

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

Titel der Dissertation:

**Die Auswirkungen von Di(2-ethylhexyl) Phthalat und  
Mono(2-ethylhexyl) Phthalat auf die Lungenfunktion  
im allergischen Mausmodell**

Inaugural-Dissertation zur  
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Andreas Hübner**

aus Düsseldorf

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 29.11.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund  
Referent: Priv.-Doz. Dr. med Dr. rer. nat Dipl.-Chem. H. G. Wahl  
1. Korreferent: Prof. Dr. U. Wagner

## Inhaltsverzeichnis

<b><u>INHALTSVERZEICHNIS.....</u></b>	<b><u>III</u></b>
<b><u>ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>1. EINLEITUNG .....</u></b>	<b><u>2</u></b>
1.1 EIGENSCHAFT UND VERWENDUNG VON PHTHALATEN .....	2
1.2 DEHP-DIETHYLHEXYLPHTHALAT .....	4
1.3 TOXIKOLOGISCHE EFFEKTE .....	6
1.3.1 TOXISCHE EFFEKTE AUF FÖTUS UND EMBRYO.....	7
1.3.2 TOXISCHE EFFEKTE AUF HODEN UND OVARIEN.....	7
1.3.3 TOXISCHE EFFEKTE AUF NIEREN.....	8
1.3.4 TOXISCHE EFFEKTE AUF DIE LUNGE.....	8
1.3.5 TOXISCHE EFFEKTE AUF DIE LEBER .....	9
1.4 ALLERGISCHE ERKRANKUNGEN .....	10
1.5 ZIEL DER VORLIEGENDEN ARBEIT .....	12
<b><u>2. MATERIAL UND METHODEN .....</u></b>	<b><u>14</u></b>
2.1 MATERIALIEN .....	14
2.2 VERSUCHSAUFBAU .....	17
2.2 EINTEILUNG VON VERSUCHSGRUPPEN .....	17
2.3 AUSLÖSUNG EINER ATEMWEGSREAKTION DURCH EXPOSITION GEGENÜBER EINES AEROSOLS .....	19
2.4 MESSUNG DER LUNGENFUNKTION MITTELS HEAD-OUT-BODY-PLETYSMOGRAPHEN.	19
2.5 BLUTENTNAHME BEI MÄUSEN UND GEWINNUNG VON SERUM .....	22
2.6 ELISA ZUM NACHWEIS VON IMMUNGLOBULINEN UND NEUROTROPHINEN .....	22
2.7 PRÄPARATION UND BRONCHO-ALVEOLÄRE LAVAGE (BAL) .....	23
2.8 BESTIMMUNG DER ZELLZAHL IN DER BAL.....	23
2.9 DIFFERENZIERUNG DER ZELLEN AUS DER BAL.....	24
2.10 ANFERTIGUNG DER LUNGENPRÄPARATE .....	24
2.10.1 HE (HÄMATOXYLIN-EOSIN) -FÄRBUNG DER LUNGENPRÄPARATE .....	24
2.10.2 PAS ( PERIODIC-ACID-SCHIFF) -FÄRBUNG DER LUNGENPRÄPARATE .....	25
2.10.3 NERVE GROWTH FACTOR (NGF) -FÄRBUNG DER LUNGENPRÄPARATE .....	25
2.10.4 VASCULAR CELL ADHESION MOLECULE (V-CAM) -FÄRBUNG DER LUNGENPRÄPARATE .....	26
2.11 STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	27
<b><u>3. ERGEBNISSE .....</u></b>	<b><u>28</u></b>
3.1 EINFLUSS DER PHTHALATE AUF DIE LUNGENFUNKTION .....	28
3.1.1 DEHP-GRUPPE.....	28
3.1.2 MEHP-GRUPPE.....	30
3.2 UNTERSUCHUNGEN DER ZELLEN IN DER BRONCHO-ALVEOLÄREN LAVAGE (BAL) .....	31
3.3 NACHWEIS VON IMMUNGLOBULINEN AUS DEM MAUSSERUM.....	33
3.3.1 GESAMT-IGE-KONZENTRATION BEI DEHP .....	33
3.3.2 GESAMT-IGE-KONZENTRATION BEI MEHP .....	34
3.3.3 KONZENTRATION DER IMMUNGLOBULINE IGM, IGG1 ND IGA BEI DEHP UND MEHP ...	35
3.4 NACHWEIS VON NGF AUS DER BAL .....	35
3.4.1 NGF-KONZENTRATION BEI DEHP .....	35

---

3.4.2 NGF-KONZENTRATION BEI MEHP .....	36
<b>3.5 FÄRBUNG DER LUNGENPRÄPARATE.....</b>	<b>37</b>
3.5.1 HE-FÄRBUNG DER LUNGENPRÄPARATE.....	37
3.5.2 V-CAM FÄRBUNG DER LUNGENPRÄPARATE .....	39
3.5.3 NGF-FÄRBUNG DER LUNGENPRÄPARATE .....	40
<b><u>4. DISKUSSION .....</u></b>	<b><u>42</u></b>
4.1 EINFLUSS DER PHTHALATE AUF DIE LUNGENFUNKTION .....	42
4.2 UNTERSUCHUNG DER BAL .....	43
4.3 UNTERSUCHUNG DES SERUMS .....	44
4.3 STRUKTURELLE VERÄNDERUNGEN DER LUNGE.....	45
<b><u>5. LITERATURVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>A</u></b>
<b><u>6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>E</u></b>
<b><u>7. TABELLENVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>F</u></b>
<b><u>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u></b>	<b><u>G</u></b>
<b><u>9. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER: .....</u></b>	<b><u>H</u></b>
<b><u>10. DANKSAGUNG .....</u></b>	<b><u>I</u></b>

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von Phthalaten auf das Lungengewebe und die Lungenfunktion von BALB/c - Mäusen untersucht. Es wurden der Weichmacher Di(2-ethylhexyl) Phthalat (DEHP), der in der Medizin am häufigsten verwendet wird, sowie dessen erster Metabolit Mono(2-ethylhexyl) Phthalat (MEHP) untersucht.

Nach der Exposition der Mäuse gegenüber den beiden Phthalaten kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) im Provokationstest mit Metacholin zur Auslösung einer konzentrationsabhängigen signifikanten (DEHP,  $p < 0,01$ ) bzw. hochsignifikanten (MEHP,  $p < 0,001$ ) Atemwegshyperreagibilität.

Im Serum der Phthalat exponierten Mäuse konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Konzentrationsunterschiede für Gesamt-IgE, IgM, IgG1 oder IgA nachgewiesen werden. In der bronchoalveolären Lavage (BAL) der DEHP und MEHP exponierten Mäuse konnte eine im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) signifikant erhöhte Konzentration des Neurotrophins Nerve Growth Factor (NGF) nachgewiesen werden. Sowohl in der BAL als auch in den histologischen Untersuchungen der Lunge zeigte sich eine deutliche konzentrationsabhängige Zunahme der Makrophagenzahl. Dies zeigte sich insbesondere bei den MEHP exponierten Mäusen. In den histologischen Untersuchungen der Lungenpräparate zeigten sich eine Verbreiterung der Basalmembran und eine Hyperplasie der Becherzellen. Die immunhistochemische Färbung zeigte in den Lungenpräparaten sowohl der DEHP als auch der MEHP exponierten Mäusen im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine deutliche Anwesenheit von NGF im Bereich der Schleimhaut des Bronchiolus sowie im interstitiellen Gewebe. In den Endothelien der Lungenarterien der exponierten Mäuse konnte im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine vermehrte Expression von V-CAM nachgewiesen werden.

Anhand der beschriebenen Ergebnisse lässt sich vermuten, dass es nach Phthalatexposition zu einer vermehrten Expression von V-CAM in Endothelien der Lungenarterien mit nachfolgender Einwanderung von überwiegend Makrophagen ins Interstitium kommt. Als Folge der erhöhten NGF-Konzentration kann es zu einer allergischen Entzündung, bronchialen Hyperreaktivität und Atemwegsobstruktion kommen.

Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig (Proof of concept), um die Pathogenese vollständig erklären zu können.

## 1. Einleitung

### 1.1 Eigenschaft und Verwendung von Phthalaten

Mit Phthalaten, als Weichmacher eingesetzt in Polyvinylchlorid (PVC) und anderen Kunststoffen, kommen wir täglich in Berührung. Sie sind zu einem wesentlichen, meist unbemerkten Bestandteil unseres täglichen Lebens geworden. Der Kontakt im alltäglichen Leben kommt auf vielfältige Weise zustande, über den Gebrauch von Lacken, Farben, Kosmetika, Verpackungen für Lebensmittel, Bodenbeläge, pharmazeutische Produkte und Kinderspielzeuge. Aus diesem Grund ist die Erforschung der Wirkung von Phthalaten auf den menschlichen Körper von großer wissenschaftlicher und gesellschaftlicher Bedeutung.

Phthalate werden Kunststoffen, denen elastische Eigenschaften verliehen werden sollen, in mehr oder weniger hoher Konzentration (bis zu 60%) zugesetzt. Sie sollen die betreffenden Materialien strapazierfähiger, flexibler und einfacher zu handhaben machen. Sie wirken dabei als so genannte äußere Weichmacher, da sie mit dem Kunststoff keine chemische Bindung eingehen. Aufgrund der fehlenden chemischen Bindung können die Phthalate jedoch wieder relativ leicht aus dem Kunststoff herausgelöst werden bzw. allmählich heraus migrieren.

Vor allen Dingen über den Einsatz des gebräuchlichsten Kunststoffs in der Medizin, das PVC, kommen Patienten in Kontakt mit den Weichmachern. 90% der Phthalate werden als Weichmacher eingesetzt. Insbesondere ist hier Diethylhexylphthalat (DEHP) als meist genutzter Weichmacher zu nennen. Es werden ca. 30 000 Tonnen PVC pro Jahr im medizinischen Sektor verbraucht. Seine vielfältigen Eigenschaften wie zum Beispiel die Möglichkeit der Sterilisierbarkeit mit allen gängigen Methoden machen ihn in der Medizin nahezu unersetzlich.

In Produkten wie Blutbeuteln, Infusionsbeuteln, Dialysebeuteln, Urinbeuteln, Kathetern, PVC-Schlauchsystemen für verschiedenste Einsatzgebiete und vielen anderen PVC-haltigen Verbrauchsmaterialien der Medizin kommen Phthalate vor. Gerade im Bereich der Dialyse sowie der Intensiv- und der Transfusionmedizin besteht darum eine besonders hohe Exposition der Patienten gegenüber den Phthalaten.

Phthalate kommen aber auch in vielen anderen Bereichen zum Einsatz. Sie dienen als Trägersubstanzen für Duftstoffe in Parfums, Deodorants und anderen Körperpflegemitteln. Sie sind Komponenten in Nagellacken und Haarsprays. Darüber

hinaus werden sie auch als Formulierungsmittel in Pestizidanwendungen, als industrielle Lösemittel und Schmierstoffe und als Additive in der Textilindustrie verwendet. Tabelle 1 bietet einen Überblick über die gebräuchlichsten Phthalate und ihre Anwendungen.

**Tabelle 1: Verwendung wichtiger Phthalatsäureester**

Phthalat	Anwendungen
DMP	Körperpflegemittel, Parfums, Deodorants, Pharmazeutische Produkte
DEP	Körperpflegemittel, Parfums, Deodorants, Pharmazeutische Produkte
BBzP	PVC (z.B. Transformatoren, Bodenbeläge, Rohre und Kabel, Teppichböden, Wandbeläge), Dichtmassen, (Lebensmittel)-Verpackungen, Kunstleder, Lebensmitteltransportbänder
DBP	Pharmazeutische Produkte (time-release Medikamente, magensaft-resistente Verkapselungen), PVC, Zellulose-Kunststoffe, Dispersionen, Lacke/Farben (auch Nagellacke), Klebstoffe (v.a. Polyvinyl-Acetate), Schaumverhüter und Benetzungsmittel in der Textilindustrie, Körperpflegemittel, Parfums, Deodorants, (Lebensmittel)-Verpackungen
DEHP	PVC (z.B. Bodenbeläge, Rohre und Kabel, Teppichböden, Wandbeläge, Schuhsohlen, Vinyl-Handschuhe, KFZ-Bauteile), Dispersionen, Lacke/Farben, Emulgatoren, Verpackungen
DnOP	PVC-Produkte (wie DEHP)
DiNP	PVC (z.B. Bodenbeläge, Rohre und Kabel, Teppichböden, Wandbeläge, Schuhsohlen, KFZ-Bauteile), Dispersionen, Lacke/Farben, Emulgatoren, (Lebensmittel)Verpackungen
DiDP	PVC (z.B. Bodenbeläge, Rohre und Kabel, Teppichböden, Wandbeläge), Dispersionen, Lacke/Farben, Emulgatoren, (Lebensmittel)Verpackungen

DMP :Dimethylphthalat

DEP :Diethylphthalat

BBzP :Butylbenzylphthalat

DBP :Dibutylphthalat (Di-n-butylphthalat und Di-iso-butylphthalat)

DEHP :Di(2-ethylhexyl)phthalat

DnOP :Di-n-octylphthalat

DiNP :Di-iso-nonylphthalat

DiDP :Di-iso-decylphthalat

Aufgrund der Tatsache, dass auch Kinderspielzeuge hohe Anteile an Phthalaten enthielten, wurden von der Kommission der Europäischen Gemeinschaften verschiedene Verordnungen zur Verwendung von Phthalaten verabschiedet. Bereits 1999 wurden die meisten Phthalate in bestimmten Spielzeugen und Babyartikeln verboten (1999/815/EG). 2004 folgten das Verbot in kosmetischen Mitteln sowie die eingeschränkte Verwendung in anderen Konsumentenprodukten wie Farben und Klebstoffen (2004/93/EG). Nach Richtlinie 2005/84/EG dürfen Spielzeug und Babyartikel, die DEHP, DBP oder BBP in Konzentrationen von mehr als 0,1 Masse-% des weichmacherhaltigen Materials enthalten, nicht in Verkehr gebracht werden. In

PVC-Produkten wie Bodenbelägen, Rohren und Kabeln, Teppichböden, Wandbelägen, Schuhsohlen, Vinyl-Handschuhen und KFZ-Bauteilen werden Phthalate weiterhin großvolumig eingesetzt. Ebenso wird DEHP weiterhin in Medizinprodukten als Weichmacher eingesetzt. In Arzneimitteln bleibt DBP als Hilfsstoff zulässig.

DBP und DEHP werden von der EU auf Grundlage der vorhandenen tierexperimentellen Studien in Kategorie 2 "fortpflanzungsgefährdend" eingestuft (2003/36/EG; 76/769/EWG). Als Stoff und in Zubereitungen müssen sie als "R 61: Kann das Kind im Mutterleib schädigen" und "R 62: Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen" deklariert werden. Sie werden jedoch nach der International Agency for Research on Cancer (IARC) als nicht cancerogen deklariert.

## **1.2 DEHP-Diethylhexylphthalat**

In Westeuropa machten 1998 die Phthalate ca. 90% der Weichmacherproduktion aus. Der Anteil von DEHP lag bei knapp 50 %, was eine absolute Produktion von ca. 450 000 Tonnen pro Jahr ausmacht.

Dies hängt vor allen Dingen damit zusammen, dass DEHP mit 2-Ethylhexanol als Alkohol mittlerer Länge die meisten technischen und medizinischen Anforderungen gut erfüllt und zudem kostengünstig produziert werden kann. So kommt auch in medizintechnischen Produkten hauptsächlich DEHP zur Anwendung.

Hierbei stellt sich die Verwendung in Infusionssystemen als Problem heraus. Über den Kontakt der Infusionssysteme u.a. mit lipidhaltigen Lösungen und Blut (Erythrozytenkonzentrate) kommt es zu einer Extraktion von DEHP. Dadurch tritt eine Kontamination der Patienten auf, was insbesondere im Bereich der Intensivmedizin, bei Dialysepatienten und vor allen Dingen bei Frühgeborenen ein großes Problem darstellt. Loff et al [22] konnten nachweisen, dass es bei Verwendung von lipidhaltigen Emulsionen zu einer vermehrten Aufnahme von DEHP aus dem Infusionssystem kommt. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass es durch Infusionssysteme, die während einer Operation benutzt werden, zu einer erhöhten DEHP-Konzentration des Patienten kommt [4].

Wie in Abbildung 1 dargestellt, wird DEHP im ersten Schritt durch Lipasen zu MEHP und 2-Ethylhexanol hydrolysiert. Bei oraler Aufnahme kommt es bereits intestinal zu einer Hydrolyse mit anschließender Resorption von MEHP und 2-Ethylhexanol. Die Metabolite werden artenspezifisch zu einer Vielzahl von weiteren sekundären



Metaboliten abgebaut. MEHP wird durch Cytochrom P450-abhängige Enzyme weiter oxidiert. 2-Ethylhexanol wird über den entsprechenden Aldehyd zu 2-Ethylhexansäure oxidiert. Es folgen verschiedene  $\beta$ -,  $\omega$ - und  $\omega$ -1 - Oxidationsprodukte, wobei 4- und 2-Heptanon als Endprodukte der  $\beta$ - Oxidation gefunden wurden [47]. Walin et al [48] konnten in Gewebe von Verstorbenen in allen Organen DEHP in verschiedenen Konzentrationen nachweisen. MEHP konnte aufgrund seiner im Vergleich zu DEHP höheren Polarität nicht im Fettgewebe nachgewiesen werden [8]. 2-Ethylhexansäure wurde insbesondere in Leber und Niere gefunden [27].

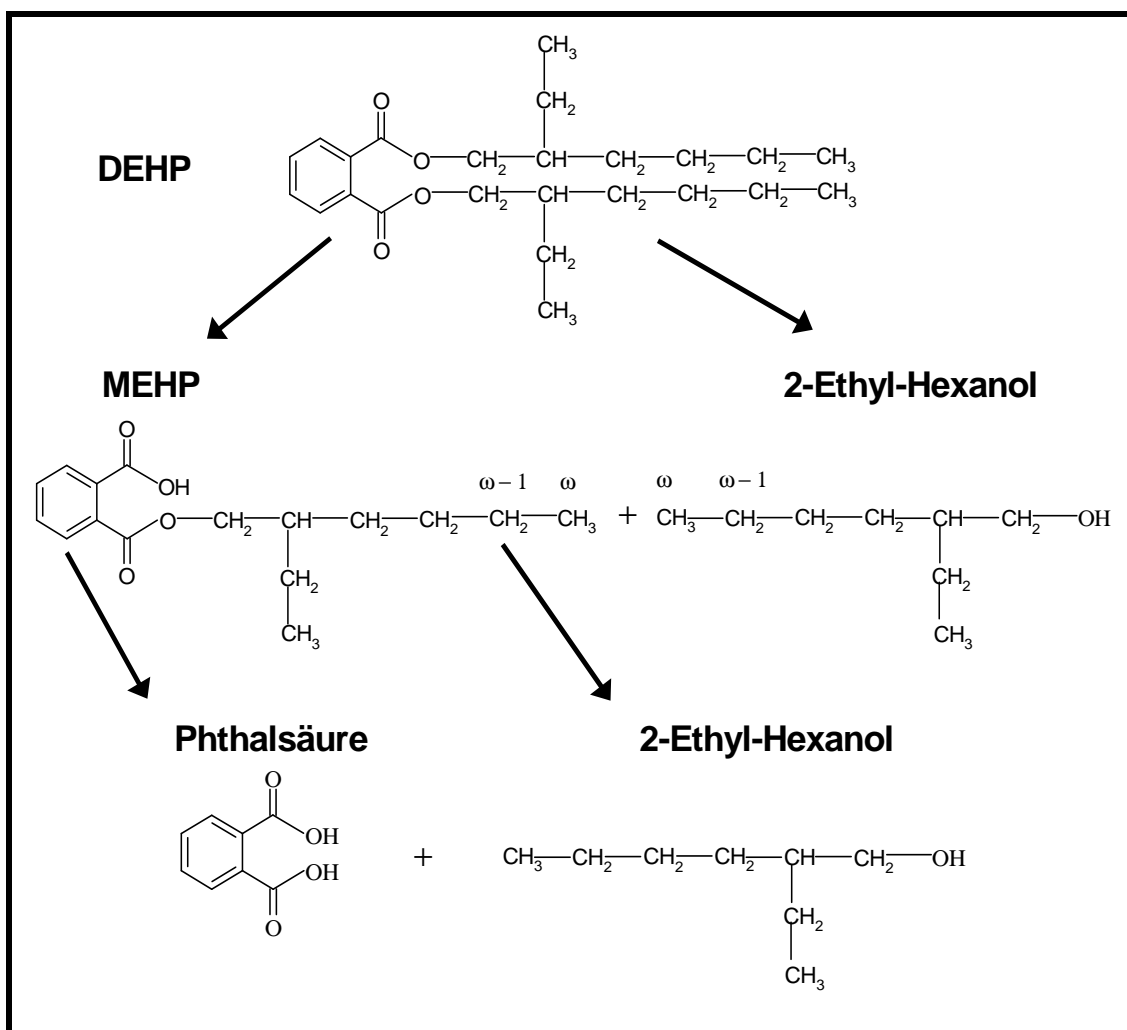


Abbildung 1: Primäre DEHP-Metabolite durch Hydrolyse

### 1.3 Toxikologische Effekte

Da die Exposition gegenüber Phthalaten durch Produkte des täglichen Bedarfs und Vorkommen in der Umwelt vielfältig ist, haben deren Auswirkungen auf den menschlichen Körper eine große arbeits- und umweltmedizinische Bedeutung. Es liegt bei den Phthalaten allerdings nur ein geringes Maß an akuter Toxizität vor, welches zudem mit zunehmendem Molekulargewicht der Verbindung weiter abnimmt. Es ist jedoch von einer Belastung der gesamten Bevölkerung auszugehen.

