere Exposition zu induzieren. Als potentes Antigen zur Immunisierung und Sensibilisierung hat sich das Hühnereiweiß OVA erwiesen, welches seit mehreren Jahren etabliert ist (Renz, 1994).

### **1.9.1. Übertragbarkeit von Tiermodellen auf den Menschen**

Die Möglichkeit der Übertragung von Untersuchungsergebnissen aus Tiermodellen auf humane Erkrankungen ist limitiert. Zu achten ist neben pathophysiologischen Aspekten auch auf anatomische Unterschiede, welche zu unterschiedlicher Ausprägung von physiologischen Störungen führen können. Anatomisch und physiologisch gibt es zwischen Maus und Mensch eine sehr große Anzahl von Übereinstimmungen:

Sowohl bei der Maus als auch beim Menschen teilen sich die Atemwege in einen nasopharyngealen, einen tracheobronchialen und einen alveolaren Teil auf. Die Atemmechanik, die Lungenstruktur und die Struktur der Atemwege entsprechen einander im Grunde. So ist die Schichtung der Atemwegswände in eine Epithelschicht mit darunter liegender Basallamina, einem subepithelialen Bindegewebe, bestehend aus Fibroblasten, Myofibroblasten, Nervenfaserendigungen und extrazellulären Fasern sowie einer bronchialen



Muskelschicht, die von glatten Muskelzellen gebildet wird, bei beiden Spezies im wesentlichen identisch.

Unterschiede gibt es makroskopisch in der unterschiedlichen Lappenaufteilung bei Maus und Mensch. So hat die Mäuselunge nur einen linken Lobus, im Gegensatz zum Menschen, der zwei Lobi besitzt. Auf der rechten Seite besitzen Mäuse vier anstatt drei Lobi. Des Weiteren ist eine fehlende dichotome Teilung der Atemwege bei der Maus auffällig, welche beim Menschen charakteristisch ist. Zudem fehlen respiratorische Bronchiolen bei der Maus, bei der ausschließlich die Alveolen für den Gasaustausch verantwortlich sind.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Mäuse- und Menschenlunge anatomisch durchaus ähnlich sind, wenn man einmal von den Größenordnungen absieht, denn die Bronchiolen besitzen mit 0,01- 0,05 mm bei der Maus ein kleineres Kaliber als die humanen Alveolen mit durchschnittlich 0,2- 0,4 mm. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Größenunterschiede dargestellt.

**Tabelle 1.1: Anatomische Unterschiede der respiratorischen Organe bei Mensch und Maus**

	<b>Maus</b>	<b>Mensch</b>
Anatomie	re Lunge: 4 Lappen li Lunge: 1 Lappen	re Lunge: 3 Lappen li Lunge: 2 Lappen
Hauptbronchus	~ 1 mm	~ 10 - 15 mm
Bronchiolen	~ 0,01 - 0,05 mm	< 1 mm
Terminale Bronchiolen	~ 0,01 mm	~ 0,6 mm
respiratorische Bronchiolen	nicht vorhanden	~0,5 mm
Alveolen	~ 0,0039 - 0,0069 mm	~ 0,2 - 0,4 mm

Die Regulation des Immunsystems und die Effektormechanismen der allergischen Reaktion sind in weiten Teilen direkt von der Maus auf den Menschen übertragbar. Allerdings muss die Frage gestellt werden, ob die Hauptcharakteristika des menschlichen Asthma bronchiale auch im Mausmodell

angetroffen werden können und ob diese durch die selben Faktoren ausgelöst werden.

Zu den charakteristischen Faktoren des chronisch-allergischen Asthma, die hierbei verglichen werden, gehören:

- Atemwegsentzündung
- Gestörte Atemfunktion
- „Airway Remodelling“

Die Atemwegsentzündung ist auf zellulärer Ebene bei Mensch und Maus sehr ähnlich. Dabei kommt es zu einem Infiltrat der Atemwege, bei dem eosinophile Granulozyten und Th2-Zellen vorherrschen. Diese Entzündungszellen lassen sich nicht nur in den Lumina der proximalen und distalen Atemwege, sondern auch in deren Mukosa auffinden. Im Bereich des Zytokinmusters liegen ebenfalls Übereinstimmungen vor. Es herrscht bei den Effektorzellen ein IL-4, IL-5 und IgE dominiertes Milieu vor. Bei beiden Spezies wird die IgE-Produktion von Th2-Zellen über IL-4 und IL-13 gesteuert. Die Soforttypreaktion wird beim Menschen von IgE vermittelt, bei der Maus kommt es zusätzlich zu diesem Effekt zu einem Anstieg des IgG<sub>1</sub>.

Durch eine Bronchoobstruktion, vor allem der kleinen Atemwege, kommt es sowohl beim Menschen als auch bei der Maus durch eine Verkleinerung des Atemweglumens zu einer teilweise reversiblen Erhöhung des Atemwegwiderstands. Im Gewebe kommen im entzündlichen Infiltrat vor allem eosinophile und neutrophile Granulozyten, Th2-Zellen und dendritische Zellen vor. Die Epithelschädigung führt bei beiden Spezies zum „Airway-Remodelling“ (Hellings, 2004).

Tabelle 1.2: Entzündungsspezifische Charakteristika bei Mensch und Maus

	Mensch	Maus
<b>IgE-Produktion</b>	• T-Zell abhängig	
	• IL-4, IL-13	
	• IFN- $\gamma$	
<b>Vermittlung der Typ I-Reaktion durch</b>	• IgE	• IgE, IgG1
<b>Zytokinproduktion nach Allergen-Stimulation in vitro</b>	• IL-4	
	• IL-5	
	• TNF- $\alpha$	
	• IFN- $\gamma$	
<b>Zellinfiltrat in der Atemwegsmukosa</b>	• Eosinophile	
	• T-Zellen	
	• Neutrophile	
	• DC	
<b>Entzündungsprofil in der BAL-Flüssigkeit</b>	• Eosinophile Granulozyten	
	• T-Zellen	
	• IL-4	
	• IL-5	
	• IFN- $\gamma$	
<b>Atemwegsfunktion</b>	• bronchiale Hyperreagibilität	
	• akute Bronchoobstruktion	

## 1.10. Ziele der Arbeit

Das allergische Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Atemwegserkrankung, deren komplexer Phänotyp durch eine chronisch-allergische Entzündung, eine erhöhte Mukusproduktion, die Entwicklung einer bronchialen Hyperreagibilität, sowie strukturelle Veränderung der Atemwege charakterisiert wird. All diese Faktoren führen zu einem erhöhten Atemwegwiderstand, welcher die typischen asthmatischen Symptome hervorruft.

Bei dieser Arbeit wurde ausschließlich auf die allergische Form des Asthma bronchiale eingegangen. Ziel dieser Arbeit war es, ein Mausmodell für ein chronisch-experimentelles Asthma bronchiale zu generieren, welches als Basis für neue Behandlungsstrategien dienen kann. Dazu ist ein möglichst vollständiger Phänotyp auszuprägen, der dem des humanen Asthmatikers entspricht. Wir wählten Mäuse des Balb/c-Stammes, da eine ausgeprägte Entzündungsreaktion auf Allergene bei diesen Tieren bekannt ist (Herz, 1998). In mehreren Arbeiten wurden bisher akute Modelle einer allergischen Atemwegsentszündung beschrieben, welche sich aber zumeist auf die proximalen Anteile der Lungen beschränkten. Ausgehend von einem dieser akuten Modelle (Renz, 1989), haben wir ein Protokoll der chronischen Atemwegsprovokation entwickelt, mit welchem wir dem oben angesprochenen Phänotyp näher gekommen sind. Als Kriterien für unser Bemühen, eine chronische Inflammation der Atemwege zu demonstrieren, wurden folgende Faktoren festgelegt:

- 1) eine atopische Komponente, die durch den Anstieg des systemischen Gesamt-IgE und insbesondere durch den Anstieg des allergenspezifischen IgE-Titers als Sensibilisierungskontrolle durchgeführt wurde;
- 2) der entzündliche Aspekt einer manifesten, von Th2-Zellen und eosinophilen Granulozyten dominierten allergischen Atemwegsinfammation in distalen und proximalen Teilen der Atemwege;
- 3) eine Ausdehnung der entzündlichen Vorgängen in distalen und proximalen Lungenanteilen;
- 4) eine Hyperplasie der Becherzellpopulation mit einhergehend gesteigerter Mukussektion;

- 5) eine Chronifizierung des Beschwerdebildes durch den Atemwegsumbau, mit subepithelialer Fibrose und Einwanderung von Myofibroblasten in die Wände der kleinen Atemwege;
- 6) eine zunehmende, inkomplett reversible Atemwegsobstruktion;
- 7) eine persistierende Hyperreagibilität.

Hierzu wurden Balb/c-Mäuse mit einem artfremden Protein intraperitoneal sensibilisiert und anschließend an zwei aufeinander folgenden Tagen jede Woche über einen Zeitraum von 12 Wochen mit eben diesem Protein über die Atemwege exponiert. Nach Ablauf des Expositionsprotokolls wurde die Entzündung innerhalb der Atemwege durch die morphologische Untersuchung des leukozytären Infiltrats der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BAL), sowie durch eine Analyse der Entzündung im Gewebe mittels Lungenhistologie charakterisiert. Anhand der Bestimmung spezieller Zytokinkonzentrationen in der BAL konnte die Art der T-Zell-Population näher beschrieben werden.

Mit immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Techniken wurden die Atemwege auf mögliche Strukturveränderungen untersucht. Abschließend sollten durch die Head-Out-Body-Plethysmographie lungenphysiologische Parameter aufgezeichnet werden, die durch eine persistierende oder akute Bronchoobstruktion und mögliche Strukturveränderungen der Atemorgane hervorgerufen werden können.

## **2. Material und Methoden:**

### **2.1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung**

In allen Experimenten wurden weibliche, pathogenfreie BALB/C Mäuse (Harlaan Winkelmann, Hannover, D) verwendet. Die Tiere wogen 18-22 Gramm und waren zu Beginn des Versuchs 6-8 Wochen alt. Gehalten wurden die Mäuse unter Standardbedingungen in Käfigen, mit je 6 Tieren, in den tierexperimentellen Einrichtungen des Instituts mit einem 12 Stunden Lichtrhythmus. Sie wurden einer Ovalbumin- (OVA) freien Diät unterzogen, bei der sie jederzeit Zugang zu Futter und Wasser hatten. Vor Beginn der Experimente wurden die Tiere eine Woche lang in der Versuchsräumen akklimatisiert.

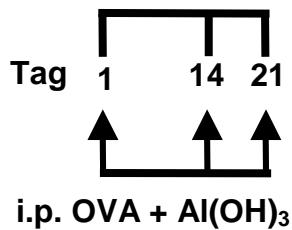
### **2.2. Protokoll zur Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung**

Zur Entwicklung einer allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge ist eine Sensibilisierung von Nöten. Durch intraperitoneale OVA-Injektion (OVA grade VI, Sigma, Deisenhofen, D), werden die Mäuse an den Tagen 1, 14 und 21 des Experiments sensibilisiert. 10 µg des Proteins sind an 1,5 Gramm des Adjuvands Aluminiumhydroxid ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) (Pierce, Rockford, USA) gebunden und in 200 µl PBS gelöst.

Die Exposition der Tiere erfolgt zweimal wöchentlich an aufeinanderfolgenden Tagen (Montag und Dienstag), wobei die Mäuse einem Aerosol aus 1% OVA (OVA grade V, Sigma, Deisenhofen, D) in PBS ausgesetzt werden, welches sie durch den Respirationstrakt aufnehmen. Dieses geschieht über einen Zeitraum von bis zu 12 Wochen, für jeweils 20 Minuten in einer mit Streu ausgelegten Expositions-kammer. Die Exposition findet erstmals am 26. Tag des Versuchsprotokolls und zum letzten und 24. Male an Tag 104 statt. Bei jeder Exposition werden 3 ml des Aerosols maschinell, mit einem Pari-Boy (Pair-Boy, Pari-Werke, Starnberg, D) vernebelt. Zur Entlüftung wird eine Absaugpumpe angeschlossen, die einen Stau des Aerosols durch einen gleichmäßigen Sog von 14 Litern pro Minute verhindert. Die Kontrollgruppe wird entsprechend dazu mit sterilem PBS mit  $\text{Al}(\text{HO}_3)$  sensibilisiert und mit PBS als Aerosol exponiert.

Für die Untersuchungen stehen 25 Mäuse der Kontrollgruppe und 40 OVA-sensibilisierte Mäuse zur Verfügung.

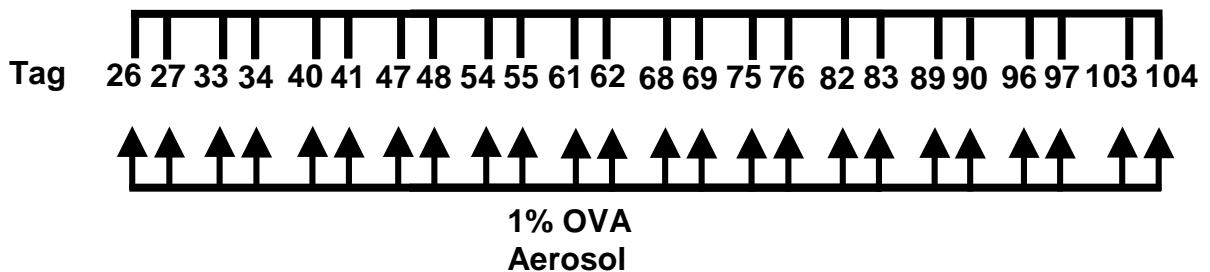
### Protokoll: Tiermodell Chronisches Asthma



#### Gruppe:

OVA → OVA + Al(OH)<sub>3</sub> / 1% OVA Aerosol

Kontrolle → Al(OH)<sub>3</sub> / PBS Aerosol



#### Untersuchungen

- 1) Lungenfunktion: a) Baseline/ EF50 (0., 2., 4., 6., 8., 10., 12. Woche)  
 b) bronchiale Hyperreagibilität (0., 4., 8., 12. Woche)  
 c) Akute Bronchoobstruktion (0., 4., 8., 12. Woche)

- 2) Histologie: a) Lunge (HE/PAS/EvG)  
 b) Lunge (Immunfluoreszenz)  
 c) BAL (Quick Diff /Zytokine)  
 d) Elektronenmikroskopie
- } 0., 4., 8., 12. Woche

Abbildung 2.1: Sensibilisierungs- und Expositionsprotokoll

## **2.3. Gewinnung von Probematerial**

### **2.3.1. Gewinnung der Serumproben**

Um zu zeigen, dass die Tiere auf die intraperitonealen Injektionen mit OVA und dem Adjuvanz  $\text{Al}(\text{OH})_3$  mit einer Allergen-spezifischen Antikörperproduktion reagieren, werden die Allergen-spezifischen IgE, IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2</sub> Antikörperkonzentrationen im Serum der Mäuse mittels ELISA analysiert (Neuhaus-Steinmetz, 2000). Dies wird durchgeführt, um den Nachweis für eine erfolgreiche Immunisierung zu erhalten. Monoklonale Ratten-Antimäus-Antikörper gegen IgE, IgG1, IgG2 und die benötigten Standards werden bezogen von Pharmingen (Hamburg, D).

Die Tiere werden in einer Wärmekammer bei bis zu 50°C für 10 Minuten erwärmt, um eine periphere Dilatation der Gefäße zu erreichen. Anschließend wird mit einem kleinen chirurgischen Skalpell die dann gut sichtbare Vene im proximalen Drittel des Schwanzes angeritzt. Bei richtigem Druck fließt nun Blut tropfenweise aus der Wunde und kann in einem Eppendorf-Cap aufgefangen werden. Die Läsion am Mäuseschwanz wird noch einige Zeit komprimiert, um ein Nachbluten zu verhindern. Pro Maus werden so zwischen 350 und maximal 550 µl Material gewonnen. Zur Entnahme werden nur Tiere herangezogen, die am selben Tag noch präpariert werden. Die Proben werden bei Raumtemperatur (RT) für 3 Stunden bis zur vollständigen Gerinnung inkubiert. Das Material wird für 20 Minuten bei 2000g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und anschließend bei -20°C zur Untersuchung gelagert.

### **2.3.2. Gewinnung der broncho-alveolären Lavage (BAL)**

Zur Darstellung des inflammatorischen Entzündungsinfiltrats in den Atemwegen wird die BAL als Methode gewählt, da hiermit das Lungengewebe nicht geschädigt wird und auch danach noch zur histologischen Darstellung herangezogen werden kann. Diese Methode ermöglicht die Gewinnung des luminalen Entzündungsinfiltrats durch eine Spülung des Respirationstraktes mit einer Flüssigkeit, die sich in allen Teilen der Atemweglumina verteilt. Balb/c-



Mäuse, welche nach obigem Schema exponiert worden sind, werden nach 1, 4, 8 und 12 Expositionswochen eine Stunde nach der letzten Methacholin- (MCh) Provokation durch Zervikaldislokation getötet und deren Lungen lavagiert. Vorteil hierbei ist die Beurteilung aller luminaler Anteile der Atemorgane und somit auch von peripheren Zonen der Lungen, welche durch andere Methoden, wie zum Beispiel der transtrachealen Biopsiegewinnung nicht gelänge.

Die zuvor präparierte und distal abgeklemmte Trachea wird mit einer 20 G Kanüle kanüliert. Anschließend wird über eine 1ml Spritze, mit 800µl eiskaltem PBS, pH 7,6 (4°C, PAA No H15-002) vermischter Protease-Inhibitor (complete<sup>TM</sup> Mini, Roche, Mannheim, D) langsam appliziert und danach wieder aspiriert. Dieser Vorgang wird 2 Mal durchgeführt, so dass etwa  $1,4 \pm 0,2$  ml Probenmaterial pro Versuchstier gewonnen werden. Die Flüssigkeit wird sofort auf Eis gelegt, um mögliche Stoffwechselforgänge, die das Zytokinmuster beeinträchtigen könnten, zu unterbinden.

#### **2.4. Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinen mittels Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**

Zur Demonstration der erfolgten Sensibilisierung der Tiere mit OVA werden die Serumkonzentrationen der OVA-spezifischen Immunglobuline ( $OVA_{spec}Ig$ ) der Subklassen IgE, IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2a</sub> mittels Sandwich-ELISA gemessen (Herz, 1998). Dies ist nach dreifacher intraperitonealer Injektion von hochreinem OVA (OVA Grade VI) der pathogenfrei gehaltenen Balb/c-Mäuse erfolgt. Hierzu wird zunächst eine Flachboden-Mikrotiterplatte (MaxiSorp<sup>TM</sup> Surface, 96 Kavitäten, Nunc, Roskilde, DK) mit einer OVA-Lösung (OVA Grade VI, 20 mg/ml PBS, 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>) beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Lösung wird verworfen und die Platte dreimal mit Waschpuffer (PBS mit 0,1% TWEEN (Merck, Darmstadt, D)) gewaschen. Die übrigen Bindungsstellen werden mit einem Block-Puffer (PBS mit 3% Bovines Serum Albumin (BSA) (Sigma, Steinheim, D)) in einer 3-stündigen Inkubation bei RT abgesättigt. Im nächsten Schritt werden die Serumproben entsprechend der zu messenden Ig-Subklassen verdünnt (für  $OVA_{spec} IgE$  1:20, für  $OVA_{spec} IgG_1$  1:1000 und für  $OVA_{spec} IgG_{2a}$  1:500 000) und von dieser Verdünnung sowie von den Ig-Standards (Standard-Mausserum, Anti-

OVA IgG<sub>1</sub> bzw. Anti-OVA IgG<sub>2a</sub> (Pharmingen, Hamburg, D)), 50 µl aufgetragen. Die Ig-Standards werden in folgenden Konzentrationen aufgetragen: Anti-OVA IgE 8-1000 LU, Anti-OVA IgG<sub>1</sub> 88 pg/ml - 88 ng/ml, Anti-OVA IgG<sub>2a</sub> 88 pg/ml - 88 ng/ml. Im Anschluss wird erneut bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen werden 50 µl biotinylierte Anti-Maus IgE-, Anti-Maus IgG<sub>1</sub>- bzw. Anti-Maus IgG<sub>2a</sub>-Antikörper (2,5 µg/ml, Anti-Maus IgE, Anti-Maus IgG<sub>1</sub> bzw. Anti-Maus IgG<sub>2a</sub>, biotinyliert (Pharmingen, Hamburg, D)) hinzugegeben und für 2 Stunden bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Auf erneutes dreimaliges Waschen folgt die Hinzugabe von 50 µl Streptavidin-Peroxidase-Lösung (1:1000 in PBS (Sigma, Steinheim, D)). Die Platte wird danach für 30 Minuten bei RT auf einem Schüttler inkubiert, bevor 100 µl POD-Substratlösung (BM blue POD Substrate (Roche, Mannheim, D)) aufgetragen werden. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT und unter Lichtabschluss wird die eintretende Farbreaktion mit dem Hinzufügen von 50 µl 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, D) abgestoppt. Letzteres bewirkt einen Farbumschlag von blau nach gelb, dessen Absorption bei 450 nm in einem Absorptionsphotometer (Tecan Sunrise, Salzburg, A) gemessen wird. Die Auswertung der Analyse erfolgt unter Zuhilfenahme der Photometersoftware Magellan 2 (Tecan, Salzburg, A).

## **2.5. Quantifizierung und Differenzierung von Leukozytensubpopulationen der BAL**

Die Bestimmung der Zellkonzentration in der BAL, bestehend aus Proteaseinhibitor, gelöst in PBS, und gewonnenem zellulären Infiltrat, wird mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt (Kammerfaktor  $1 \cdot 10^4$ ). Dazu werden 40 µl der BAL-Flüssigkeit mit 10 µl Tryptanblau-Lösung vermischt und nach 3 Minuten ausgezählt. Der Mittelwert wird errechnet, indem jeweils vier Kleinquadrate ausgezählt werden und die Zellzahl durch die Formel:

$$\text{Anzahl der Zellen} \cdot \text{Verdünnung} \cdot 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

ermittelt wird.

Im Anschluss an die Quantifizierung wird ein Teil der Flüssigkeit zytozentrifugiert. Hierdurch werden die Zellen fixiert, um sie anschließend mikroskopisch differenzieren zu können. Bei diesem Verfahren werden 50 µl der bronchoalveolären Lavage mit 150µl PBS vermischt und 5 Minuten lang bei 320 g auf Objektträger zentrifugiert (Cytospin 3, Shandon, USA). Diese werden nach dem Vorgang 30 Minuten lang an der Luft getrocknet und danach mit Diff-Quick® (Dade AG, Düdingen, CH) gefärbt. Nach einem erneuten Trocknungsvorgang werden die Präparate mikroskopisch nach morphologischen Kriterien differenziert. Dieses geschieht bei einer 400-fachen Vergrößerung. Das Infiltrat der Atemweglumina wird nach morphologischen Kriterien unter dem Mikroskop differenziert in Makrophagen, Lymphozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten.

Neutrophile Granulozyten kommen nur in sehr geringer Zahl und nur in sehr wenigen Lungen vor, so dass sie in der weiteren Betrachtung außer Acht gelassen werden.

## **2.6. Konzentrationsbestimmung von Zytokinen der BAL mittels Cytometric Bead Array (CBA)**

Nach Zählung der zellulären Bestandteile wird die BAL bei 300g 5 Minuten zentrifugiert und der zellfreie Überstand in spezielle Caps pipettiert. Der Überstand wird bis zur Analyse der Zytokine bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren und aufbewahrt. Die Konzentration verschiedener Zytokine (IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ ) aus dem zellfreien BAL-Überstand der OVA-exponierten Tiere, sowie der Mäuse der Kontrollgruppe wird mittels CBA-Technik ermittelt. Die Grundlage für die Messung dieser Zytokine bilden fünf verschiedene Arten von Latexpartikeln, welche mit unterschiedlichen Antikörpern beschichtet sind, die spezifisch eines der Zytokine binden. Jede der fünf Partikelarten zeigt bei der Anregung durch einen Laser (488 nm) eine spezifische Fluoreszenzintensität; so dass jede Intensität speziell einem der Zytokine zuzuordnen ist. Nach Zugabe der Proben bzw. der verschiedenen Zytokinstandards, wird ein zweiter Phyto-Erythrin-konjugierter Antikörper hinzugefügt. Die Probenlösung wird dann durch einen FACScan (Becton Dickinson, USA) und Becton Dickinson Software ausgewertet. Die Anregung durch den Laser verursacht bei jedem der Partikel, der eines der

fünf Zytokine spezifisch an der Oberfläche gebunden hat, zwei unterschiedliche Fluoreszenzsignale: zum einen lassen sich aufgrund der Antikörperspezifität und der Eigenfluoreszenz der Zytokine diskriminieren (FL3: 670 nm), zum anderen kann anhand der PE-Fluoreszenzintensität der gebundene Sekundärantikörper (FL1:488 nm) auf die Konzentration der unterschiedlichen Zytokine geschlossen werden.

Zur Analyse werden spezielle Kits angewendet (Mouse TH1/TH2 Cytokine CBA Kit (Pharmingen, Becton, Dickinson, USA)). Zunächst werden zu 50µl der antikörperbeschichteten Latexpartikel 50 µl des unverdünnten, zellfreien BAL-Überstandes oder eine der Standardverdünnungen hinzugegeben. Als Zytokinstandards werden neun Verdünnungen im Bereich von 20- 5000 pg/ml benutzt. Im nächsten Arbeitsschritt werden 50 µl des PE-konjugierten Sekundärantikörpers hinzugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einem abgedunkelten Zimmer inkubiert. Danach wird einmal mit Waschpuffer gewaschen, wobei die anschließende 5 Minuten dauernde Zentrifugation bei 200 g erfolgt. Das Beadpallet wird in 300 µl Waschpuffer resuspendiert. Vor der anschließenden Analyse im FACScan muss die Probe 3-5 Sekunden durchmischt werden. Der Mediator TGF-β1 wird mit einem Standard ELISA unter zu Hilfenahme von Hühner anti Mensch-TGFβ<sub>1</sub> (R+D Systems) gemessen (Renz, 1994).

## **2.7. Lungenhistologie**

Die histologischen Untersuchungen finden an den zuvor lavagierten Atemorganen statt, was möglichst gewebeschonend durchgeführt wurde. Die Organe werden nach der Broncho- alveolären Lavage mit 4% Formaldehyd in situ fixiert, aus dem Thorax entfernt und anschließend in 4% Formaldehyd gelagert. Aus den in Paraffin eingebetteten Proben werden Dünnschnitte von 3 µm Dicke hergestellt (Accu-Cut SRM 200 Rotary microtome (Sakura, Japan)), welche anschließend mit Hämotoxylin und Eosin angefärbt werden.

Um die Inflammation der Atemwege darzustellen werden Atemorgane der Balb/c-Mäuse im Anschluss an die Lavage in situ mit 4% (wt/vol) Formaldehyd (Merck,

Darmstadt, D), welches durch die Trachea appliziert wird fixiert und in speziellen Plastikbehältern in der selben Lösung aufbewahrt. Diese mit Haematoxilin (Hämatoxilin II nach Gill, Merck, Darmstadt, D) und Eosin (Eosin G, Merck, Darmstadt, D) gefärbten Schnitte dienen der Darstellung des entzündlichen Infiltrats. Bei dieser Färbung stellt Hämatoxylin das Chromatin der Zellkerne blau und Eosin das Zytoplasma und die Intrazellulärsubstanz rosa bis rot dar. Dazu deparaffiniert man die Proben mit Xylol und absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 90 %, 70 % v/v). Danach werden die Proben mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend 8 Minuten lang mit Haematoxilin gefärbt. Nach einem weiteren Waschvorgang unter warmem, fließendem und anschließend destilliertem Wasser werden die Präparate 5 Minuten in Eosin gefärbt, um danach mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70, 96, 100% Ethanol) entwässert zu werden. Anschließend werden sie noch mit Histomanit zum Schutz eingedeckelt.