Diese Belastung konnten Wallin et al [48] bereits 1974 zeigen, indem sie Gewebe Verstorbener untersuchten. Hierbei zeigte sich, daß sowohl Patienten, die Bluttransfusionen erhalten hatten, als auch solche die keine Transfusionen erhalten hatten, eine DEHP-Kontamination aufwiesen.

Im medizinischen Bereich kommt es in den verschiedensten Situationen zur Kontamination der Patienten über einen Kontakt mit PVC-Produkten. Ein Risiko besteht u. a. bei Infusionen mit verschiedenen Lösungen, Transfusion von Blut und Blutbestandteilen, sowie insbesondere in der Intensivmedizin durch maschinelle Beatmung, Herz-Lungen-Maschine, Dialyse und enterale sowie parenterale Ernährung. Eine erhöhte Kontaktzeit und Temperatur sowie Lipophilie der verwendeten Lösungen und starke mechanische Inanspruchnahme der PVC-Behälter führen zu einer verstärkten Emigration der Weichmacher aus dem verwendeten Material.

Ein großes Problem in der Verwendung von Weichmachern besteht darin, dass diese keine chemische Verbindung zu der Grundsubstanz eingehen und so relativ einfach wieder aus dem Kunststoff austreten können. Aufgrund des geringen Dampfdruckes von DEHP wird die Belastung in der Atemluft als eher niedrig eingestuft, jedoch gilt dies nicht für Bereiche der DEHP-Produktion und -Verarbeitung, bzw. in Räumen mit entsprechend hoher Konzentration an DEHP-haltigen Produkten.

Durch Nahrungsmittel wird jedoch der Hauptteil der Belastung der allgemeinen Bevölkerung mit DEHP verursacht. Hier spielen zum einen die Anreicherung in der Umwelt, die Nahrungsmittelproduktion und der Austritt aus Verpackungsfolien der Lebensmittel eine Rolle.

Die Emission in die Umwelt entsteht bei der Produktion, des Gebrauchs und der Entsorgung von DEHP und DEHP enthaltenden Produkten. Nach der Emission in die Luft wird nur ein geringer Anteil des stabilen DEHP photooxidiert. Der Hauptteil findet sich in Böden und, trotz der geringen Wasserlöslichkeit, in Gewässern wieder. Und hier

kommt es aufgrund von kaum stattfindender Hydrolyse zu einer langen Halbwertszeit von über 100 Jahren.

Die Aufnahme von Weichmachern kann über die Atemwege, die Haut, den Verdauungstrakt und direkt intravenös erfolgen. Bei Kindern kommt es zudem durch so genanntes ``mouthing`` (in den Mund nehmen von Kunststoffgegenständen) zur Kontamination. Früh- und Neugeborene sind zudem einem besonders hohen Risiko durch Exposition mit DEHP ausgesetzt. Bei Ihnen resultiert aufgrund des niedrigen Körpergewichtes bei gleicher absoluter Belastung eine deutlich höhere Belastung pro kg Körpergewicht. Es scheint eine herabgesetzte Metabolisierung von DEHP zu bestehen [50].

### **1.3.1 Toxische Effekte auf Fötus und Embryo**

Da sie die Plazentaschranke überwinden können wirken DEHP und seine Metabolite teratogen und fetotoxisch auf Fötus und Embryo [37]. Hierbei kann es zu einer Verhinderung der Implantation kommen. Zudem können Spontanaborte, histologische Veränderungen an Leber, Niere und Hoden, Gewichtsabnahme von Niere und Hoden, Malformation von Skelett, Herz und Niere, Neuralrohrdefekte, Hydrocephalus und Absterben des Fötus auftreten [26, 36]. Hierbei wird die toxische Wirkung durch die Metabolite von DEHP verursacht [31, 44], die im Körper der Mutter entstehen und über die Plazenta zum Fötus gelangen [44].

### **1.3.2 Toxische Effekte auf Hoden und Ovarien**

Insbesondere männliche Fortpflanzungsorgane zeigten sich während der Entwicklung in der fetalen und neonatalen Phase bei niedrigen Dosierungen sehr empfindlich. In den Hoden kommt es zu einer Atrophie, Abnahme von Zahl und Qualität der Spermien, Abnahme des Zinkgehaltes sowie zu einem gehäuften Auftreten von Tumoren [25, 36, 38, 39, 51]. Hier scheint in erster Linie MEHP verantwortlich zu sein und zu einer Störung der Sertoli-Zellen zu führen. Es kommt zu einer Verringerung der Proliferation und der Interaktion mit den Gonozyten [33].

In den weiblichen Reproduktionsorganen kommt es zu einer Verlängerung der Zyklusdauer, unterdrückter oder verspäteter Ovulation, Verkleinerung der präovulatorischen Follikel, unterdrückter oder verminderter Estradiolproduktion, Gewichtsabnahme von Ovarien und Uterus sowie Abnahme der Fertilität [2, 3, 5, 34]. Desweiteren tritt konzentrationsabhängig von MEHP eine Inhibition der

Progesteronproduktion auf [45]. Es kommt zudem wie in den Sertoli-Zellen des Hodens zu einem Stimulationsverlust von cAMP, welches für die normale Zellfunktion essentiell ist [45, 46]. Genau wie in den Hoden zeichnet sich auch in den Ovarien MEHP als verantwortliches Agens ab [11, 45, 46].

### **1.3.3 Toxische Effekte auf Nieren**

An Rattennieren zeigte sich unter DEHP-Belastung eine signifikant erniedrigte Nierenfunktion mit erhöhten Creatininwerten. Zudem kam es zu Bildung von Zysten [9]. Die beschriebenen Effekte traten bei einer Dosis auf, die unter den Werten liegt, denen Patienten bei Hämodialyse ausgesetzt sind. Bei höheren Dosen kam es zu einer fokal tubulären Degeneration, Atrophie und regenerativer tubulärer Hyperplasie [49]. Weiterhin wurde von Rock et al [32] eine signifikante Senkung der Herzfrequenz und des Blutdruckes unter MEHP-Belastung beschrieben.

### **1.3.4 Toxische Effekte auf die Lunge**

Veränderungen in der Lunge wurden bisher relativ selten untersucht. Es wurden durch DEHP verursachte Entzündungen, Ödeme und Blutungen beschrieben.

Roth et al [33] beschrieben Lungenveränderungen bei Frühgeborenen, die durch die Verwendung von DEHP-haltigen Schlauchsystemen verursacht waren. Es bildete sich eine Hyalinmembranerkrankung, die sich erst nach Austausch der PVC-Schlauchsysteme gegen Ethylen/Vinylacetat-Schlauchsysteme wieder besserte. In der Lunge eines der Frühgeborenen, das kurz nach der Geburt verstarb, konnte DEHP nachgewiesen werden. Klimisch et al [20] behandelten Ratten mit einer Inhalationsdosis von 230 mg/kg Körpergewicht/Tag. Hierbei zeigte sich eine Gewichtszunahme der Lunge mit Verdickung der Alveolarsepten und eine erhöhte Proliferation von Schaumzellen.

In einer Arbeit von Oie et al [24] wird beschrieben, dass durch das Abbauprodukt MEHP ein erhöhtes Risiko einer Entzündung der Atemwege besteht und hierdurch Asthma bronchiale ausgelöst werden könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wird die These aufgestellt, dass die Entzündung durch MEHP ausgelöst wird, indem es Prostaglandine und Thromboxane imitiert.

Gourlay et al [15] konnten zeigen, dass es zu einer Entzündungsreaktion mit Ausbildung des Integrin CD 11b kam, nachdem Blut mit DEHP-haltigem PVC in

Kontakt gekommen war. Ein Ansteigen der Immunglobulinexpression zeigte sich auch bei Larsen et al [21]. Diese hatten BALB/c Mäuse mit subcutan-Injektionen von Phthalaten behandelt. Hierbei kam es dann vor allen Dingen bei MEHP zu einem Anstieg von Gesamt-IgE und IgG1. Zudem konnten Hansen et al [16] zeigen, daß es, bedingt durch eine Inhalation von Phthalaten, bei Mäusen zu einer Entzündung der Atemwege kommt. Diese basiert auf einem durch IgG1 vermittelten Mechanismus, wobei MEHP eine T(H)2-ähnliche Rolle spielt.

### **1.3.5 Toxische Effekte auf die Leber**

Da in der Leber der größte Teil der Metabolisierung und Akkumulation stattfindet, kommt es hier zu einer Vielzahl von Veränderungen, die die Struktur und die Funktion dieses Organs beeinträchtigen. Hierbei sind die Veränderungen unabhängig von der Applikationsform der Metaboliten beschrieben. David et al [10] konnten für Ratten und Mäuse einen DEHP-Wert in der Nahrung für nicht-cancerogene Effekten in der Leber bestimmen. Dieser Wert lag bei 500 ppm.

Es wurde eine Größenzunahme der Leber beschrieben [8], die nach Ende der Applikation reversibel war [35]. Weiterhin kam es zu einer Verminderung der Leberfunktion, zu einer Veränderung der Enzyme sowie zu histologischen Veränderungen bis hin zu Zellnekrosen [18, 19]. Zudem kam es, als eine der Hauptwirkungen von DEHP, zu einer Peroxisomenproliferation bzw. einer Induktion peroxisomaler Enzyme [12, 20]. Diese führte zu einer Steigerung der hepatischen peroximalen  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und zur Hypertrophie der Leber sowie Bildung von hepatocellulären Carcinomen.

Dieser Effekt von DEHP konnte in einer 1982 publizierten U.S. National Toxicology Programm Studie nachgewiesen werden. Hierbei wurde eine durch DEHP verursachte höhere Inzidenz von hepatocellulären Carcinomen sowohl in Ratten als auch in Mäusen beiderlei Geschlechts nachgewiesen. In einer von David et al [10] durchgeführten Studie zeigte sich, dass die meisten durch DEHP hervorgerufenen Leberveränderungen reversibel sind. Zudem stellte er fest, daß die Inzidenz von Lebertumoren in einer Gruppe von Mäusen, bei denen die Gabe von DEHP nach einer gewissen Zeit eingestellt wurde, geringer ist als in der Gruppe, die einer zweijährigen Exposition gegenüber DEHP ausgesetzt waren.

## 1.4 Allergische Erkrankungen

Als allergische Erkrankungen werden Immunreaktionen auf normalerweise harmlose Antigene bezeichnet. Antigene stellen die Gesamtheit aller Moleküle dar, die zu einer zellulären oder humoralen Abwehrreaktion des Körpers führen. Kommt es zu einer Antigenexposition, kann eine allergische Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ 1 nach Coombs und Gell auftreten, wie sie beim Asthma bronchiale zu finden ist.

Beim Asthma bronchiale handelt es sich um eine chronische, entzündliche Erkrankung der Atemwege mit dauerhaft bestehender Überempfindlichkeit. Bei entsprechend veranlagten Personen führt die Entzündung zu anfallsweiser Luftnot infolge einer Obstruktion der Atemwege. Verursacht wird diese reversible Obstruktion durch eine vermehrte Sekretion von Schleim, einem Spasmus der Bronchialmuskulatur und der Bildung von Schleimhautödemen in den Bronchien. Zudem spielen die Entzündung der Atemwege und das "Airway Remodeling" [17] eine Rolle bei der Pathogenese. Es kommt zu einer Hyperreagibilität der Atemwege, also einer Überempfindlichkeit, für die es verschiedene Auslöser gibt. Fünf Prozent der Erwachsenen und sieben bis zehn Prozent der Kinder leiden an Asthma bronchiale. In den letzten Jahrzehnten ist es insbesondere in den Industriestaaten zu einem Anstieg von Inzidenz und Prävalenz des Asthma bronchiale gekommen.

Bereits in der Kindheit zeigen sich erste Anzeichen einer Disposition zu allergischen Erkrankungen, die sich durch Symptome mit positivem Hauttest auf Allergene und erhöhte gesamt- und allergenspezifische Serumwerte für Gesamt-IgE zeigen [14]. Asthma bronchiale beginnt in der Regel schon im Kindesalter und ist die häufigste chronische Erkrankung dieses Lebensabschnitts. Pro Jahr gibt es in Deutschland ca. 5000 asthmabedingte Todesfälle. Frauen erkranken häufiger an Asthma als Männer.

Grundsätzlich lässt sich das allergische (extrinsische) Asthma vom nicht-allergischen Asthma (intrinsischen) unterscheiden. In der Regel sind Mischformen beider Varianten zu beobachten, wobei das allergische Asthma bei Kindern häufiger ist, im Alter hingegen die nicht-allergische Form vermehrt auftritt. Auslöser des Asthmas im Kindesalter ist überwiegend der Zigarettenrauch in der elterlichen Wohnung.

Beim allergiebedingten Asthma kommt es bei entsprechender genetischer Veranlagung zur Atopie durch Kontakt mit bestimmten Allergenen zur Bildung von Immunglobulinen, die zusammen mit Zytokinen die fürs Asthma typischen Reaktionen hervorrufen. Weiterhin kann es neben dieser Sofortreaktion vom Typ I nach Einatmen

des Allergens, noch nach 6 bis 12 Stunden zu einer Spätreaktion kommen; diese wird über IgG vermittelt. Oft treten beide Reaktionen auf. Asthma kann sich auch auf dem Boden eines vorher bestehenden Heuschnupfens entwickeln. Hierbei kommt es zu einem Etagenwechsel, indem die allergisch entzündlich Erkrankung auf die unteren Atemwege übergreift. Dieses ist bei fast einem Viertel dieser Patienten innerhalb von 10 Jahren zu beobachten.

Eine genetische Komponente kann ebenfalls bei der Entstehung von Asthma zu Grunde liegen. Bei Kindern von Eltern, die beide an allergischem Asthma leiden, besteht ein Erkrankungsrisiko von 60-80 %. Hierbei spielt insbesondere das Chromosom 5 eine Rolle. Auf diesem sind u.a. der T-Helfer-Zelltyp 2 (Th2)-Zytokin-Gencluster sowie die Gene für IL-12p40, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 lokalisiert.

Beim nicht-allergiebedingten Asthma sind mehrere auslösende Reize zu nennen: zum einen Atemwegsinfektionen, Medikamentenunverträglichkeiten (Analgetika, Betablocker), besondere körperliche Anstrengung, Einwirkung von giftigen (toxischen) oder irritierenden Stoffen (Lösungsmittel), sowie gaströsophagealer Reflux. Die Rolle von Phthalaten in diesem Zusammenhang ist zurzeit noch Teil der Forschung.

Das allergische Asthma bronchiale ist im Wesentlichen geprägt durch reversible Bronchokonstriktion, Atemnot, Entzündung der Atemwege und das "Airway Remodeling". Es kommt zu einer Atemwegsobstruktion durch Verlegung des Lumens infolge eines Schleimhautödems, einer Hyperkrinie und eines Bronchospasmus. Die Bereitschaft der kleinen und mittleren Atemwege, auf bestimmte Reize mit einer Konstriktion der glatten Muskulatur zu reagieren, wird auch als Atemwegshyperreagibilität (AHR) bezeichnet. Mit Hilfe von invasiven (transpulmonaler Widerstand) und nicht-invasiven Methoden (Head-out-Plethysmographie) kann dieser zentrale Effekt des allergischen Asthma bronchiale nachgewiesen werden. Beim Remodeling kommt es zu einer Fibrose großer Lungenanteile, einer Verdickung der Basalmembranen und einer Hypertrophie der glatten Muskulatur. Es tritt eine erhöhte Deposition von Typ-III-Kollagen um die Atemwege und eine Transformation von Fibroblasten in Myofibroblasten auf.

Es lassen sich bei Asthmapatienten eine erhöhte Anzahl von aktivierten Eosinophilen mit assoziierter Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie dem Major Basic Protein und dem Eosinophil Cationic Protein nachweisen, die beide von Eosinophilen stammen

[13, 28]. Sowohl die Eosinophilie als auch die Hyperreagibilität und eine gesteigerte Fibrose werden durch die Ausschüttung von Th2-Zytokinen gesteuert.

Die Entzündung, insbesondere die Gesamt-IgE-vermittelte Sofortreaktion, ist neben der AHR ein entscheidender Faktor bei der Entstehung des Asthma bronchiale. Insbesondere den Eosinophilen fällt hier eine bedeutende Rolle zu, da sie maßgeblich zur Zerstörung des Atemwegsepithels beitragen, die Gefäßpermeabilität erhöhen und auf die glatten Mukelzellen kontraktil wirken. Sie bewirken so eine Atemwegsobstruktion durch ein Schleimhautödem und die Engstellung des Atemwegslumens.

Es zeigte sich, dass die Gesamt-IgE-Antikörperproduktion der B-Zellen durch von T-Helferzellen stammende Interleukine kontrolliert wird. Es konnte die Existenz von zwei verschiedenen Arten von CD4+T-Helferzellen nachgewiesen werden, die sich bei Aktivierung aus naiven T-Helferzellen entwickeln können. Diese unterscheiden sich durch die von Ihnen produzierten Zytokinprofile [1, 23]. TH1-Zellen produzieren proinflammatorische Zytokine, wie Interferon-gamma, Lymphotoxin-alpha oder Tumornekrosefaktor-beta sowie IL-2. Im Vergleich hierzu produzieren TH2-Zellen eine Gruppe verschiedener Zytokine, wie etwa IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13, die zusammen die humorale Immunreaktion steuern. Hierbei spielt die Isotypenänderung nach Gesamt-IgE und IgG1 eine Rolle, sowie die mukosale Immunität durch die Induktion von Mastzellen- und Eosinophilenwachstum und die Produktion differenzierender Faktoren. Es gibt jedoch auch Zytokine, die von beiden Gruppen exprimiert werden, wie IL-3, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor (GM-CSF) und TNF-alpha.