Zur Verdeutlichung der bronchialen Mukushypersekretion in den Atemwegen werden weitere Schnitte einer Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS-Färbekit, Merck, Darmstadt, D) unterzogen. Dabei werden Kohlenhydrate mit der Periodsäure oxidiert. Die entstehenden Aldehydgruppen ergeben mit Schiffs-Reagenz die charakteristische Rotfärbung. Dadurch können Zellen, die Mukus enthalten, angefärbt werden, da der Schleim, bestehend aus reduzierenden Polysacchariden, neutralen Mukopolysacchariden und Muko- und Glykoproteinen, nach der Prozedur an der intensiven roten Farbe zu erkennen ist. Auch hierfür müssen die Schnitte vorerst durch eine absteigende Alkoholreihe vom Paraffin befreit werden. Nach Waschung mit destilliertem Wasser wird zunächst 5 Minuten mit Perjodsäure gefärbt. Nachdem die Präparate nun 3 Minuten unter fließendem Wasser gereinigt werden, gelangen sie im nächsten Schritt für 15 Minuten in Schiffs-Reagenz. Auch danach werden sie wieder unter fließendes Wasser gehalten und zusätzlich mit destilliertem Wasser gewaschen. Als Gegenfärbung wird bei diesen Schnitten Haematoxilin (Hämatoxilin II nach Gill, Merck, Darmstadt, D) verwendet, wozu sie 2 Minuten in Haematoxilin gefärbt werden und anschließend wieder mit einer ansteigenden Alkoholreihe entwässert werden. Bei der PAS-Färbung ist zu beachten, dass die Lungen aus denen die angefärbten Schnitte angefertigt werden zuvor lavagiert wurden, was

Auswirkungen auf die intraluminale Verschleimung, aber nicht auf die intrazellulären Mukuskonzentration hat.

Eine Sirius-Red/Fast-Green-Färbung wird verwendet, um fibrilläres Kollagen in den Atemorganen spezifisch anfärben zu können. Dazu werden entparaffinierte Schnitte 30 Minuten bei RT in einer gesättigten Pikrinsäure-Lösung (Fluka Chemie, Buchs, CH) mit 0,1% Sirius-Red (C.I. 35780, Polysciences, Warrington, USA) und 0,1% Fast Green (FCF, Sigma-Aldrich, Stainheim, D) inkubiert und im Anschluss unter fließendem Wasser abgespült. Mit dem Farbstoff Sirius-Red kann spezifisch fibrilläres Kollagen nachgewiesen werden, da sich dieser spezifisch in die Tripel-Helix-Struktur des Kollagenmoleküls einlagert. Die Fast-Green-Färbung dient als Gegenfärbung.

## **2.8. Quantifizierung und Differenzierung der Leukozytensubpopulationen in den Atemwegswänden**

Zur Bestimmung des zellulären Infiltrats im Lungengewebe werden aus zuvor paraffinierten Lungen Schnittpräparate angefertigt. Diese Präparate werden zur mikroskopischen Auswertung einer Haematoxilin- und Eosin-Färbung unterzogen, um eingewanderte Zellen morphologisch differenzieren zu können. Im Gegensatz zu der BAL, bei der lediglich die Zelle in den Atemwegslumina quantifiziert und näher qualifiziert werden, können in der mikroskopischen High Powerfield (HPF) Auszählung die gewebliche Infiltration, der in das Atemwegsgewebe penetrierten Entzündungszellen, verdeutlicht werden. Dazu werden vom Untersucher mehrere repräsentative Abschnitte der Proben ausgezählt und die Ergebnisse gemittelt. Dieses geschieht ohne Kenntnisse über Zugehörigkeit des mikroskopischen Präparates zu Kontrollgruppe oder zu Dauer der Exposition, um die Objektivität des Untersuchers zu gewährleisten. Zusätzlich kann mit dieser Methode die Analyse eines Infiltrats auch in proximale und distale Kompartimente der Atemwege eingeteilt werden. Auch hier werden Präparate der Kontrollgruppe und der OVA-Gruppe in der 1., 4., 8. und 12. Expositionswoche angefertigt und beurteilt.

## **2.9. Immunhistologie**

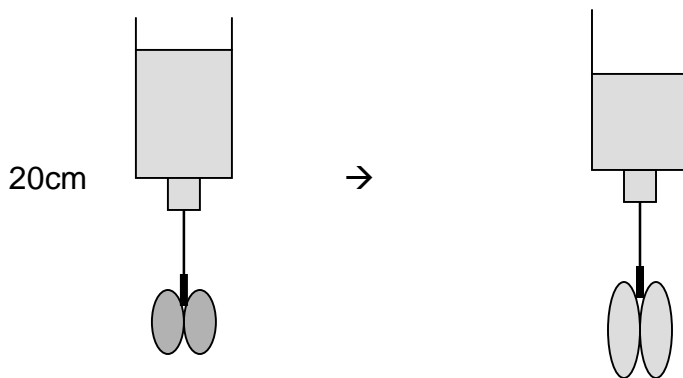
Die immunhistochemische Darstellung wird zur Anfärbung von Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Myofibroblasten durchgeführt. Die Atemorgane werden in situ mit 0,9 ml Tissue Tek (SAKURA, Vogel, Giessen, D) unter Zuhilfenahme einer Kanüle gefüllt, mit Tissue Tek von außen benetzt und anschließend in Flüssigstickstoff eingefroren. Gelagert werden die Organe bis zur weiteren Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Zum Schneiden werden die Präparate zunächst bei Raumtemperatur bis zu 24 Stunden aufgetaut und getrocknet. Danach werden sie 10 Minuten in Aceton inkubiert und wieder an der Luft getrocknet, um sie mit dem Mikrotom (Micron Laborgeräte, Walldorf, D) in 3  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte teilen zu können.

Fibroblasten werden durch monoklonales Ratten IgG gegen „fibroblast-specific peptide“(Klon ER-TR7, Biogenesis, Poole, GB) dargestellt, glatte Muskelzellen und Myofibroblasten durch monoklonales Maus IgG gegen  $\alpha$ -smooth muscle actin (Klon 1A4, Immunotech, Marceilles, F). Diese Methode wurde im Labor von Herrn Prof. Dr. H. Fehrenbach (Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt, Pneumologie, Klinikum der Philipps-Universität, Marburg) durchgeführt.

## **2.10. Bestimmung des Lungenvolumens**

Diese Art der Präparation der Lunge wird zum einen zur Bestimmung des Lungenvolumens, zum anderen zur Herstellung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie verwendet. Die vergleichende Analyse der Ultrastruktur ist nur an standardisiert entfalteten Lungenpräparaten möglich. Die eigentliche elektronenmikroskopische Analyse der Lungenpräparate wurde im Labor von Herrn Prof. Dr. H. Fehrenbach ausgeführt. Zur Bestimmung des Lungenvolumens der OVA-exponierten Mäuse, werden die nicht lavagierten Lungen freipräpariert, die glatte Muskulatur um die Trachea entfernt und in die eröffnete Luftröhre ein Trachealkatheter eingeführt. Dieser wird mittels einer Ligatur an der Trachea fixiert und nach Entnahme der Organe aus dem Thorax an ein Schlauchsystem angeschlossen. Angeschlossen an die Lungen ist so ein Fixativgefäß mit einer Fixationsflüssigkeit aus 0,1 molarem Cocadylatpuffer, mit 1,5% Formaldehyd und

1,5% Glutaraldehyd. Die Flüssigkeit hat eine Osmolarität von 600 mOsmol/kg und der pH liegt bei 7,35. Der Abstand zwischen Flüssigkeitsspiegel und Bifurcatio tracheae beträgt dabei 20 cm. Nun wird langsam Flüssigkeit in die Lunge laufen gelassen bis sich die Lungen komplett entfaltet haben. Die Lungen werden 20 Minuten in diesem Zustand belassen, wobei durch Nachfüllen des Fixativs ein konstanter Druck von 20 cm Fixativsäule gewährleistet wird. Im Anschluss werden die Tracheen unterhalb der Kanüle abgebunden und die vollständig entfalteteten Organe bei 4°C in Fixativ bis zur Volum enbestimmung gelagert.



**Abbildung 2.2: Bestimmung des Lungenvolumens durch hydrostatischen Druck**

## **2.11. Lungenpräparation unter standardisierten Bedingungen für die Elektronenmikroskopie**

Anschließend an die Volumenbestimmung werden im Institut für Pathologie von Herrn Prof. Dr. H. Fehrenbach elektronenmikroskopische Bilder der Atemwegsstrukturen angefertigt (Fehrenbach, 2002).

## **2.12. Messung der Lungenfunktion**

### **2.12.1. Aufbau der Messapparatur**

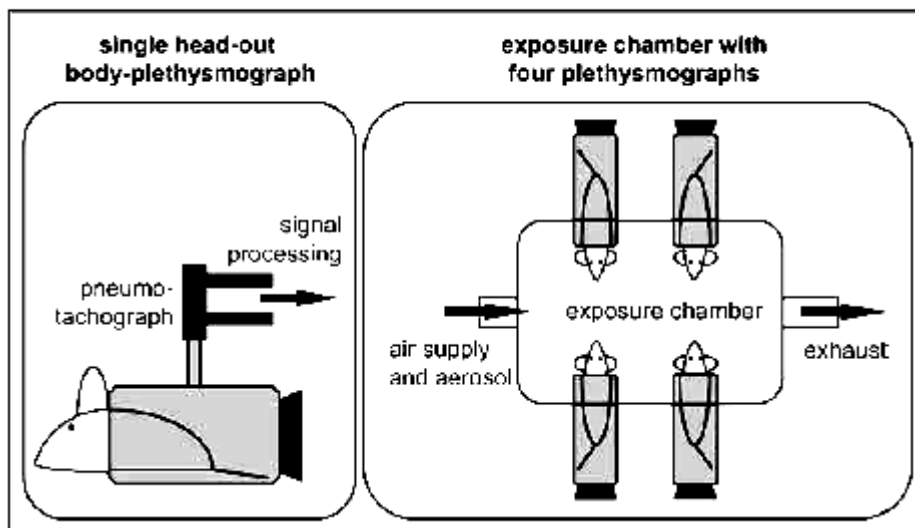
Die Messung der atemphysiologischen Parameter findet in einer Glasexpositions-kammer statt, in welche 4 Plethysmographen (Forschungsstätten, Medical School Hannover, D) eingefügt werden können. Die atemphysiologisch relevanten Daten werden so von bis zu 4 Tieren gleichzeitig ermittelt. Diese



Apparatur besteht aus einer 2,5 Liter fassenden Expositionskammer, die über einen Eingang be- und einen Ausgang entlüftet wird. Auch Aerosole können hier vernebelt und in die Kammer geleitet werden. Die Entlüftung der Kammer geschieht mit Hilfe einer Pumpe. Diese erzeugt einen Sog von 14 l/min. Jede Maus befand sich bei den Messung mit dem Thorax in einem so genannten Head-out-Body- Plethysmographen.

Der Köpfe der Tiere ragen durch eine, aus Latex individuell für die Tiere angefertigte, Manschette in das Lumen der Expositionskammer. Diese Manschette, (9mm ID, dental latex dam, Roeko, Langenau, D), besitzt ein kreisrundes Loch in der Mitte für den Mäusekopf und ist durch ein Gewebeband verstärkt, um ein Einreißen der Latexmanschette zu verhindern. Das Latex dient der möglichst luftdichten Abtrennung von Mäusekopf und Thorax. Ein Drehverschluss ermöglicht die luftdichte Verschließung der Plethysmographen nach hinten.

## Head-out body-plethysmograp



**Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau des Head-out Body-Plethysmographen (Nach: Wegmann. Animal Models of Experimental Asthma. Axel Springer Verlag 2004)**

Bei der Atmung kommt es zu Bewegungen des Mäusethorax. Bei der Inspiration wird Luft im Plethysmographen komprimiert, bei der Expiration gedehnt. Diese

Druckunterschiede führen zu einem Luftstrom im Ableitungsrohr, an welches ein Pneumotachograph (PTM 378/0.9, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D) anzuschließen ist. Dieses Instrument misst das Druckgefälle und leitet plethysmographisch das Atemflusssignal ab. Dies geschieht in Verbindung mit einem Differentialdruckwandler (DP 45/14, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D), welcher an ein Potentiometer (CFBA, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D) angeschlossen ist. Über einen A/D Konverter (DT 301 PCI D/A converter, Data translation, Marlboro, MA, USA) wird das Signal mit einer Rate von 225000/s übertragen. Der Druck in der Kammer entspricht den Fluktuationen am Pneumotachographen und ist somit der Atemstromstärke direkt proportional.

In 15 Sekunden dauernden Perioden werden die Atemflusssignale eines jeden Atemzuges gesammelt, ausgewertet, gemittelt und oszillographisch dargestellt. Die lungenphysiologischen Parameter: Atemzugvolumen, halbmaximaler expiratorischer Atemfluss ( $FE_{50}$ ), Frequenz, Inspirations- und Expirationszeit werden durch die HEM 3.5 Software (Notocord, Croissy sur Seine, FR) und ein Microsoft EXEL Programm analysiert und gespeichert.

### **2.12.2. Messablauf**

Bei der Messung werden zur gleichen Zeit automatisch unterschiedliche lungenphysiologisch wichtige Parameter aufgezeichnet. Neben der Atemfrequenz werden die Expirationszeit, die Inspirationszeit, also die Dauer von der Spitze der Atemflussskurve bis zur Basis der Atemflussskurve und anders herum, das Atemzugvolumen und der halbmaximale expiratorische Atemfluss ( $FE_{50}$ ) und damit der Atemfluss in der Mitte der Expirationsphase gemessen. Die Mäuse werden vor Start der Untersuchung zur Beruhigung 10 Minuten in der Messapparatur belassen, da die Tiere nach Unterbringung in den Plethysmographen teilweise sehr unruhig sind und unverhältnismäßig starke Bewegungen der Tiere eventuell eine Beeinflussung der Ableitung der Atemwegparameter zu Folge haben könnten. Zu Beginn einer jeden Messung wird zunächst 15 Minuten lang die sogenannte Baseline  $X \pm SD$  für den  $EF_{50}$  ermittelt. In diesen 15 Minuten atmet die Maus ungefähr 4000 Mal ein und aus.

Alle während dieser Messperiode aufgenommenen Werte werden gemittelt und gleich 100 gesetzt. Somit werden entsprechend abweichende Werte während der Messperiode gegenüber diesen Kontrolldaten als prozentuale Abweichungen von der Baseline erfasst. Auch während der eigentlichen Messung findet eine kontinuierliche Messung der Parameter statt (500/sec). Die Auswertung am Computer mit Microsoft EXEL erfolgt alle 15 Sekunden.

Zusätzlich zu den Untersuchungen von AHR und ABO wurde die Baseline noch in den Wochen 2, 6 und 10 dokumentiert, um diesen Wert im Verlauf über den gesamten Untersuchungszeitraum in 2wöchigen Abständen vorliegen zu haben. Bei all diesen Untersuchungen wurde der  $EF_{50}$  als Verlaufsparemeter verwendet.

### **2.12.3. Messung der AHR (Akuten Hyperreagibilität)**

Die Messung der akuten Hyperreagibilität (AHR) erfolgte 24 Stunden nach der letzten Allergenprovokation der jeweiligen Woche in der oben beschriebenen Expositions-kammer. Dazu wurde  $\beta$ -Methyl-Methacholin (MCh), ein Acetylcholin-Derivat, in PBS gelöst und mittels eines Pari-Boys (Pair-Boy, Pari-Werke, Starnberg, D) in der Expositions-kammer vernebelt. Durch dieses Pharmakon kommt es aufgrund einer Bindung an cholinerge Rezeptoren der glatten Atemwegsmuskulatur zu einer Konstriktion der Atemwege und einer vermehrten Produktion von Mukus in den Atemwegen. Daraus resultiert eine Obstruktion der Atemwege.

Dieser Provokationstest wird auch am Menschen durchgeführt, nur dass hier lediglich bis zu einem 20%igen Abfall des  $EF_{50}$  getestet wird, bevor ein Abbruch des Tests erfolgt. Im Mausmodell wird dieser Test bis zu einem Abfall von 50% des  $EF_{50}$  durchgeführt, bis die Untersuchung abgebrochen wird. Hierbei werden die Tiere mit einer aufsteigenden Reihe von MCh-Konzentrationen in einem Aerosol ausgesetzt. In Abständen von 4 Minuten und 40 Sekunden werden die Tiere für 70 Sekunden mit einem Aerosol provoziert. Begonnen wird mit reinem PBS, danach werden 12,5; 25; 50; 75; 100 und 150 mg/ml MCh-Lösungen vernebelt.

**Tabelle 2.1: MCh-Exposition zur Ermittlung der Atemwegsreagibilität**

MCh Konzentration	Beginn der Exposition
0 mg/ml (PBS)	Start
12,5 mg/ml	4 min 40 sec
25 mg/ml	9 min 20 sec
50 mg/ml	14 min
75 mg/ml	18 min 40 sec
100 mg/ml	23 min 20 sec
150 mg/ml	28 min

Die atemphysiologischen Parameter wurden dabei aufgezeichnet und die MCh-Konzentration, die einen 50%igen Abfall des halbmaximal expiratorischen Atemflusses  $MCH_{50}$  mg/ml ermittelt.

#### **2.12.4. Messung der ABO (Akuten Broncho-Obstruktion)**

Unter ABO versteht man eine konstriktorische Reaktion des Respirationstraktes auf ein spezifisches Allergen. Durch einen immunologischen Prozess kommt es zu einer Mastzelldegranulation und durch die ausgeschütteten Mediatoren innerhalb kurzer Zeit zu einer Veränderung der Atemwegsparameter. Die Messung der ABO erfolgt in den Wochen 1, 4, 8 und 12 jeweils entsprechend der zwei mal wöchentlichen OVA-Exposition am ersten Expositionstag der Woche (Montag). Hierzu werden je vier Tiere in der Allergenexpositions-kammer einem Aerosol aus 1% OVA in pathogenfreiem PBS ausgesetzt. Diese Prozedur dauert 20 Minuten, während dieser Zeit werden die Atemwegsparameter der Tiere abgeleitet. Fällt der  $EF_{50}$ -Wert der Tiere für länger als drei Perioden (45 Sekunden) unter 50% wurde die Provokation für diese Maus beendet, um das Tier nicht unnötigen Belastungen auszusetzen. Bei der Untersuchung der ABO wurde als relevanter Parameter der  $EF_{50}$ -Wert beobachtet, zusätzlich aber alle anderen oben genannten Parameter aufgezeichnet.

### 2.13. Statistik

Die graphische, sowie statistische Auswertung wurde unter Verwendung von Microsoft Excel sowie von GraphPad Prism® durchgeführt. Sämtliche Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) angegeben. Zur Überprüfung von Unterschieden zwischen den Vergleichsgruppen auf statistische Signifikanz wurde der ANOVA-Test verwendet. Der p-Wert wird dabei als Signifikanzniveau festgelegt. (\* entspricht  $< 0,05$ ; \*\* entspricht  $< 0,01$ ; \*\*\* entspricht  $< 0,001$ )

### 3. Ergebnisse:

#### 3.1. Kontrolle der erfolgten Sensibilisierung durch Ovalbumin (OVA)

Die pathogenfreien 6-8 Wochen alten, weiblichen Balb/c- Mäuse werden durch drei intraperitoneale Injektionen von hochreinem OVA (Grade VI) und als Adjuvands Aluminiumhydroxid (Al[OH<sub>3</sub>]) sensibilisiert. Zur Kontrolle des systemischen Sensibilisierungserfolges wird den Tieren aus den Schwanzgefäßen Blut abgenommen, und in deren Serum werden mit einem ELISA Immunglobuline nachgewiesen. Hierzu werden die OVA-spezifischen Immunglobuline IgE<sub>OVA</sub>, IgG<sub>1OVA</sub> und IgG<sub>2aOVA</sub> gemessen.

**Tabelle 3.1: Kontrolle der Sensibilisierung durch Nachweis der Immunglobuline**

Antikörper	PBS	OVA 1.Woche	OVA 12. Woche
Anti-OVA IgE (LU/ml)	212 ± 72	866 ± 168***	5.529 ± 1.171***
Anti-OVA IgG <sub>1</sub> (LU/ml)	175 ± 38	4.254 ± 1.587 ***	5.574 ± 1.750***
Anti-OVA IgG <sub>2a</sub> (LU/ml)	1.622.379 ± 20.412	338.136 ± 94.866 n.s.	665.438 ± 54.339 n.s.

Bei der Untersuchung ergibt sich sowohl in der akuten Phase, eine Woche nach erfolgter intraperitonealer Sensibilisierung, als auch in der chronischen Phase, 12 Wochen nach der Sensibilisierung bzw. nach 24 Expositionen mit dem spezifischen Protein, ein signifikanter Anstieg des Anti-OVA IgE um den Faktor 4 und 26. Auch der Anti-OVA IgG<sub>1</sub>-Titer lag im gesamten Untersuchungszeitraum signifikant und um ein Vielfaches über dem Ausgangswert. Der Titer des nicht Allergie assoziierten IgG<sub>2a</sub> zeigte keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

## **3.2. Inflammationsprozesse in den Atemwegen**

### **3.2.1. Intraluminale Inflammation/Bronchoalveoläre Lavage (BAL)**

Die luminale Infiltration der Atemwege durch inflammatorische Zellen kann durch die Bronchoalveoläre Lavage (BAL) dargestellt werden. Wodurch das entzündliche Infiltrat aller Atemwegslumina auf schonende Art und Weise beurteilt werden kann. Die eingewanderten Leukozyten werden nach morphologischen Kriterien unter dem Mikroskop differenziert in Makrophagen, Lymphozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten. Da in den bronchoalveolären Flüssigkeiten (BALF) neutrophile Granulozyten nur sehr sporadisch gefunden werden können, werden diese bei der Beurteilung des gewonnenen Probenmaterials nicht weiter berücksichtigt.

#### **3.2.1.1. Absolute Zellzahlen in der BAL**

1, 4, 8 und 12 Wochen nach Expositionsbeginn werden Tiere der Kontroll- und Versuchsgruppe lavagiert. Die absoluten Zahlen, als auch die relative Verteilung der Leukozyten-Unterklassen sind dabei in der Kontrollgruppe über den gesamten Zeitraum nicht signifikant unterschiedlich, so dass in der vorliegenden Arbeit die verschiedenen PBS-Expositionszeiträume nicht weiter beachtet werden und alle Präparate der Kontrolltiere zu einer Gruppe zusammengefasst werden. Die BAL der mit PBS- exponierten Tiere enthält durchschnittlich  $78.800 \pm 14.000$  Leukozyten, die zum überwiegenden Teil aus Alveolarmakrophagen bestehen. Bei den OVA-exponierten Tieren zeigt sich hingegen ein deutliches intraluminales Leukozyteninfiltrat, welches sich über die Dauer der Expositionszeit verändert. In der 1. Expositionswoche wird in der BAL eine Gesamtleukozytenzahl von  $1.300.000 \pm 290.000$  Leukozyten festgestellt, was dem mehr als 16fachen Wert der Kontrollgruppe entspricht und den maximalen Wert der Entzündungszellen in diesem Versuch darstellt. Danach ist bei den OVA-exponierten Mäusen ein Abfall der Leukozytenzahl, auf bis zu  $340.000 \pm 29.000$  Leukozyten in der 8. Woche zu registrieren, woraufhin die Population in der 12.Woche noch einmal auf  $463.000 \pm 91.000$  Zellen ansteigt. Während des gesamten Versuches ist die Zellzahl im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht und mindestens um den Faktor 4 größer als bei den Kontrolltieren.

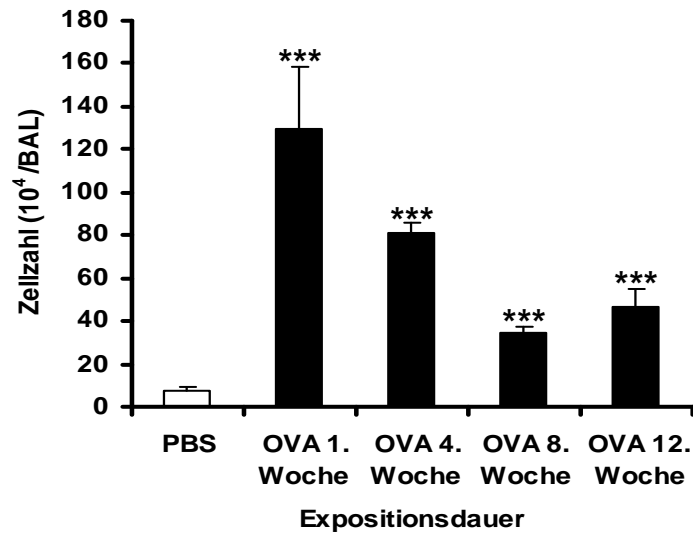


Abbildung 3.1: Leukozytenkonzentration in der BAL

Der überwiegenden Teil der Leukozyten besteht in der Kontrollgruppe mit  $75.600 \pm 13.000$  aus Alveolarmakrophagen. Nur in der 1. Woche des Expositionszeitraums mit OVA kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Niveaus der Makrophagenanzahl mit  $276.000 \pm 32.000$ . Deren Zahl fällt anschließend wieder auf Werte zwischen  $53.000 \pm 16.000$  in der vierten Woche und  $46.000 \pm 8.300$  Zellen in der 8. Woche ab. Somit sind die Werte bei den OVA-Mäusen in der 4. und 8. Woche sogar, wenn auch nicht signifikant, niedriger als in der Kontrollgruppe. In der 12. Woche kommt es, mit  $142.000 \pm 18.500$  Makrophagen, zu einem Anstieg, der auch zur Kontrollgruppe und den Vorwochen signifikant ist.

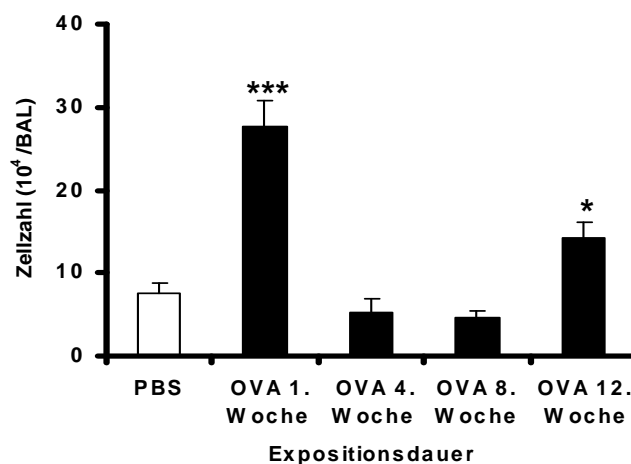
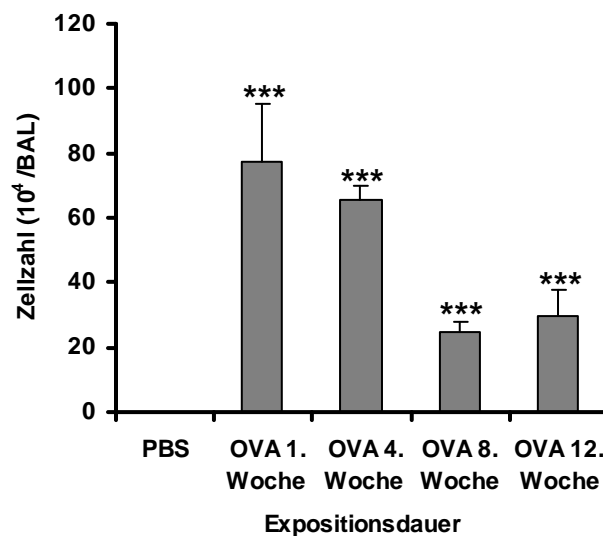


Abbildung 3.2: Makrophagenkonzentration in der BAL



Eosinophile Granulozyten lassen sich in der Kontrollgruppe im Gegensatz zu der OVA- exponierten Gruppe nur sporadisch beobachten (900/BAL). Bei diesen erreichen die eosinophilen Granulozyten in der 1. Woche ein Maximum. Es finden sich  $772.000 \pm 181.000$  Zellen in der BAL. Im weiteren Expositionsverlauf nimmt die Zellzahl an diesem Leukozytentyp stetig auf  $250.000 \pm 27.000$  in der 8. ab, um in der 12. Woche nochmals deutlich anzusteigen. Damit ist die Anzahl an eosinophilen Granulozyten den ganzen Expositionszeitraum über signifikant erhöht.



**Abbildung 3.3: Anzahl der Eosinophilen Granulozyten in der BAL**

Auch Lymphozyten werden in der Kontrollgruppe nur vereinzelt gesehen. In der OVA-Gruppe lässt sich hingegen in der 4. Woche nach Expositionsbeginn der maximale Wert von  $83.800 \pm 7.100$  Lymphozyten finden. Die Anzahl sinkt danach zwar ab, scheint aber in der 8. und 12. Woche ein relativ konstantes Niveau von  $43.900 \pm 4.400$  und  $42.000 \pm 8.000$  Lymphozyten zu erreichen.

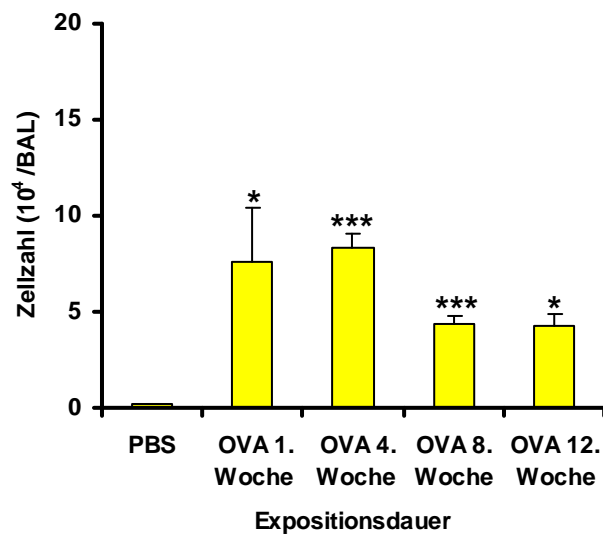


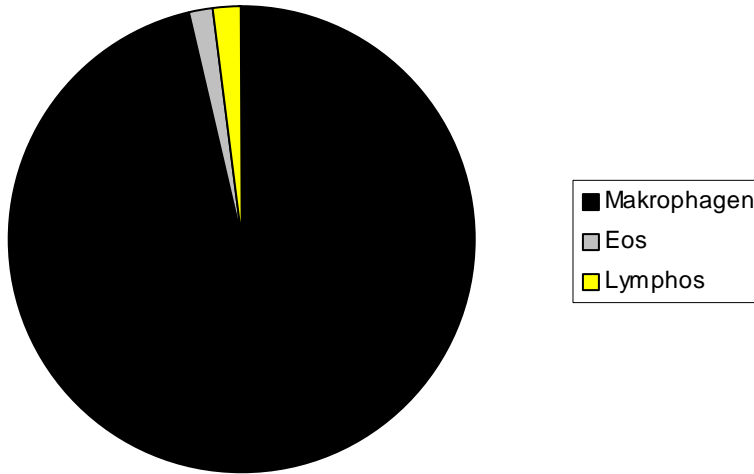
Abbildung 3.4: Lymphozytenkonzentration in der BAL

### 3.2.1.2. Relative Verteilung der Leukozyten-Subtypen in der BAL

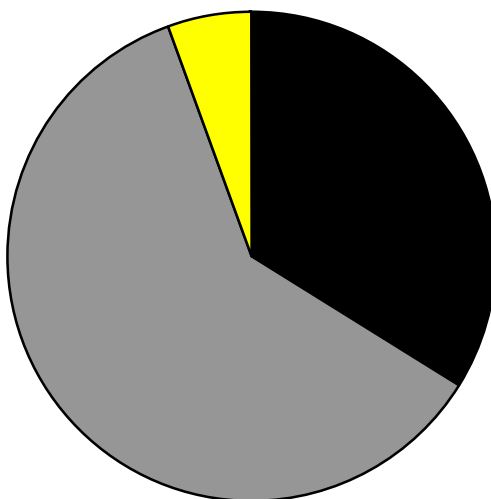
Bei der Betrachtung der relativen Verteilung der verschiedenen Entzündungszellen der Kontrollgruppe zeigen sich fast ausschließlich Alveolarmakrophagen und nur ein geringer Anteil an eosinophilen Granulozyten (1,5%) und Lymphozyten (2%).

Bei der OVA-Gruppe beträgt nach 1wöchiger OVA-Exposition der Anteil der eosinophilen Granulozyten 60% und der Prozentsatz der Makrophagen 34%. Der prozentuale Anteil der dieser Granulozytenpopulation an der Gesamt-leukozytenzahl erreicht in der 4. Woche sein Maximum mit 81% und sinkt danach bis zur 12. Woche auf 63% ab. Die relative Häufigkeit der Lymphozyten steigt im Gegensatz dazu von 5% in der 1. Expositionswoche auf 13% in der 8. Woche an und bleibt ab da relativ konstant.

### Leukozytenverteilung PBS



### Leukozytenverteilung 1. Woche OVA



### Leukozytenverteilung 12. Woche OVA

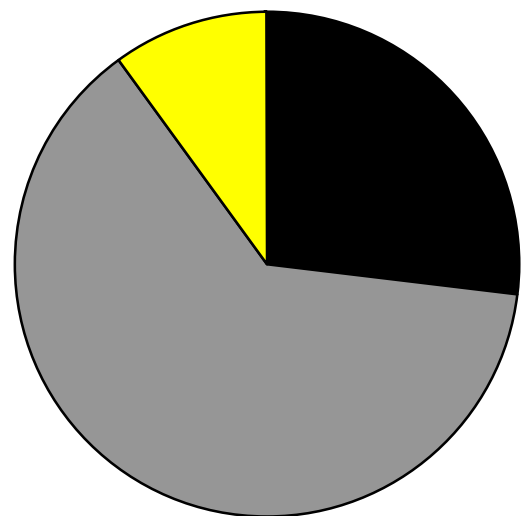


Abbildung 3.5: Relative Verteilung der Leukozyten-Subtypen in der BAL

#### 3.2.1.3. Zytokinkonzentrationen in der BAL

In der zellfreien, zuvor eingefrorenen BALF werden mit dem CBA (cytometric bead array) folgende Zytokine gemessen: TNF- $\alpha$ , IL-5, IL-4 und TGF- $\beta$ .

Eine Erhöhung der Konzentration von IL-4 ist nur in der 1. Woche der OVA-Exposition bei den sensibilisierten Tieren zu beobachten, in allen anderen Proben liegt die Menge an IL-4 unter der Nachweisgrenze von 7 pg / ml.

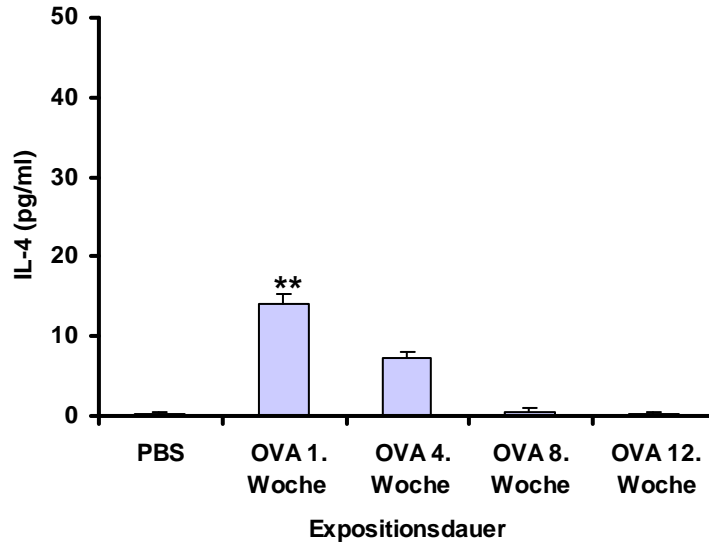


Abbildung 3.6: IL-4-Konzentration in der BAL

In der Kontrollgruppe ist TNF- $\alpha$  nicht nachweisbar. Der Spiegel steigt bei den OVA-exponierten Tieren in der ersten Woche auf 134 pg/ml an, sinkt aber bis zur 8. Woche auf 50 pg/ml ab und ist in der 12. Woche nicht mehr nachweisbar. Eine signifikante Erhöhung ergibt sich somit für die 1. bis 8. Expositionswoche.

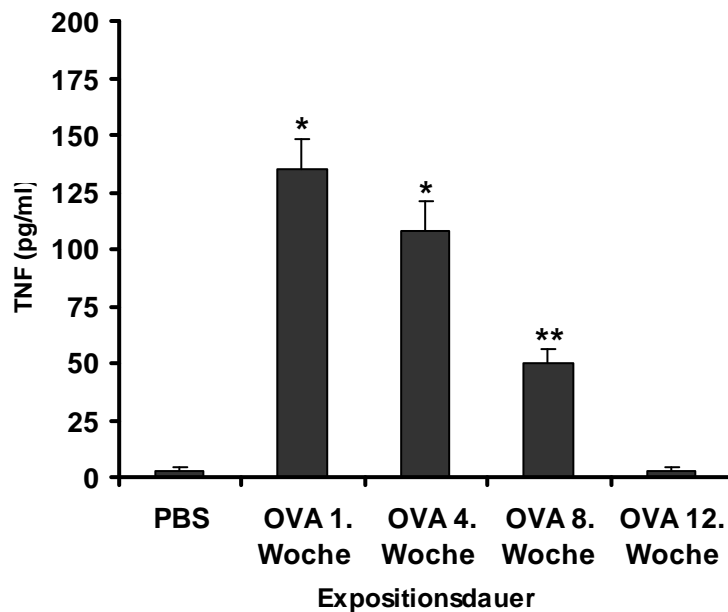
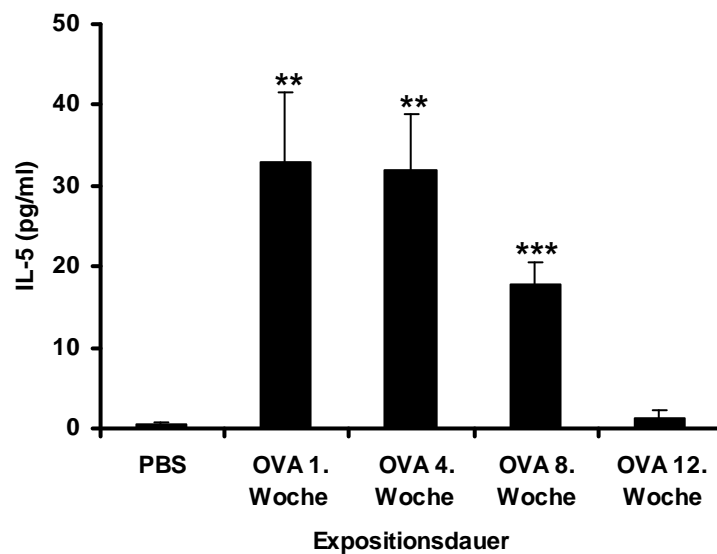


Abbildung 3.7: TNF- $\alpha$ -Konzentration in der BAL

Bei den Kontrollmäusen kann kein IL-5-Spiegel über der Nachweisgrenze festgestellt werden. In der ersten bis zur achten Expositionswoche mit OVA wird ein signifikant erhöhter IL-5-Spiegel in der BAL nachgewiesen. Die Konzentration fällt von der ersten Woche (33 pg/ml) auf 18 pg/ml in der 8. Woche ab. Auch hier befindet sich die Zytokinkonzentration in der 12. Woche unter der Nachweisgrenze.



**Abbildung 3.8: IL-5-Konzentration in der BAL**

Der Spiegel von TGF- $\beta$ 2 beträgt bei der Kontrollgruppe mit  $31,9 \pm 24,4$  und liegt damit signifikant unter den Werten der Versuchstiere über den gesamten Expositionszeitraum. Nach einer Woche Exposition kommt es zu einer Erhöhung des TGF- $\beta$  (auf  $548 \pm 397$  pg/ml). Danach pendelte sich die Menge des Zytokins auf Werte, bis zu 50 Mal höher als bei den Kontrolltieren, (zwischen  $1.487 \pm 477$  pg/ml in der 8. Woche und  $1.568$  pg/ml in der 4. Woche) ein. Wobei in den Wochen 4, 8 und 12 keine signifikanten Unterschiede zu einander vorliegen.

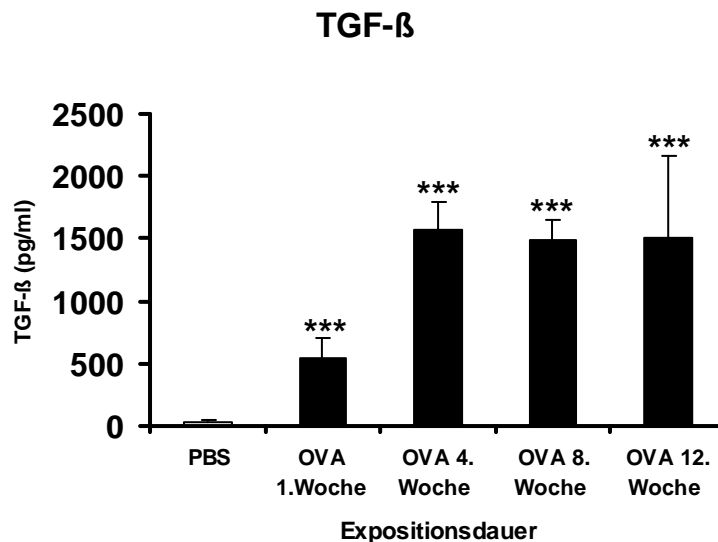


Abbildung 3.9: TGF- $\beta$ -Konzentration in der BAL

### 3.2.2. Inflammation in den Atemwegswänden

#### 3.2.2.1. Absolute Zellzahl in den Atemwegswänden

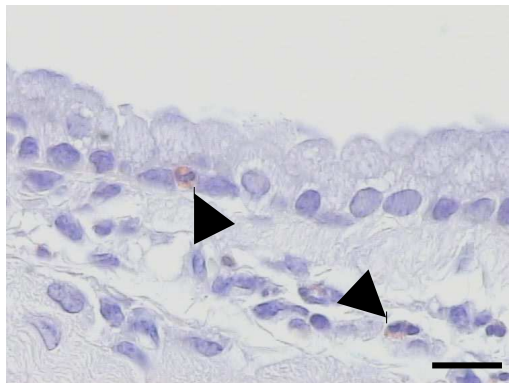
Im Gegensatz zu der bronchoalveolären Lavage, bei der lediglich die Zelle in den Atemwegslumina quantifiziert und näher qualifiziert werden, kann in der mikroskopischen High Powerfield (HPF) Auszählung die gewebliche Infiltration, der in das Atemwegsgewebe penetrierten Entzündungszellen verdeutlicht werden. Zusätzlich kann mit dieser Methode die Analyse eines Infiltrats auch in proximale und distale Kompartimente der Atemwege eingeteilt werden.

Betrachtet man zuerst die absolute Zellzahl über die ganze Lunge gemittelt, so gibt es in der Kontrollgruppe keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Expositionszeiträumen mit PBS, so dass alle Präparate als eine Gruppe zusammengefasst werden. Pro HPF kann man  $7 \pm 3$  Leukozyten finden, wobei davon im Schnitt  $4 \pm 3$  Makrophagen und  $3 \pm 2$  Lymphozyten sind. Eosinophile Granulozyten scheinen hier nicht in das Gewebe zu migrieren, sind zumindest nicht darstellbar.

Nach wiederholter OVA-Provokation sind pro HPF zwischen 163 und 103 eingewanderte Leukozyten differenzierbar. Das Maximum wird in der 12. Woche erreicht, davor hat die Zellzahl in etwa auf einem Niveau (135 Zellen in der 1.

Woche bzw. 104 in der 4. und 8. Woche) gelegen. Gegenüber der Kontrolle ist die Population den gesamten Zeitraum über signifikant erhöht. Bei den Makrophagen ist das Infiltrat in der 1. Woche (mit 16 Zellen/HPF) 4 mal größer als bei der Kontrollgruppe. Mit zunehmender OVA-Expositionszeit sinkt die Makrophagenzahl pro HPF stetig (auf 5 in der 12. Woche) ab. Nur bis zur 8. Woche ist die Zahl bei diesem Zelltyp signifikant erhöht.

Auch die Infiltration eosinophiler Granulozyten sinkt mit Häufung der Allergen-Exposition kontinuierlich, vom Maximalwert von  $(91 \pm 23/\text{HPF})$  eosinophilen Granulozyten pro HPF in der ersten Woche auf  $21 \pm 9$  Zellen in der 12. Woche.



**Abbildung 3.10: Intraepitheliale eosinophile Granulozyten nach chronischer Allergenprovokation**

**3µm dicke Paraffinschnitte; HE-Färbung; repräsentative Längsschnitt durch einen intermediären Atemweg; OVA 12. Woche; Pfeile kennzeichnen eosinophile Granulozyten.**

**Balken = 25 µm. (In Kooperation mit Prof. Dr. H. Fehrenbach).**

Bei den Lymphozyten ist eine klare Beziehung zwischen Allergenprovokationsdauer und Populationsgröße zu erkennen. Nach zwei OVA-Expositionen sieht man ein Infiltrat von  $28 \pm 11$  Zellen pro HPF, was in der ersten Expositionswoche eine signifikante Veränderung bedeutet. In der Folgezeit kommt es, mit Erhöhung der Anzahl der Allergenexpositionen zu einem kontinuierlichen Anstieg der Lymphozytenzahlen bis zur 12. Woche ( $138$  Lymphozyten/HPF). Das Niveau der Leukozytenzahl ist über den gesamten Expositionszeitraum signifikant erhöht.

### **3.2.2.2. Relative Verteilung der Entzündungszellen den Wänden der Atemwege**

Betrachtet man die relative Verteilung der inflammatorischen Zellen, im Gewebe, so stellt man fest, dass bei der Kontrollgruppe 43% der Leukozyten Lymphozyten und 57% Makrophagen sind. Nach OVA-Provokation ist der Makrophagenanteil mit 10 bis 12% in der 1. bis 8. Woche im Vergleich zur Kontrolle relativ klein, sinkt in der 12. Woche dann nochmals auf 3% ab.

Bei der prozentualen Verteilung ergibt sich bei den eosinophilen Granulozyten ein klarer Zusammenhang zwischen Expositionszeit und Populationsgröße. Beträgt der Anteil in der 1. Woche noch 68% fällt er daraufhin über 48% in der 4. und 26% in der 8. auf 13% in der 12. Woche ab.

Der Lymphozyten/Leukozyten-Quotient ist in den Wochen 1 und 4 niedriger als bei den Kontrolltieren (21 und 40% gegenüber 43% bei den PBS-Tieren), steigt aber über den gesamten Zeitraum kontinuierlich auf bis zu 84% in der letzten Expositionswoche an.

In der OVA-Gruppe ist die Gesamtleukozytenzahl relativ konstant und signifikant zur Kontrolle erhöht. Sowohl die relative als auch die absolute Makrophagenzahl nimmt mit der Zeit ab und ist am Ende der Exposition geringer als bei den PBS-Tieren. Sowohl die eosinophilen Granulozyten als auch die Lymphozyten sind die ganze Zeit über signifikant erhöht, wobei es zu einer Verschiebung von einem hohen Anteil an eosinophilen Granulozyten anfangs, zu einem Lymphozyten-dominierten Entzündungsinfiltrat kommt.



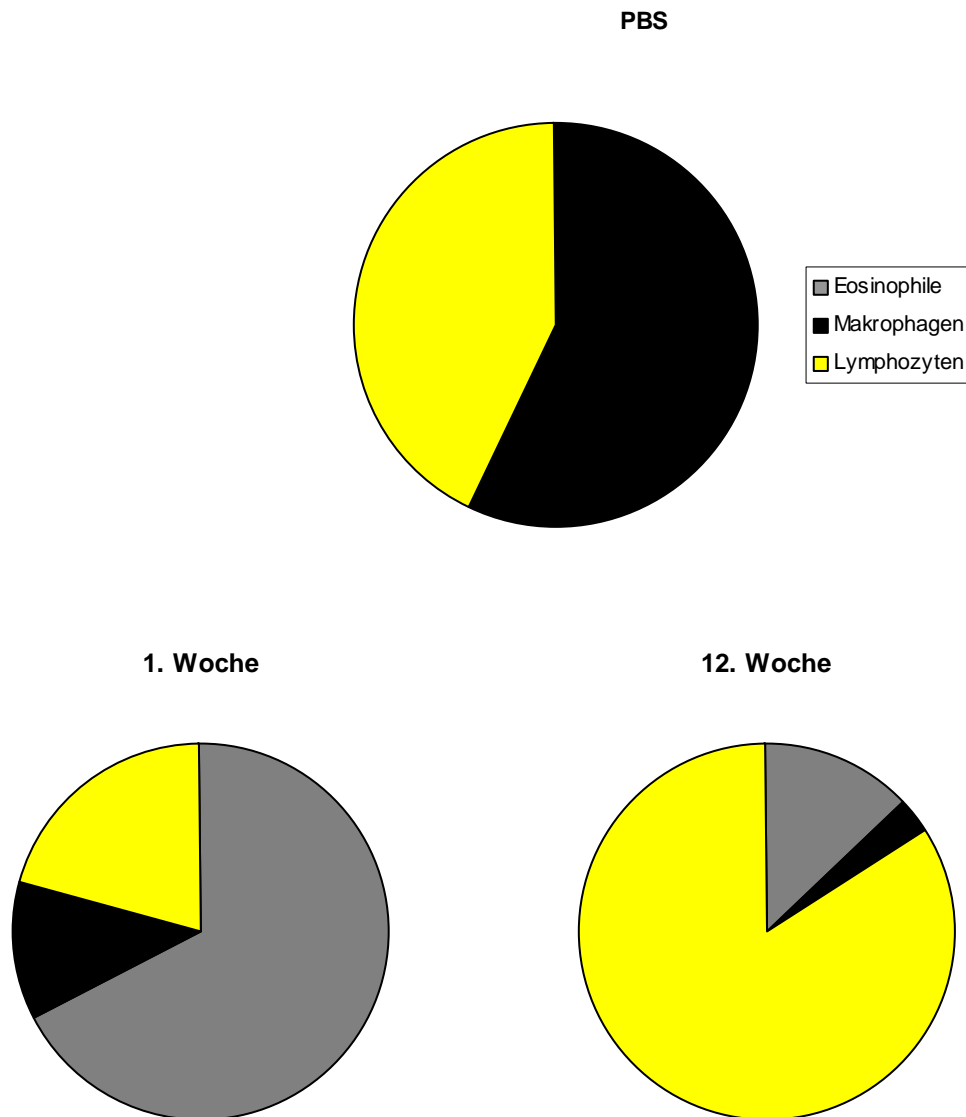


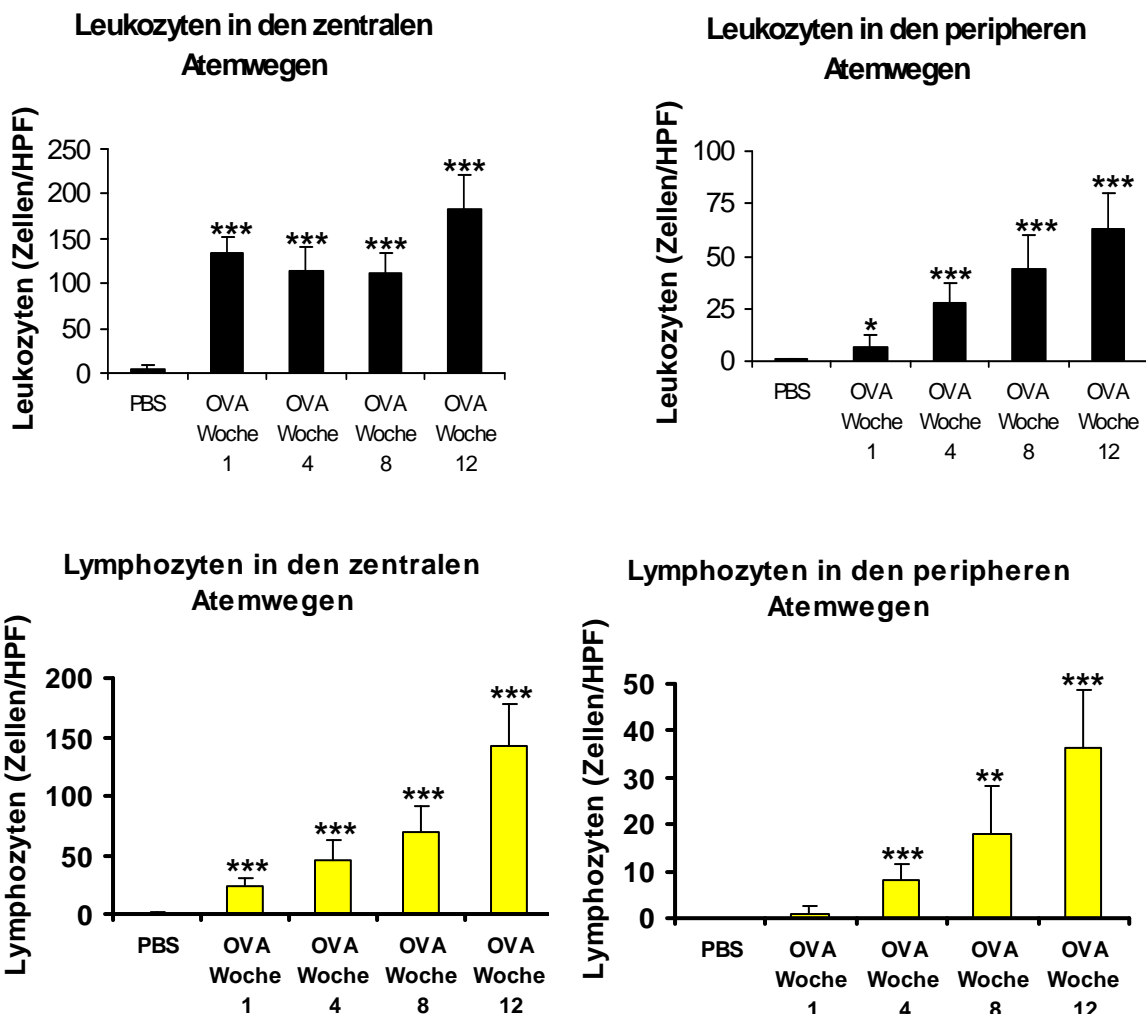
Abbildung 3.11: relative Verteilung der Leukozyten im Lungengewebe

### 3.2.2.3. Verteilung der Entzündungszellen auf die verschiedenen Kompartimente

Betrachtet man die Verteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Anteile der Lunge zeigt sich ein vollkommen anderes Bild:

Wie weiter oben beschrieben kommt es zu einer massiven Erhöhung der Leukozytenzahl in den Atemwegen. Bei der Betrachtung der verschiedenen Kompartimente zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Lungenbereichen. Sind in den 1. Woche in den zentralen Anteilen  $135 \pm 16$  Zellen pro High Powerfield (HPF) sichtbar, können nur vereinzelte Entzündungszellen in der Peripherie ( $7 \pm 5$ /HPF) entdeckt werden. Im Laufe des Expositionszeitraumes

kommt es zu einer klaren Verschiebung: Peripher erhöht sich die Leukozytenzahl kontinuierlich auf das 9fache (mit  $63 \pm 16/\text{HPF}$ ) in der 12. Woche, dem hingegen kommt es nur zu einer leichten Vermehrung (auf  $184 \pm 37/\text{HPF}$ ) in den zentralen Atemwegen. Differenziert man weiter nach den Leukozyten-Subpopulationen, so zeigt sich bei den eosinophilen Granulozyten ein interessantes Bild. Es kommt in der ersten Expositionswoche zu einer massiven Infiltration von eosinophilen Granulozyten in den zentralen Bereichen ( $102 \pm 18$  Zellen/HPF) aber nur zu einer sehr viel geringeren Penetration in periphere Lungenteile ( $5,5 \pm 4,6/\text{HPF}$ ). Nach einer 12-wöchigen Exposition sind peripher ( $20 \pm 12,5/\text{HPF}$ ) 4mal mehr eosinophile Granulozyten darstellbar als in der ersten Woche, dem hingen sinkt deren Anzahl in den zentralen Abschnitten kontinuierlich ( $29 \pm 10$  Zellen/HPF) ab. Die Lymphozyten, die sich über den gesamten Zeitraum drastisch vermehren, kommen in der ersten Woche fast ausschließlich zentral vor, (bei  $24 \pm 6/\text{HPF}$  zu einem Lymphozyten peripher). Nach chronischer Exposition finden sich in der 12. Woche  $143 \pm 36$  Zellen zentral aber auch  $36 \pm 13$  Zellen peripher.