### **1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit**

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob im Mausmodell die Exposition mit Phthalaten zu einer bronchialen Hyperreagibilität führt und Zeichen einer Entzündungsreaktion nachgewiesen werden können.

Hierbei werden im Mausmodell die Auswirkungen von Phthalaten auf die Lunge untersucht. Da es sich bei DEHP um den am häufigsten verwendeten Weichmacher handelt und MEHP das erste Abbauprodukt ist, wird sich diese Arbeit speziell mit diesen beiden Stoffen befassen.



Es werden zunächst die Veränderungen der Lungenfunktion und des Lungengewebes untersucht. Hierbei werden verschiedene histologische Methoden angewendet. Desweiteren wird analysiert, welche Veränderungen des Immunsystems auftreten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

1. OVA-Lösung (Grad V 1%ig in PBS)	Sigma, D
2. PBS-Puffer (Dublecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories, AU
3. MEHP (Phthalic Acid Mono-2-ethylhexyl Ester)	TCI Europe
4. DEHP (Phthalic Acid Di-2-ethylhexyl Ester)	TCI Europe
5. Plexiglaskasten 22 x 23 x 14 cm	Spezialanfertigung
6. Kompressor (Pari-Master)	Pari-Werke, D
7. Nebulisator (Pari-Boy)	Pari-Werke, D
8. Head-out-Body-Pletysmograph	Fraunhoferinstitut für Toxikologie und experimentelle Medizin, D ITEM
9. Acetyl- $\beta$ -Methylcholin (Metacholin)	Sigma, D
10. Wärmeinkubator GTR 199	Greisinger, D
11. Skalpell (Disposable Scalpell No. 10)	Feather, J
12. 1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, D
13. Sterilium	Braun, D
14. Pipette	Eppendorf, D
15. Zentrifuge (Rotina 48 RS)	Hettich Zentrifugen, D
16. 96er-well-ELISA-Platten (Maxisorp)	Nunc, DK
17. Mehrkanalpipette (Finnpipette)	Labsystems, FIN
18. Pipettenspitzen (Fintip)	Labsystems, FIN
19. Ansaugwanne (10 Tip-Tubs)	Eppendorf, D
20. 1,3 ml Reaktionsgefäß	Greiner Bio-One, D
21. Schüttler (IKA-Schüttler MTS4)	IKA-Werke, D
22. Mehrkanalwasher (Nunc-Imuno Wash 12)	Nunc, DK
23. Photometer (Tecan-Photometer Sunrise)	Tecan, AU
24. Photometersoftware (Magellan 2)	Tecan, AU
25. Streptavidinperoxidase (1 mg/ml)	Sigma, D
26. Farbsubstrat (BM Blue POD Substrate)	Roche, D
27. Block-Puffer: - PBS (Dublecco's, ph 7) - BSA (Albumin Bovine 3%ig in PBS)	PAA Laboratories,AU Sigma, D
28. Waschpuffer: - PBS (Instamed PBS Dublecco) - Tween (0,1 %ig in PBS)	Biochrome, D Merck, D

---

29. Schwefelsäure (2 M)	Merck, D
30. Natriumhydrogencarbonat (0,1 M)	Merck, D
31. IgE: - 1. AK: Anti-Maus-Gesamt-IgE (PC284) Standard: Monoklonales Maus Gesamt-IgE (03231 D) - 2. AK: Anti-Maus-Gesamt-IgE-Biotin (02132 D)	The Binding Site, UK Pharmingen, D Pharmingen, D
32. IgG1: - 1. AK: Anti-Maus-IgG1 (A85-3) Standard: Monoklonales Maus IgG1 - 2. AK: Anti-Maus-IgG1-Biotin (A 85-1)	Pharmingen, D Pharmingen, D Pharmingen, D
33. IgA: - 1. AK: Anti-Maus-IgA (C 10-3) Standard: Monoklonales Maus IgA (M 18-254) - 2. AK: Anti-Maus-IgA-Biotin (C 10-1)	Pharmingen, D Pharmingen, D Pharmingen, D
34. IgM: - 1. AK: Anti-Maus-IgM (II/41) Standard: Monoklonales Maus IgM (G 155-228) - 2. AK: Anti-Maus-IgM-Biotin (R 6-60.2)	Pharmingen, D Pharmingen, D Pharmingen, D
35. IL 4: - 1. AK: Anti-Maus-IL 4 (18031 D) - 2. AK: Anti-Maus-IL 4-Biotin (18042 D)	Pharmingen, D Pharmingen, D
36. IL 5: - 1. AK: Anti-Maus-IL 5 (18051 D) - 2. AK: Anti-Maus-IL 5 (18062 D)	Pharmingen, D Pharmingen, D
37. Präparierbesteck	
38. 1 ml Spritzen (BD Plastipak)	Beckton Dickinson, D
39. Kanülen (Microlance 3 0,45x13)	Beckton Dickinson, D
40. 1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, D
41. Casy Cell Counter+Analyser System Modell TT	Schärfe System, D
42. Casy cup	Schärfe System, D
43. Casy ton	Schärfe System, D
44. Casy clean	Schärfe System, D
45. Zytocentrifuge	Shandon, D
46. Probenkammer	Shandon, D
47. Zytoclip	Shandon, D
48. Objektträger (76x26 mm Mattrand)	Menzel Gläser, D
49. Färbelösungen (Diff-Quick)	Dade-Behring, D
50. Mikroskop (BH2)	Olympus, D
51. Mikrotom (ACCU-Cut SRM 200 Rotationsmikrotom)	Sakura, USA
52. Streckwasserbad	Sakura, USA
53. 3% Gesamt-IgE Formaldehydlösung	Merck, D
54. Präparatebehältnisse (20 ml)	Zinsser Analytik, D

---

55. Objektträger (76x26 mm, Mattrand)	Menzel-Gläser, D
56. Objektträger Super Frost Plus (75x25x1 mm)	Menzel-Gläser, D
57. Hämatoxylin II nach Gill	Merck, D
58. Eosin 1%	Merck, D
59. Ethanol absolut	Riedel- de Haen, D
60. Neo-Mount	Vogel, D
61. Neo-Clear	Vogel, D
62. Entellan neu	Vogel, D
63. Eindeckgläschen (24x50)	Menzel-Gläser, D
62. Periodsäure 0,5% wässrig	Merck, D
63. Schiffs Reagenz	Merck, D
64. Hämatoxylin III nach Gill	Merck, D
65. PBS Dulbecco	Biochrom AG,D
66. Ethanol absolut	Riedel-de Haen, D
67. NGF (M20)	SantaCruz Biotechnology, USA
68. DAPI	AppliChem, D
69. ProLong Antifade Kit	MolecularProbes,USA
70. VCAM-1 (C-19)	SantaCruz Biotechnology, USA
71. Levamisol-Solution	Vector Laboratories, Inc., USA
72. Avidin Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Inc., USA
73. Anti-Goat IgG	Vector Laboratories, Inc., USA
74. DAKO LSAB 2 System	DAKO Cytomation, USA
75. DAKO Nuklear Fast Red	DAKO Cytomation, USA
76. BALB/c-Mäuse	Harlan Winkelmann, Borche, D

## 2.2 Versuchsaufbau

Bei den Versuchstieren handelte es sich um weibliche 6-8 Wochen alte BALB/c-Mäuse, die zu je vier Tieren unter keimarmen Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigsystemen bei konstanter Raumtemperatur von 20 °C gehalten wurden.

Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 40 Tagen zwanzigmal, das heißt jeden zweiten Tag, einem ihrer Gruppe zugeordneten Aerosol ausgesetzt (Challenge). Hierzu wurden die Tiere einer Versuchsgruppe 20 Minuten in einen luftdicht abgeschlossenen Plexiglaskasten gesetzt. In diesen wurden über einen Nebulisator jeweils 5 ml des entsprechenden Aerosols eingebracht. Die Kontrollgruppe wurde mit PBS behandelt. Hierbei handelt es sich um eine phosphatgepufferte Salzlösung, die nach der Inhalation keine Auswirkung auf die Zellen hat, da sie isotonisch und nicht zelltoxisch ist. Die Referenzgruppe wurde mit OVA benebelt. Dies ist die Abkürzung für Ovalbumin und ist das mengenmäßig häufigste Protein im Eiweiß von Vogeleiern. Daß es bei der Behandlung mit OVA zu einer Atemwegshyperreagibilität kommt, hatten unter anderem Reuter et al [30] gezeigt. Die Versuchsgruppen wurden der ihnen zugeordneten Konzentration des entsprechenden Weichmachers ausgesetzt.

Zunächst wurde die Lungenfunktion mittels Head-Out-Body-Pletysmographen gemessen. Anschließend wurde den Mäusen Blut entnommen, um aus dem Serum Immunglobuline zu bestimmen. Nach dem Töten der Tiere erfolgte die Präparation mit der Organentnahme. An den Lungen wurde eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) vorgenommen. In der BAL-Flüssigkeit wurden dann die Zellen gezählt und differenziert und Neurotrophine bestimmt.

Abschließend erfolgte die Anfertigung der Lungenpräparate, die mit verschiedenen histologischen Methoden aufbereitet wurden.

## 2.2 Einteilung von Versuchsgruppen

Den zwei Versuchsreihen mit MEHP und DEHP wurden jeweils 40 Tiere zugeordnet. Je Versuchsreihe wurden eine Kontrollgruppe (PBS) und eine Referenzgruppe (OVA) mit jeweils vier Tieren gebildet und vier Gruppen mit je acht Tieren, die einer aufsteigenden Weichmacherkonzentration zugeordnet waren. Die Tiere wurden im Rahmen des Versuchs einem Aerosol des entsprechenden Weichmachers ausgesetzt. Das Aerosol bestand aus einer PBS-Lösung, versetzt mit steigenden Konzentrationen an

Weichmachern (250-2000 mg/L). Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht des zeitlichen Ablaufs des Versuchs.

Tabelle 2: Challenge Zeitplan

Tag	Datum	Wochentag	Tätigkeit		
1	19.01.2004	Mo	Challenge		
2	20.01.2004	Di			
3	21.01.2004	Mi	Challenge		
4	22.01.2004	Do			
5	23.01.2004	Fr	Challenge		
6	24.01.2004	Sa			
7	25.01.2004	So	Challenge		
8	26.01.2004	Mo			
9	27.01.2004	Di	Challenge		
10	28.01.2004	Mi			
11	29.01.2004	Do	Challenge		
12	30.01.2004	Fr			
13	31.01.2004	Sa	Challenge		
14	01.02.2004	So			
15	02.02.2004	Mo	Challenge		
16	03.02.2004	Di			
17	04.02.2004	Mi	Challenge		
18	05.02.2004	Do			
19	06.02.2004	Fr	Challenge		
20	07.02.2004	Sa			
21	08.02.2004	So	Challenge		
22	09.02.2004	Mo			
23	10.02.2004	Di	Challenge		
24	11.02.2004	Mi			
25	12.02.2004	Do	Challenge		
26	13.02.2004	Fr			
27	14.02.2004	Sa	Challenge		
28	15.02.2004	So			
29	16.02.2004	Mo	Challenge		
30	17.02.2004	Di			
31	18.02.2004	Mi	Challenge		
32	19.02.2004	Do			
33	20.02.2004	Fr	Challenge		
34	21.02.2004	Sa			
35	22.02.2004	So	Challenge		
	23.02.2004	Mo	Challenge		
	24.02.2004	Di	Challenge	AHR	
	25.02.2004	Mi	BE, BAL, Histo		
	Gruppe 1	n=4	PBS Challenge		
	Gruppe 2	n=4	OVA Challenge		
	Gruppe 3	n=8	DEHP/MEHP Challenge 250 mg/L		
	Gruppe 4	n=8	DEHP/MEHP Challenge 500 mg/L		
	Gruppe 5	n=8	DEHP/MEHP Challenge 1000 mg/L		
	Gruppe 6	n=8	DEHP/MEHP Challenge 2000 mg/L		

### **2.3 Auslösung einer Atemwegsreaktion durch Exposition gegenüber eines Aerosols**

Es wurde versucht, eine lokale allergenspezifische Entzündungsreaktion in den Atemwegen hervorzurufen und eine bronchiale Hyperreagibilität zu induzieren. Hierzu wurden die Tiere innerhalb von 40 Tagen zwanzigmal über jeweils zwanzig Minuten in einem luftdicht abgeschlossenen Plexiglaskasten dem zugeordneten Aerosol (5ml) ausgesetzt, das über einen Nebulisator eingebracht wurde. Die Tiere der Kontroll-Gruppe wurden mit PBS behandelt, wohingegen die Mäuse in der Referenz-Gruppe mit OVA benebelt wurden.

### **2.4 Messung der Lungenfunktion mittels Head-Out-Body-Pletysmographen**

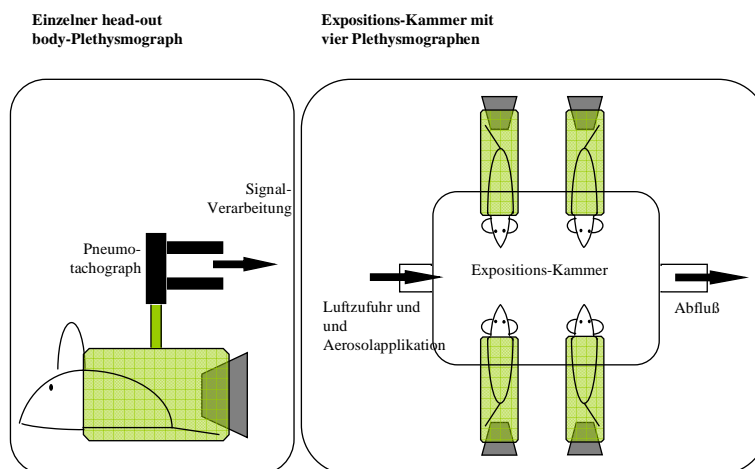
Mit Hilfe des Head-Out-Body-Pletysmographen ist es möglich, physiologische Lungenparameter kontinuierlich zu messen. Weiterhin lässt sich eine Aussage über das Ausmaß der Atemwegshyperreagibilität, der zuvor sensibilisierten Mäuse machen. Gemessen wurden jeweils die nachfolgend aufgeführten Parameter.

#### Protokoll

Als Parameter wurden bestimmt:

- Atemfrequenz (BPM)
- Atemzugvolumen (VT)
- Atemminutenvolumen (AMV)
- Inspirations-(TI) sowie Expirationszeit (TE)
- mittlerer expiratorischer Atemfluss (EF-50) als Maß für die Obstruktion der Atemwege
- mittlerer inspiratorischer Atemfluss (IF-50)
- maximaler expiratorischer Atemfluss
- maximaler inspiratorischer Atemfluss

## Der head-out body-Plethysmograph



**Abbildung 2: Aufbau der Messkammer zur Bestimmung der Atemwegsreaktion unter Metacholinprovokation**

Die Meßapparatur bestand aus einer gläsernen Expositions-kammer, an der seitlich vier Plethysmographen saßen, in denen die Messung erfolgte. Über eine Einlassöffnung der Expositions-kammer konnten Aerosole verabreicht werden, eine Saugpumpe sorgte für einen kontinuierlichen Luftstrom. Die Plethysmographen, in denen die Mäuse saßen, waren luftdicht verschlossen, so dass es, bedingt durch die Thoraxbewegungen der Mäuse, zu Volumenschwankungen kam. Diese wurden von einem Pneumotachographen registriert und in elektrische Signale umgeformt, die nach Verstärkung durch eine Digital-Analog-Wandlerkarte in digitale Signale umgewandelt und mit einem PC ausgelesen wurden. Die Auswertung und Berechnung erfolgt mit Notocord hem 3.5 in Verbindung mit Microsoft Excel.

24 Stunden nach der letzten Challenge erfolgte die Messung. Hierzu wurden die Mäuse in die Plethysmographen gesetzt und anschließend eine Wartezeit von 15 Minuten eingehalten, so dass sich die Mäuse beruhigen und ihre Atmung normalisieren konnten.

Es folgte eine 15-minütige Baseline-Messung, mit Messintervallen von je 14 Sekunden, zu der alle im Anschluß gewonnenen Daten relativ in Bezug gesetzt wurden. Die Messdaten wurden als 100 % gesetzt. Begonnen wurde mit PBS als Kontrolle, danach folgte eine Exposition mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe des



$\beta$ -Sympathikomimetikums Metacholin (MCh), wobei die Expositionsdauer jeweils 70 Sekunden betrug.

- nach 15 Minuten	Baseline-Messung
- 15`10``	PBS
- 19`50``	1. MCh-Konzentration (25 mg/ml)
- 24`30``	2. MCh-Konzentration (50 mg/ml)
- 29`10``	3. MCh-Konzentration (75 mg/ml)
- 33`50``	4. MCh-Konzentration (100 mg/ml)
- 38`20``	5. MCh-Konzentration (125 mg/ml)
- 43`10``	6. MCh-Konzentration (150 mg/ml)
- 46`40``	Ende der Messung

MCh dient in der interneuronalen und der neuromuskulären Synapse der Aktionspotentialübertragung. Es ist ein Derivat des Neurotransmitters Acetylcholin und wurde in aerosoler Form in die Expositionskammer eingebracht. Nachdem die Mäuse das Aerosol eingeatmet haben, bindet es an die cholinergen Rezeptoren der neuromuskulären Synapsen und gibt so ein Signal zur Muskelkontraktion. Da es nur eingeatmet wird, wirkt es lediglich auf die Atemwegsmuskulatur. Die Aerosol-Expirationsintervalle waren so bemessen, dass es zu keinen Akkumulationseffekten in der murinen Lunge führen konnte. Die so ausgelöste Bronchoobstruktion verursacht einen Anstieg des Atemwegswiderstandes, gegen den die Maus atmen muß. Dies führt zu einer verlangsamten Ausatemungsgeschwindigkeit und zu einem verringerten mittleren expiratorischen Atemfluß (EF-50). Bei Tieren besteht eine erhöhte Reagibilität auf unspezifische Reize, z.B. MCh, wenn eine allergische Entzündung in der Lunge vorliegt. Diese Tiere reagieren mit einer 50%igen Reduktion des EF-50 schon bei deutlich niedrigeren MCh-Konzentrationen.

In dem Versuch wurde die Konzentration von MCh ermittelt, die eine 50%ige Reduktion des bei Ruheatmung herrschenden EF-50 verursacht. Kam es zu einem Absinken des EF-50-Wertes unter 50% der Baseline für fünf Meßperioden in Folge oder waren in den folgenden 15 Meßperioden nach einmaligem Absinken unter 50% der Baseline weitere fünf unter 50%, wurde das Tier aus der Wertung genommen. Nun wurde mittels Microsoft Excel diejenige Konzentration an Metacholin im Aerosol bestimmt, bei der der Median der EF-50-Werte unter 50% der Baseline der jeweiligen Maus gefallen war.

## **2.5 Blutentnahme bei Mäusen und Gewinnung von Serum**

Die Gewinnung von Blutproben diente der Bestimmung von Immunglobulinen aus dem durch Zentrifugation gewonnenen Serum.

### Protokoll

Die Mäuse wurden für zehn Minuten bei 60 °C in den Inkubator gesetzt, um eine ausreichende Füllung der Venen zu gewährleisten. Nachdem der Schwanz mit Sterilium desinfiziert war, wurde die untere Schwanzvene eingeritzt und das Blut in einem 1,5 ml Eppendorfcup gesammelt. Danach wurden die Gefäße, nachdem das Blut ca. eine Stunde geronnen war, bei 4000 rpm für 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Überstände wurden mit der Pipette abgenommen in ein 1,5 ml Eppendorfcup überführt und bei -80 °C eingefroren.