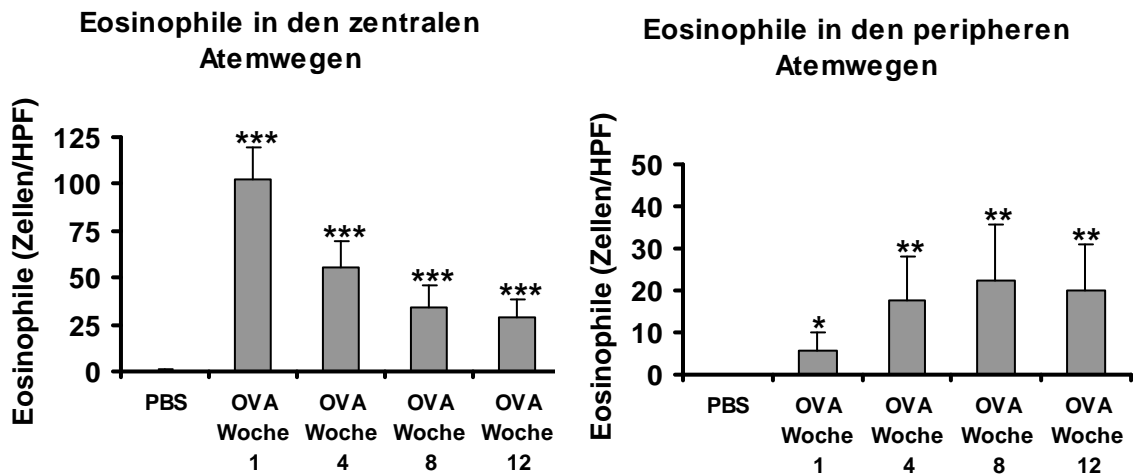


Abbildung 3.12: Leukozytenkonzentration in verschiedenen Kompartimenten

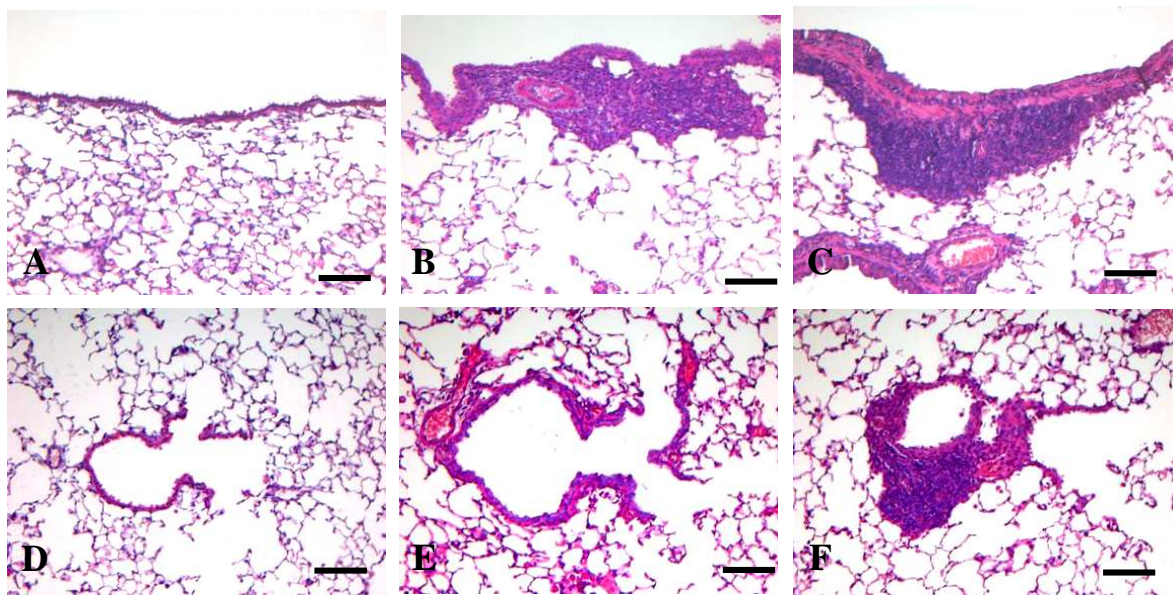
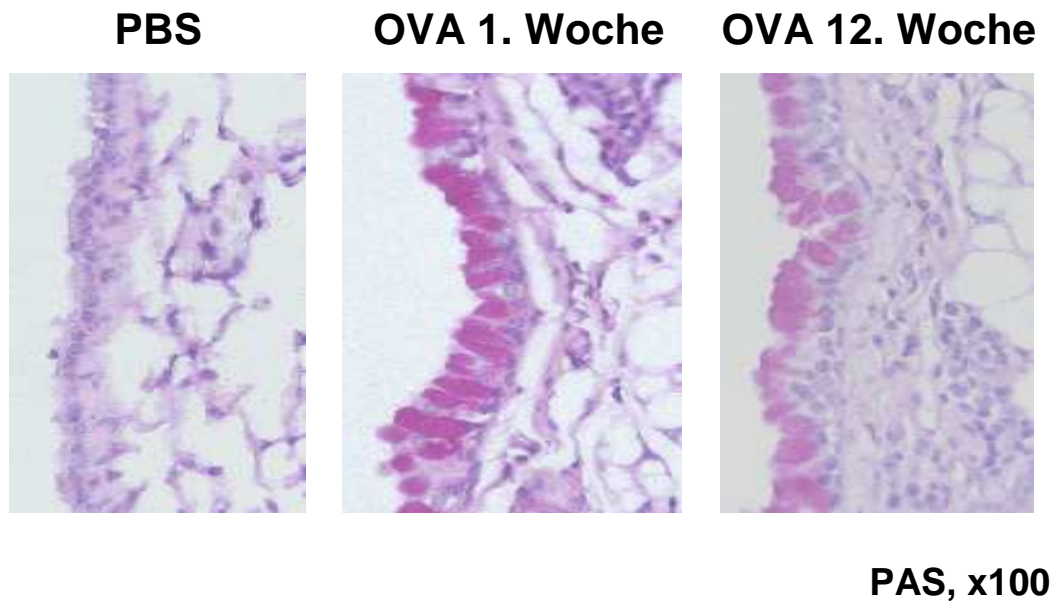


Abbildung 3.13: Allergische Atemwegsentzündung nach chronischer Allergenprovokation 3µm dicke Schnitte; HE-gefärbt (s. 2.7). repräsentative Längsschnitte durch proximale (A-C) bzw. distale (D-F) Atemwege; nach akuter (B, E) oder chronischer OVA-Provokation (C, F) bzw. Kontrollgruppe (A, D). Balken = 100 µm.

### **3.3. Induktion von Mukusproduktion durch chronische OVA-Exposition in sensibilisierten Mäusen**

OVA-sensibilisierte Balb/c-Mäuse werden bis zu 12 Wochen mit selbigem Protein über die Atemwege provoziert, um mögliche Effekte auf das respiratorische Epithel nachweisen zu können. Zur Verdeutlichung einer möglichen Becherzellhyperplasie werden Schnittpräparate einer PAS-Färbung unterzogen. Perjodsäure-Schiff-Färbung stellt Zellkerne blau und Glykosaminoglykane, Kohlenhydrate und Glykogen rot dar.

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der OVA-Gruppe ist in den zentralen Atemwegen eine mehrreihige Tunica mucosa respiratoria zu sehen, mit Flimmerzellen und Bürstensaumzellen. Unter der Mucosa liegt eine unterschiedlich dicke Schicht, bestehend aus kollagenem Bindegewebe und glatten Muskelzellen und je nach Schnitthöhe und -führung auch mit Knorpelanteilen. Weiter in der Peripherie weicht das mehrreihige Epithel einer einreihigen Tunica mucosa mit flacheren Zellen. Das respiratorische Epithel der Kontrollgruppe ist sowohl im zentralen als auch im peripheren Anteil der Atemwege regelmäßig und weist kein mukus-enthaltenden Becherzellen auf. In den Atemwegen der mit OVA-exponierten Tiere lassen sich durch die PAS-Färbung intrazellulär zum Teil größere Mengen von Mukusbestandteilen, wie Muko-, Glykoproteine und Mukopolysaccharide nachweisen. Charakteristischer Weise wird der Mukus in der apikalen, dem Lumen zugewandten Seite gespeichert. In der ersten Woche nach Expositionsbeginn findet sich, vor allem in den großen Atemwegen, eine deutliche Ausbildung von Becherzellen, auf die peripheren Gebieten des Atemtraktes trifft dies zu diesem Zeitpunkt so nicht zu. Es sind in zentralen Anteil der Lunge einige Mukosazellen schleimgefüllt, weiter distal können nur sehr vereinzelte durch PAS angefärbte Zellen identifiziert werden. Nach vier Woche kommt es zu einer Steigerung der Menge der mukösen Zellen in den Atemwegen mit großem Lumen, in den Präparaten sind an einigen Stellen mehr als die Hälfte der Epithelzellen schleimgefüllt. Auch weiter peripher ist ein großer Teil der Mukosazellen PAS-positiv, wobei in deutlich geringerem Maße als weiter zentral.

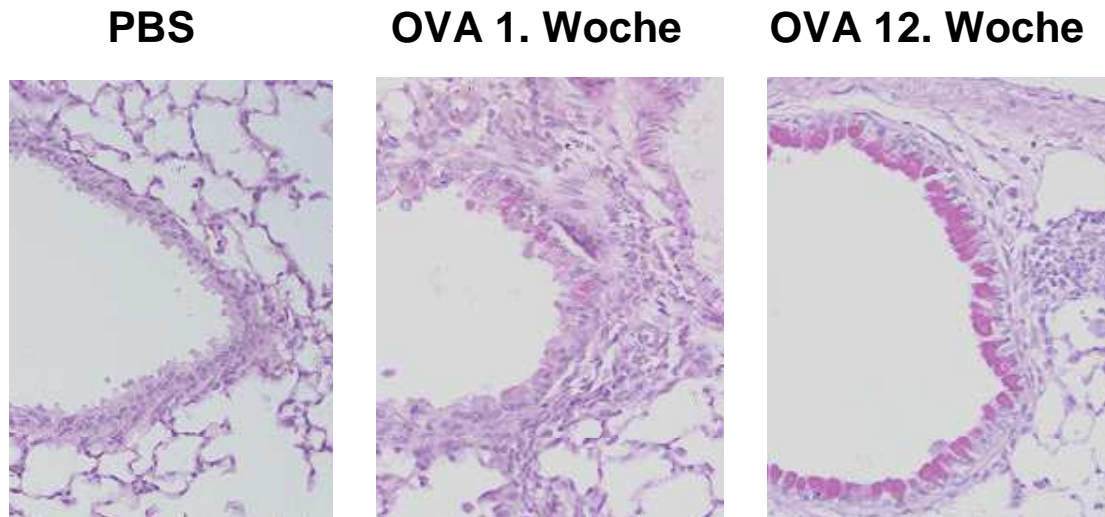


**Abbildung 3.14: Induktion einer Becherzellhyperplasie in zentralen Atemwegen**  
**3µm dicke Schnitte; PAS-gefärbt (s. 2.7); repräsentative Schnitte; Kontrollgruppe, akute und chronische OVA-Exposition**

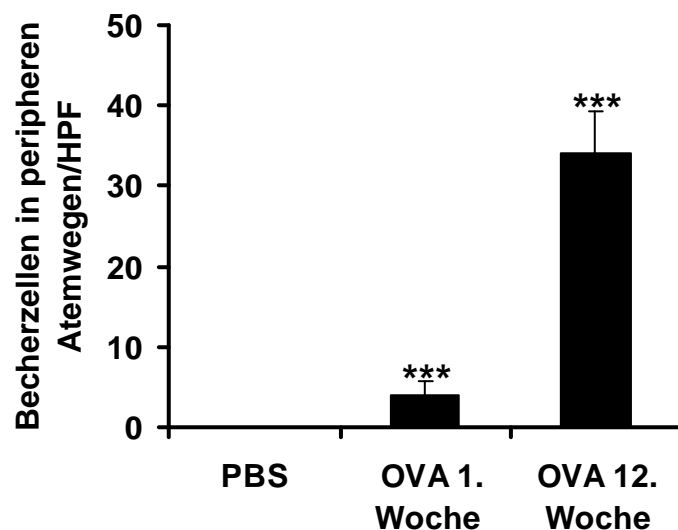
Nach 8 und 12 Wochen Allergenexposition kommt es zu einer nochmaligen Hyperplasie der Becherzellen in allen Abschnitten der Lunge. In großen Lumina bilden hier die Becherzellen den überwiegenden Anteil des Schleimhautepithels. Auch in den distalen Regionen der Atemwege lassen sich bis hin zu den terminalen Bronchioli Becherzellen in großem Maße finden. Somit ist über den Expositionszeitraum eine stetige Zunahme PAS-positiver Zellen zu verzeichnen. Des weiteren wird eine Verlagerung der erhöhten Becherzellichte mit zunehmenden Allergenprovokationsdauer in die Peripherie beobachtet, die mit einer gleichzeitig Vermehrung der schleimgefüllten Epithelzellen in der Bronchien einhergeht.

Zur Quantifizierung der festgestellten Becherzellmetaplasie, in den kleinen Atemwegen der Versuchstiere, werden die PAS-positiven Mucosazellen in repräsentativen Bildabschnitten im Mikroskop bei 50fachen Vergrößerung ausgezählt. Drei Abschnitte werden pro Präparat ausgewertet und die Ergebnisse gemittelt. Der Mittelwert der Auszählung wird zum Vergleich der Schnittproben verwendet. In der Kontrollgruppe gibt es keine schleimgefüllten Zellen in den peripheren Teilen der Lungen. Schon nach einer Woche Allergenexposition sind

in jedem Sichtfeld im Durchschnitt 4 Entzündungszellen sichtbar. Bis zur 12. Woche erhöht sich dieser Wert kontinuierlich auf  $34 \pm 7$  Becherzellen pro HPF in der Lungenperipherie.



**Abbildung 3.15: Induktion einer Becherzellhyperplasie in peripheren Atemwegen**  
3  $\mu$ m dicke Schnitte; PAS-gefärbt (s. 2.7); repräsentative Schnitte; Kontrollgruppe, akute und chronische OVA-Exposition



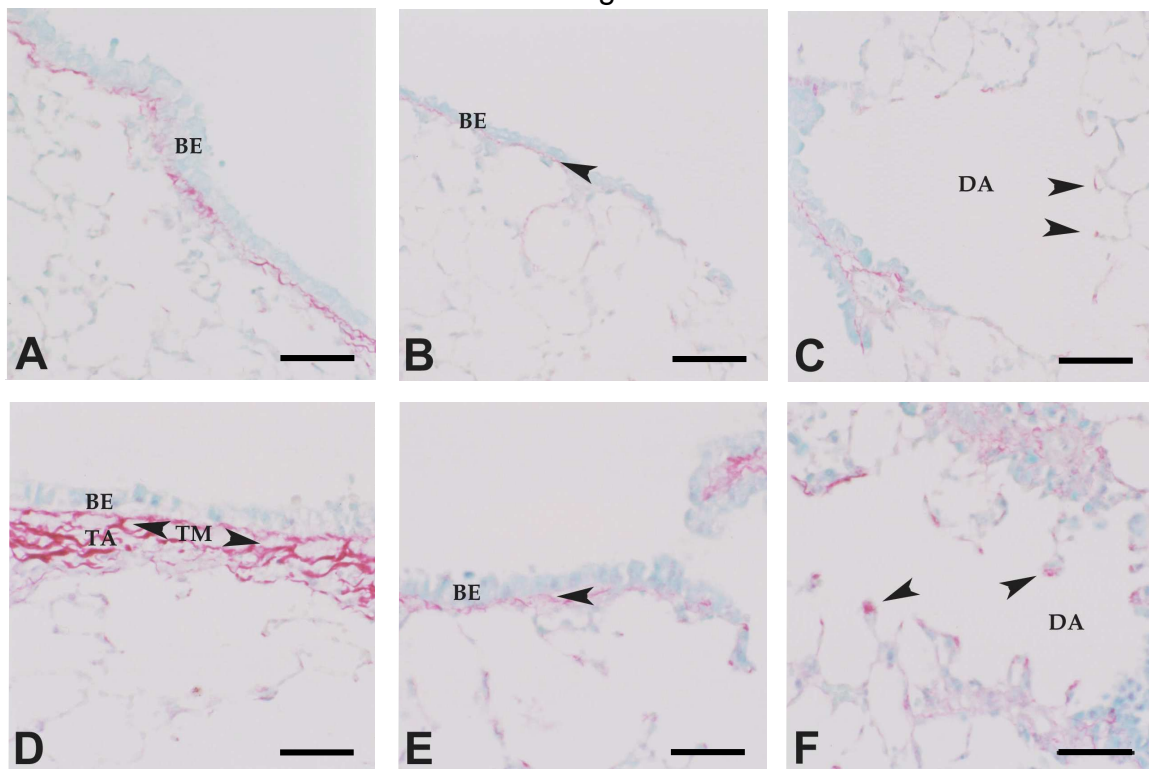
**Abbildung 3.16: Quantifizierung der Becherzellhyperplasie in peripheren Atemwegen**

Diese Untersuchungsmethode an den Schnittpräparaten verstärkt also die Betrachtungsergebnisse der Schnittpräparate zusätzlich; bei nicht Allergen provozierten Tieren sind keine Becherzellen in den kleinen Atemwegen zu finden.

Mit steigender Expositionsdauer vermehren sich die Becherzellen bei OVA exponierten Tieren vor allem peripher bis zur 12. Woche kontinuierlich.

### 3.4. Strukturelle Veränderungen der Atemwege im Rahmen von Remodellingvorgängen

Wie bereits oben beschrieben, ist es gelungen in der BAL der chronisch Allergenexponierten Mäuse sehr hohe Konzentrationen an TGF- $\beta$ , einem Zytokin mit sowohl anti-inflammatorischer, als auch pro-fibrotischer Wirkung, nachzuweisen. Es stellt sich die Frage, ob dieser und/oder andere Mediatoren und eine damit assoziierte ständige Allergenprovokation mit persistierender Atemwegsentzündung einen fibrotischen Umbau der Atemwegswand hervorruft. Diese Prozesse können mit einer Sirius red /Fast green-Färbung dargestellt werden. Mit dieser lässt sich selektiv fibrilläres Kollagen vom Typ I nachweisen, indem sich der Farbstoff in die Matrix einlagert.



**Abbildung 3.17: entzündliche Atemwegspathologie nach chronischer Allergenprovokation**  
 Sirius Red/fast green Färbung (s. 2.7). Repräsentative Längsschnitte, proximale (A, D), intermediäre (B, E) bzw. distale (C, F) Atemwege der Kontrolltiere (A-C) oder mit OVA 12. Woche (D-F). Pfeile kennzeichnen Bereiche mit Kollageneinlagerung.

BE = Bronchialepithel; DA = Ductus alveolaris; TM = Tunica muscularis; TA = Tunica adventitia; Balken = 50  $\mu$ m. (In Kooperation mit Prof. Dr. H. Fehrenbach).

Im Rahmen einer Kooperation mit der klinischen Forschergruppe „Chronische Atemwegserkrankungen“ unter der Leitung von Professor Dr. Fehrenbach wurden einige der eingefrorenen und paraffinisierten Probeorgane im Institut für Pathologie der Universität Marburg histochemisch und immunhistochemisch analysiert, um mögliche ultrastrukturelle Veränderungen der Lungen darzustellen. Um eine Ausbreitung der Entzündung von zentralen zu peripheren Gebieten der Atemorgane darzustellen, wurden Ultradünnschnitte aus oberen, mittleren und unteren Sektionen angefertigt und in Epoxidharz eingebettet, sowie die Paraffinschnitte zur Darstellung von Fibrosen, Atemmuskulaturveränderungen und nervaler Versorgung speziell angefärbt.

Mit der Sirius red/fast green Färbung lässt sich in den proximalen Anteilen der Lunge bei allen Tieren, sowohl bei der Kontroll- als auch bei der Allergen-exponierten Gruppe deutlich Kollagen I nachweisen. Weiter distal, im Ductus alveolaris, ist bei der Kontrollgruppe nur noch an den Alveolareingängen Kollagen vom Typ I zu finden. Desweiteren fällt auf, dass der Anteil der Flimmerepithelzellen bei allen Lungen kontinuierlich von proximal nach distal abnimmt. Eine vermehrte Einlagerung von Kollagen Typ I ist bei den chronisch OVA-exponierten Tieren proximal und distal zu beobachten. Diese Einlagerung betrifft vor allem die Tunica muscularis und die Tunica adventitia. Selbst in den Bereichen des Alveolareingangs sind fibrotische Umbau-Prozesse zu erkennen (Abb. 3.17). Für eine genauere Lokalisation der Kollageneinlagerung wurde eine ultrastrukturelle Analyse des Atemwegsgewebes mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie in der klinischen Forschergruppe „Chronische Atemwegserkrankungen“ von Professor Dr. Fehrenbach durchgeführt. Diese ergab, dass vor allem in der Lamina propria reticularis der Atemwegswand eine vermehrte Einlagerung der kollagenen Fasern stattfand (data not shown). Diese ist im Vergleich zur Lamina propria reticularis der PBS-Gruppe deutlich verdickt.

Bei den Lungen der mit OVA-exponierten Mäuse findet sich ein hoher Anteil an Becherzellen in den zentralen aber auch den mittleren Abschnitten der Atemwege. Auch in den mittleren Abschnitten ließen sich Mukus-produzierende Zellen deutlich häufiger finden, ebenso wie seromuköse Zellen in mittleren und



distalen Bereichen. Bei den chronisch OVA-exponierten Tieren kommt es somit zu einer Ausbreitung von mukösem Schleim bildenden Becherzellen nach weiter distal.

TGF- $\beta$  kann als ein Schlüsselmediator des „Airway Remodellings“ angesehen werden. Neben der pro-fibrotischen Wirkung kann es auch eine Proliferation von Myozyten, Myofibroblasten und Fibroblasten induzieren. In den Bereichen mit entzündlichen Infiltraten kommt es zu einem Anstieg der Myofibroblastenzahl, welche sich durch den Gehalt an  $\alpha$ -smooth-muscle-protein anfärben lassen. Die Infiltrate werden durch Plasmazellen dominiert.

Die Lamina propria ist bei den Kontrollorganen eine dünne Schicht zwischen der Tunica muscularis und dem Epithel, bestehend aus vereinzelt Fibrozyten, einigen elastischen und kollagenen Fasern. In wenigen Schnitten lassen sich auch Nervenfasern erkennen. Dem hingegen ist die Lamina propria bei den Atemwegen der OVA-Tiere in allen Bereichen des Bronchialbaumes klar verdickt und enthält wesentlich mehr Fasern vom kollagenen und elastischen Typ. Durch immunhistochemische und ultrastrukturelle Methoden lässt sich eine Vermehrung der Fibrozyten und Nervenfasern zeigen.

Durch eine ultrastrukturelle Untersuchung kann an der Alveolareingängen eine Vermehrung der Myofibroblasten festgestellt werden. Weiterhin kommt es zu einer Verdickung der Alveolarsepten und zu einer Zunahme von kollagenen Fasern und Elastin.

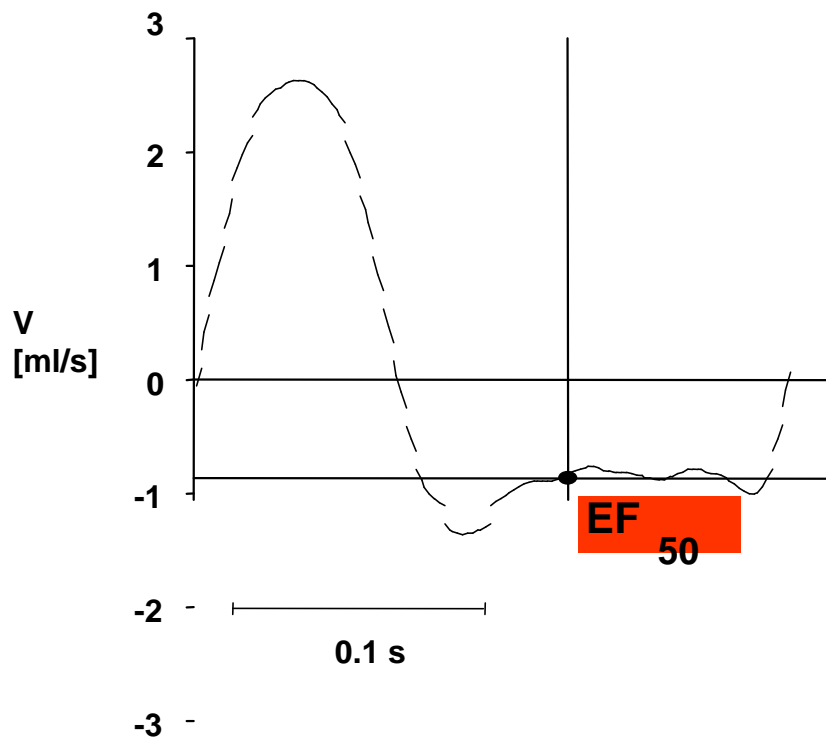
### **3.5. Lungenfunktion als Indikator für einen asthmatischen Phänotyp**

Die Lungenfunktionsuntersuchung findet in einer Glasexpositionskammer statt, in welche bis zu vier Mäuse mit dem Kopf ragen. Die Atemparameter werden mittels eines Pneumotachographens abgeleitet und durch einer speziellen Software ausgewertet. Bei diesem Versuch wird zum einen der halbmaximalen expiratorische Atemfluss (EF<sub>50</sub>) in Ruhe gemessen und zum anderen unter  $\beta$ -Methyl-Methacholin(MCh)- beziehungsweise OVA-Exposition die Werte der

akuten Hyperreagibilität (AHR) und der akuten Bronchoobstruktion (ABO) ermittelt.

### 3.5.1. Akute Hyperreagibilität (AHR)

Um den Wert der AHR zu ermitteln, werden die Tiere einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von MCh-Lösungen ausgesetzt. Durch die Software wird die Konzentration ermittelt, die zu einem Abfall von 50% des  $EF_{50}$  führt.

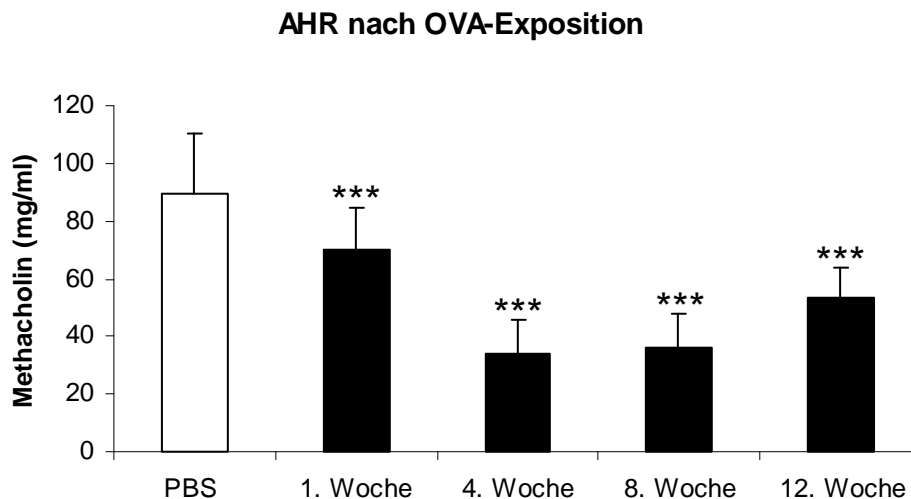


**Abbildung 3.18: Atemflusskurve chronisch Allergen-exponierter Tiere mit expiratorischer Obstruktion**

Aus der MCh-Provokation resultiert eine Veränderung der Atemflusskurve im Sinne einer Bronchoobstruktion mit Beeinflussung vor allem der Expiration (Die obige Abbildung zeigt eine solche Veränderung im Idealfall.).

Um den Abfall des  $EF_{50}$  auf 50% zu erreichen wird bei der Kontrollgruppe eine MCh-Konzentration von  $90 \pm 21$  mg/ml benötigt. Mit einer ebenso starken Reaktion auf das Pharmakon reagieren die Tiere, die mit OVA einem relevanten Allergen ausgesetzt werden, schon nach der ersten Woche bei einer Konzentration von  $70 \pm 15$  mg/ml. Am sensitivsten reagieren die Versuchstiere in

der 4. und 8. Woche auf den unspezifischen Stimulus. Bei  $34 \pm 12$  mg/ml in der 4. bzw.  $36 \pm 12$  mg/ml in der 8. Woche. In diesem Zeitraum kommt es zu einer gleich starken, lungenphysiologischen Antwort auf den pharmakologischen Reiz bei weniger als der Hälfte der Konzentration, bei der die Kontrollgruppe dem entsprechend reagiert. In der 12. Woche ist der Wert mit  $53 \pm 11$  mg/ml zwar höher als bei den Untersuchungen davor, aber liegt trotzdem noch signifikant unter dem Wert der Kontrolltiere.



**Abbildung 3.19: AHR im Verlauf der OVA-Provokation**

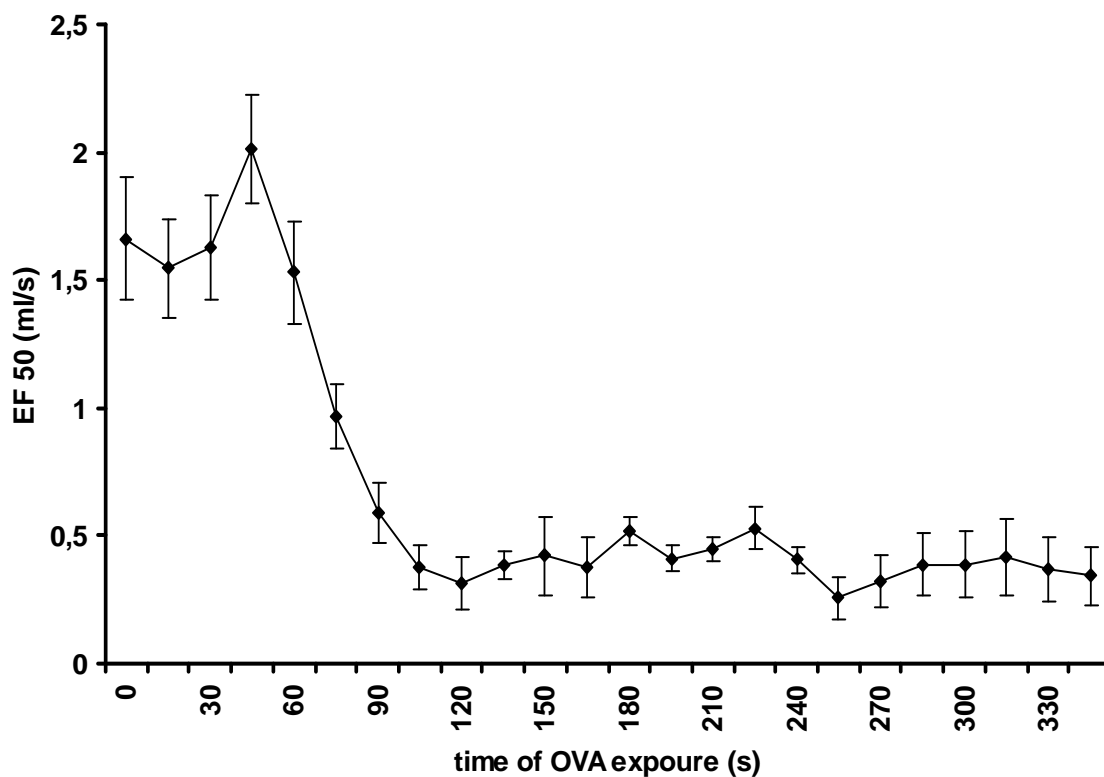
### 3.5.2. Akute Bronchoobstruktion (ABO)

Die ABO entsteht durch die erhöhte Reagibilität der Atemwege auf ein eingeatmetes Allergen, resultierend in einer Erhöhung des Atemwiderstandes. Der Unterschied zu der AHR ist somit, dass bei der ABO eine spezifische Reaktion auf ein Allergen vorliegt und keine unspezifische Antwort auf einen exogenen Reizfaktor. Auch hier wurde als Verlaufsparemeter der  $EF_{50}$ -Wert ermittelt.

Den Ausgangswert stellt hier die zuvor über 15 Minute ermittelte Baseline von 1,65 ml pro Sekunde dar; also den errechneten Mittelwert der 15 Sekunden dauernden Intervalle. In der ersten Minute nach Start der OVA-Verneblung steigt der  $EF_{50}$  auf bis zu  $2,0 \pm 0,5$  ml an, was einer Zunahme von 20 % entspricht. Durch Unruhe der Tiere erhöht sich ihre Atemfrequenz, was zu einer Erhöhung des gemessenen  $EF_{50}$  führt und als Messfehler anzusehen ist. Nach 60 Sekunden der

Aerosolapplikation kommt es zu einem rapiden Abfall der Werte, im Verlauf auf bis zu  $0,38 \pm 0,24$  ml/sec, also einer Erniedrigung auf bis zu 20 % des Ausgangsniveaus. Nach spätestens 20 Minuten wird die Exposition bei allen Mäusen beendet.

Unter Allergenprovokation kommt es bei Mäusen schon innerhalb von kurzer Zeit zu einer massiven Verringerung des EF<sub>50</sub>-Wertes, das heißt zu einem signifikanten Anstieg des Atemwegwiderstandes ab 75 Sekunden nach Start der Verneblung. Zusätzlich kommt es subjektiv zu einer Atemnot der Tiere.



**Abbildung 3.20: Akute Bronchoobstruktion, ausgelöst durch OVA-Exposition  
Gruppe OVA; 1. Woche; während OVA-Exposition**

Bei chronischer Allergenexposition wird bei den Tieren in der nach 4, 8 und 12 Wochen die ABO unter OVA-Provokation gemessen. Einen derartigen Abfall des EF50 in Form einer so stark ausgeprägten ABO kann in den Folgewochen nicht mehr verzeichnet werden.

### 3.5.3. Persistierenden Bronchoobstruktion

Die Mittelwerte des Atemwegwiderstandes (im Sinne des  $EF_{50}$ ) der OVA-exponierten und sensibilisierten Tiere wurden mit denen der Kontrollgruppe verglichen, welche vernebeltem PBS ausgesetzt wurden. Dieses geschah über den gesamten Untersuchungszeitraum alle zwei Wochen.

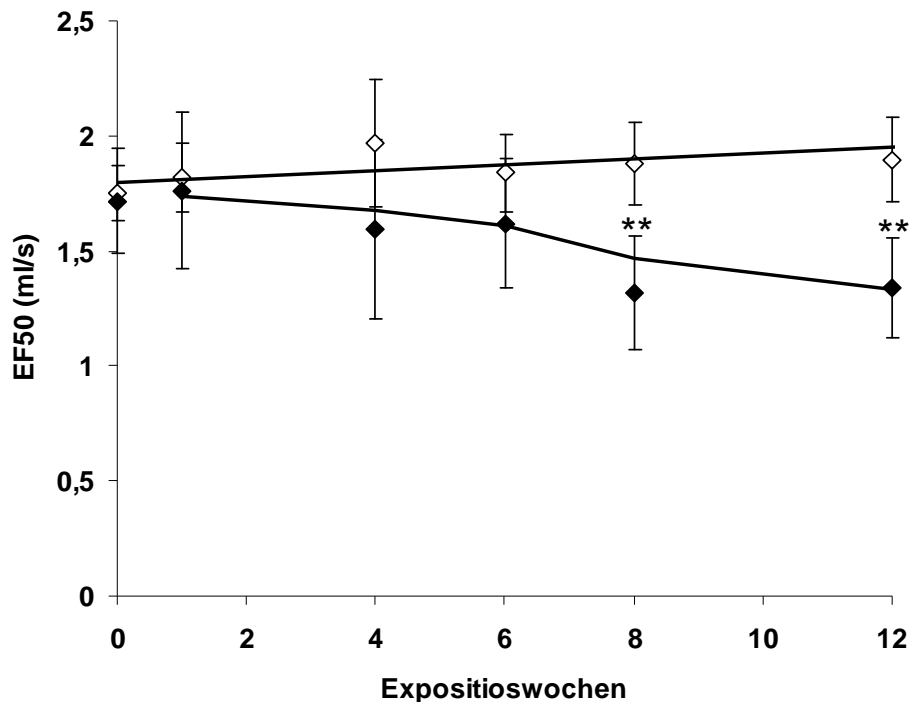


Abbildung 3.21: Chronische Bronchoobstruktion durch 12wöchige OVA-Exposition sensibilisierter Balb/c-Mäuse

$EF_{50}$  der Baseline über 15 Minuten; schwarz: OVA, weiß: Kontrolle

Zwar gibt es bei den Kontrolltieren über den Zeitraum der Exposition Veränderungen des  $EF_{50}$ , diese sind aber über die gesamte Zeit nicht signifikant. Die Werte liegen zwischen 1,75 und 1,97 ml/s. Vergleicht man die Werte der OVA-Tiere mit denen der Kontrollgruppe, kommt es sehr wohl zu signifikanten Unterschieden ab der 8. Expositionswoche. Bei den mit OVA-exponierten Mäusen wird in der ersten Woche ein durchschnittlicher Atemfluss von 1,76 erreicht, dieser fällt bis zur 12. Woche auf einen Wert von 1,3 ml/s ab.

### 3.6. Zustand der Tiere während der Expositionszeitraumes

#### 3.6.1. Gesamtgewicht

Um den Zustand der Mäuse im Laufe der Untersuchung zu dokumentieren werden die Tiere direkt nach Cervicaldislokation gewogen. Wir haben dabei angenommen, dass eine konstante Gewichtszunahme für einen guten Allgemeinzustand der Tiere spricht. Für die Untersuchungen werden 6 bis 8 Wochen alte, weibliche Balb/c- Mäuse verwendet, die zu Beginn 20 bis 25 Gramm schwer und damit noch nicht ausgewachsen sind.

Über den gesamten Zeitraum unterscheidet sich das Gewicht der OVA und PBS exponierten Mäuse nicht signifikant. Zwar sind die Tiere der OVA-Gruppe in der ersten Woche mit 23,0 Gramm fast ein Gramm und in der achten Woche sogar 1,2 Gramm leichter (22,7 zu 23,8 g) als die Kontrolltiere, aber diese Unterschiede sind nicht signifikant. In der letzten Expositionswoche sind die OVA-Mäuse mit 24,2 Gramm sogar um ein Zehntelogramm schwerer als die Kontrollen.

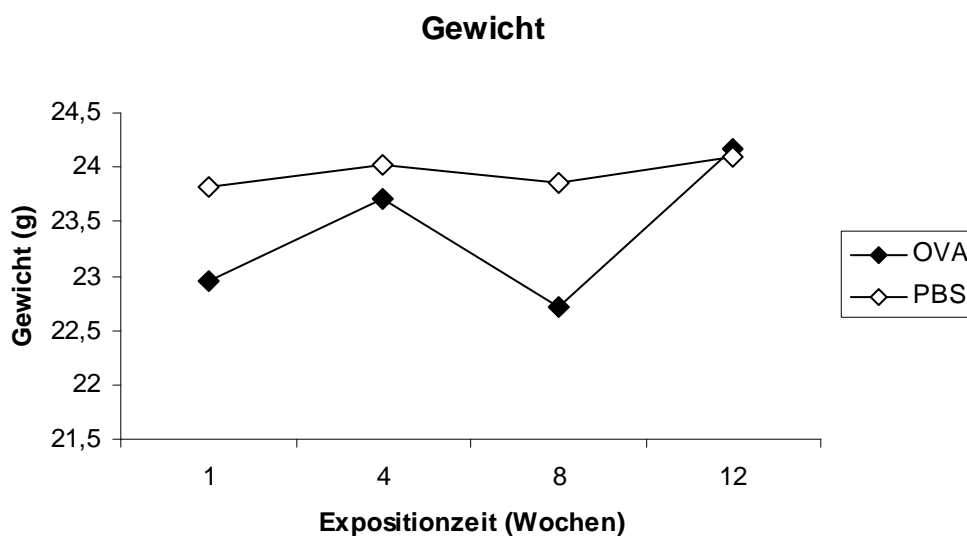


Abbildung 3.22: Gewichtsentwicklung während der intermittierenden Allergenexposition

#### 3.6.2. Milzgewicht

Neben der Messung des Gesamtgewichts werden auch die Milzen gewogen, um mögliche Auswirkungen der Allergenexposition auf die Milz als lymphatisches Organ durch eine immunologische Antwort darzustellen. Es fällt auf, dass in der

ersten Expositionswoche das Gewicht der Milzen mit 0,17 Gramm bei der OVA-Gruppe in Vergleich zur PBS-Gruppe mit 0,135 Gramm erhöht ist. In Bezug auf das Körpergewicht haben die Allergen-exponierten Tiere signifikant schwerere Milzen. Nach 4, 8 und 12wöchiger PBS-Provokation steigt das Milzgewicht in der PBS-Gruppe nur leicht an, in Relation zum Gesamtgewicht bleibt es nahezu konstant. Bei den Mäusen der OVA-Gruppe hingegen kommt es in der 4. Woche zu einem starken relativen (zum Körpergewicht) und absoluten Anstieg von 173 auf 208 mg. Damit ist der Unterschied zur Kontrollgruppe hoch signifikant. In der 8. Woche fällt das Gewicht der Milzen in dieser Gruppe wieder ab (auf 156 Milligramm) und bleibt im Verhältnis zum Gesamtgewicht auch in der 12. Woche auf diesem Niveau. Ab der 8. Woche gibt es zwischen den beiden Gruppen hier keine signifikanten Unterschiede.

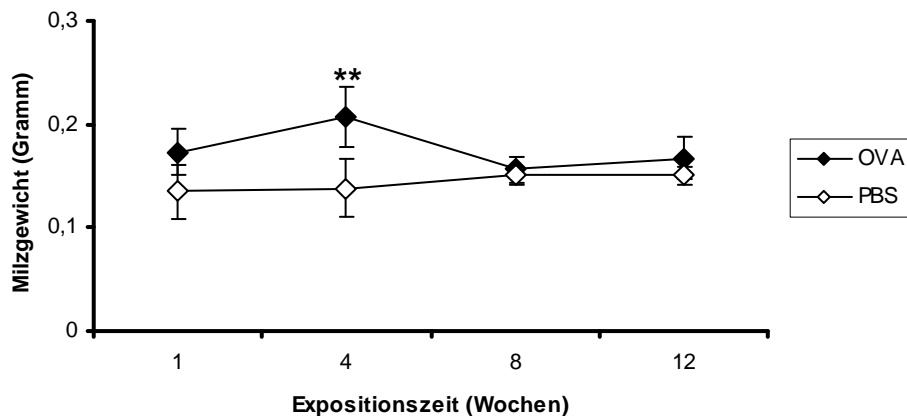


Abbildung 3.23: Entwicklung des Milzgewichts bei intermittierender Allergenexposition

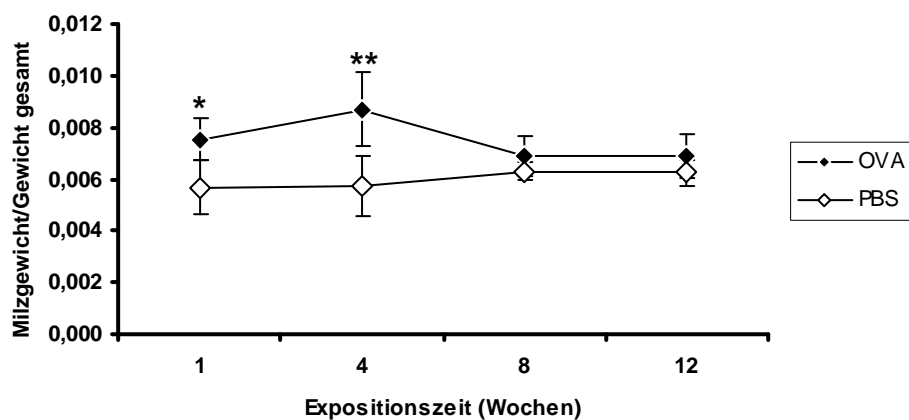


Abbildung 3.24: Entwicklung des Milzgewichts bei intermittierender Allergenexposition in Bezug auf das Gesamtgewicht

### 3.7. Persistenz der Veränderungen

Im Gegensatz zu existierenden akuten Modellen des allergischen Asthma bronchiale, haben wir versucht, den Phänotyp einer chronischen Erkrankung möglichst genau nachzuempfinden. Dazu gehört auch eine, über den Provokationszeitraum hinaus andauernde, Veränderung der Lungenphysiologie und der Lungenfunktion. Um zu untersuchen, ob die durch chronische Allergenprovokation induzierte allergische Atemwegsentzündung über einen längeren Zeitraum persistiert, haben wir Tiere nach 12wöchiger Allergenprovokation weitere sechs Wochen unter Standardbedingungen gehalten und erst dann nach dem schon zuvor angewandten Schema untersucht.

Die Tiere haben in der 6. Woche nach Ende der Exposition im Vergleich zur 12. Woche der OVA-Exposition eine deutliche Verringerung der intraluminalen Entzündung (BAL) gezeigt. Die Leukozytengesamtzahl liegt mit  $121.000 \pm 5.000$  Zellen noch über der Anzahl der Leukozyten in der Kontrollgruppe dieser Unterschied ist aber nicht mehr signifikant. Im Vergleich zu der 12. Expositionswoche hat sich die Anzahl weiter verringert. Nach 6 Wochen expositionsfreier Zeit bilden die Makrophagen mit 80% der Zellen den größten Anteil am entzündlichen Infiltrat, deren Anzahl sinkt aber dennoch absolut (auf  $97.00 \pm 8.300$  Zellen/BAL) ab. Wobei sie in der 12. Woche mit 34% einen relativ geringeren Anteil am luminalen Infiltrat der inflammatorischen Zellen besitzen. Eosinophile Granulozyten sind 6 Wochen nach chronischer Allergenexposition in der BAL nicht mehr nachzuweisen. Der Anteil der Lymphozyten an der Gesamtleukozytenzahl steigt nach der Expositionszeit auf 20% an und hat damit den höchsten relativen Anteil im Untersuchungszeitraum in der 18. Woche erreicht.

Die Zahl der Lymphozyten in der 18. Woche unterscheidet sich als einzige signifikant (t-Test: 0,004) von der Zahl der Kontrollgruppe.



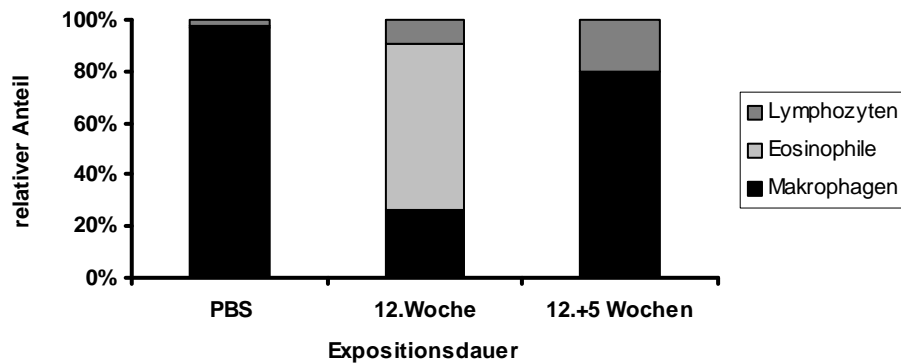


Abbildung 3.25: Relative Verteilung der Leukozyten in der BAL nach 6 expositionsfreien Wochen; Kontrollgruppe, chronische OVA-Exposition und 6 Wochen nach Ende der OVA-Exposition

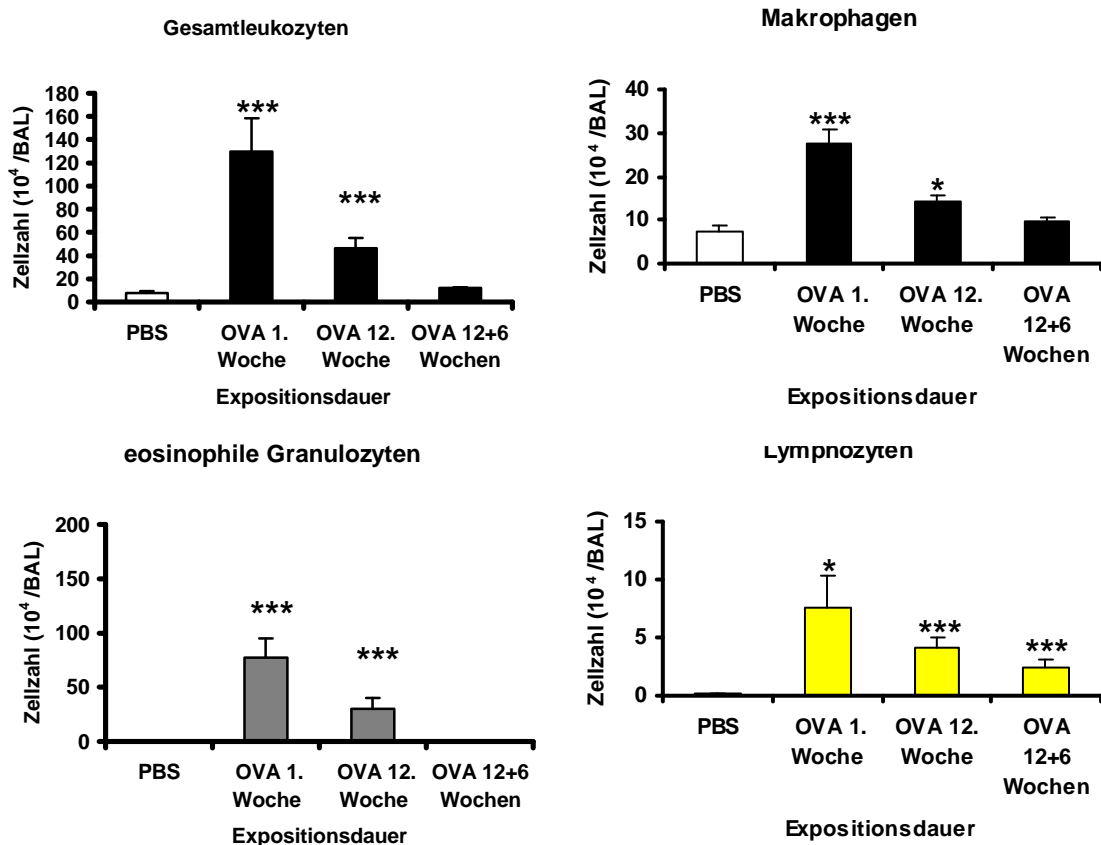


Abbildung 3.26: absolute Leukozytenzahl in der BAL nach 6 expositionsfreien Wochen; Kontrollgruppe, chronische OVA-Exposition und 6 Wochen nach Ende der OVA-Exposition

Bei den parenchymatösen Veränderungen zeigt sich ein anderes Bild:

Auch hier kommt es zu einem Rückgang der Entzündung bei allen Leukozytentypen, aber eosinophile Granulozyten sind noch immer in deutlichem Maße zu erkennen. Ebenso sind die Lymphozyten und Makrophagen noch immer signifikant häufiger als ohne eine vorherige Allergenexposition. Relativ gesehen steigt aber auch hier der Anteil der Lymphozyten bezogen auf die Gesamtzahl der Leukozyten an.