## **2.6 ELISA zum Nachweis von Immunglobulinen und Neurotrophinen**

Mittels der ELISA-Technik gelingt ein spezifischer, quantitativer Nachweis von bestimmten Immunglobulinen (Ig). Es wurde die Konzentration von Gesamt-IgE, -IgM, -IgG1 und -IgA sowie des Neurotrophins Nerve Growth Factor (NGF) untersucht.

### Protokoll

Die 96-well-Mikrotiterplatten wurden mit je 50 µl/well des jeweiligen primären Antikörpers (1. AK) beschichtet, der gegen das entsprechende zu untersuchende Ig gerichtet war. Über Nacht wurde bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit dem Waschpuffer, um überschüssige AK zu entfernen, erfolgte eine Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit 150 µl/well Blockpuffer bei Raumtemperatur (RT) für drei Stunden auf einem Schüttler. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden sowohl die Standards, die als Referenzwert dienten und das Ig in bekannter Konzentration enthalten, als auch die verdünnten Proben zu je 50 µl/well aufgetragen und für vier Stunden bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem Waschvorgang, der das überschüssige Probenmaterial entfernte, wurden 50 µl/well des biotinierten sekundären Antikörpers (2. AK) aufgetragen, der spezifisch an das vom 1. AK gebundene Ig band, und zwei Stunden bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde erneut gewaschen, um den überschüssigen 2. AK zu entfernen. Von der 1:1000 verdünnten Streptavidinperoxidase wurden 50 µl/well aufgetragen und bei RT im Dunkeln 30 Minuten inkubiert. Nach anschließendem zehnmaligen Waschen wurden

je 100 µl/well POD-Farbsubstrat aufgetragen. In der darauf folgenden Inkubation im Dunkeln setzte die an das Biotin gebundene Streptavidinperoxidase das Pod-Farbsubstrat in einen blauen Farbstoff um. Hierbei war die Intensität abhängig von der zu bestimmenden Ig-Konzentration. Die Inkubation wurde zu dem Zeitpunkt mit 2 molarer Schwefelsäure gestoppt, wenn der letzte Standard farblich vom mitgeführten Leerwert (nur Waschpuffer) zu unterscheiden war. Hierbei kam es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Anschließend wurde die Extinktion photometrisch gemessen (Meßfilter 450 nm, Referenzfilter 690 nm) und anhand der Standardkurven die Konzentration der Ig mit dem Photometerprogramm Magellan 2 berechnet.

### **2.7 Präparation und broncho-alveoläre Lavage (BAL)**

Die BAL diente der Gewinnung von intrapulmonalen Zellen und Entzündungsmediatoren, um Aussagen über eine eventuell vorhandene Entzündung der Lunge machen zu können.

#### Protokoll

Die Tötung der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation. Danach wurden die Tiere gewogen und anschließend präpariert. Leber und Milz wurden herauspräpariert, die Leber wurde gewogen und dann mit der Milz bei -80 °C eingefroren. Nach der Freilegung der Lunge wurde eine Kanüle in die Trachea eingebracht, über die die Lunge mit 1 ml PBS gespült wurde. Die Spülflüssigkeit ließ man in ein 1,5 ml Eppendorfcup laufen, welches zur weiteren Analyse auf Eis gelagert wurde.

### **2.8 Bestimmung der Zellzahl in der BAL**

Mit dem Casy Cell Counter wurde die Zellzahl in der BAL-Spülflüssigkeit mittels der elektrischen Widerstandsmessung bestimmt.

#### Protokoll

In ein Casy cup, das mit 10 ml Casy ton gefüllt war, wurden 50 µl BAL-Spülflüssigkeit gegeben. Nach Spülung des Cell Counter mit reinem Casy ton und Platzierung der Probe auf dem Probensockel, erfolgte die Messung der Zellkonzentration in der BAL-Spülflüssigkeit. Die Bearbeitung der Daten erfolgte mit Windows Excel.

## **2.9 Differenzierung der Zellen aus der BAL**

Mit der Zytocentrifuge erfolgte die Aufbereitung der Zellen aus der BAL, so dass sie mit Hilfe des Mikroskops differenziert werden konnten.

### Protokoll

Die Probenkammern wurden mit je 50 µl der BAL-Flüssigkeit und 150 µl PBS gefüllt und mit einem Filterpapier und einem Objektträger in einen Zytoklip-Zentrifugeneinsatz geklemmt. Nach der nun folgenden Zentrifugation über 5 Minuten bei 700 rpm wurden die Präparate 30 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend mit Diff-Quick gefärbt. Unter dem Mikroskop erfolgte anschließend die Zelldifferenzierung mit 400-facher Vergrößerung.

## **2.10 Anfertigung der Lungenpräparate**

Um die morphologischen Veränderungen, die bei einer Entzündung der Atemwege auftreten, untersuchen zu können, wurden histologische Präparate angefertigt. Diese wurden unter dem Lichtmikroskop beurteilt, indem die Entzündungsreaktion sowohl in der Bronchuswand als auch in der Wand des begleitenden Gefäßes untersucht wurde und die beteiligten Entzündungszellen identifiziert wurden.

### Protokoll

Nach der BAL wurden die Lungen in 3%iger Formaldehydlösung fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden mit dem Mikrotom 3 µm Dünnschnitte angefertigt, in das Streckwasserbad gelegt und dort auf den jeweiligen Objektträger gebracht. Bei der PAS- und HE-Färbung wurden die Schnitte auf Mattrand-Objektträger gebracht, bei der VCAM- und NGF-Färbung auf Super Frost Plus Objektträger. Die Präparate wurden über Nacht getrocknet.

### **2.10.1 HE (Hämatoxylin-Eosin) -Färbung der Lungenpräparate**

#### Protokoll

Die Objektträger wurden zum Entparaffinieren 15 Minuten in Neo-Clear getaucht, dann zweimal für je eine Minute in 100 % Ethanol und anschließend für jeweils eine Minute in 90%-, 80%- und 70%igen Ethanol. Die Objektträger wurden mit Aqua dest. gespült und daraufhin 10 Minuten in Hämatoxylin II nach Gill gefärbt. Anschließend wurde 10 Minuten mit warmem Leitungswasser und mit Aqua dest. gespült. Nach der nun

folgenden Färbung mit Eosin über fünf Minuten, wurde wieder mit Aqua dest. gespült. Danach kamen die Objektträger jeweils eine Minute in 70%-, 80%-, 90%- und 100%igen Ethanol und dann für 15 Minuten in Neo-Clear. Abschließend wurden sie mit Neo-Mount und den Eindeckgläschen eingedeckt.

### **2.10.2 PAS ( Periodic-Acid-Schiff) -Färbung der Lungenpräparate**

#### Protokoll

Die Präparate wurden zweimal für je eine Minute in 100% Ethanol, dann in 80%- und 70%igem Ethanol entparaffiniert, wonach sie 15 Minuten in Neo-Clear rehydratisiert wurden. Nach Spülen mit Aqua dest. kamen sie fünf Minuten in Periodsäure und wurden mit Leitungswasser und Aqua dest. wieder gewaschen. Nachdem sie 15 Minuten in Schiffs Reagenz gestanden hatten, wurden sie nach erneuter Spülung mit Leitungswasser und Aqua dest. zwei Minuten mit Hämatoxylin III nach Gill gefärbt. Nach Spülung mit Leitungswasser kamen sie für je eine Minute in 70%-, 80- und 90%igen Ethanol, anschließend in Neo-Clear. Abschließend konnten sie mit Neo-Mount und den Eindeckgläschen eingedeckt werden.

### **2.10.3 Nerve growth factor (NGF) -Färbung der Lungenpräparate**

NFG gehört zur Gruppe der Neurotrophine. Es konnte in einem Tiermodell [29] gezeigt werden, daß NGF eine wichtige Rolle in der Entstehung des allergischen Asthmas spielt. Produziert und freigesetzt wird NGF durch verschiedene Zellen des Immunsystems [6], z.B. Th2-Helferzellen, Eosinophile, Makrophagen und Mastzellen. Es führt zu einer allergischen Entzündung, bronchialen Hyperreaktivität und Atemwegsobstruktion.

#### Protokoll

Die Präparate wurden zuerst entparaffiniert. Hierzu wurden sie in Xylol und dann in eine absteigende Alkoholreihe getaucht. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und mit einem Fettstift eingekreist, damit die anschließend hinzugegebenen Flüssigkeiten über dem Präparat blieben. In einem ersten Schritt wurden die Präparate mit 1% BSA und 3% Donkeyserum, in PBS gelöst, bedeckt. Diese Lösung wurde nach 60 Minuten wieder abgekippt. Im Anschluß daran wurde der primäre Antikörper aufgebracht. Es erfolgte eine Inkubation mit den Antikörpern über Nacht. Am nächsten Tag wurde für drei mal fünf Minuten mit PBS gewaschen. Der weitere Ablauf erfolgte

im Dunkeln. Hierbei wurde zunächst mit dem sekundären Antikörper über zwei Stunden inkubiert. Danach wurde erneut mit PBS für drei mal fünf Minuten gewaschen und DAPI für 30 Minuten aufgetragen. Im Anschluß erfolgte eine erneute Waschung für drei mal fünf Minuten mit PBS. Nach dem Trocknen wurden die Präparate mit dem ProLong Antifade Kit eingedeckt.

#### **2.10.4 Vascular Cell Adhesion Molecule (V-CAM) -Färbung der Lungenpräparate**

Bei dem Vascular cell adhesion molecule (V-CAM) handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül, das vom Endothel kleiner und großer Gefäße exprimiert wird. Es wird durch Stimulierung von Cytokinen gebildet und sorgt über eine Adhäsion für eine Einwanderung von Monozyten, Lymphozyten, Basophilen und Eosinophilen in das umliegende Gewebe.

##### Protokoll

Die Präparate wurden zunächst in Xylol und dann in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und mit einem Fettstift eingekreist, damit die nun hinzugegebenen Flüssigkeiten über dem Präparat blieben. Für zehn Minuten wurde Levamisol hinzugegeben und für zwei mal zehn Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurde für eine Stunde in PBS gelöstes Rabbitserum aufgetragen. Nachdem diese Lösung abgekippt worden war, wurde zwei Mal für jeweils 15 Minuten Avidin aufgebracht und erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurde für 15 Minuten Biotin aufgetragen. Im Anschluß erfolgte wieder eine Spülung mit PBS. Über Nacht wurde der Primärantikörper (V-CAM) bei 4 °C aufgebracht. Am nächsten Tag erfolgte zunächst eine erneute Waschung mit PBS für drei mal zehn Minuten, dann wurde der biotinierte Anti -Goat-Antikörper für 30 Minuten aufgetragen. Nachdem für drei mal zehn Minuten mit PBS gewaschen worden war, wurde für jeweils 30 Minuten das LSAB 2 System aufgetragen. Zwischen den Schritten und abschließend wurde jeweils für drei mal zehn Minuten mit PBS gewaschen. Nachdem für fünf Minuten mit Leitungswasser gespült worden war, wurde für zehn Minuten Fast Red aufgetragen. Abschließend wurden die Präparate kurz gewässert und in eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol eingebracht.

### **2.11 Statistische Auswertung**

Im Ergebnisteil werden die ermittelten Daten zunächst deskriptiv dargestellt. Hierbei werden die Daten als Mittelwert und Standardabweichung gezeigt. Die statistischen Berechnungen wurden auf einem PC mit dem Softwarepaket Microsoft Excel für Windows XP Version 2002 sowie dem Statistikprogramm GraphPad Prism Version 04.1 durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss der Phthalate auf die Lungenfunktion

##### 3.1.1 DEHP-Gruppe

In der durchgeführten Versuchsreihe wurde der Einfluß von DEHP bzw. MEHP auf die Lungenfunktion der Mäuse untersucht. Die Mäuse waren in einem genau festgesetzten Plan mit den Phthalaten behandelt worden. Hierzu wurde jede Versuchsgruppe zwanzigmal über jeweils zwanzig Minuten den Weichmachern ausgesetzt. Die Mäuse befanden sich in einem luftdicht abgeschlossenen Plexiglaskasten, in den über einen Nebulisateur 5 ml des entsprechenden Aerosols eingebracht wurden. Anschließend wurde mit Hilfe der Head-out-Pletysmographie das Ausmaß der Atemwegshyperreagibilität (AHR) der Mäuse untersucht.

Die Messung der DEHP-Gruppe zeigte dabei die in Abbildung 3 dargestellten Ergebnisse:

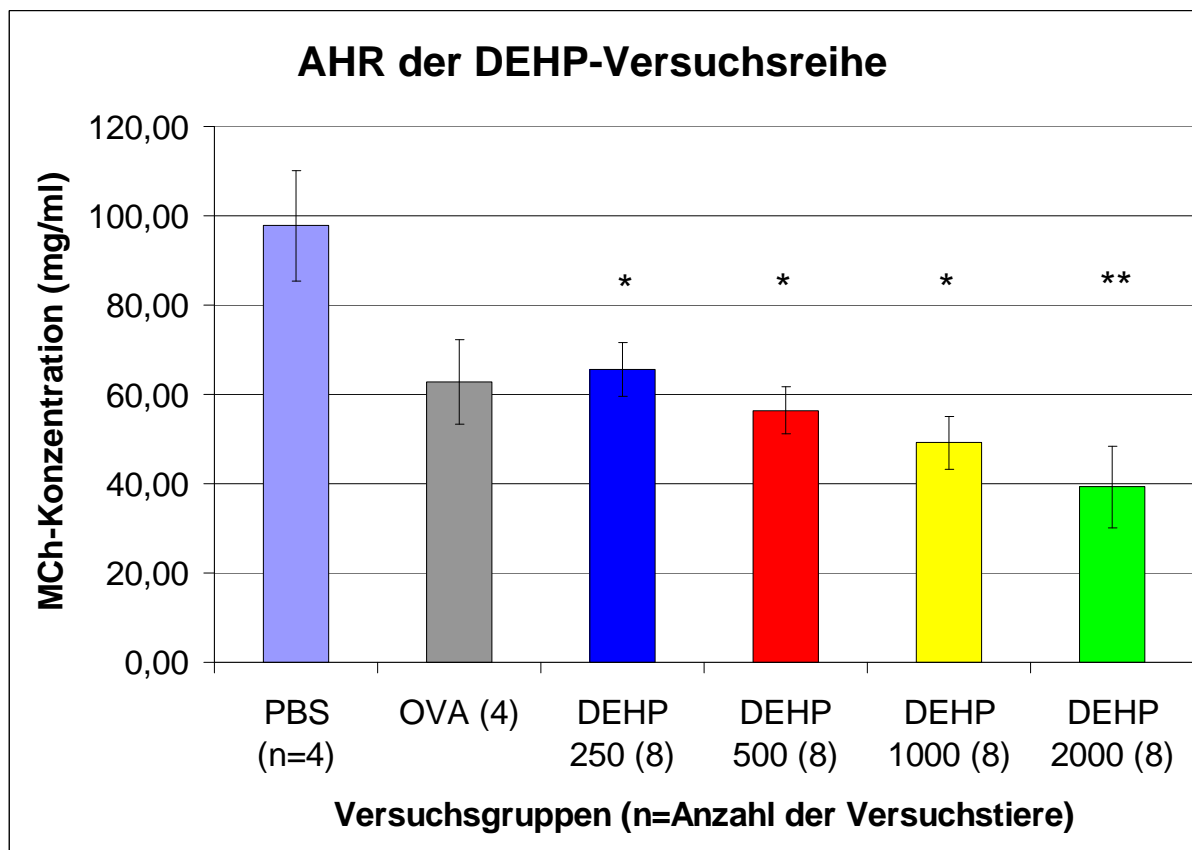


Abbildung 3: Lungenfunktion der DEHP (Diethylhexylphthalat)-, OVA (Ovalbumin)-Gruppe im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe PBS (Phosphate Buffered Saline) im Provokationstest mit MCh (Metacholin). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, ( $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\*,  $p < 0,001$  \*\*\*).

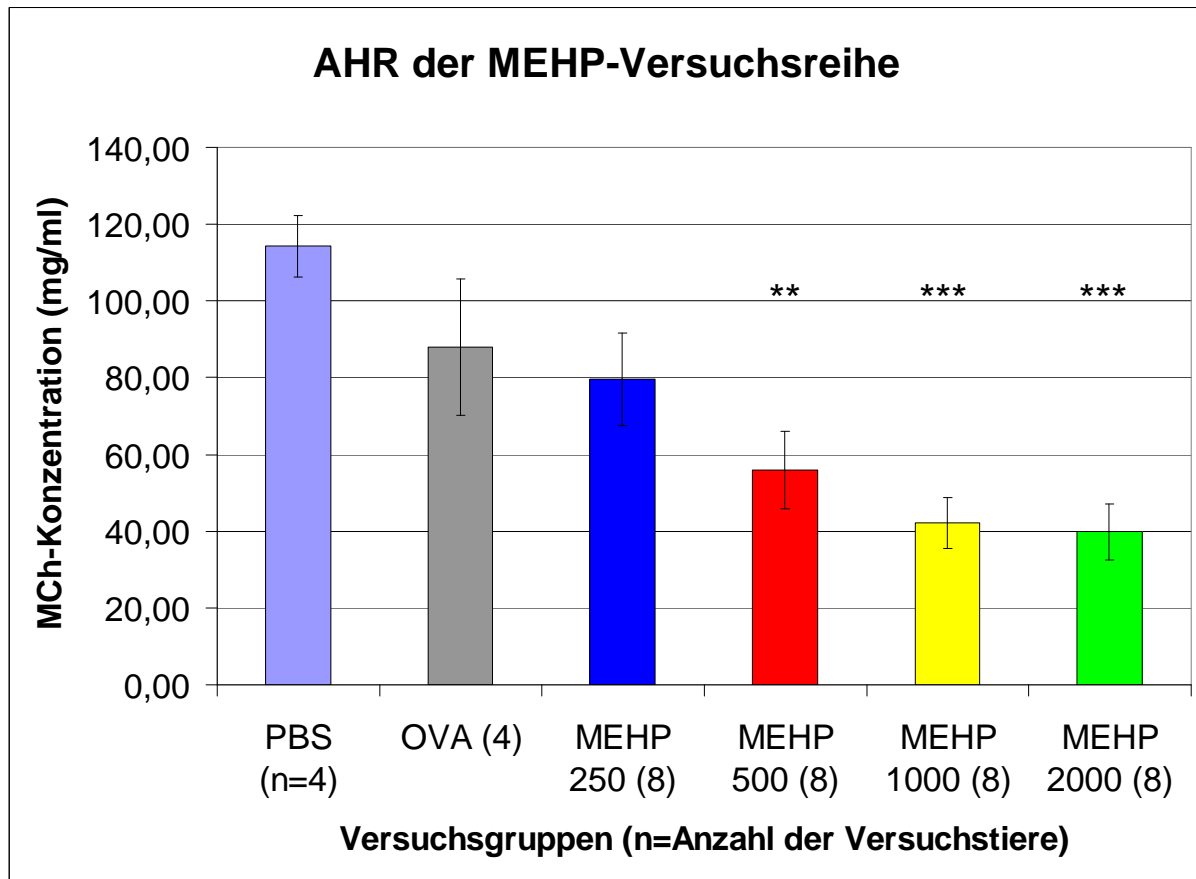


In der PBS-Kontrollgruppe kam es zu einem Absinken des EF-50 Wertes um 50% bei einer durchschnittlichen Metacholin (MCh)-Konzentration von  $98 \pm 16$  mg/ml (MW $\pm$ SEM). In der OVA-Gruppe kam es bereits bei einer MCh-Konzentration  $63 \pm 12$  mg/ml (MW $\pm$ SEM) zu einem 50%igen Absinken des EF-50 Wertes. In den Gruppen der Mäuse, die vorher dem vernebelten Weichmacher DEHP ausgesetzt waren, zeigten sich mit steigender Konzentration des Weichmachers immer geringere MCh-Konzentrationen, die zu einer 50%igen Reduktion des bei Ruheatmung herrschenden EF-50 führten. Dabei kam es in der Gruppe mit 250 mg/l DEHP bei einer MCh-Konzentration von  $66 \pm 6$  mg/ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,05$ ) zu einem Absinken des EF-50 Wertes um 50%, während dies in der 500 DEHP-Gruppe schon bei einer MCh-Konzentration von  $56 \pm 5$  mg/ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,05$ ) der Fall war. In den beiden anderen Gruppen mit 1000 bzw. 2000 mg/l DEHP zeigte sich schon bei einer MCh-Konzentration von  $49 \pm 7$  ( $p < 0,05$ ) bzw.  $39 \pm 10$  mg/ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,01$ ) ein Absinken des EF-50 Wertes um 50%.