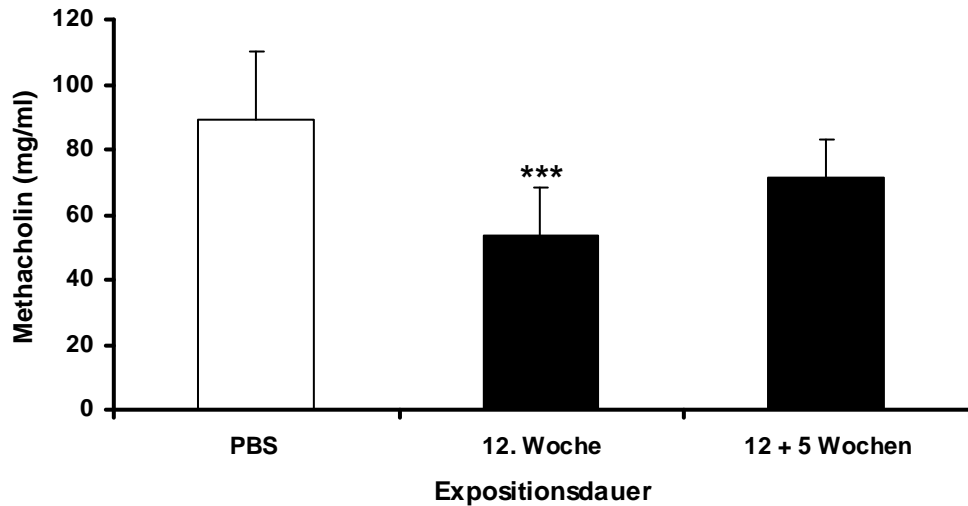
**Tabelle 3.2: Entzündliches Infiltrat des Lungenparenchym durch chronische Allergenprovokation**

Kompartiment	Zellart	PBS	OVA wk 12	OVA wk 12+6
<b>Atemwegsgewebe (Zellen/HPF)</b>	eosinophile G.	0 ± 0	20,17 ± 4,45**	1,25 ± 0,52*
	Lymphozyten	0 ± 0	36,33 ± 5,12**	9,17 ± 1,25**
	Makrophagen	0 ± 0	6,67 ± 1,43**	3,67 ± 0,88*

Es zeigt sich also auch 6 Wochen nach Beendigung der Exposition noch eine deutliche Entzündungsreaktion.

Bei der Lungenfunktion können keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Dabei ist zu bemerken, dass nur noch 3 Versuchstiere zur Verfügung standen.

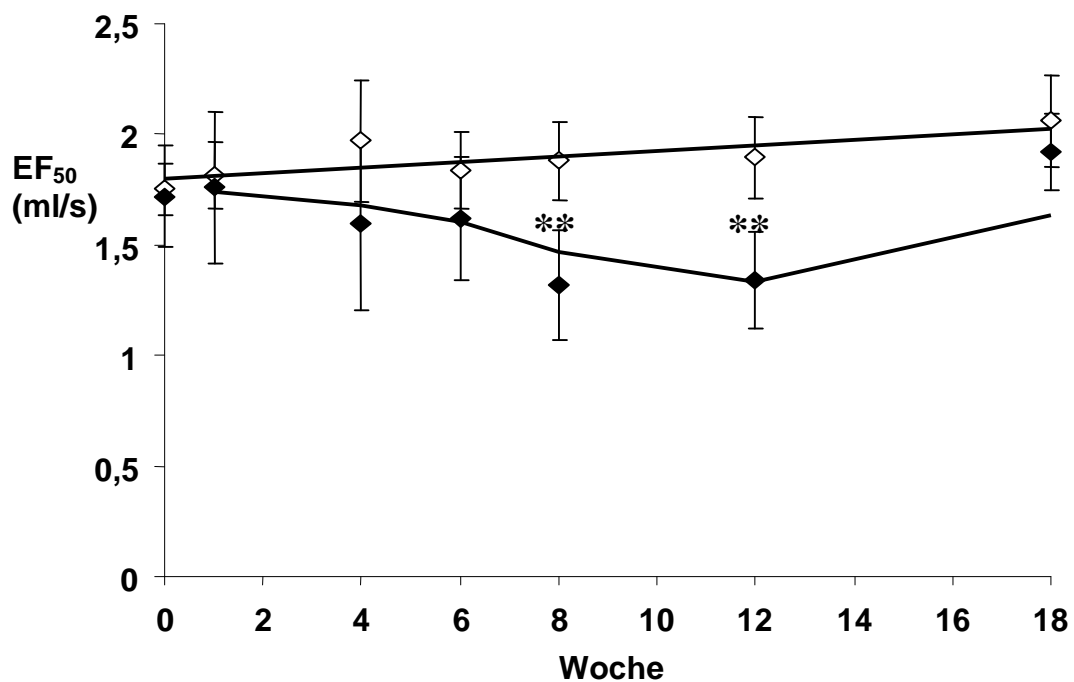
So kommt es zu keiner signifikant verstärkten AHR 6 Wochen nach Ende der Allergenexposition. Der EF<sub>50</sub> wird bei den Kontrolltieren bei einer Konzentration von 90 mg/ml MCh erreicht, bei chronischer OVA-Exposition bei 53 mg/ml MCh, nach 6 Wochen Expositionspause aber erst nach 70 mg/ml MCh. Somit kann in diesem Versuch eine persistierend-signifikante AHR nicht induziert werden.



**Abbildung 3.27: AHR nach chronischer OVA-Exposition**

**Kontrolltiere, chronische OVA-Exposition und 6wöchige Pause nach chronischer Exposition**

6 Wochen nach Beendigung der OVA-Exposition kommt es wieder zu einem Anstieg des  $EF_{50}$  in der OVA-Gruppe in Ruhe und ist somit nicht mehr signifikant zur Kontrollgruppe erniedrigt. Auch hier können wieder nur 3 Tiere zu den Versuchen hinzugezogen werden.



**Abbildung 3.28: chronisch erhöhter Atemwegwiderstand in Ruhe**

#### 4. Diskussion:

Diese Studie demonstriert ein Modell des experimentellen Asthma bronchiale, welches charakteristische Aspekte der menschlichen Erkrankung beinhaltet. Besonderer Schwerpunkt diese Arbeit war es, die Chronifizierung pathologischer Prozesse in den Atemwegen der Versuchstiere zu erreichen und zu beschreiben. Dies sollte zur Etablierung eines Mausmodells für das chronische Asthma bronchiale führen. Definiert haben wir den allergisch-asthmatischen Phänotyp mit verschiedenen Charakteristika, an denen sich dieses Modell messen lassen muss.

Dazu gehören:

- Ein erfolgreicher Nachweis einer systemischen Sensibilisierung durch den Anstieg allergen-spezifischer Immunglobuline im Serum.
- Ein Th2-dominiertes Zytokinmilieu als weiterer Beleg für einen allergischen Phänotyp.
- Eine durch inhalative Allergen-Exposition induzierte pulmonale Inflammation durch eosinophile Granulozyten und Th2-Lymphozyten.
- Eine Ausbreitung der Entzündungsreaktion auf sämtliche Kompartimente des Atemwegssystems.
- Eine Chronifizierung der inflammatorischen Prozesse.
- Eine Hyperplasie der Becherzellen mit gesteigerter Mukusproduktion.
- Eine Chronifizierung der Veränderungen, verdeutlicht durch einen Atemwegsumbau.
- Eine andauernde Veränderung der respiratorischen Parameter als Folge einer persistierenden Obstruktion der Atemwege.
- Eine anhaltende Überempfindlichkeit der Atemwege gegenüber exogene Reizen.

Diese Punkte sind für das allergische Asthma bronchiale des Menschen typisch und sollen, soweit wie möglich, auch in diesem murinen Modell nachvollzogen werden können, um die humane Pathologie möglichst genau zu simulieren.

Erreicht werden soll die Ausprägung dieses Phänotyps durch eine 3malige intraperitoneale (i.p.) Sensibilisierung und eine anschließende Proteinexposition

als Aerosol über den Respirationstrakt. Diese Vorgehensweise hat sich schon in anderen Tiermodellen als eine potente Form der Sensibilisierung herausgestellt (Renz, 1994). Es ist zu kritisieren, dass hierbei nicht der natürliche Weg der Sensibilisierung gewählt worden ist. In anderen Arbeiten (Graffi, 2002; Yu, 1999) gelang dieses auch durch intratracheale Applikation eines artfremden Proteins. Basierend auf einem funktionierenden Akut-Modell für das allergische Asthma, entschieden wir uns für den unphysiologischen Weg des Primings (Neuhaus-Steinmetz, 2000), zumal für uns der systemische Effekt der Methode im Vordergrund stand. In Verbund mit  $\text{Al(OH)}_2$  hat sich OVA als ein hoch potentes Allergen bei Balb/c Mäusen herausgestellt. Durch eine mehrmonatige Exposition durch das artfremde Allergen OVA via Respirationstrakt wollten wir eine Chronifizierung des Beschwerdebildes erreichen, um der humanen Erkrankung näher zu kommen, da auch die Patienten den aerogenen Allergenen oft über lange Zeiträume ausgesetzt sind. Zur Unterscheidung zwischen akuten und chronischen Veränderungen der Atemwege haben wir bewusst in regelmäßigen Abständen während des Expositionszeitraumes Untersuchungen durchgeführt. So ist es gelungen, eine Chronologie der Veränderungen der asthmatischen Pathologie zu erstellen.

Schwerpunkte dieser Studie sollten eine Chronifizierung der Vorgänge im Rahmen eines „*Airway Remodelling*“ und einer persistierenden Inflammation sowie die Lungenfunktion sein, da zum einen das „*Airway Remodelling*“ ein klarer Anhalt für persistierende Veränderungen ist und zum anderen die Lungenfunktion den, für den Patienten entscheidenden Faktor der Erkrankung darstellt. Während des Versuches fand eine Ausbreitung der inflammatorischen Prozesse statt. Eine Ausprägung der progressiven Entzündung in proximalen und distalen Bereichen der Lunge, zusammen mit einem ansteigenden Anteil von Lymphozyten im Vergleich zu den eosinophilen Granulozyten in der chronischen Phase konnte so bisher nicht beschrieben werden.

Voraussetzung für die Erzeugung einer allergischen Atemwegsentzündung ist die systemische Sensibilisierung. Hierbei ist die grundsätzliche Übereinstimmung zwischen Mensch und Maus zu erwähnen; nur dass die allergische Reaktion vom Typ I nach Coombs und Gell im murinen Modell nicht nur durch IgE, sondern

auch durch IgG1 ausgelöst wird. Deshalb wurde neben dem OVA-spezifischen IgE auch der OVA-spezifische IgG1-Spiegel gemessen.

Die allergische Sensibilisierung beginnt mit Kontakt und Reaktion eines Individuums auf ein fremdes Protein. Dieses kann auf unterschiedliche Art und Weise geschehen. Über die Haut, das Gefäßsystem, den Respirations-, den Urogenital- oder den Gastrointestinaltrakt. Durch antigen-präsentierende Zellen (APZ), wie dendritische Zellen (DC), Makrophagen und B-Lymphozyten, welche die fremden Proteine aufnehmen, wird die Sensibilisierung eingeleitet. Kleine Peptidfragmente dieser Proteine werden mittels MHCII-Rezeptoren an die Oberfläche dieser Zelle transportiert, wo der Peptid/MHC II-Komplex mit dem T-Zell-Rezeptor der CD4<sup>+</sup> T-Helferzelle (Th2-Zelle) interagieren kann. Das leitet dann den Prozess einer Aktivierung, Differenzierung und klonalen Expansion von Th2-Zellen ein. Damit geht eine Produktion und Sekretion von für Th2-Zellen typische Interleukinen einher, welche wiederum mit B-Zellen interagieren. Dies bewirkt das Recruitment und die Aktivierung von Effektorzellen, vor allem von eosinophilen Granulozyten im entzündeten Gewebe.

Die Induktion der IgE-Produktion ist zentraler Punkt einer jeden allergischen Reaktion. Durch eine Kreuzvernetzung von Allergen und hoch affinen Fcε-Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen kommt es zur Degranulation dieser Zelle und dem Freisetzen von vasoaktiven, proinflammatorischen Substanzen. Beim allergischen Asthma kommt es durch eine Kombination von Mediatoren der Th2- und Mastzellen zusammen mit Faktoren aus respiratorischem Epithel, glatten Muskelzellen und Nervenzellen, sowie von den bereits erwähnten eosinophilen Granulozyten, zu den asthma-typischen Veränderungen der Lungen: eosinophilen dominierte Inflammation, Ödem, Kontraktion der glatten Muskelzellen, Zunahme der Schleimproduktion und daraus folgend zu einer Atemwegsobstruktion (Busse, 2001).

In dieser Studie ist es gelungen, einen hochsignifikanten Anstieg von OVA-spezifischem IgE und IgG1 zu erreichen. Dieses beweist den Erfolg der Sensibilisierung durch i.p. Injektionen von OVA mit Al[OH<sub>3</sub>], was auch andere Arbeiten zuvor gezeigt haben (Mojtavabi, 2002). Da es über den 12wöchigen Expositionszeitraum nicht zu einem Abfall der Immunglobuline kam, kann man

davon ausgehen, dass dieser Effekt nicht nur als eine akute Reaktion auf die Sensibilisierung anzusehen war. Vielmehr kam es zu einem erneuten Anstieg in der 12. Woche, was durch die Induktion einer sekundären Immunantwort erklärt werden kann. Diese unterscheidet sich von der primären Immunantwort vor allem durch die erhöhte Produktion OVA-spezifischer Antikörper und einer schnelleren Reaktionszeit des Immunsystems. Die Unterschiede nach Rückgang der primären Immunantwort sind zu erklären mit der Persistenz OVA-spezifischer B- und T-Zellen, die als Memory-Zellen das „Immunologische Gedächtnis“ darstellen. Diese Zellen überleben in den peripheren lymphatischen Organen, zum Beispiel in den regionalen Lymphknoten oder dem bronchien- assoziierten lymphatischen Geweben. Bei erneutem Allergenkontakt durch eine Allergenprovokation werden die bereits vorhandenen allergen-spezifischen Gedächtniszellen aktiviert und beginnen mit der weiteren klonalen Expansion, die zu einer im Vergleich zur Primärantwort rascheren Abwehrreaktion führt (Mandell, 2000).

Charakteristische Zytokine für Th2-Zellen sind IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, die nicht ausschließlich aber zum großen Teil von diesen T-Helferzellen produziert und sezerniert werden. Diese Mediatoren haben wesentliche regulatorische Funktionen bei der Entstehung allergischer Erkrankungen im Allgemeinen und der Pathogenese des Asthma bronchiale im Speziellen. In dieser Studie haben wir stellvertretend für das gesamte Th2-Zytokinprofil IL-4 und IL-5 in der BAL gemessen. Es kam bei beiden Zytokinen initial zu einem deutlichen Anstieg der Konzentration, was mit einem Überwiegen der Th2-Zellen zu erklären ist.

IL-4 wird auch von neben der Th2-Zellen auch von APZ gebildet und bewirkt eine Differenzierung von nativen Th0-Zellen zu allergen-spezifischen Th2-Zellen, welche dann ihrerseits durch die Freisetzung der Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 die allergische Entzündungsreaktion steuern (Collins, 1995; O`Hehir, 1991). Unter dem Einfluss von IL-4 führen aktivierte allergenspezifische B-Zellen einen Klassenswitch von IgM zu IgE (in der Maus auch zu IgG<sub>1</sub>) durch und bewirken damit den Aufbau einer spezifischen humoralen Immunität (Yoshimoto, 1995). So sind IL-4-defiziente Mäuse nicht in der Lage IgE zu produzieren.

Die Konzentration fiel bei den OVA-exponierten Tieren nach dem Maximum in der 1. Woche beständig ab und war in der 8. Woche nicht mehr messbar erhöht. Eine

Aktivierung von B-Lymphozyten und die Ausprägung eines Th2-dominierten Zytokinmilieus war aber schon in den ersten Wochen erreicht und schien sich danach auch nicht mehr umzukehren.

IL-5 ist ein zentraler Faktor in der Regulation der Funktion von eosinophilen Granulozyten, die als Effektorzellen der allergischen Entzündung von großer Bedeutung sind. Dabei werden verschiedene Funktionen der eosinophilen Granulozyten durch IL-5 beeinflusst. Im Knochenmark erhöht IL-5 die Produktion der eosinophilen Granulozyten und hemmt im allergischen Gewebe deren Apoptose. Zusätzlich werden eosinophile Granulozyten durch IL-5 aktiviert. Die Ausschüttung von eosinophilentypischen Granulaproteinen ist vermutlich für die chronische Entwicklung der allergischen Entzündung verantwortlich. Das zeigt sich vor allem dadurch, dass sowohl die Zahl der eosinophilen Granulozyten, als auch das Ausmaß ihrer Mediatorfreisetzung, in der Regel sehr gut mit dem klinischen Schweregrad der allergischen Erkrankung korrelieren (Bousquet, 1990). Ein weiterer wichtiger Effekt des IL-5 ist die Beeinflussung der Lungenfunktion (AHR) und die Induktion eines „*Airway Remodellings*“ in den Atemwegen (Lee, 2001). Produziert wird IL-5 vor allem von Th2-Zellen.

Die Konzentration an IL-5 war in unserer Studie in den ersten 8 Expositionswochen deutlich erhöht, fiel aber in der 12. Woche ab. Parallel dazu sank auch die Zahl der eosinophilen Granulozyten im Gewebe (aber nicht in der BAL), so dass hier eventuell ein kausaler Zusammenhang angenommen werden kann. Die AHR war allerdings durch den Abfall des Interleukins nicht beeinflusst worden.

Es ist bekannt, dass Th1- und Th2-Subpopulationen eine antagonistische Wirkung aufeinander ausüben. So inhibieren IL-4 und IL-10 die Entwicklung und Aktivität von Th1-Zellen und das Th1-Zytokin, IFN- $\gamma$  die Entwicklung von Th2-Zellen. Wobei man erwähnen muss, dass einige Mediatoren, wie IL-10 von beiden Subpopulationen sezerniert werden können.

Wie auch in anderen Arbeiten beschrieben (Barnes, 2002) wird TNF- $\alpha$  in allergisch-inflammatorischen Atemwegsorganen in hohen Konzentrationen produziert und wirkt unter anderem als chemotaktisches Signal für eosinophile



Granulozyten (Lampinen, 2004). Es führt im Rahmen von Umbauvorgängen zu einer Stimulation der Migration von Epithelzellen (Sacco, 2004). Wir konnten eine Erhöhung von TNF- $\alpha$  bis zur 8. Expositionswoche nachweisen. Dieser unter anderem von aktivierten Makrophagen und Th1-Zellen sezernierte Mediator markiert Entzündungsreaktionen im reagierenden Gewebe, dient in diesem Fall aber nicht der Infektabwehr, sondern ist vielmehr Indikator für die allgemeine Inflammation.

Neben IL-4, IL-5 und TNF- $\alpha$  haben wir die Konzentration von TGF- $\beta$  über den gesamten Expositionszeitraum gemessen. Es wird angenommen, dass das Epithel des Bronchialbaumes der Hauptproduzent von TGF- $\beta$  bei Asthmatikern ist (Vignola, 2003; Schramm, 2003). Daneben sezernieren aber auch noch andere immunologisch bedeutende Zellen größere Mengen an TGF- $\beta$ , zu diesen gehören eosinophile Granulozyten und Leukozyten (Fehrenbach, 2002). Hohe TGF Konzentrationen können auch in der BAL von Patienten mit Asthma bronchiale gefunden werden und es wurde berichtet, dass TGF- $\beta$  auch während der späten Phase der allergischen Reaktion vom Soforttyp synthetisiert wird (Magan, 1997). TGF- $\beta$  scheint in den Atemwegen eine Menge unterschiedlicher Funktionen zu übernehmen. Dazu gehören:

- die Entwicklung von Toleranz (wahrscheinlich über Th3-Zellen);
- die Entstehung von fibrotischen Vorgängen im Rahmen eines Atemwegsumbaus (Philipps, 2002) und einer Angiogenese (Bonewald, 1999);
- die Beeinflussung von akuter Atemwegsreagibilität und Entzündung in den Atemwegen (Schramm, 2003)
- Hemmung der Proliferation und Supprimierung der Zytokinproduktion von B- und T-Lymphozyten (Roberts, 1998; Gerwin, 1990).

Aufgrund der Vielzahl der Effekte von TGF- $\beta$  sollen die unterschiedlichen Effekte und mögliche Kausalitäten bei den verschiedenen Unterpunkten diskutiert werden.

Der TGF- $\beta$ -Spiegel war über den gesamten Zeitraum sehr deutlich erhöht, fiel im Verlauf nicht ab (im Gegensatz zu den anderen gemessenen Zytokinen), vielmehr

stieg die Konzentration in der BAL in der letzten Expositionswoche in Bezug zur ersten Woche erneut signifikant an.

Eine i.p.-Sensibilisierung und eine chronische Allergen-Exposition induziert bei Balb/c Mäusen eine chronische Atemwegsentzündung.

Es wurde ein Mausmodell entwickelt, welches dem Phänotyp der allergischen Erkrankung des Menschen durch eine chronische Inflammation der Atemwege, möglichst nahe kam. Dazu wurde, ausgehend von einem akuten Modell einer allergischen Entzündung der Atemwege, die Art und Weise der Allergen-Exposition beim Menschen (chronisch als Aerosol, im Intervall) weitgehend nachgeahmt, um eine Chronifizierung der inflammatorischen Prozesse zu erreichen.

Zur Untersuchung der zellulären Entzündungsvorgänge haben wir unterschiedliche Kompartimente der Atemwege in zweiwöchigem Abstand über die Dauer der Exposition von 12 Wochen betrachtet und nach einer Pause von sechs Wochen weitere Messungen durchgeführt. Wert gelegt wurde auf eine Unterteilung in intraluminale (BAL) und parenchymatöse Abschnitte der Atemorgane zum einen und eine weitere Aufteilung des Atemwegsgewebes in proximale und distale Regionen zum anderen. Bei der Beschreibung von Umbauvorgängen in den Atemwegen haben wir eine zusätzliche Aufteilung in intermediäre Anteile unternommen.

Voranzustellen ist die zentrale Rolle der eosinophilen Granulozyten in allergisch entzündlichen Geweben. Die Einwanderung dieser Effektorzellen ist ein komplexer Vorgang, gesteuert durch eine Reihe von Mediatoren, der auch in dieser Studie eines Tiermodells der menschlichen Asthmapathologie nachvollzogen werden konnte. Neben den von uns nachgewiesenen Zytokinen, TNF- $\alpha$  und IL-5, spielen IL-13, Eotaxin, GM-CSF und viele andere Mediatoren eine entscheidende Rolle beim Recruitment dieser Zellen in das Atemwegsgewebe. Der Prozess der Einwanderung startet mit der erhöhten Ausschüttung von eosinophilen Granulozyten in die Blutbahn. Es folgt die Aktivierung, das Rolling entlang der Endothelzellen, die Adhäsion an eben diese

Zellen, die Diapedese durch die Endothelschicht und die Chemotaxis in das entzündete Gewebe (Lampinen, 2004). Betrachtet man die Funktionen der eosinophilen Granulozyten, wird die Schlüsselstellung dieses Zelltyps klar.

So können diese sowohl zytotoxische Mediatoren, wie Peroxidasen, als auch bronchoaktive Substanzen, wie zum Beispiel Leukotriene, sezernieren. Eosinophile Granulozyten haben die Fähigkeit, Antigene zu präsentieren und Th2-Zytokine auszuschütten und die Effekte der infiltrierenden Lymphozyten zu verstärken (Wills-Karp, 2004). Trotzdem wurden die Einflussmöglichkeiten der pulmonalen Eosinophilie oft als unabhängige Variable neben der Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale angesehen und ihre regulatorischen Effekte unterschätzt. In Knock-out-Tierversuchen wurden akute und chronische pathophysiologische Vorgänge mit Funktionen der eosinophilen Granulozyten in Verbindung gebracht. So bilden Eosinophilen-defiziente Tiere keine Becherzellhyperplasie aus, produzieren weniger Schleim in den Becherzellen und antworten auf eine Allergenexposition nicht mit einem hyperreagiblen Bronchialsystem (Kumar, 2002). Bei Unterdrückung der Produktion von Eosinophilen-Peroxidase kommt es zu keiner stärker ausgeprägten Epithelschädigung mit konsekutiven Umbauvorgängen und Einlagerung von Matrix-Proteinen und keiner Vermehrung von glatten Muskelzellen in den Atemwegen (Wills-Karp, 2004). Somit können die eosinophilen Granulozyten als Ausgangspunkt des „*Airway Remodellings*“ angesehen werden

Durch den Beginn einer Allergenprovokation von sensibilisierten Balb/c-Mäusen, also im akuten Stadium der allergischen Reaktion, wurde eine massive, von eosinophilen Granulozyten dominierte Entzündung vor allem der BAL erreicht, die das intraluminale Milieu repräsentiert. Dieses wurde schon in einigen anderen Arbeiten gezeigt (Lee, 2004; Bousquet 1990; Foster, 2000). Eine Migration in das Gewebe der Lungen fand zusätzlich statt, wobei hier der Schwerpunkt der Infiltration in zentralen Anteilen des Atemwegsparenchyms erfolgte. Dies korrelierte mit einer starken Erhöhung von IL-4, IL-5 und TNF- $\alpha$  in der BAL.

Auch Lymphozyten und Makrophagen wanderten in die Lumina der Atemwege und in geringerem Maße ins Gewebe ein. Mit Abnahme der pro-

inflammatorischen Zytokine IL-4, IL-5 und TNF- $\alpha$  in der BAL nahm auch die Konzentration der eosinophilen Granulozyten und der Makrophagen in der BAL ab der 4. Woche ab. Eine Verringerung der intraluminalen, inflammatorischen Zellen (in der BAL) deckt sich mit Studien, die mit einer längeren Allergen-Provokation gearbeitet haben (Sakai, 2001; Kenyon, 2003). Umgekehrt proportional dazu stieg die TGF- $\beta$ -Konzentration bis zur 4. Woche an und blieb bis zum Ende der OVA-Verneblung konstant. Ob die Abnahme der Zellkonzentration von Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten mit dem Abfall der pro-inflammatorischen Zytokine oder dem Überwiegen von TGF- $\beta$ , als einem anti-inflammatorischen Mediator zu erklären ist, kann aufgrund dieser Studie nicht abschließend geklärt werden. Kausale Zusammenhänge sind aber durch beide Vorgänge vorstellbar.

Eine chronische Allergen-Exposition führt zu einer Ausbreitung inflammatorischer Prozesse auf alle Atemwegskompartimente.

Diese Studie verdeutlicht die Ausdehnung der allergischen Entzündung in der chronischen Phase auf die verschiedenen Kompartimente der Atemwege. So kam es zu einer Verschiebung von einer proximal betonten Entzündung zu einem Prozess in allen Anteilen der Atemorgane bei der Chronifizierung der inflammatorischen Prozesse. Bei der akuten Entzündungsreaktion war, wie oben beschrieben, die Inflammation in den Lumina der Atemwege am deutlichsten. Im Gegensatz zu der akuten Entzündung war die chronische Entzündung durch eine lymphozytäre Gewebsinflammation gekennzeichnet. In diesem Zusammenhang haben wir, was die Entwicklung der Entzündung angeht, nicht nur eine Verlagerung von proximal nach distal und von den Atemwegslumina in die verschiedenen Atemwegschichten beobachtet, es kam auch zu einer Verschiebung des Lymphozyten/Eosinophilen-Verhältnisses zu Gunsten der Lymphozyten im Gewebsinfiltrat.

Auch wenn die Abnahme intraluminaler, inflammatorischer Zellen schon beschrieben wurde (Sakai, 2001), ist bisher von einer Verlagerung der Entzündungsprozesse in der chronischen Phase einer Allergenprovokation bei Mausmodellen des experimentellen Asthmas von proximalen in die distalen Atemwegen noch nicht berichtet worden.

Die Becherzellhyperplasie ist Bestandteil des „*Airway Remodelling*“ beim chronischen Asthma bronchiale.