Zusammenfassend lässt sich hierbei feststellen, dass es unter dem Einfluß von DEHP bei einer Provokation wie in diesem Fall mit Metacholin, zu einer Auslösung einer signifikanten Atemwegshyperreagibilität gekommen ist. Diese Reaktion war umso ausgeprägter, je höher vorher die Konzentration von DEHP gewesen war.

### 3.1.2 MEHP-Gruppe

Die gleiche Messung wie für die DEHP-Gruppe wurde auch für die MEHP-Gruppe durchgeführt, in der sich folgende Ergebnisse zeigten:



**Abbildung 4:** Lungenfunktion der MEHP (Diethylhexylphthalat)-, OVA (Ovalbumin)-Gruppe im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe PBS (Phosphate Buffered Saline) im Provokationstest mit MCh (Metacholin). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, ( $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\*,  $p < 0,001$  \*\*\*).

Wie in Abbildung 4 veranschaulicht zeigte sich, daß es bei den Tieren der PBS-Kontrollgruppe erst bei einer MCh-Konzentration von  $114 \pm 8$  mg/ml (MW $\pm$ SEM) zu einem Absinken des EF-50 Wertes um 50% kam, wohingegen dies in der OVA-Gruppe schon bei einer MCh-Konzentration von  $88 \pm 18$  mg/ml (MW $\pm$ SEM) der Fall war. In den mit MEHP behandelten Gruppen zeigte sich ebenfalls, dass die MCh-Konzentrationen, die ein Absinken der EF-50 Werte um 50% verursachten, mit steigender MEHP-Konzentration immer geringer wurden. In der 250 MEHP-Gruppe trat dies bei  $80 \pm 12$  mg/ml (MW $\pm$ SEM) auf, während dies in der 500 MEHP-Gruppe bereits bei  $56 \pm 10$  mg/ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,01$ ) der Fall war. Gleiches zeigte sich bei den beiden anderen Gruppen. Bei der 1000 MEHP-Gruppe trat ein Absinken des EF-50 Wertes um 50% bei einer MCh-Konzentration von  $42 \pm 7$  mg/ml (MW $\pm$ SEM)

( $p < 0,001$ ) auf, in der 2000 MEHP-Gruppe konnte dies schon bei einer MCh-Konzentration von  $40 \pm 7$  mg/ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,001$ ) beobachtet werden.

In der MEHP-Gruppe zeigte sich ein vergleichbarer Effekt wie in der DEHP-Gruppe. Es ließ sich ebenfalls feststellen, dass der Effekt der Atemwegshyperreagibilität umso größer ausfiel, je höher die Dosis an MEHP war, mit der die Mäuse vorher behandelt worden waren.

### 3.2 Untersuchungen der Zellen in der broncho-alveolären Lavage (BAL)

Um eine Aussage darüber zu treffen, ob es in der Lunge während der Behandlung mit den Weichmachern zu einer Entzündungsreaktion gekommen war, wurde eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. Zunächst wurde in einem Ausstrich unter dem Mikroskop der Zelltyp bestimmt. Hierbei zeigte sich, daß sowohl in den Präparaten der DEHP-Gruppe als auch der MEHP-Gruppe fast ausschließlich Makrophagen (>98%) vorkamen. In der Kontroll-Gruppe konnten neben überwiegend Makrophagen (95,3%) noch vereinzelt Lymphozyten (4,3%) und Eosinophile (0,4%) gefunden werden. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt, wie in Abbildung 5 zu sehen.

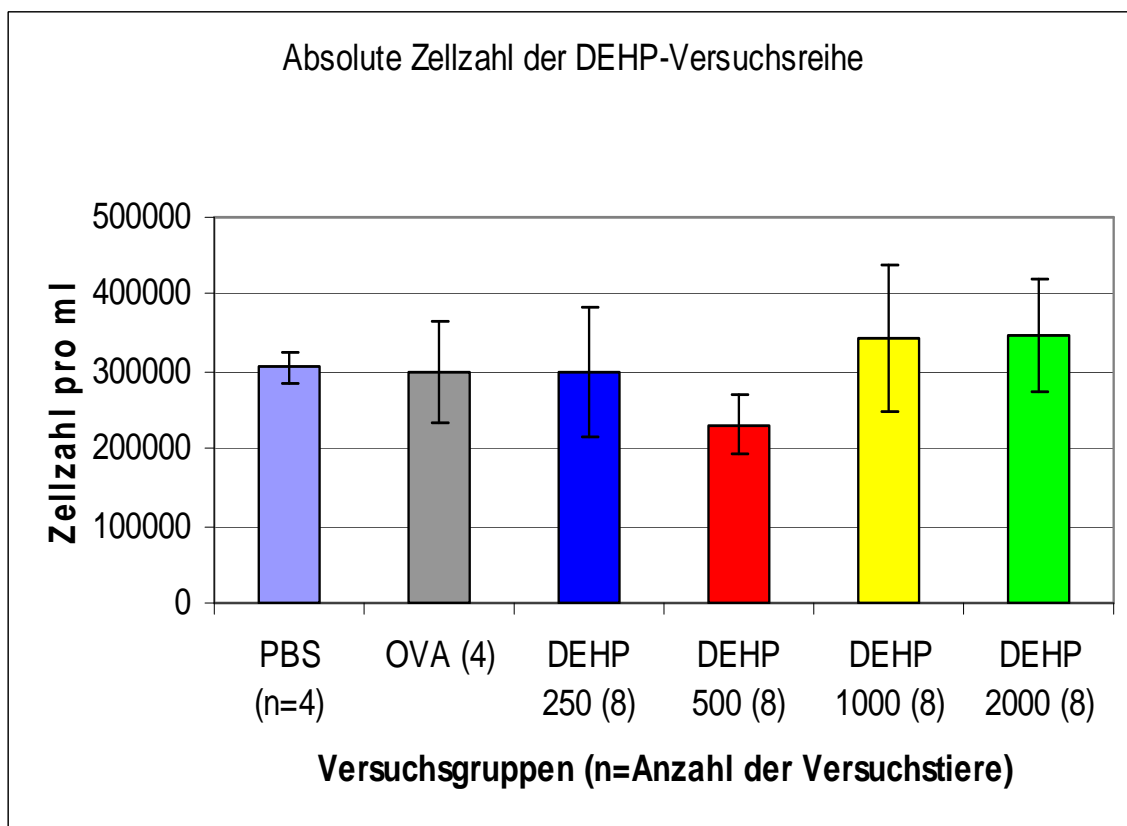
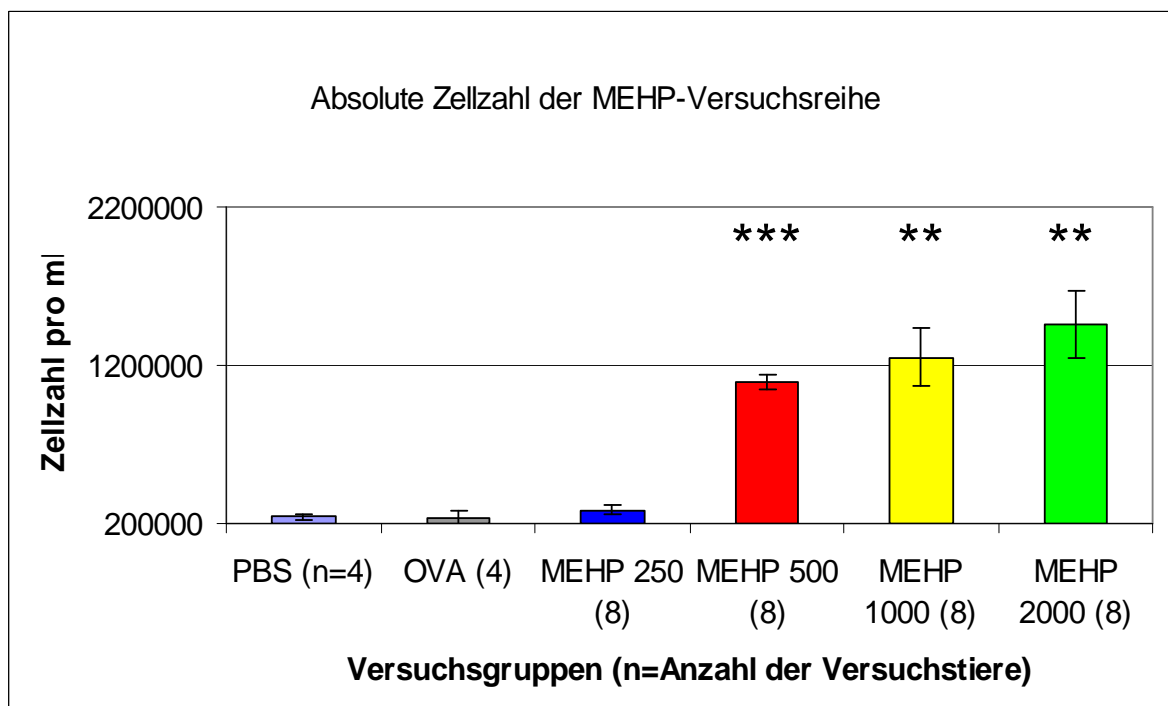


Abbildung 5: Zellzahl in der BAL der DEHP (Diethylhexylphthalat)-, OVA (Ovalbumin)-Gruppe im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe PBS (Phosphate Buffered Saline). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ).

Bei der DEHP-Versuchsgruppe zeigten sich in der PBS-Kontrollgruppe und der OVA-Referenzgruppe annähernd gleiche Zellzahlen von durchschnittlich  $305000 \pm 11873$  bzw.  $300000 \pm 33292$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM). Bei den mit DEHP behandelten Tieren konnten in der 250 Gruppe  $298750 \pm 30052$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM) gezählt werden, während es in der 500 Gruppe  $231429 \pm 15028$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM) waren. In der 1000 DEHP-Gruppe lagen  $343750 \pm 33217$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM) und in der 2000 DEHP-Gruppe  $345714 \pm 27590$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM) vor.

Bei den MEHP-Gruppen zeigten sich folgende Ergebnisse:



**Abbildung 6: Zellzahl in der BAL der MEHP (Diethylhexylphthalat)-, OVA (Ovalbumin)-Gruppe im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe PBS (Phosphate Buffered Saline). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ).**

Wie in Abbildung 6 dargestellt, zeigt sich in der MEHP-Versuchsgruppe in der PBS-Kontrollgruppe eine Zellzahl von  $243333 \pm 9913$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM) und bei der OVA-Referenzgruppe eine Zellzahl von  $232500 \pm 22909$  Zellen/ml (MW $\pm$ SEM). In der 250 MEHP-Gruppe kommt es zu einem Anstieg der Zellzahlen auf  $287500 \pm 10771$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM), bei der 500 MEHP-Gruppe zu einem Aufstieg auf  $1094286 \pm 19622$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,001$ ). Auch in der 1000 MEHP-Gruppe zeigt sich eine Erhöhung der Zellzahlen auf  $1252500 \pm 63107$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,01$ ). In der letzten Gruppe mit 2000 mg/l MEHP konnte eine Zellzahl von  $1458750 \pm 73783$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,01$ ) bestimmt werden.

Es zeigt sich hier, im Gegensatz zur DEHP-Gruppe, eine klarere Korrelation zwischen der Höhe der Phthalat-Konzentration und der Zellzahl. Die Zellzahl war umso höher, je höher die Konzentration mit MEHP war.

### 3.3 Nachweis von Immunglobulinen aus dem Mause serum

Um eine Immunreaktion der Mäuse auf die Phthalate nachzuweisen, wurde das Serum der Mäuse mittels ELISA auf die Ausschüttung von Immunglobulinen untersucht.

#### 3.3.1 Gesamt-IgE-Konzentration bei DEHP

Die Ergebnisse der Messungen der Gesamt-IgE-Konzentrationen in der DEHP-Gruppe sind in Abbildung 7 dargestellt:

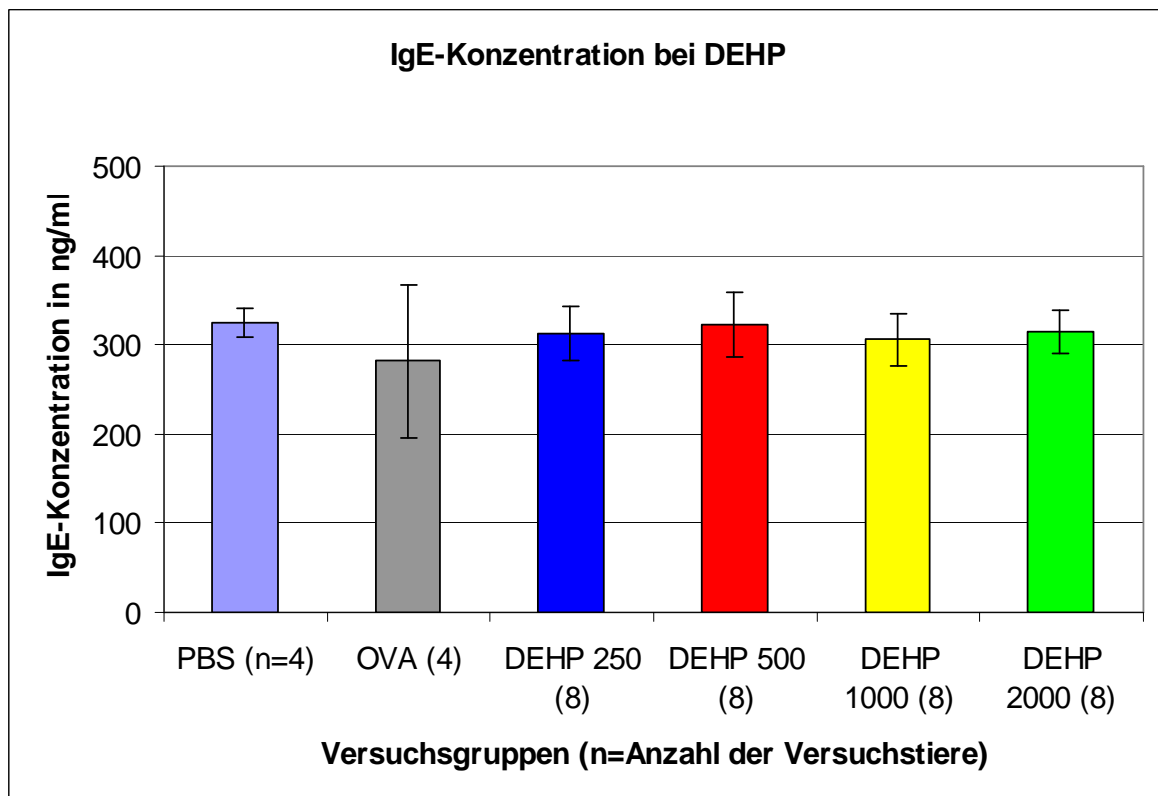


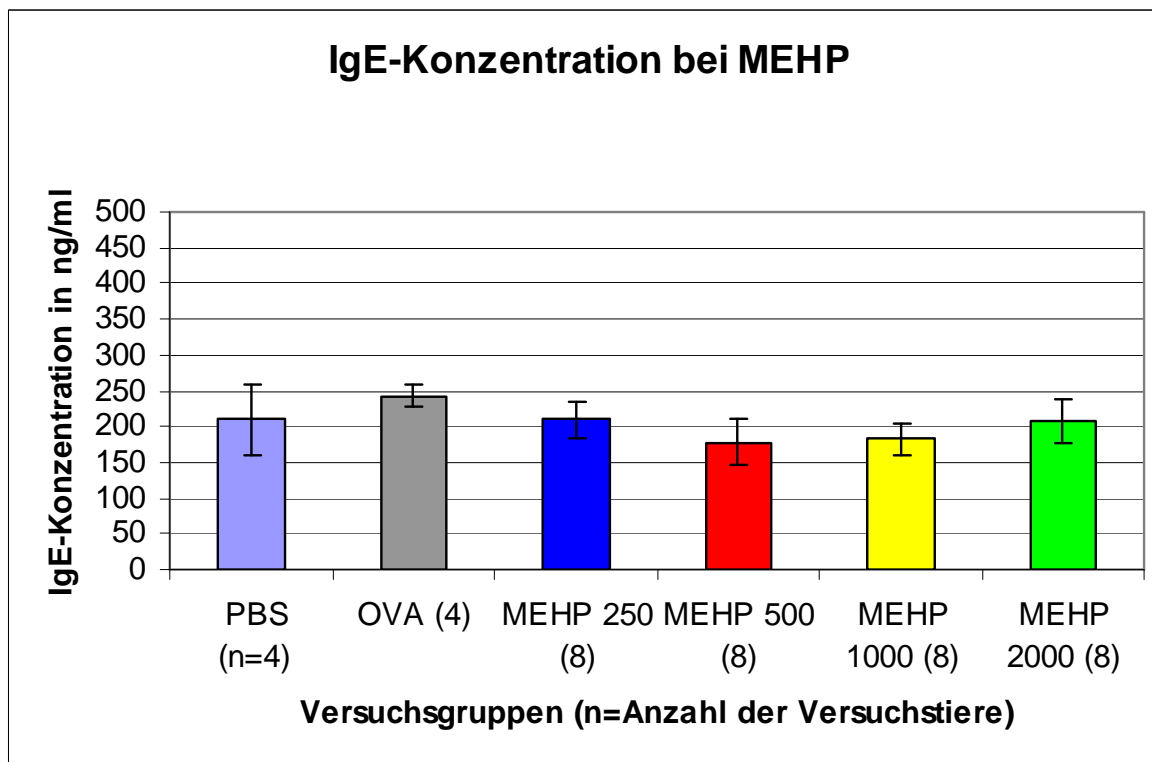
Abbildung 7: Entwicklung der Gesamt-IgE-Konzentration in der DEHP (Diethylhexylphthalat)-, OVA (Ovalbumin)-Gruppe im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe PBS (Phosphate Buffered Saline). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ).

In der Kontrollgruppe mit PBS zeigte sich eine Konzentration von  $324 \pm 16$  ng/ml (MW $\pm$ SEM), während es in der Referenzgruppe mit OVA eine Konzentration von  $282 \pm 86$  ng/ml (MW $\pm$ SEM) nachgewiesen werden konnte. Bei den DEHP-Gruppen 250, 500, 1000, 2000 zeigten sich Konzentrationen von  $313 \pm 30$ ,  $323 \pm 36$ ,  $306 \pm 30$  bzw.

315 ± 25 ng/ml (MW±SEM). Signifikante Konzentrationsunterschiede konnten nicht registriert werden.

### 3.3.2 Gesamt-IgE-Konzentration bei MEHP

Die Messungen der Gesamt-IgE-Konzentrationen in der MEHP-Gruppe zeigten die in Abbildung 8 dargestellten Ergebnisse:



**Abbildung 8:** Entwicklung der Gesamt-IgE-Konzentration in der MEHP (Diethylhexylphthalat)-, OVA (Ovalbumin)-Gruppe im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe PBS (Phosphate Buffered Saline). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ).