Schleim, bestehend aus Proteinen und Lipiden, bedeckt auch unter physiologischen Bedingungen das Epithel der Atemwege und schützt es vor inhalativen Noxen. Unter pathologisch-respiratorischen Bedingungen, wie dem Asthma bronchiale oder der COPD, kommt es zu einer teils erheblichen Steigerung der Schleimproduktion. Dabei verliert der Schleim seine Schutzfunktion und verstärkt vielmehr die pathophysiologischen Prozesse in den Atemwegen. Die Funktion des Schleims ist es, eingeatmete Partikel zu binden und in Kombination mit den Zilien des Flimmerepithels diese Fremdkörper im Rahmen der mukoziliären Clearance aus den Atemwegen zu entfernen (Rogers, 2002).

Eine gesteigerte Anzahl von Becherzellen in den Atemwegen (Becherzellhyperplasie) ist neben der Induktion fibrotischer Umbauprozesse, der Verdickung der retikulären Basalmembran, einer vermehrten bronchialen Vaskularisierung, der Hypertrophie von glatten Muskeln und mukösen Drüsen, Teil des „*Airway Remodellings*“ (Kumar, 2001; Jeffery, 2001). Hierfür werden die TH<sub>2</sub>-Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 verantwortlich gemacht. Eine direkte Beeinflussung einer Becherzellhyperplasie durch diese Zytokine ist allerdings nur für IL-9 belegt (Wills-Karp, 2000; Rogers, 2002). Die erhöhte Anzahl an Becherzellen im Atemwegsepithel ist direkt verbunden mit einer chronischen Mukushypersekretion und daraus resultierend, mit einer Atemwegsobstruktion. Bei Asthma-Patienten ist ihr Vorkommen allerdings auf die intermediären und distalen Atemwege beschränkt, während die Mukusproduktion in den proximalen, knorpelhaltigen Atemwegsabschnitten durch submuköse Drüsen gewährleistet wird (Widdicombe, 1999). Im Vergleich zu gesunden Probanden zeigen Patienten mit moderatem Asthma eine bis zu dreifach, Patienten mit chronischem schweren Asthma eine bis zu 30-fach erhöhte Häufigkeit von Becherzellen im Epithel der Atemwege, vor allem in weiter distalen Bronchien (Ordonez, 2001; Aikawa, 1992). Da es in weiter distalen Atemwegsabschnitten nicht möglich ist, den gebildeten Mukus durch Abhusten zu entfernen, kommt der gesteigerten Mukusproduktion in diesen Atemwegsbereichen große pathophysiologische Bedeutung zu (Widdicombe, 1999). Gerade während und nach einem Asthmaanfall kommt es

zu einer massiven Erhöhung der Schleimproduktion. So fielen bei Sektionen von Asthmapatienten durch Schleimpfropfen verschlossene Atemwege auf (Rogers, 2002).

Im Mausmodell ist die allergen-induzierte Atemwegsentzündung zumeist mit einer Becherzellhyperplasie der proximalen Atemwege assoziiert, allerdings zeigt bisher keine Studie das Vorkommen mukus-produzierender Zellen in distalen Atemwegsabschnitten (Smith, 2001). In der hier vorliegenden Studie war es möglich, durch die fortwährende Allergenprovokation nicht nur die Progression der Atemwegsentzündung, sondern auch das Fortschreiten der Becherzellhyperplasie bis in die distalen Atemwege zu induzieren. Dabei ist es durchaus möglich, dass durch die chronische Allergenexposition geringe Mengen des Aerosols auch bis in die distalen Atemwege gelangten und dort eine Atemwegsentzündung und die damit einhergehenden pathophysiologischen Veränderungen des Atemwegsepithels auslösen konnten.

Zusammenfassend resultierte die wiederholte Allergenprovokation in einer deutlichen Becherzellhyperplasie, die durch die Beteiligung der distalen Atemwege dem beim humanen Asthma bronchiale beobachteten Phänotyp in hohem Maße ähnelt. Weiterhin muss bei der Betrachtung der von uns angefertigten PAS-Präparate darauf hingewiesen werden, dass durch eine vorangegangene Lavagierung der Atemorgane der intraluminale Mukus herausgewaschen wurde. Bei Betrachtung der Anzahl der Becherzellen in den Atemwegen kann man aber von einer deutlich erhöhten Verschleimung der Bronchien ausgehen.

Eine chronische Allergenexposition verursacht strukturelle Veränderungen der Lungen bei Menschen und ebenso im Tiermodell.

Häufig wird das allergische Asthma bronchiale als eine Erkrankung mit reversibler Erhöhung des Atemwegswiderstandes beschrieben, obwohl bekannt ist, dass sowohl bei Erwachsenen, als auch bei Kindern eine Obstruktion der Atemwege schon bei asymptomatischen Patienten auch außerhalb des Asthmaanfalls vorliegt. Diese Komponente der klinisch nachweisbaren Obstruktion der Atemwege beruht auf dem Boden struktureller Veränderungen der Bronchien und

Bronchioli, die unter dem Begriff des „*Airway Remodelling*“ zusammengefasst werden (Vignola, 2000).

Das Vollbild des „*Airway Remodelling*“ besteht aus einer Verdickung der Basalmembran, Zunahme von Becherzellen, Myofibroblasten, Nervenfasern und Blutgefäßen (McDonald, 2001), sowie einer Einlagerung von interstitieller Matrix (Chiappara, 2001).

„*Airway Remodelling*“ ist ein bedeutender Aspekt von Wundreparaturmechanismen in allen Organen und kann am besten verstanden werden als ein Heilungsprozess, resultierend aus einer Schädigung des respiratorischen Epithels. So kommt es während eines chronisch-entzündlichen Prozesses innerhalb der Atemwege, wie beim allergischen Asthma bronchiale, zu einer massiven Schädigung der Bronchialepithelzellen, was nicht nur zu einer Ablösung ganzer Teile des Bronchialepithels (Laitinen, 1985), dem „*epithelial shedding*“, sondern auch zu einer Aktivierung der überlebenden Bronchialepithelzellen und der darunter liegenden Fibroblasten führt (Knight, 2001). Ausgangspunkt dieser Schädigung sind Mediatoren von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen, sowie einer Vielzahl anderer Effektorzellen. Neben der Sekretion extrazellulärer Matrix reagieren aktivierte Strukturzellen mit der Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine, die zur Regulation des Wundheilungsprozesses beitragen. Die Sekretion extrazellulärer Matrix sorgt dabei zunächst für einen provisorischen Abschluss des geschädigten Bronchialgewebes. Die Produktion von Kollagen Typ IV und Laminin durch Fibroblasten und Bronchialepithelzellen stellt also den ersten Schritt des Wundheilungsprozesses dar. Es kommt somit zu einer Reparatur von epithelialen Strukturen, um den normalen Aufbau und die Funktion wiederherzustellen. Gerade bei stärkerer Verletzung kommt es zu überschießendem Ersatz des Ursprungsgewebes durch Bindegewebe, das die Funktion nicht vollständig übernehmen kann (Maddox, 2002). Wie bereits erwähnt, spielen dabei Zytokine wie IL-1 $\beta$ , PDGF und vor allem das, im Mausmodell in hohen Konzentrationen vorgefundene, TGF- $\beta$  eine bedeutende regulierende Rolle (Roche, 1989), die sowohl die Chemotaxis als auch die Aktivierung von Fibroblasten umfasst. Neuerdings wird in diesem Zusammenhang auch der „*nerve growth factor*“ (NGF) diskutiert, der ebenfalls in sehr hohen Konzentrationen in der BAL chronisch exponierter Tiere nachweisbar war (Micera, 2001).

Ursprünglich wurde das strukturelle „*Airway Remodelling*“ in Atemwegserkrankungen nur mit Veränderungen von Endothelzellen und extrazellulärer Matrix, als Reaktion auf die Entzündung in Verbindung gebracht. Dieser Begriff wurde auf andere pathologische Situationen ausgeweitet (Bousquet, 2000).

Schon früh im Prozess des Asthma bronchiale kommt es, wie auch von uns gezeigt, zu einer Verdickung der Lamina reticularis. Durch eine Anfärbung mit sirius red/fast green konnten wir bei den chronisch allergen-exponierten Tieren eine Einlagerung von Kollagen in der Basalmembran nachweisen. Auch in anderen Arbeiten wurde eine Einlagerung von Kollagen I, III, IV und Fibronectin beschrieben (Vignola, 2003). Diese Veränderungen konnten auch bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale gezeigt werden. Uns ist es gelungen, eine zusätzliche Ausbreitung der Basalmembran-Verdickung, durch Einlagerung von Kollagenmolekülen, nach distal durch sirius red/fast green nachzuweisen. Es kam nicht nur zu einer Einlagerung in die Tunica reticularis sondern auch in die Tunica adventitia und untergeordnet auch in die Tunica muscularis.

Eine zentrale Rolle in der Pathogenese des chronischen Asthma bronchiale spielt der Mediator TGF- $\beta$ .

Eine Erklärung für die gesteigerte Neo-Synthese extrazellulärer Matrix, vor allem kollagener Fasern, ist die deutlich erhöhte Konzentration von TGF- $\beta$  in der BAL. Kenyon et al. haben gezeigt, dass schon eine Instillation von TGF- $\beta$  über 7 Tage eine peribronchiale Ablagerung von Kollagen im Mausmodell bewirkt. Myofibroblasten und Fibroblasten scheinen dabei die Hauptproduzenten von kollagenen Fasern zu sein (Kenyon, 2003). Auch diese waren in den chronisch allergen-exponierten Atemwegsorganen der Versuchstiere deutlich häufiger anzutreffen als in der Kontrollgruppe. Das von eosinophilen Granulozyten und Epithelzellen produzierte TGF- $\beta$  stimuliert Fibroblasten der Submukosa zur Umwandlung in Myofibroblasten, welche Kollagen produzieren und in die Submukosa der Atemwege sezernieren. Myofibroblasten sind durch eine Expression von  $\alpha$ -SMA und Pro-Kollagen charakterisiert (Hashimoto, 2001). So resultiert die in-vitro TGF- $\beta$ -Stimulation von Fibroblasten, aus der Bronchialwand von Asthma-Patienten, in einer Transformation zu Myofibroblasten. Die



Produktion von kollagenen Fasern scheint Ausgangspunkt für die Atemwegsfibrose zu sein. Besondere Beachtung schenken wir den fibrotischen Prozessen der kleinsten Atemwege, hier kam es bis zu den Eingängen der Alveolen zu Umbauprozessen und Einlagerung von extrazellulärer Matrix. Dies ist insofern von Bedeutung, als gerade Störungen des Atemflusses in den Lumina mit dem kleinsten Durchmesser zu entscheidender Erhöhung des Atemflusswiderstandes führen (Wagner, 1998).

Es kam in den Lungen der Versuchstiere zu einer deutlichen Vermehrung von Nervenfasern und Blutgefäßen. Beides kann mit den hohen TGF- $\beta$ -Konzentrationen erklärt werden, da dieser Mediator nach Bonewald sowohl eine verbesserte Vaskularisierung des entzündeten Gewebes, als auch eine verstärkte nervale Versorgung induziert (Bonewald, 1999).

Zusätzlich zu den Veränderungen im Atemwegslumen und im Lungenparenchym fiel eine deutlich erhöhte Zahl von inflammatorischen Zellen in der Endothelschicht auf. Diese waren zumeist eosinophile Granulozyten und Lymphozyten. Mit zunehmender Infiltration von Lymphozyten in das Atemwegsgewebe zeigte sich jedoch auch eine deutliche Abnahme der Infiltration eosinophiler Granulozyten. Möglicherweise ist dies ein erster Aspekt für die Entwicklung einer Toleranz bei chronischen Allergenprovokation. Eine solche Toleranzentwicklung ist bereits in vielen Tiermodellen beschrieben worden und stellt ein Problem bei der Entwicklung geeigneter Tiermodelle für das chronische Asthma dar (Epstein, 2004). Ein Teil des veränderten Entzündungsverhaltens könnte mit den stark erhöhten Konzentrationen an TGF- $\beta$  in der BAL zu erklären sein (Zhang, 1999), allerdings steht dies im Gegensatz zur gesteigerten Infiltration von Lymphozyten in das Atemwegsgewebe.

Pulmonale Inflammation, strukturelle Veränderungen und eine vermehrte Verschleimung führen zu einer Störung der Lungenfunktion bei allergen-exponierten Tieren.

Einen besonderen Aspekt dieser Studie sollte die Messung der Lungenfunktion der Versuchstiere darstellen, da die lungenphysiologischen Veränderungen im Mittelpunkt der asthmatischen Beschwerden stehen. Dazu muss geklärt werden,

welche Parameter überhaupt aussagekräftig sind, für diese Störungen und inwiefern wir eine Beeinträchtigung der Funktionen erwarten.

Im Mittelpunkt der asthmatischen Atempathologie steht eine während der Expiration verstärkt auftretende Obstruktion der Atemwege mit Erhöhung des Atemflusswiderstandes. Hier muss unterschieden werden zwischen einer persistierenden Erhöhung des Atemwegwiderstandes und einer reversiblen Veränderung in Folge von akuten Reaktionen auf spezifische oder unspezifische Reizstoffe. Exemplarisch für eine unspezifische Reaktion (AHR) haben wir, wie aus anderen Arbeiten bekannt, eine Verneblung mit MCh herangezogen (Wagner, 1999; Neuhaus-Steinmetz, 2000; Hamelmann, 2001). Das Acetylcholin-Derivat bewirkt durch Bindung an cholinerge Rezeptoren des Atemwegsepithels eine Verengung der Atemwege mit konsekutiver Erhöhung des Atemwegwiderstandes. Zur Darstellung der spezifischen Antwort (ABO) wurden die Tiere einem Aerosol aus verdünntem Allergen ausgesetzt.

Klinisch äußert sich eine Atemwegsobstruktion in einer Verringerung der Einsekundenkapazität ( $FEV_1$ ) bzw. in einem gesteigerten Atemwegwiderstand. Das Kaliber der Atemwege ist ein wichtiger Parameter, der den Atemwegwiderstand beeinflusst. Bei Verringerung des Atemwegskalibers vergrößert sich gemäß Strömungsmechanik der Widerstand, der einer Strömung innerhalb einer Röhre entgegengebracht wird (Stroppe, 1994). Das bedeutet, dass sämtliche Veränderungen der Atemwegswand, die zu einer Verringerung des Atemwegskalibers führen, eine Erhöhung des Atemwegwiderstands zur Folge haben. Beim chronischen Asthma bronchiale kommen verschiedene Einflussfaktoren in Frage, die solche Veränderungen mit sich bringen können: die Atemwegsentzündung, einhergehend mit einem Ödem sowie die Infiltration von Zellen in das Bronchialgewebe; die Einlagerung von kollagenen Fasern; die Hyperplasie bzw. Hypertrophie der glatten Atemwegsmuskulatur. Letztlich führt die vermehrte Produktion von Mukus in Verbindung mit einer entzündungsbedingten Schädigung des Atemwegsepithels und damit des Ziliarapparates zu einer verschlechterten mukoziliären Clearance und damit ebenfalls zu einer Verminderung des Atemwegskalibers (Bates, 2003).

Bei der Auswahl der Technik, mit der man die Lungenfunktion der Mäuse dokumentieren will, muss man Unterschiede zwischen Mensch und Tier beachten. Zusätzlich ist die Auswahl der physiologisch relevanten Parameter nicht einfach (Bates, 2003). Wir entschieden uns für eine nicht-invasive Messung von nicht anästhesierten Mäusen. Gründe hierfür waren die sehr häufigen Messungen zum Teil für 16 Wochen, wobei invasive Messmethoden nicht mehrfach an einem Tier durchgeführt werden können; sowie eine mögliche Beeinflussung der Lungenfunktion durch inhalative Anästhetika. So benutzten wir die Head-out-Body-Plethysmographie zur oszillographischen Darstellung und Ableitung der Lungenfunktionsdaten. Klinisch dient der  $FEV_1$  als bester Parameter für die Feststellung einer Atemwegsobstruktion. Im Mausmodell und auch beim Menschen wird der halbmaximale expiratorische Atemfluss ( $EF_{50}$ ) als relevanten Indikator für eine Obstruktion der Atemwege verwendet (Wagner, 1998; Neuhaus-Steinmetz, 2000), da er sehr sensibel auf eine Verringerung des Atemwegsdurchmessers reagiert und eng mit den klinischen Symptomen von Asthmatikern korreliert.

Wodurch ist eine persistierende Erhöhung des Atemwegwiderstandes zu erklären?

Im Rahmen von Remodelling-Vorgängen findet eine zunehmende Fibrosierung der Bronchien statt, die die Kalibervariabilität der Atemwege einschränken kann und zu einer Einengung des Lumens führt (Roche, 1989). In dem hier etablierten Modell korreliert eine beständige Verringerung des expiratorischen Atemflusses sowohl mit der Progression der allergischen Atemwegsentszündung, als auch mit dem Ausmaß des „*Airway Remodelling*“. Dieser Zusammenhang konnte bisher nur schwer im Tiermodell gezeigt werden. Eine mögliche Begründung hierfür können die bisher so nicht erwähnten strukturellen Veränderungen der distalen Atemwegsabschnitte bei Tiermodellen für das chronische Asthma sein. Dabei scheint deren Bedeutung maßgeblich zu sein. Schließlich beträgt der Anteil der distalen Atemwege am Gesamtwiderstand des Bronchialsystems bis zu 50%, wodurch die Beteiligung distaler Atemwege im Falle einer AHR besonderes schwerwiegend ist (Wagner, 1998).

Es wird bei Asthma-Patienten mit zunehmendem Alter eine verstärkte Beeinträchtigung der Ruheatmung beobachtet, die in einer persistierenden Atemwegsobstruktion begründet ist (Bai, 2000). Bisher konnte bereits in mehreren Studien ein Zusammenhang dieser persistierenden Atemwegsobstruktion mit dem Alter der Patienten, der Dauer und dem Schweregrad der asthmatischen Erkrankung und mit dem Ausmaß der AHR assoziiert werden (Boulet, 1994; Bai, 2000). Neben diesen Zusammenhängen gibt es allerdings bisher noch keine Erkenntnisse über den zugrunde liegenden Pathomechanismus. Im Mittelpunkt der Diskussionen steht das „*Airway Remodelling*“, dessen Ausmaß ebenfalls sowohl mit dem Schweregrad als auch mit der Dauer der Erkrankung korreliert (Bai, 2000).

Was sind die Ursachen für eine gesteigerte Reagibilität auf spezifische (AHR) und unspezifische (ABO) Noxen?

Die Atemwegshyperreagibilität (AHR) ist sicher eines der klinisch auffälligsten Merkmale des Asthma bronchiale. Histamin, unter anderem von Mastzellen und Makrophagen ausgeschüttet, scheint direkt auf die glatte Muskulatur der kleinen Atemwege gesunder Individuen zu wirken. Die Obstruktion der Atemwege ist über die Histamin<sub>1</sub>-Rezeptoren der glatten Muskulatur gesunder und asthmatischer Personen vermittelt. Zusätzlich dazu bewirkt Histamin eine Irritation der bronchialen Gefäße, die zu einer Flüssigkeits-Exsudation ins Gewebe führt (Wagner, 1998).

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf die Reagibilität der Atemwege sind die eosinophilen Granulozyten, die durch ihre Mediatoren direkt eine AHR auslösen können. Wichtigster Auslöser der AHR sind aber Th<sub>2</sub> Lymphozyten, die über eine Induktion von IgE von B-Zellen, Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und durch vasoaktive Substanzen (wie TNF- $\alpha$ ) die Hyperreagibilität der Lungen auslösen (Hamelmann, 2001).

Eine Erklärung für die spezifisch erhöhte Reagibilität auf das Allergen (ABO) wird mit der Ausprägung einer sekundären Immunabwehr erklärt. Durch allergenspezifische B- und T-Zellen, die im reagierenden Gewebe persistieren, kommt es zu einer schnelleren und ausgeprägteren immunologischen Reaktion, die durch spezifische IgE-Antikörper erklärt werden kann. In dieser Studie konnten wir nach

der 1. Expositionswoche diesen Effekt nicht mehr darstellen. Gründe hierfür können eine unzureichende Ausprägung von Gedächtniszellen oder die Ausbildung von Toleranz sein. Eine weitere mögliche Erklärung wäre die Erschöpfung der Effektorzellen an bronchokonstriktorisches Mediatoren. Diesen Nachweis konnten wir aber nicht erbringen, zumal die weiter nachweisbare AHR dem entgegensteht.

Nach 12-wöchiger Allergen-Provokation konnte eine im Vergleich zu Tieren mit akuter allergen-induzierter Atemwegsentzündung eine weiter gesteigerte Atemwegsreagibilität gegenüber MCh festgestellt werden. Interessanterweise geht dabei die Steigerung der Atemwegsreagibilität mit einer Verringerung der intraluminalen Entzündung einher. Allerdings nimmt im Verlauf der Studie die Entzündung des Atemwegsgewebes nicht ab, sondern nimmt an Umfang sogar noch zu und betrifft weitere Bereiche des Bronchialsystems. Zwar verringert sich der Anteil eosinophiler Granulozyten innerhalb des allergischen Atemwegsinfiltrats deutlich, jedoch sind über den gesamten Expositionsverlauf stets eosinophile Granulozyten sowohl in der BAL als auch im Gewebe zu beobachten. Eventuell ist gerade die Lokalisation der eosinophilen Granulozyten, die sich in der chronischen Atemwegsentzündung in unmittelbarer Nähe der glatten Atemwegsmuskulatur befinden, von Bedeutung. Hinzu kommt die Progression der allergischen Entzündung nach distal. Es kommt zu einer Einbeziehung von Atemwegsabschnitten, die zuvor nicht mit in die Asthmapathogenese involviert waren, aber von großer Bedeutung für die Lungenfunktion sind. Somit könnte die Entzündung der distalen Atemwegsabschnitte kumulativ zu der gesteigerten Atemwegsreagibilität beitragen. Nach 6wöchiger Expositionspause hatte sich die AHR in unserer Studie wieder zurückgebildet, zumindest konnte keine signifikante Veränderung betrachtet werden. Dies könnte unter anderem in kausalem Zusammenhang mit einer unzureichenden Ausbildung von Gedächtniszellen stehen oder dem Rückgang von eosinophilen Granulozyten im Atemwegsgewebe und -lumen, wobei wir das nicht beweisen können.

Neben Zellen des allergischen Atemwegsinfiltrats werden auch verschiedene Nervenwachstumsfaktoren wie NGF und die Zellen der glatten

Atemwegsmuskulatur mit der Ausbildung einer Atemwegsüberempfindlichkeit in Zusammenhang gebracht (Shore, 2004).

In Bronchial-Biopsien von Asthma-Patienten konnte gezeigt werden, dass die glatte Atemwegsmuskulatur sowohl eine Hyperplasie der einzelnen Zellen als auch eine Hypertrophie aufweist. Patienten, die an einer schweren Asthma-Exazerbation verstarben, weisen im Vergleich zu Asthma-Patienten, die durch andere Ursachen zu Tode kamen, eine deutlich verdickte Atemwegsmuskulatur auf (Carroll, 1993). Weiterhin beschreiben einige Studien gewisse Unterschiede zwischen der glatten Atemwegsmuskulatur von Asthma-Patienten und der gesunder Individuen. In Bronchialmuskelbiopsien konnte eine erhöhte Expression und eine gesteigerte Aktivität der Myosin-Leichtketten-Kinase bei Asthma-Patienten nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass wir in den Schnitten der Lungen gehäuft Nervenfasern angeschnitten haben und der Gehalt an  $\alpha$ -smooth-muscle-protein sich im Verlauf der Allergen-Exposition erhöhte. Der genaue Mechanismus der Entstehung bronchialer Hyperreaktivität ist allerdings bisher ungeklärt.

Zur Aufdeckung möglicher lungenstrukturellen Prozesse im Rahmen der Ausbildung eines Emphysems haben wir das Lungenvolumen ermittelt (data not shown). Es kam zu keinen signifikanten Veränderungen, sodass wir die Entstehung größerer emphysematöser Veränderungen nahezu ausschließen können.

Zur Verdeutlichung des Allgemeinzustandes verglichen wir während der Studie das Körpergewicht der Versuchstieren, wobei sich während der gesamten Studie keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe ergaben und alle Tiere entsprechend des Entwicklungsstandes an Gewicht zunahmen. Somit kam es durch die Allergenprovokation zu keiner relevanten körperlichen Einschränkung der Tiere, die eine Veränderung der lungenphysiologischen Parameter erklären könnte.

Messungen der Milzgewichtes wurden zur Verdeutlichung von immunologischen Veränderungen und konsekutiver Antwort des lymphozytären Systems der Versuchstiere auf die Allergen-Provokation gewertet, wobei es hier aber nur in der

ersten Wochen zu signifikanten Unterschieden kam. In weiteren Untersuchungen, die nicht im Rahmen dieser Studie besprochen werden können, wurden die Milzen aufgearbeitet und die lymphozytären Zellen weiter differenziert.

## 5. Literaturverzeichnis

**Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T.** Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest*. 1992 Apr;101(4):916-21.

**Anderson H, Poloniecki J, Strachan D, Beasley R, Björkstén B, Asher M.** Immunization and symptoms of atopic disease in children: Results from the international study of asthma and allergies in childhood. *American Journal of Public Health* 2001 Vol.91 (7).

**Asher MI, Keil U, Anderson HR, Beasley R, Crane J, Martinez F, Mitchell EA, Pearce N, Sibbald B, Stewart AW, et al.** International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J*. 1995 Mar;8(3):483-91.

**Barnes PJ.** Cytokine modulators as novel therapies for asthma. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002. 42:81–98.

**Bates J, Irvin CG.** Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle. *J Appl Physiol* 94: 1297–1306, 2003.

**Beard J, Sladden T, Morgan G, Berry G, Brooks L, McMichael A.** Health impacts of pesticide exposure in a cohort of outdoor workers. *Environ. Health Perspect.* 2003;111:724-730.

**Björkstén B, et al.** Prevalence of childhood asthma, rhinitis and eczema in Scandinavia and Eastern Europe. *Eur. Resp. J*, 12 (1998) 432-437.

**Bonewald LF.** Regulation and regulatory activities of transforming growth factor beta. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1999 9(1): 33-44.

**Boulet LP, Laviolette M, Turcotte H, Cartier A, Dugas M, Malo JL, Boulet M.** Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine. *Chest*. 1997. 112: 45-52.

**Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM.** Asthma. From bronchoconstriction to airway inflammation and remodeling. (2000) *Am J Respir Crit Care Med*. 161(5): 1720-45.

**Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony Lafontaine J, Godard P, et al.** Eosinophilic inflammation in asthma. *N-Engl-J-Med* 1990; 323:1033-1039.



**Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E.** Environmental Exposure to Endotoxin and Its Relation to Asthma in School-Age Children. (2002) *The New England Journal of Medicine* Vol. 347(12), pp 869-877.

**Busse W., Lemanske R.** Asthma. *N Engl J Med* 2001;344:350–362.

**Calhoun WJ, et al.** Asthma variability in patients previously treated with  $\beta$ 2-agonists alone *J allergy Clin Immunol* Vol 112 (6) (2003).

**Chiappara A, Gagliardo R, Siena A, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G, Vignola AM.** Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2001, 1:85-93.

**Cohn L, Elias JA, Chupp GL.** Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:789-815.

**Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ.** Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med.* 1995 Oct 1;182(4):1169-74.

**Carroll NG, Cooke C, James AL.** Bronchial blood vessel dimension in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:689-95.

**Davies D, Wicks J, Powell R, Puddicombe S, Holgate S.** Airway remodelling in asthma: New insights. *J. Allergy Clin Immunol.* 2003, Vol. 111 (2).

**Epstein MM.** Do Mouse Models of Allergic Asthma Mimic Clinical Disease? *International Archives of Allergy and Immunology* 2004; 133:84-100.

**Fehrenbach H, Fehrenbach A, Pan T, Kasper M, Mason RJ.** Keratinocyte growth factor-induced proliferation of rat airway epithelium is restricted to Clara cells in vivo. *Eur Respir J* 20:1185-97. (2002)

**Foster P, Ming Y, Matthei K, Young I, Temelkovski J, Kumar R.** Dissociation of Inflammatory and Epithelial Responses in a Murine Model of Chronic Asthma. *Laboratory Investigations* 2000, Vol 80 (5) pp. 655-662.

**Foster P., Yang M., Herbert C., Kumar R.** CD4+ T-Lymphocytes Regulate airway Remodelling and Hyper-Reactivity in a Mouse Model of Chronic Asthma. *Laboratory Investigation* 2002, Vol 82 (4).

**Gerwin BI, Keski-Oja J, Seddon M, Lechner JF, Harris CC.** TGF-beta 1 modulation of urokinase and PAI-1 expression in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 1990. 259: L262-9.

**Glaab T, Daser A, Braun A, Neuhaus-Steinmetz U, Fabel H, Alarie Y, Renz H.** Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Mar;280(3):L565-73.

**Graffi SJ., Dekan G., Stingl G., Epstein MM.** Systemic administration of antigen-pulsed dendritic cells induces experimental allergic asthma in mice upon aerosol antigen rechallenge. *Clin Immunol* 2002;103:176–184.

**Hakonarson H, Wjst M.** Current concepts on the genetics of asthma. *Current Opinion in Pediatrics* 2001, 13:267–277.

**Hamelmann E, Gelfand EW.** IL-5-induced airway eosinophilia – the key to asthma? *Immunological Reviews* 2001, Vol. 179: 182–191.

**Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, Matsumoto K, Maruoka S, Horie T.** Transforming growth Factor-beta1 induces phenotypic modulation of human lung fibroblasts to myofibroblast through a c-Jun-NH2-terminal kinase-dependent pathway. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Jan;163(1):152-7.

**Hellings PW, Ceuppens J.** Mouse models of global airway allergy: what have we learned and what should we do next. *Allergy* 2004, 59: 914–919.

**Herold:** *Innere Medizin* 2004/05.

**Herz U, Braun A, Ruckert R, Renz H.** Various immunological phenotypes are associated with increased airway hyperresponsiveness, *Clin Exp Allergy* 1998; 28 (5): 625-634.

**Herz U, Ahrens B, Scheffold A, Joachim R, Radbruch A, Renz H.** Impact of in utero Th2 immunity on t-cell deviation and subsequent immediate-type hypersensitivity in the neonate. *Eur. J. Immunol.* 30 2000; 714-718.

**Hoffjan S, Ober C.** Present status on the genetic studies of asthma. *Current Opinion in Immunology* 2002; 14:709–717.

**Hogan SP, Mould A, Kikutani H, Ramsay AJ, Foster PS.** (1997) Aeroallergen-induced eosinophilic inflammation, lung damage, and airways hyperreactivity in mice can occur independently of IL-4 and allergen-specific immunoglobulins. *J Clin Invest.* 1999: 1329-39.

**Illi S, von Mutius E, Lau S, Bergmann R, Niggemann B, Sommerfeld C, Wahn U.** Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth control study. *BMJ* 2001, Vol. 322, 390-394.

**James A, Maxwell P, Pearce-Pinto G, Elliot J, Carroll N.** The relationship of reticular basement membrane thickness to airway wall remodelling in asthma. *Respiratory and Critical Care Medicine* 2002, Vol. 166 pp. 1590-1595.

**Jeffery PK.** Remodelling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Crit Care Med* 2001, Vol. 164 pp.528-538.

**Juntti H, Kokkonen J, Dunder T, Renko M, Niinimaki A, Uhari M.** Association of an early respiratory syncytial virus infection and atopic allergy. *Allergy*. 2003 Sep;58(9):878-84.

**Kay B, Phipps S, Robinson DS.** A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *Trends in Immunology* Vol.25, No.9, 2004.

**Kenyon NJ, Ward RW, Last JA.** (2003) Airway fibrosis in a mouse model of airway inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 186: 90-100.

**Kenyon N.J., Ward R.W., McGrew G., Last J.** TGF- $\beta$ 1 causes airway fibrosis and increased collagen I and III mRNA in mice *Thorax* 2003;58:772–777.

**Knight D.** Epithelium-fibroblast interaction in response to airway inflammation. *Immunol Cell Biol*. 2001; 79: 160-4.

**Kroegel, C.:** *Asthma bronchiale*. Thieme Verlag 2002.

**Kumagai K, Ohno I, Imai K, Nawaka J, Hayashi K, Okada S, Senoo H, Hattori T, Shirato K.** The involvement of matrix metalloproteinases in basement membrane injury in a murine model of acute allergic airway inflammation; *Clin Exp Allergy* 2002; 32, 1527-1534.

**Kumar RK.** Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy? *Pharmacol Ther*. 2001 Aug;91(2):93-104.

**Kumar RK, Herbert C, Yang M, Koskinen A, McKenzie A, Foster PS.** Role of Interleukin-13 in eosinophil accumulation and airway remodelling in a mouse model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1104-1111.

**Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Haahtela T.** Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1985; 131: 599-606.

**Lampinen M, Carlson M, Kansson L, Venge P.** Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* 2004; 59: 793–805.

**Lee JJ, Dimina D, et al.** Defining a Link with Asthma in Mice Congenitally Deficient in Eosinophils. *Science* (9) 2004 Vol.305.

**Lee NA, Gelfand EW, Lee JJ.** Pulmonary T cells and eosinophils: coconspirators or independent triggers of allergic respiratory pathology? *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Jun;107(6):945-57.

**Lemanske R, Madison M.** Viral infections and asthma inception. *J Allergy Clin Immunol,* 9, 2004.

**Loddenkemper R.** Asthma Burden. In *The European Lung White Book 2003* herausgegeben von der European Respiratory Society (ERS) und der European Lung Foundation (ELF). 2004: 16-25.

**Maddox L, Schwartz D.** The Pathophysiology of asthma. *Annu. Rev. Med.* 2002. 53:477–98.

**Magnan A, Retornaz F, Tsicopoulos A, Brisse J, Van Pee D, Gosset P, Chamlian A, Tonnel AB, Vervloet D.** 1997. Altered compartmentalization of transforming growth factor-beta in asthmatic airways. *Clin Exp Allergy.* 27(4): 389-95.

**Mandell G, Bennett J, Dolin R (Hrsg.).** Principles and Practice of Infectious Diseases. 5 Aufl. New York, Churchill Livingstone. 2000. pp.245.

**Masoli M.** The global burden of asthma: executive summary of the GINA Allergy; (2004).

**Matricardi P, Rosmini F, Riondino S, Fortini M, Ferrigno L, Rapicetta M, Bonini S.** Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ* 2000; 320;412-417.

**McDonald MD.** Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation; *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 15;164: S39-45.

**McMillan SJ, Lloyd CM.** Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling. *Clin Exp Allergy.* 2004 Mar;34(3):497-507.

**Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, Reich R, Pappo O, Bonini S, Marquart FX, Aloe L, Levi-Schaffer F.** Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 6162-7.

**Mojtabavi N., Dekan G., Stingl G., Epstein M.** Long-lived Th2 memory in experimental allergic asthma. *J Immunol* 2002;169:4788–4796.

**Neuhaus-Steinmetz U, Glaab T, Daser A, Braun A, Lommatzsch M, Herz U, Kips J, Alarie Y, Renz H.** Sequential development of airway

hyperresponsiveness and acute airway obstruction in a mouse model of allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000; 121(1): 57-67.

**Nockher A, Renz H.** The role of neurotrophins in the pathogenesis of asthma and related diseases: allergy and asthma as prototypic neuro-immune diseases? *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1266-1268.

**Nowak D, Volmer T, Wettengel R.** Bronchial asthma - a cost of illness analysis; *Pneumologie* 1996 May;50(5):364-71.

**O'Donnell DR, Openshaw PJ.** Anaphylactic sensitization to aeroantigen during respiratory virus infection. *Clin Exp Allergy* 1998;28:1501-1508.

**O'Garra A, Vieira P.** Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Natur Medizin* Vol 10 (8) 2004.

**O'Hehir RE, Garman RD, Greenstein JL, Lamb JR.** (1991) The specificity and regulation of T-cell responsiveness to allergens. *Annu Rev Immunol.* 9:67-95.

**Openshaw PJ, Dean GS, Culley FJ.** Links between respiratory syncytial virus bronchiolitis and childhood asthma: clinical and research approaches. *Pediatr Infect Dis J.* 2003 Feb;22(2 Suppl):S58-64; discussion S64-5.

**Ordonez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, Hotchkiss JA, Zhang Y, Novikov A, Dolganov G, Fahy JV.** Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Feb;163(2):517-23.

**Palmans E, Kips JC, Pauwels RA.** Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 627-35.

**Phipps S, Ying S, Wangoo A, Ong YE, Levi-Schaffer F, Kay AB.** The relationship between allergen-induced tissue eosinophilia and markers of repair and remodelling in human atopic skin. *J Immunol.* 2002; 169(8): 4604-12.

**Ramsey C, Celedon J.** The hygiene hypothesis and asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2005, 11:14–20.

**Renz H, Herz U.** The bidirectional capacity of bacterial antigens to modulate allergy and asthma *Eur Respir J* 2002; 19: 158–171.

**Renz H, Smith HR, Henson JE, Ray BS, Irvin CG, Gelfand EW.** Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J Allergy Clin Immunol.* 1992; 89: 1127-38.

**Renz H, Lack G, Saloga J, Schwitzer R, Bradley K, Loader J, Kupfer A, Larsen GL, Gelfand EW.** Inhibition of IgE production and normalization of airways responsiveness by sensitized CD8 T cells in a mouse model of allergen-induced sensitization. *J Immunol.* 1994; 152(1): 351-60.

**Robins RA, Rennard SI.** Biology of airway epithelial cells. In: Grystal RG, West JB, eds., *The Lung: Scientific Foundations.* New York: Raven Press, Ltd. 1997: 445pp.

**Roberts AB.** Molecular and cell biology of TGF-beta. 1998. *Miner Electrolyte Metab.* 24(2-3): 111-9.

**Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST.** Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet.* 1989; Mar 11;1(8637):520-4.

**Rogers DR.** Airway Goblet cell hyperplasia in asthma: hypersecretory and anti-inflammatory? *Clin Exp Allergy* 2002; 32:1124-1127.

**Romanet-Manent S, Charpin D, Magnan A, Lanteaume A, Vervloet D, and the EGEA Cooperative Group.** Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? *Allergy.* 2002 July; 57(7):607-613.

**Sacco O, Silvestri M, Sabatini F, Sale R, Defilippi AC, Rossi GA.** Epithelial cells and fibroblasts: structural repair and remodelling in the airways. *Paediatric Resp. Reviews* 2004) 5(Suppl A), S35–S40.

**Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, Hamada H, Hiwada K.** Prolonged antigen exposure ameliorates airway inflammation but not remodeling in a mouse model of bronchial asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001 Oct;126(2):126-34.

**Schramm,C, Herz U, Podlech J, Protschka M, Finotto S, Reddehase MJ, Koehler H, Galle PR, Lohse AW, Blessing M.** TGF-β Regulates Airway Responses Via T Cells. *J. of Immunol.* 2003 (3) S1313-1319.

**Sears M.R.** Epidemiology of childhood asthma. *Lancet* 350;1997; 1015-20 [50].

**Sporik R, Holgate S, Platts-Mills T, Cogwells J.** Exposure to house dust mite allergen. Depri and the development of asthma in children *N.Engl. J. Med.* 1990; 502-507.

**Stewart A.** Airway wall remodelling and Hyperresponsiveness: Modelling Remodelling in Vitro and in Vivo. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 2001.

**Strachan D.** Asthma and family size: a riddle worth solving. *Clinical and experimental allergy*, 1997, Vol. 27, 235-236.

**Stroppe H.** in: Physik für Studenten der Natur- und Technikwissenschaften. Stroppe H, Langer H and Streitenberger P (eds.) Fachbuchverlag Leipzig. 1994: 121 pp.

**Suzuki S, Suzuki Y, Yamamoto N, Matsumoto Y, Shirai A, Okubo T.** Influenza A virus infection increases IgE production and airway responsiveness in aerosolized antigen-exposed mice. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:732-740.

**Tashkin DP.** The role of small airway Inflammation in asthma, *Allergy and asthma proc.* 2002 Vol. 23 No. 4.

**Tattersfield A, Knox A, Britton J, Hall IP.** Asthma. *Lancet* ; Vol 360; October 26, 2002.

**Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK.** An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax.* 1998 Oct;53(10):849-56.

**Vignola A., Mirabella F, Costanzo G., Di Giorgi R, Gjomarkaj M., et al.** Airway Remodelling in Asthma. *CHEST* 2003; 123:417S–422.

**Vignola AM, Kips J, Bousquet J.** Tissue remodelling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 105: 1041-53.

**Vignola A, La Grutta S, Chiappara G, Benkeder A, Bellia V, Bonsignore G.** Cellular network in airways inflammation and remodelling. *Paediatric Resp. Reviews* (2002)3, 41-46.

**von Ehrenstein, von Mutius E, Illi S, Hachmeister A, von Kries A.** Reduced prevalence of atopic diseases in children living on a farm. *Epidemiology* 9 (1998).

**von Mutius E, Fritzscher C, Weiland SK, Roll G, Magnussen H.** Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. *BMJ.* 1992 Dec 5;305(6866):1395-9.

**von Mutius E, Martinez FD, Fritzscher C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH.** Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Feb;149(2 Pt 1):358-64.

**Wagner EM, Bleecker ER, Permutt S, Liu MC.** Direct Assessment of Small Airways Reactivity in Human Subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:447–452.

- Wegmann M, Fehrenbach H, Fehrenbach A, Held T, Schramm C, Garn H, Renz H.** Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35:1263-1271 (3.1)
- Weiland SK, von Mutius E, Hirsch T, Duhme, Fritzsich C, Werner C, Hüsing A, Stender M, Renz H, Leupold W, Keil U.** Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *European Respiratory Journal* Volume 14 Issue 4 P 862, Oct 1999.
- Wettengel, R., Volmer T.** Asthma. Medizinische und ökonomische Bedeutung einer Volkskrankheit.
- Whitehead GS, Walker JK, Berman KG, Foster WM, Schwartz DA.** Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Jul;285(1):L32-42.
- Widdicombe JG.** Advances in understanding and treatment of cough. *Monaldi Arch Chest Dis*. 1999 Jun;54(3):275-9.
- Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, Wright PF, Crowe JE Jr.** Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med*. 2004 Jan 29;350(5):443-50.
- Wilson J, Baford T.** Assessing the Evidence for Remodelling of the Airway in Asthma; *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 2001, 14, 229-247.
- Wills-Karp M.** Trophic slime, allergic slime. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Jun;22(6):637-9.
- Wills-Karp M, Karp CL.** Eosinophils in Asthma: Remodeling a Tangled Tale (2004) Vol. 305 *Science*.
- Yoshimoto T, Bendelac A, Hu-Li J, Paul WE.** Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4+, NK1.1+ T cells that promptly produce interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 5;92(25):11931-4.
- Yu C., Shieh C., Lei HY.** Repeated intratracheal inoculation of house dust mite (*Dermatophagoides farinae*) induces pulmonary eosinophilic inflammation and IgE antibody production in mice. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:228–236.



## 6. Abkürzungsverzeichnis

ABO	Atemwegshyperreagibilität auf spezifische Reize
AHR	Atemwegshyperreagibilität auf unspezifische Reize
Ak	Antikörper
Al[OH <sub>3</sub> ]	Aluminium-Hydroxid
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
Balb/c	Mäusestamm
BE	Bronchialepithel
CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	Lymphozyten
CD28	Rezeptor
CD86	Rezeptor
CBA	Cytometric-Bead-Array
DC	Dendritische Zelle
DA	Ductus alveolaris
ECHRS	European Community Respiratory Health Survey
EGF	Epidemal Growth Factor
EF50	Halbmaximale expiratorischer Fluß (Expiratorischer Mittelfluss)
ELISA	Enzyme-linked-immuno-assay
Fcε-Rezeptoren	Rezeptor
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPF	High-Power-Field
IFN-γ	Interferon Gamma

Ig	Immunglobulin
IL-	Interleukin
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
LT(B/C/D/...)	Leukotrien (B/C/D/...)
MCh	Methacholin
MHC II	major histocompatibility complex Typ 2
MHC-II-R	major histocompatibility complex Typ 2-Rezeptor
OVA	Ovalbumin (Hühnereiweiß)
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reagenz
PBS	Phosphate buffered Saline
PGD	Prostaglandin
RSV	Respiratory Syncytial Virus
TA	Tunica alveolaris
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th0	Undifferenzierte T-Helferzelle
Th1	T-Helferzelle vom Typ 1
Th2	T-Helferzelle vom Typ 2
Th3	T-Helferzelle vom Typ 3
TGF- $\beta$	Tissue growth factor- $\beta$
TM	Tunica muscularis
TNF- $\alpha$	Tissue necrosis factor

## 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1.1: Prävalenz der Asthmatischen Symptome unter Erwachsenen
- Abbildung 1.2: Bakterielle Endotoxine beeinflussen die Ausprägung atopischer Symptome.
- Abbildung 1.3: Einfluss viraler Atemwegsinfektionen auf das allergische Asthma bronchiale
- Abbildung 1.4: Differenzierung der T-Helfer Zellpopulationen
- Abbildung 1.5: Die akute Entzündungssituation beim allergischen Asthma
- Abbildung 1.6: Pathophysiologische Funktion der Th2-Lymphozyten beim allergischen Asthma bronchiale
- Abbildung 1.7: Die Rolle von Eosinophilen auf die Chronifizierung beim Asthma bronchiale
- Abbildung 2.1: Sensibilisierungs- und Expositionsprotokoll
- Abbildung 2.2: Bestimmung des Lungenvolumens durch hydrostatischen Druck
- Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau des Head-out Body-Plethysmographen
- Abbildung 3.1: Leukozytenkonzentration in der BAL
- Abbildung 3.2: Makrophagenkonzentration in der BAL
- Abbildung 3.3: Anzahl der Eosinophilen Granulozyten in der BAL
- Abbildung 3.4: Lymphozytenkonzentration in der BAL
- Abbildung 3.5: Relative Verteilung der Leukozyten-Subtypen in der BAL
- Abbildung 3.6: IL-4-Konzentration der BAL
- Abbildung 3.7: TNF- $\alpha$ -Konzentration in der BAL
- Abbildung 3.8: IL-5-Konzentration in der BAL
- Abbildung 3.9: TGF- $\beta$ -Konzentration in der BAL
- Abbildung 3.10: Intraepitheliale eosinophile Granulozyten nach chronischer Allergenprovokation
- Abbildung 3.11: relative Verteilung der Leukozyten im Lungengewebe
- Abbildung 3.12: Leukozytenkonzentration in verschiedenen Kompartimenten
- Abbildung 3.13: Allergische Atemwegsentzündung nach chronischer Allergenprovokation
- Abbildung 3.14: Induktion einer Becherzellhyperplasie in zentralen Atemwegen
- Abbildung 3.15: Induktion einer Becherzellhyperplasie in peripheren Atemwegen

- Abbildung 3.16: Quantifizierung der Becherzellhyperplasie in peripheren Atemwegen
- Abbildung 3.17: Entzündliche Atemwegspathologie nach chronischer Allergenprovokation
- Abbildung 3.18: Atemflusskurve chronisch Allergen-exponierter Tiere mit expiratorischer Obstruktion
- Abbildung 3.19: AHR im Verlauf der OVA-Provokation
- Abbildung 3.20: Akute Bronchoobstruktion, ausgelöst durch OVA-Exposition
- Abbildung 3.20: Chronische Bronchoobstruktion durch 12wöchige OVA-Exposition sensibilisierter Balb/c-Mäuse
- Abbildung 3.21: Gewichtsentwicklung bei intermittierenden Allergenexposition
- Abbildung 3.22: Entwicklung des Milzgewichts bei intermittierender Allergenexposition
- Abbildung 3.23: Entwicklung des Milzgewichts bei intermittierender Allergenexposition in Bezug auf das Gesamtgewicht
- Abbildung 3.24: Relative Verteilung der Leukozyten in der BAL nach 6 expositionsfreien Wochen
- Abbildung 3.25: absolute Leukozytenzahl in der BAL nach 6 expositionsfreien Wochen
- Abbildung 3.26: AHR nach chronischer OVA-Exposition
- Abbildung 3.27: chronisch erhöhter Atemwegswiderstand in Ruhe

- Tabelle 1.1: Anatomische Unterschiede der respiratorischen Organe bei Mensch und Maus
- Tabelle 1.2: Entzündungsspezifische Charakteristika bei Mensch und Maus
- Tabelle 1.3: Respirationsparameter
- Tabelle 2.1: MCh-Exposition zur Ermittlung der Atemwegsreagibilität
- Tabelle 3.1: Kontrolle der Sensibilisierung durch Nachweis der Immunglobuline
- Tabelle 3.2: Entzündliches Infiltrat des Lungenparenchyms durch chronische Allergenprovokation

## 8. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden: das hier etablierte Modell des chronisch-experimentellen Asthmas demonstriert eine Vielzahl struktureller und physiologischer Veränderungen, welche im humanen Asthma bronchiale beobachtet werden.

Dazu gehören eine fortschreitende Atemwegsinfektion mit Becherzellhyperplasie und „*Airway Remodelling*“ in allen Kompartimenten der Atemwegen. Wir waren in der Lage, diese Veränderungen in Korrelation zu einer progredienten Beeinträchtigung der Lungenfunktion zu setzen. Da die Beteiligung der distalen Atemwegsabschnitte und die damit einhergehende Beeinträchtigung dieser Kompartimente, unserer Meinung nach aber einen entscheidenden Einfluss auf die Lungenfunktion von asthmatischen Individuen haben, gehen wir von einer im Gegensatz zu anderen Modellen entscheidenden Annäherung des Modells an den humanen Pathomechanismus aus.

Dieses Modell bietet Möglichkeiten, die zu Grunde liegenden molekularen und zellulären Pathomechanismen der chronischen-allergischen Entzündung und des damit zusammenhängenden „*Airway Remodelling*“, zu untersuchen. Es kann Wege aufzeigen, die Bedeutung der distalen Atemwege in der Pathophysiologie des chronischen Asthmas weiter zu verstehen und auf diese Weise Möglichkeiten der Behandlung des chronischen Asthma bronchiales aufzuzeigen.

## **9. Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten in Marburg:

Aumüller, Bayer, Czubayko, Daut, Dietrich, Feuser, Gemsa, Görg, Grimm, Happle, Heeg, Herzum, Herz, Kann, Kern, Koolmann, Lammel, Löffler, Löffler, Maisch Mandrek, Moll, Mutters, Müller, Neubauer, Ramaswamy, Renz, Richter, Röhm, Rothmund, Schäfer, Seitz, Wagner, Werner.

In Bern: Zimmermann

In Fulda: Repp, Jaspersen, Wörsdörfer

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name Thorsten Held  
Anschrift Abteilung für Hand-, Unfall- und Wiederherstellungchirurgie  
Brüderkrankenhaus St. Josef  
Husener Straße 33  
33098 Paderborn  
theld@bk-paderborn.de  
thorsten.held@gmx.de  
Tel.: 0178/6998096

Geburtstag 31. Oktober 1978  
Geburtsort Bünde (Westfalen)

### Schulbildung:

1985-89 Grundschule Löhne-Bahnhof  
1989-96 Städtisches Gymnasium Löhne  
1996-98 Freiherr-von-Stein-Gymnasium Bünde/Abitur

### Zivildienst:

1998/99 Zivildienst im Pflegedienst/Neurologie, Klinikum Bad Oeynhausen I

### Hochschulbildung:

Studium der Humanmedizin an der Philipps Universität Marburg  
08/2001 Physikum (Note 2,6)  
09/2002 1. Staatsexamen (Note 3,0)  
04/2005 2. Staatsexamen (Note 2,3)  
05/2006 3. Staatsexamen (Note 1,0)

### Praktika/weitere Fortbildungen:

Fortbildungen: 08-09/2004 Akupunkturkurs der Deutschen Akademie für fachärztliche Akupunktur in Hannover (A-Diplom)

## 11. Verzeichnis der Veröffentlichungen

1. **Wegmann M, Fehrenbach H, Fehrenbach A, Held T, Schramm C, Garn H, Renz H.** Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. Clin Exp Allergy. 2005;35:1263-1271 (3.1)

publizierte Abstracts:

1. **Wegmann M, Fehrenbach H, Held T, Schramm C, Renz H.** Chronic Allergen Challenge Induces Chronic Inflammation and Remodelling in Central and Peripheral Airways in a Mouse Model of Experimental Asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2004; 169(7): A573

2. **Wegmann M, Held T, Schramm C, Herz U, Renz H.** Etablierung eines Mausmodells für das chronische Asthma bronchiale. Allergo Journal. 2004; 13: 45

3. **Wegmann M, Fehrenbach H, Fehrenbach A, Held T, Schramm C, Garn H, Renz H.** Inflammation and Remodelling of Distal Airways in a Murine Model of Chronic Experimental Asthma. J Allergy Clin Immunol. 2005, 115(2): S205



## 12. Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

### **Etablierung und Validierung eines Mausmodell für das chronische Asthma bronchiale**

in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik unter Leitung von Prof. Dr.H.Renz in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie und mit Unterstützung der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Paderborn, den 10.02.2007

Thorsten Held

### **13. Danksagung**

Die vorliegende Dissertationsarbeit wurde in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Klinikums der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Harald Renz angefertigt.

Herr Prof. Dr. Harald Renz möchte ich für die ausgezeichnete Betreuung sowie für die Möglichkeit, die Dissertationsarbeit in seiner Abteilung durchführen zu können, danken. Ich möchte allen Mitarbeitern der Abteilung für die Unterstützung bei der Arbeit danken. Vor allem gebührt Dr. Michael Wegmann, mit dem ich dieses Projekt zusammen durchgeführt habe, Dank. Er hat mich mit aller Kraft bei der Durchführung und Komplettierung der Arbeit auf freundschaftliche Art und Weise unterstützt. Frau Anja Spies möchte ich an dieser Stelle für die aufopferungsvolle und exzellente technische Unterstützung danken, ohne die diese Arbeit so nicht hätte durchgeführt werden können. Für die Anregungen zur Arbeit und die Einführungen in den Laboralltag danke ich Herrn Dr. Udo Herz, der dieses Projekt leider nicht bis zum Schluss mit verfolgen konnte.

Frau Dr. Antonia Fehrenbach, sowie Herrn Prof. Dr. Fehrenbach möchte ich für die ausgezeichnete Hilfe danken, die sie uns als Morphologen bieten konnten, was bei der Beurteilung struktureller Veränderungen und Anfertigung einiger Präparate unerlässlich war.

All meinen Freunden und meiner Familie gebührt an dieser Stelle Dank, da sich mich auch in Zeiten der beruflichen Belastung unterstützt und motiviert haben, diese Arbeit zu vollenden.

**Danke!**