Es zeigte sich in der PBS-Kontrollgruppe eine Gesamt-IgE-Konzentration von 210 ± 43 ng/ml (MW±SEM). Die Messung in der OVA-Gruppe zeigte eine Konzentration von 243 ± 16 ng/ml (MW±SEM). In der 250 MEHP-Gruppe zeigte sich eine Gesamt-IgE-Konzentration von 209 ± 22 ng/ml (MW±SEM), während in der 500 MEHP-Gruppe nur eine Konzentration von 166 ± 23 ng/ml (MW±SEM) vorlag. Eine Gesamt-IgE-Konzentration von 182 ± 16 ng/ml (MW±SEM) konnte in der 1000 MEHP-Gruppe nachgewiesen werden. In der 2000 MEHP-Gruppe lag die Konzentration bei 208 ± 24 ng/ml (MW±SEM).

### 3.3.3 Konzentration der Immunglobuline IgM, IgG1 und IgA bei DEHP und MEHP

Sowohl bei DEHP als auch bei MEHP zeigten sich keine signifikanten Veränderungen bei IgM, IgG1 und IgA.

### 3.4 Nachweis von NGF aus der BAL

Um weitere mögliche Komponenten bei der Entstehung von phthalatinduziertem Asthma bronchiale herauszufinden, wurde in der BAL NGF (Nerve growth factor) bestimmt. NGF gehört zur Gruppe der Neurotrophine und spielt im Rahmen der Pathogenese von Asthma bronchiale eine wichtige Rolle.

#### 3.4.1 NGF-Konzentration bei DEHP

In der DEHP-Gruppe zeigten sich die folgenden Ergebnisse:

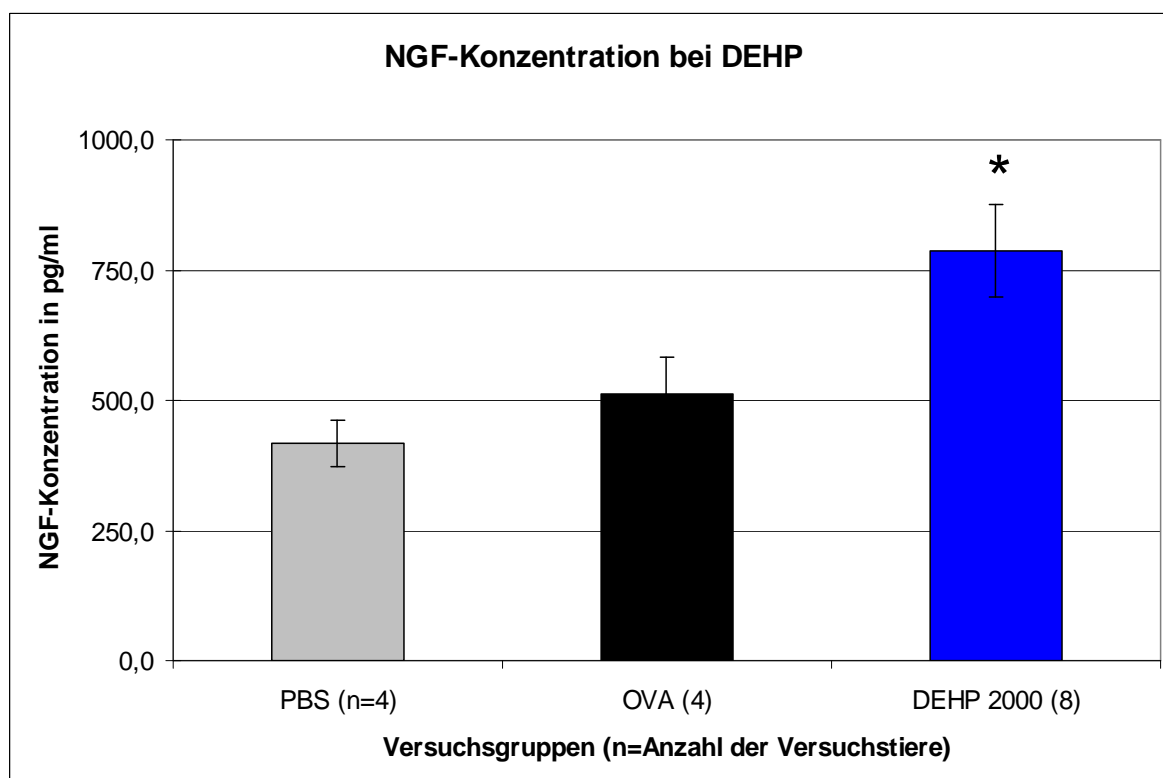


Abbildung 9: NGF-Konzentration in der DEHP (Diethylhexylphthalat)-, OVA (Ovalbumin)-Gruppe im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe PBS (Phosphate Buffered Saline). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ).

Hierbei konnte wie in Abbildung 9 dargestellt in der PBS-Kontrollgruppe eine NGF-Konzentration von  $416 \pm 45$  pg/ml (MW $\pm$ SEM) nachgewiesen werden, wohingegen in der Referenzgruppe mit OVA eine Konzentration von  $510 \pm 74$  pg/ml (MW $\pm$ SEM)

vorlag. Bei ansteigenden Konzentrationen besteht eine nicht signifikante Zunahme. Lediglich in der 2000 DEHP-Gruppe zeigte sich ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Anstieg der NGF-Konzentration  $787 \pm 90$  pg/ml (MW $\pm$ SEM).

### 3.4.2 NGF-Konzentration bei MEHP

In den Messungen innerhalb der MEHP-Gruppe auf NGF ergaben sich die in Abbildung 10 zusammengefassten Werte:

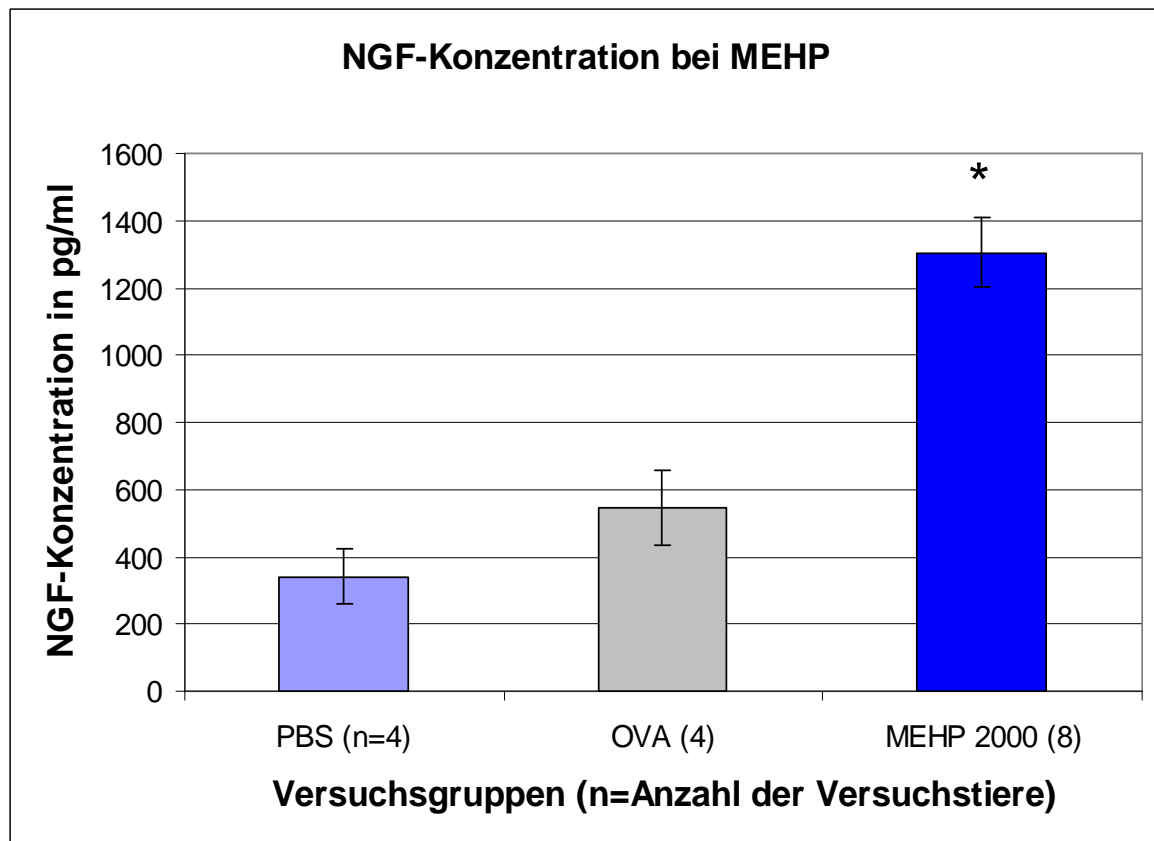


Abbildung 10: NGF-Konzentration in der MEHP (Diethylhexylphthalat)-, OVA (Ovalbumin)-Gruppe im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe PBS (Phosphate Buffered Saline). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM, ( $p < 0,05$ \*,  $p < 0,01$ \*\* ,  $p < 0,001$ \*\*\*).

Bei der ELISA-Untersuchung der BAL-Flüssigkeit zeigte sich in der PBS-Gruppe eine NGF-Konzentration von  $341 \pm 83$  pg/ml (MW $\pm$ SEM). In der OVA-Referenzgruppe zeigte sich eine Konzentration von  $574 \pm 111$  pg/ml (MW $\pm$ SEM). Bei ansteigenden Konzentrationen nicht signifikante Zunahme. Demgegenüber zeigte sich in der 2000 MEHP-Gruppe ein Anstieg auf  $1305 \pm 275$  pg/ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,05$ ).



### 3.5 Färbung der Lungenpräparate

Um zu überprüfen, ob es im Lungengewebe unter dem Einfluß der Phthalate zu strukturellen Veränderungen gekommen war, wurden verschiedene histologische und immunhistologische Untersuchungen vorgenommen.

#### 3.5.1 HE-Färbung der Lungenpräparate

Zur Untersuchung der strukturellen Veränderungen des Lungenparenchyms wurden zunächst HE (Hämatoxylin-Eosin)-Färbungen der Lungenpräparate vorgenommen.

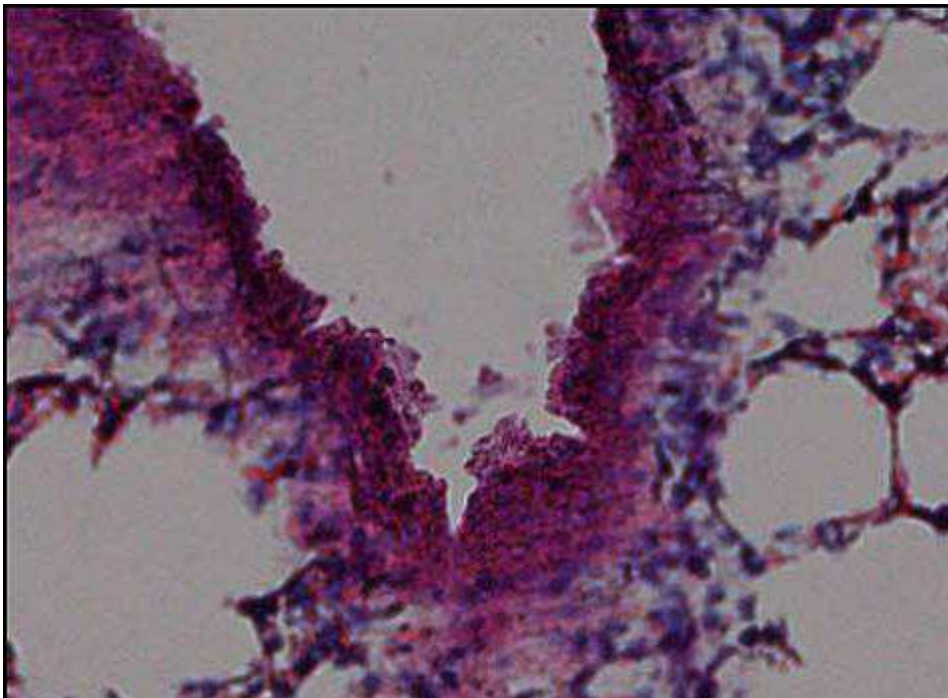
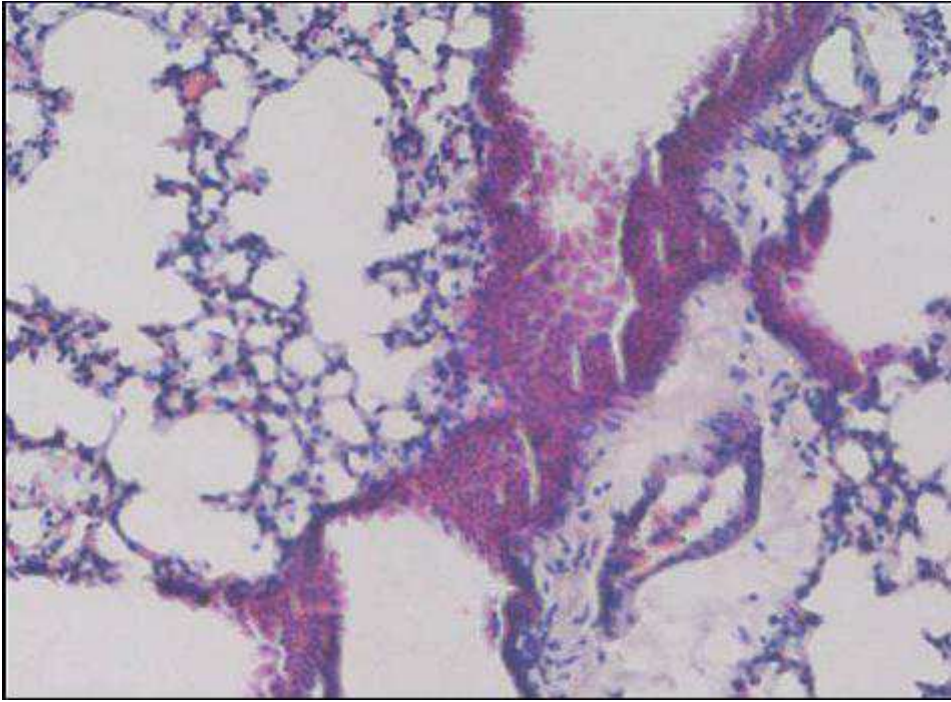
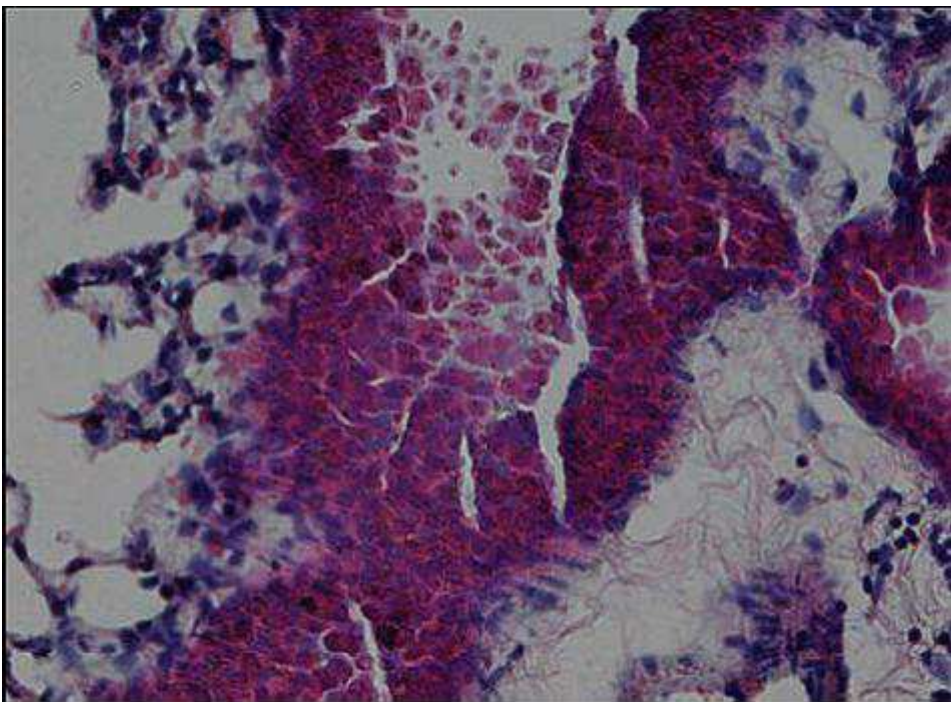


Abbildung 11: Bronchiolus terminalis, PBS-Gruppe (HE-Färbung, 20-fache Vergrößerung)

Hier zeigte sich in der PBS-Kontrollgruppe ein typisches Bild (s. Abbildung 11) eines ungeschädigten Lungengewebes. In der Aufnahme liegt ein klassischer Wandaufbau ohne sichtbare Veränderungen vor.



**Abbildung 12: Bronchiolus terminalis, 2000 DEHP-Gruppe (HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung)**



**Abbildung 13: Bronchiolus terminalis, 2000 DEHP-Gruppe (HE-Färbung, 20-fache Vergrößerung)**

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe zeigte sich in den HE-Färbungen der DEHP-Gruppe eine Verbreiterung der Basalmembran, sowie eine Hyperplasie der Becherzellen und eine erhöhte Makrophagenzahl (s. Abb 12, 13). Zudem konnte eine Zunahme der glatten Muskulatur im Bereich der Bronchiolen registriert werden.

Da es auch in den MEHP-Gruppen zu den beschriebenen Veränderungen gekommen war, erfolgt hier lediglich eine bildliche Darstellung der DEHP-Gruppe.

### 3.5.2 V-CAM Färbung der Lungenpräparate

Um Veränderungen auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen vorgenommen, die darauf abzielten, V-CAM im Bereich des Endothels nachzuweisen.



Abbildung 14: Lungenausschnitt, PBS-Gruppe (V-CAM-Färbung, 4-fache Vergrößerung)

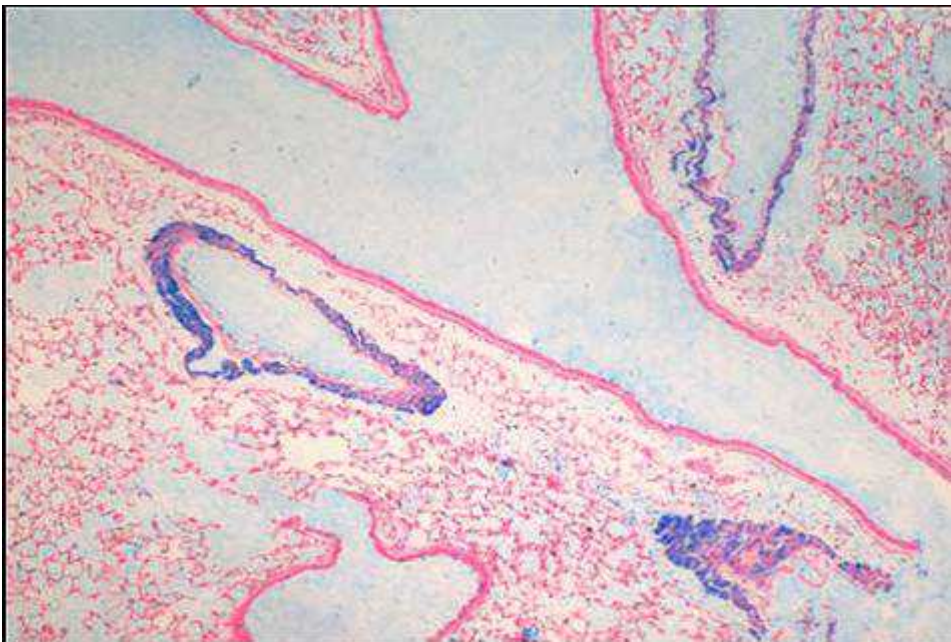
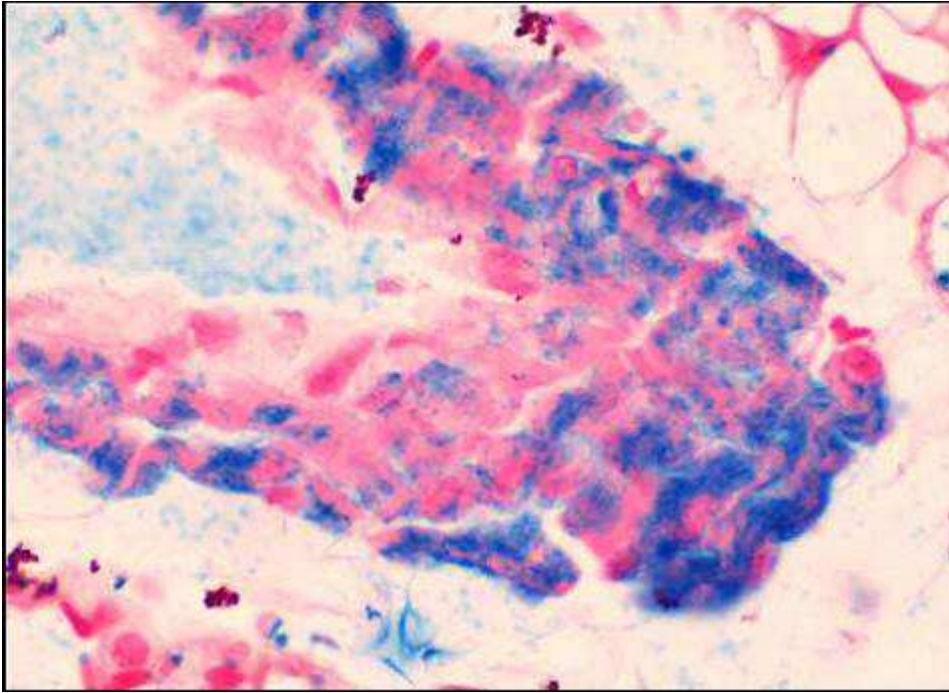


Abbildung 15: Lungenausschnitt, 2000 DEHP-Gruppe (V-CAM-Färbung, 4-fache Vergrößerung)



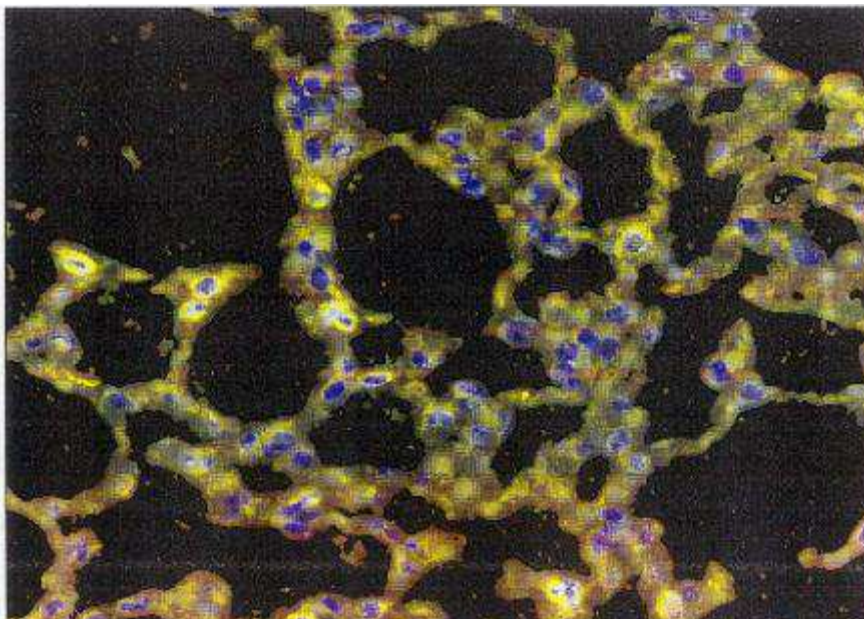
**Abbildung 16: Lungenarterie, 2000 DEHP-Gruppe (V-CAM-Färbung, 40-fache Vergrößerung)**

In den V-CAM-Färbungen der Lungenpräparate zeigte sich in den DEHP-Gruppen im Bereich des Endothels der Lungenarterie eine deutliche blaue Anfärbung (s. Abb 15, 16). Gleiche Anfärbungsmuster zeigten sich in der MEHP-Gruppe. Dahingegen blieb in den Färbungen der PBS-Kontrollgruppe eine Färbung des Endothel der Lungenarterien aus, wie in Abbildung 14 zu sehen ist. Es ist davon auszugehen, dass sich hier in der DEHP-Gruppe verstärkt V-CAM gebildet hat.

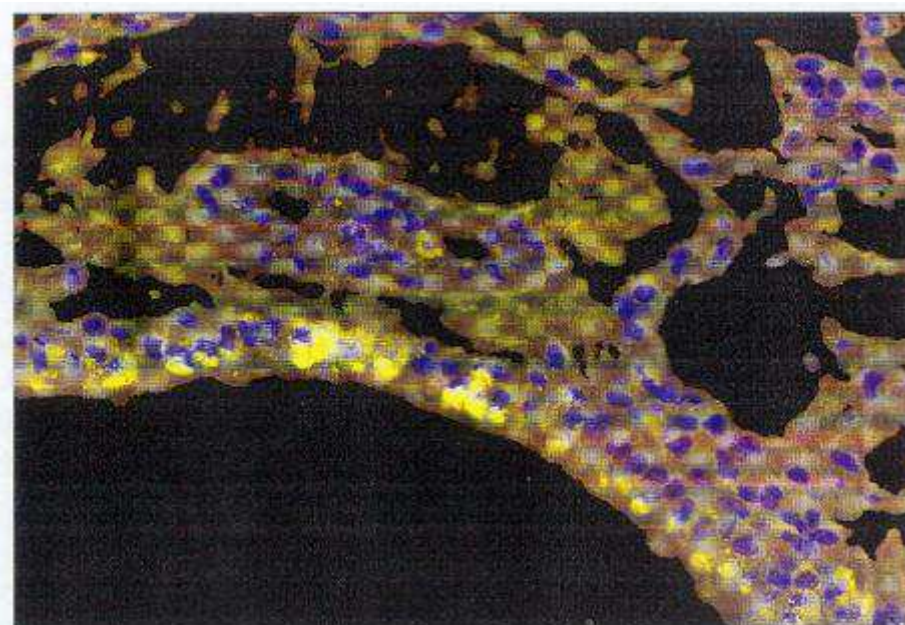
Da sich in den Aufnahmen der MEHP-Gruppe die gleichen Ergebnisse zeigten, wurde auf eine Darstellung verzichtet.

### **3.5.3 NGF-Färbung der Lungenpräparate**

Die immunhistochemische Färbung zeigte in den Lungenpräparaten sowohl bei DEHP- und MEHP-Exposition im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine deutliche Anwesenheit von NGF im Bereich der Schleimhaut des Bronchiolus sowie im interstitiellen Gewebe (s. Abb 17 und 18).



**Abbildung 17: Ausschnitt Lungengewebe, DEHP 2000 (NGF-Färbung gelb, Zellkerne blau; 40-fache Vergrößerung)**



**Abbildung 18: Bronchiolus, 2000 DEHP-Gruppe (NGF-Färbung, Zellkerne blau; 40-fache Vergrößerung)**

## 4. Diskussion

In nahezu jeder Situation des alltäglichen Lebens kommen Menschen mit Phthalaten in Berührung. So findet sich insbesondere DEHP in allen weichen PVC-haltigen Artikeln. Aber auch Kosmetika, Verpackungen, Farben und Textilien enthalten Phthalate. In Bezug auf den medizinischen Sektor spielt gerade der Einsatz von PVC eine wichtige Rolle, da Patienten aller Fachrichtungen häufig mit diesem Material in Kontakt kommen. Insbesondere über den Gebrauch von Infusionsbestecken und Beatmungsschläuchen kann es zu einer Kontamination mit Phthalaten kommen.

Zunächst wurden die entsprechenden Gruppen von BALB/c -Mäusen steigenden Aerosol-Konzentrationen von DEHP und MEHP ausgesetzt. Die Tiere wurden insgesamt zwanzigmal für jeweils zwanzig Minuten dem ihrer Gruppe zugeordneten Weichmacher ausgesetzt. Dann wurde mittels der Head-out-Pletysmographie die Atemwegsreaktion der Mäuse nach Provokation mit Metacholin gemessen. Zudem wurde den Mäusen Blut entnommen zur Analyse von Immunglobulinen. Weiterhin wurde eine bronchoalveoläre Lavage der Tiere durchgeführt, um intrapulmonale Zellen zu gewinnen. Die so gewonnenen Zellen wurden gezählt und anschließend unter dem Mikroskop identifiziert. Mit dem Serum und der BAL-Flüssigkeit wurden verschiedene ELISA-Untersuchungen durchgeführt, um Veränderungen in der Konzentration von Immunglobulinen zu messen (Gesamt-IgE, -IgG1, -IgM, -IgA und NGF). Die Lungen der Tiere wurden zunächst nach verschiedenen histologischen Methoden gefärbt und anschließend mikroskopisch analysiert. Hierbei wurden HE- und PAS-Färbungen sowie immunhistochemische Färbungen auf VCAM und NGF verwendet.

### 4.1 Einfluss der Phthalate auf die Lungenfunktion

Es sollte untersucht werden, ob durch die vorangegangene Belastung mit Phthalaten unterschiedliche Ausprägungen einer Atemwegshyperreagibilität hervorgerufen werden und ob dabei Abhängigkeiten von der Phthalat-Konzentration bestehen. In dem Versuchsaufbau wurde mit Hilfe der Head-out-Pletysmographie die Lungenfunktion der Mäuse nach Phthalatexposition gemessen. Im Rahmen der Messung wurden die Mäuse steigenden Konzentrationen von Metacholin ausgesetzt, um so eine Atemwegshyperreagibilität auszulösen. Die Lungenfunktion wurde anhand des mittleren expiratorischen Atemflusses (EF-50) beurteilt, der das Maß für die Obstruktion der Atemwege darstellt.

Es zeigte sich in der DEHP-Gruppe, dass bei den Mäusen, die vorher höheren Konzentrationen von Phthalaten ausgesetzt waren, schon bei geringeren Metacholin (MCh)-Konzentrationen ein signifikantes Absinken des EF-50 Wertes um 50% auftrat. So kam es in der 2000-DEHP-Gruppe schon bei einer Metacholin-Konzentration von  $39 \pm 10$  mg/ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,01$ ) zu einem Absinken des EF-50 Wertes um 50% wohingegen dies in der 250-Gruppe erst bei einer MCh-Konzentration von  $66 \pm 6$  mg/ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,05$ ) der Fall war. Demgegenüber zeigte sich in der PBS-Kontroll-Gruppe ein Absinken des EF-50 Wertes um 50% erst bei einer MCh-Konzentration von  $98 \pm 16$  mg/ml (MW $\pm$ SEM) und in der OVA-Gruppe bereits bei einer MCh-Konzentration von  $63 \pm 12$  mg/ml (MW $\pm$ SEM).

In der MEHP-Gruppe zeigte sich eine vergleichbare Entwicklung. Auch hier kam es in der PBS-Kontroll-Gruppe erst bei einer MCh-Konzentration von  $114 \pm 8$  mg/ml (MW $\pm$ SEM) zu einem 50%igen Absinken des EF-50 Wertes, in der OVA-Gruppe bei einem Wert von  $88 \pm 18$  mg/ml (MW $\pm$ SEM). Dahingegen war dies in der 250-Kontroll-Gruppe bei  $80 \pm 12$  mg/ml (MW $\pm$ SEM) und in der 2000-MEHP-Gruppe schon bei  $40 \pm 7$  mg/ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,001$ ) der Fall.

In beiden Gruppen, sowohl bei DEHP als auch bei MEHP, zeigte sich eine signifikante Abhängigkeit in der Ausprägung der Atemwegshyperreagibilität von der vorangegangenen Exposition mit Phthalaten. Es zeigte sich auch ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der Phthalat-Konzentration und der Atemwegsreaktion. Je größer die Konzentration war, desto schneller kam es auch zu einem 50%igen Absinken des EF-50 Wertes und desto ausgeprägter waren auch die Atemwegsreaktionen.

## 4.2 Untersuchung der BAL

Die BAL wurde zum einen auf darin vorhandene Zellen untersucht. Wie schon beschrieben wurden hier fast ausschließlich Makrophagen gefunden. Des Weiteren wurde die Konzentration von Entzündungsmediatoren in der BAL gemessen.

Hierbei wurde das Augenmerk vornehmlich auf die Produktion von NGF gelegt. In einer ELISA-Untersuchung der BAL wurde die Menge von NGF sowohl bei DEHP als auch bei MEHP gemessen. Hierbei zeigte sich in der 2000 DEHP-Gruppe eine signifikant höhere NGF-Konzentration von  $787 \pm 90$  pg/ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,05$ ) als in

der PBS-Gruppe,  $416 \pm 45$  pg/ml (MW $\pm$ SEM), sowie der OVA-Referenzgruppe,  $510 \pm 74$  pg/ml (MW $\pm$ SEM).

Bei MEHP konnte ebenfalls eine signifikante Steigerung der NGF-Produktion bei den höheren Konzentrationen gegenüber den Kontrollgruppen gemessen werden. Hier lag in der 2000 MEHP-Gruppe eine ebenfalls signifikant höhere NGF-Konzentration  $1305 \pm 275$  pg/ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,05$ ) vor, als in der OVA-Gruppe von  $574 \pm 111$  pg/ml (MW $\pm$ SEM) sowie der PBS-Gruppe  $341 \pm 83$  pg/ml (MW $\pm$ SEM).

In der Untersuchung der BAL auf NGF zeigte sich sowohl bei DEHP als auch bei MEHP deutlich, dass es unter dem Einfluß der Phthalate zu einer signifikant vermehrten Produktion des Nerve Growth Factor gekommen war.

### 4.3 Untersuchung des Serums

Das Serum der Mäuse wurde auf das Vorhandensein von Immunglobulinen untersucht. Speziell auf das Vorhandensein von Gesamt-IgE wurde das Serum geprüft, da dies eine wichtige Rolle im Rahmen der Pathogenese des allergischen Asthmas spielt. Durch einen ersten Kontakt mit einem bestimmten Allergen kommt es zur Ausbildung von spezifischen Gesamt-IgE-Antikörpern durch Plasmazellen, die gegen dieses spezielle Allergen gerichtet sind. Bei einem Zweitkontakt mit diesem Allergen kommt es über eine Bindung an Gesamt-IgE und durch dessen Kopplung an Mastzellen zu einer Ausschüttung von Histamin. Dieses bewirkt unter anderem eine Kontraktion der glatten Muskulatur in den Bronchien und führt so zu einem für das Asthma bronchiale typischen Bronchospasmus. Diese durch Gesamt-IgE vermittelte Reaktion wird als allergische Reaktion vom Soforttyp bezeichnet.

In den Elisa-Untersuchungen sowohl der DEHP- als auch der MEHP-Gruppe ließ sich jedoch keine relevante Konzentrationsänderung gegenüber den PBS- und OVA-Gruppen feststellen. Zum Teil lagen die Konzentrationen sogar etwas unterhalb denen der PBS- und OVA-Gruppen. Nur bei den hohen Konzentrationen, 2000 DEHP bzw. MEHP, lagen annähernd gleiche Gesamt-IgE-Konzentrationen wie in den PBS- und OVA-Gruppen vor.

Anhand der hierbei erhobenen Daten, kann man demnach keinen direkten Einfluß der Phthalate auf die Produktion von Gesamt-IgE erkennen. Sowohl in der DEHP- als auch in der MEHP-Gruppe kommt es zu keiner signifikanten Steigerung der Produktion von Gesamt-IgE.



Auch bei den weiteren Immunglobulinen, IgM, IgG1 und IgA, zeigten sich sowohl bei DEHP als auch bei MEHP, keine signifikanten Veränderungen.

### 4.3 Strukturelle Veränderungen der Lunge

Um die durch die Phthalate verursachten strukturellen Veränderungen in der Lunge zu untersuchen, wurden die Organe mit unterschiedlichen Methoden histologisch aufgearbeitet. Zudem wurden die in der BAL gewonnenen Zellen gezählt und identifiziert.

Die Untersuchung der BAL ergab, dass sowohl bei DEHP als auch bei MEHP fast ausschließlich Makrophagen zu finden waren. Im Gegensatz zu den PBS- und OVA-Gruppen, in denen sich ein eher ausgeglichenes Zellmuster zeigte mit einer leichten Überzahl der Makrophagen. In der DEHP-Gruppe zeigte sich nur in den Gruppen mit einer hohen DEHP-Konzentration eine höhere Zellzahl als in den PBS- und OVA-Gruppen. Hier lag die Zellzahl bei  $343750 \pm 33217$  bzw.  $345714 \pm 27590$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM) in der 1000 bzw. 2000 DEHP-Gruppe, während in der PBS- bzw OVA-Gruppe,  $305000 \pm 11873$  bzw.  $300000 \pm 33292$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM) gemessen wurden. In der 250 und 500 DEHP-Gruppe lag eine Zahl von  $298750 \pm 30052$  bzw.  $231429 \pm 15028$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM) vor. Eine Abhängigkeit der Phthalatkonzentration zur Anzahl der Zellen war hier nicht so ausgeprägt wie in der MEHP-Gruppe. In dieser Gruppe zeigte sich deutlicher, dass es mit einem Anstieg der MEHP-Konzentration, auch zu einem signifikanten Anstieg der Makrophagenanzahl in der BAL kam. In der 250 MEHP-Gruppe kam es zu einer Steigerung der Zellzahl,  $287500 \pm 10771$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM), jedoch war dies erst ab der 500 Gruppe signifikant ausgeprägter,  $1094286 \pm 19622$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,001$ ). Sowohl in der 1000 MEHP-Gruppe,  $1252500 \pm 63107$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,01$ ), als auch in der 2000 MEHP-Gruppe,  $1458750 \pm 73783$  Zellen /ml (MW $\pm$ SEM) ( $p < 0,01$ ), lagen gleichfalls signifikant höhere Zellzahl vor als in der PBS-, bzw. OVA-Gruppe,  $243333 \pm 9913$ , bzw.  $232500 \pm 22909$  Zellen/ml (MW $\pm$ SEM).

In den histologischen Untersuchungen der Lunge wurden zunächst konventionelle HE-Färbungen vorgenommen. Bei den hohen Konzentrationen sowohl von DEHP als auch von MEHP fiel besonders auf, dass die Makrophagenzahl im Lungengewebe gegenüber den Kontrollgruppen deutlich erhöht war. Dies bestätigte damit auch die Ergebnisse der BAL-Untersuchungen. Die Verbreiterung der Basalmembran, sowie eine Hyperplasie der Becherzellen und eine Zunahme der glatten Muskulatur im Bereich der Bronchiolen waren nur gering ausgeprägt. In beiden Gruppen konnten ähnliche Veränderungen

festgestellt werden. Bei den höheren Konzentrationen fiel insbesondere eine erhöhte Makrophagenzahl auf.

Um zu untersuchen, welche Effekte auf immunhistochemischer Ebene auftraten, wurden weitere Färbungen der Lungenschnitte vorgenommen. Zum einen wurde untersucht, ob sich unter dem Einfluß der Phthalate V-CAM (vascular cell adhesion molecule) gebildet hatte, und zum anderen wurden die Lungenschnitte auf das Vorhandensein von NGF überprüft.

Es zeigte sich in den Färbungen auf V-CAM, dass es im Endothel, der die Bronchiolen begleitenden Gefäße, zur Expression dieses Adhäsionsmoleküls gekommen war. Hier zeigte sich besonders bei den hohen Konzentrationen, sowohl bei DEHP als auch bei MEHP, ein deutlicher Unterschied in der Ausprägung der V-CAM-Expression gegenüber der PBS-Kontrollgruppe. Es lässt sich also hier ein Zusammenhang zwischen dem Einfluß der Phthalate und der Expression des V-CAM-Moleküls vermuten. Smith [40] konnte zeigen, dass es durch V-CAM zu einer Einwanderung von Entzündungszellen aus den Blutgefäßen ins Interstitium kommt.

In den Lungenpräparaten, die auf das Vorhandensein von NGF untersucht worden waren, zeigte sich im Interstitium und in der Schleimhaut des Bronchiulus die für NGF-typische deutlich gelbliche Anfärbung des Gewebes. Insbesondere im Interstitium, in den Bereichen in denen auch vermehrt Makrophagen vorkommen, war es zu einer besonders ausgeprägten Bildung von NGF gekommen.

Bonini et al [6] konnten nachweisen, dass der Nerve growth factor (NGF) eine besondere Bedeutung bei der Entwicklung von allergischen Erkrankungen hat, insbesondere bei Asthma bronchiale. Es konnte nachgewiesen werden, dass die NGF-Konzentration im Serum mit der Ausprägung der allergischen Erkrankung korrelierte. So konnten sie in einem Tiermodell nachweisen, dass es unter dem Einfluß von NGF zu einer Überempfindlichkeit gegenüber Histamin kam, wohingegen durch Anti-NGF-Gabe eine Abnahme der Atemwegsüberempfindlichkeit zu verzeichnen war.

Auch Quarcoo et al [29] wiesen in einem Mausmodell den Einfluß von NGF bei der Entwicklung von Asthma bronchiale nach. Sie verglichen NGF-tg-Mäuse mit Wild-Typ-Mäusen. Die NGF-tg-Mäuse überexprimierten NGF in den Clara Zellen der Atemwege. Es wurde an ihnen untersucht, ob es durch die höhere NGF-Konzentration, zu einem Anstieg von Gesamt-IgE-vermittelten Atemwegsentzündungen kam. Die Mäuse wurden zum einen intraperitoneal sowie über die Atemwege mit OVA

sensibilisiert. Hier zeigten sich nach OVA-Exposition zum einen erhöhte OVA-spezifische Gesamt-IgE-Antikörper sowie eine vermehrte Anzahl an Eosinophilen in den Atemwegen. In der vorliegenden Arbeit konnte ein Anstieg der Gesamt-IgE-Konzentration nicht nachgewiesen werden. Zudem wurden in der BAL sowohl in der DEHP- als auch in der MEHP-Gruppe fast ausschließlich Makrophagen gefunden. Der bei Quarcoo et al nachgewiesene Gesamt-IgE-Anstieg kann evtl. mit der von Ihnen durchgeführten zusätzlichen intraperitonealen Sensibilisierung in Zusammenhang stehen.

Anhand der beschriebenen Ergebnisse lässt sich vermuten, dass es, bedingt durch den Einfluß der Phthalate, zunächst zu einer Expression von V-CAM auf den Endothelzellen kam. Dieses führte als Adhäsionsmolekül zu einer Einwanderung von verschiedenen Zellen ins Interstitium, die an der Entstehung einer Entzündungsreaktion beteiligt sind. In dieser Phase spielt nun das Neurotrophin NGF eine entscheidende Rolle. Es wird u.a. von Makrophagen, Th2-Helferzellen und Eosinophilen gebildet [7]. In den BAL-Untersuchungen und den Lungenfärbungen konnte, wie oben erwähnt, eine erhöhte Makrophagenzahl nachgewiesen werden, die für die signifikant erhöhten NGF-Konzentrationen verantwortlich sind. Als Folge der erhöhten NGF-Konzentration lässt sich vermuten, dass es hierdurch bedingt zu einer allergischen Entzündung, bronchialen Hyperreaktivität und Atemwegsobstruktion kam.

## 5. Literaturverzeichnis

1. **Abbas AK, Murphy KM, Sher A.,** Functional diversity of helper T-lymphocytes. *Nature*, 383(6603):787-93, 1996 Oct 31
2. **Agarwal DK, Lawrence WH, Autian J.,** Antifertility and mutagenic effects in mice from parenteral administration of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP). *J Toxicol Environ Health*, 16: 71-84, 1985
3. **Agarwal DK, Lawrence WH, Turner JE, Autian J.,** Effects of parenteral di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on gonadal biochemistry, pathology, and reproductive performance of mice. *J Toxicol Environ Health*, 26: 39-59, 1989
4. **Barry YA, Labow RS, Keon WJ, Tocchi M, Rock G.,** Perioperative exposure to plasticizers in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 97(6):900-5, 1989 June
5. **Berman E, Laskey JW.,** Altered steroidogenesis in whole-ovary and adrenal culture in cycling rats. *Reprod Toxicol*, 7: 349-358, 1993
6. **Bonini S, Lambiase A, Lapucci G, Properzi F, Bresciani M, Bracci Laudiero ML, Mancini MJ, Procoli A, Micera A, Sacerdoti G, Bonini S, Levi-Schaffer F, Rasi G, Aloe L.,** Nerve growth factor and asthma. *Allergy*, 57 Suppl 72:13-5, 2002. Review. Erratum in: *Allergy*, 58(4):366, 2003 Apr
7. **Braun A, Appel E, Baruch R, Herz U, Botchkarev V, Paus R, Brodie C, Renz H.,** Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur J Immunol*, 28(10):3240-51, 1998 Oct
8. **Chu I, Villeneuve DC, Secours V, Franklin C, Rock G, Viau A.,** Metabolism and tissue distribution of mono-2-ethylhexyl phthalate in the rat. *Drug Metab Dispos*, 6: 146-149, 1978
9. **Crocker JF, Safe SH, Acott P.,** Effects of chronic phthalate exposure on the kidney. *J Toxicol Environ Health*, 23: 433-444, 1988
10. **David RM, Moore MR, Cifone MA, Finney DC, Guest D.,** Chronic peroxisome proliferation and hepatomegaly associated with the hepatocellular tumorigenesis of di(2-ethylhexyl)phthalate and the effects of recovery. *Toxicol Sci*, 50(2):195-205, 1999 Aug
11. **Davis BJ, Weaver R, Gaines LJ, Heindel JJ.,** Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of FSH-cAMP stimulation in rat granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 128: 224-228, 1994
12. **Dirven HA, van den Broek PH, Jongeneelen FJ.,** Effect of di(2-ethylhexyl)phthalate on enzyme activity levels in liver and serum of rats. *Toxicology*, 65: 199-207, 1990
13. **Filley WV, Holley KE, Kephart GM, Gleich GJ.,** Identification by immunofluorescence of eosinophil granule major basic protein in lung tissues of patients with bronchial asthma. *Lancet*, 2(8288):11-6, 1982 Jul
14. **Gergen PJ, Mullally DI, Evans R 3rd.,** National survey of prevalence of asthma among children in the United States, 1976 to 1980. *Pediatrics*, 81(1):1-7, 1988 Jan
15. **Gourlay T, Samartzis I, Stefanou D, Taylor K.,** Inflammatory response of rat and human neutrophils exposed to di-(2-ethyl-hexyl)-phthalate-plasticized polyvinyl chloride. *Artif Organs*, 27(3):256-60, 2003 Mar

- 16. Hansen JS, Larsen ST, Poulsen LK, Nielsen GD.**, Adjuvant effects of inhaled mono-2-ethylhexyl phthalate in BALB/cJ mice. *Toxicology*, 232(1-2):79-88, 2007 Mar
- 17. Holgate ST. Related Articles.**, The epidemic of allergy and asthma. *Nature*, 402(6760 Suppl):B2-4, 1999 Nov 25
- 18. Jacobson MS, Kevy SV.**, Grand RJ. Effects of a plasticizer leached from polyvinyl chloride on the subhuman primate: a consequence of chronic transfusion therapy. *J Lab Clin Med*, 89: 1066-1079, 1977
- 19. Kevy SV, Jacobson MS.**, Hepatic effects of a phthalate ester plasticizer leached from poly(vinyl chloride) blood bags following transfusion. *Environ Health Perspect*, 45: 57-64, 1982
- 20. Klimisch HJ, Gamer AO, Hellwig J, Kaufmann W, Jackh R.**, Di-(2-ethylhexyl) phthalate: a short-term repeated inhalation toxicity study including fertility assessment. *Food Chem Toxicol*, 30(11):915-9, 1992 Nov
- 21. Larsen ST, Hansen JS, Thygesen P, Begtrup M, Poulsen OM, Nielsen GD.**, Adjuvant and immuno-suppressive effect of six monophthalates in a subcutaneous injection model with BALB/c mice. *Toxicology*, 169(1):37-51, 2001 Dec 1
- 22. Loff S, Subotic U, Reinicke F, Wischmann H, Brade J.**, Extraction of Di-ethylhexyl-phthalate from Perfusion Lines of Various Material, Length and Brand by Lipid Emulsions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 39(4):341-345, 2004 Oct
- 23. Mosmann TR, Coffman RL.**, TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.*, 7:145-73, 1989
- 24. Oie L, Hersoug LG, Madsen JO.**, Residential exposure to plasticizers and its possible role in the pathogenesis of asthma. *Environ Health Perspect.*, 105(9):972-8, 1997 Sep
- 25. Oishi S.**, Effects of co-administration of di(2-ethylhexyl)phthalate and testosterone on several parameters in the testis and pharmacokinetics of its mono-de-esterified metabolite. *Arch Toxicol*, 63: 289-295, 1989
- 26. Parkhie MR, Webb M, Norcross MA.**, Dimethoxyethyl phthalate: embryopathy, teratogenicity, fetal metabolism and the role of zinc in the rat. *Environ Health Perspect*, 45: 89-97, 1982
- 27. Pennanen S, Manninen A.**, Distribution of 2-ethylhexanoic acid in mice and rats after an intraperitoneal injection. *Pharmacol Toxicol*, 68: 57-59, 1991
- 28. Peterson CG, Skoog V, Venge P.**, Human eosinophil cationic proteins (ECP and EPX) and their suppressive effects on lymphocyte proliferation. *Immunobiology.*, 171(1-2):1-13, 1986 Mar
- 29. Quarcoo D, Schulte-Herbruggen O, Lommatzsch M, Schierhorn K, Hoyle GW, Renz H, Braun A.**, Nerve growth factor induces increased airway inflammation via a neuropeptide-dependent mechanism in a transgenic animal model of allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy.*, 34(7):1146-51, 2004 Jul
- 30. S Reuter, A Heinz, M Sieren, S Züfle, R Wiewrodt, M Stassen, R Buhl, C Taube.**, *Pneumologie*, 61 DOI: 10.1055/s-2007-967228, 2007
- 31. Ritter EJ, Scott WJ, Jr., Randall JL, Ritter JM.**, Teratogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate, 2-ethylhexanol, 2-ethylhexanoic acid, and valproic acid, and potentiation by caffeine. *Teratology*, 35: 41-46, 1987

- 32. Rock G, Labow RS, Franklin C, Burnett R, Tocchi M.**, Hypotension and cardiac arrest in rats after infusion of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), a contaminant of stored blood. *N Engl J Med.*, 316(19):1218-9, 1987 May 7
- 33. Roth B, Herkenrath P, Lehmann HJ, et al.** DEHP as plasticizer in PVC respiratory tubing systems: indications of hazardous effects on pulmonary function in mechanically ventilated, preterm infants. *European Journal of Pediatrics*, 147: 41–46, 1988
- 34. Seth PK, Srivastava SP, Agarwal DK, Chandra SV.**, Effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on rat gonads. *Environ Res*, 12: 131-138, 1976
- 35. Seth PK.**, Hepatic effects of phthalate esters. *Environ Health Perspect*, 45: 27-34, 1982
- 36. Sharpe RM.**, Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicol Lett*, 120: 221-232, 2001
- 37. Singh AR, Lawrence WH, Autian J.**, Maternal-fetal transfer of <sup>14</sup>C-di-2-ethylhexyl phthalate and <sup>14</sup>C-diethyl phthalate in rats. *J Pharm Sci*, 64: 1347-1350, 1975
- 38. Sjoberg P, Bondesson U, Kjellen L, Lindquist NG, Montin G, Ploen L.**, Kinetics of di-(2-ethylhexyl) phthalate in immature and mature rats and effect on testis. *Acta Pharmacol Toxicol Copenh*, 56: 30-37, 1985
- 39. Sjoberg P, Lindqvist NG, Ploen L.**, Age-dependent response of the rat testes to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect*, 65: 237-242, 1986
- 40. Smith CW.**, Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol.*, 71(1):76-87. Review, 1993 Jan
- 41. Song XF, Wei GH, Deng YJ, Chen X, Liu X, Zhang DY.**, Di(2-ethylhexyl) phthalate affects the testes and leydig cells of neonatal KM mice. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 12(9):775-9, 2006 Sep
- 42. Tickner JA, Schettler T, Guidotti T, McCally M, Rossi M.**, Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: a critical review. *Am J Ind Med.*, 39(1):100-11, 2001 Jan
- 43. Tickner, J. A.**, The Use of Di-2-Ethylhexyl Phthalate in PVC Medical Devices: Exposure, Toxicity, und Alternatives. *Lowell Center for Sustainable Production. University of Massachusetts, Lowell, USA, 1999*
- 44. Tomita I, Nakamura Y, Yagi Y, Tutikawa K.**, Fetotoxic effects of mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) in mice. *Environ Health Perspect*, 65: 249-254, 1986
- 45. Treinen KA, Dodson WC, Heindel JJ.**, Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation and progesterone production by mono(2-ethylhexyl) phthalate in rat granulosa cell cultures. *Toxicol Appl Pharmacol*, 106: 334-340, 1990
- 46. Treinen KA, Heindel JJ.**, Evidence that MEHP inhibits rat granulosa cell function by a protein kinase C-independent mechanism. *Reprod Toxicol*, 6: 143-148, 1992
- 47. Wahl HG. Habilitationsschrift**, Nachweis und medizinische Relevanz von 4-Heptanon als Endmetabolit des Weichmachers Di(2-ethylhexyl), *Phthala*, 2004
- 48. Wallin RF, Klamer B, Nicora RW, Thompson CR.**, Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) metabolism in animals and post-transfusion tissue levels in man. *Bull Parenter Drug Assoc.*, 28(6):278-87, 1974 Nov-Dec

**49. Ward JM, Peters JM, Perella CM, Gonzalez FJ.,** Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice. *Toxicol Pathol*, 26: 240-246, 1998

**50. Wilkinson CF, Lamb JC.,** The potential health effects of phthalate esters in children's toys: a review and risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*, 30: 140-155, 1999

**51. Williams DT, Blanchfield BJ.,** Retention, excretion and metabolism of di-(2-ethylhexyl) phthalate administered orally to the rat. *Bull Environ Contam Toxicol*, 11: 371-378, 1974

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abbauprozess von DEHP	S. 5
Abbildung 2: Aufbau der Messkammer zur Bestimmung der Atemwegsreaktion. Wahl HG. Habilitationsschrift	S. 19
Abbildung 3: Lungenfunktion der DEHP-Gruppe	S. 28
Abbildung 4: Lungenfunktion der MEHP-Gruppe	S. 30
Abbildung 5: Zellzahl bei DEHP	S. 31
Abbildung 6: Zellzahl bei MEHP	S. 32
Abbildung 7: Entwicklung der Gesamt-IgE-Konzentration bei DEHP	S. 33
Abbildung 8: Entwicklung der Gesamt-IgE-Konzentration bei MEHP	S. 34
Abbildung 9: Entwicklung der NFG-Konzentration bei DEHP	S. 35
Abbildung 10: Entwicklung NFG-Konzentration bei MEHP	S. 36
Abbildung 11: Bronchiolus terminalis, PBS-Gruppe (HE-Färbung, 20-fache Vergrößerung)	S. 37
Abbildung 12: Bronchiolus terminalis, 2000 DEHP-Gruppe (HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung)	S. 38
Abbildung 13: Bronchiolus terminalis, 2000 DEHP-Gruppe (HE-Färbung, 20-fache Vergrößerung)	S. 38
Abbildung 14: Lungenausschnitt, PBS-Gruppe (V-CAM-Färbung, 4-fache Vergrößerung)	S. 39
Abbildung 15: Lungenausschnitt, 2000 DEHP-Gruppe ( V-CAM-Färbung, 4-fache Vergrößerung)	S. 39
Abbildung 16: Lungenarterie, 2000 DEHP-Gruppe (V-CAM-Färbung, 40-fache Vergrößerung)	S. 40
Abbildung 17: Ausschnitt Lungengewebe, DEHP 2000 (NGF-Färbung, 40-fache Vergrößerung)	S. 41
Abbildung 18: Bronchiolus, 2000 DEHP-Gruppe (NGF-Färbung, 40-fache Vergrößerung)	S. 41



## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendung wichtiger Phthalatsäurediester ( Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial-, und Umweltmedizin der Universität Erlangen, Matthias Wittasek, wissenschaftlicher Mitarbeiter) S. 3

Tabelle 2: Challenge Zeitplan S. 18

## 8. Abkürzungsverzeichnis

AHR	= Atemwegshyperreagibilität
AK	= Antikörper
AMV	= Atemminutenvolumen
BAL	= Broncho alveoläre Lavage
BBP	= Benzylbutyl Phthalat
BPM	= Atemfrequenz
cAMP	= cyclisches Adenosinmonophosphat
DBP	= Dibutyl Phthalat
DEHP	= Di(2-ethylhexyl) Phthalat
EF-50	= Mittlerer expiratorischer Atemfluss
ELISA	= Enzyme-linked immunosorbent assay
HE	= Hämatoxylin Eosin
IF-50	= Mittlerer inspiratorischer Atemfluss
Ig	= Immunglobulin
MEHP	= Mono(2-ethylhexyl) Phthalat
NGF	= Nerve growth factor
OVA	= Ovalbumin
PAS	= Periodic Acid Schiff
PBS	= Phosphate Buffered Saline
PVC	= Polyvinylchlorid
RT	= Raumtemperatur
TE	= Expirationszeit
TI	= Inspirationszeit
V-CAM	= Vascular cell adhesion molecule
VT	= Atemzugvolumen

---

## 9. Verzeichnis der akademischen Lehrer:

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Adamkiewicz, Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Becker, Bette, Cetin, Christiansen, Czubayko, Dauth, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fruhsdorfer, Gerdes, Geus, Gotzen, Grimm, Griss, Gudermann, Happle, Hasilik, Hofmann, Hörle, Jungclas, Kaluza, Kern, Klenk, Klose, Köhler, Koolmann, Krieg, Kroll, Lang, Leppek, Löffler, Lohoff, Mandrek, Maisch, Meinhardt, Meyer, Moll, Mueller U., Mutters, Neubauer, Neumüller, Oertel, Radsack, Rausch, Renschmidt, Renz, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Seifart, Seitz J., Steininger, Seybert, Sure, Vohland, Voigt, Wahl, Walther, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

Meine akademischen Lehrer in Köln waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Deutsch, Schuldes, Ürlings, Wolters, Zeh

## 10. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Dr. Hans Günther Wahl für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas sowie seine intensive, persönliche und hervorragende Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. Harald Renz, danke ich für die Bereitstellung der Mittel und der Räumlichkeiten in seinem Institut.

Ebenfalls danke ich Dr. Henrik Junclas für seine ständige Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Philipps-Universität Marburg danke ich für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau für Ihre unendliche Geduld und liebevolle Unterstützung, meinen Kindern, den Mäusen, sowie meiner Familie, die mir dieses Studium ermöglicht und mich stets motiviert hat.