

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
der Universität zu Köln

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

Untersuchungen zur prospektiven Identifizierung asthmaauslösender Substanzen im Atemtrakt

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Würde eines doctor rerum
medicinalium der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

vorgelegt von Lilli Podola
aus Düsseldorf

Promoviert am
26. November 2008

Dekanin/Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1. Berichterstatterin/Berichterstatter: Professor Dr. med. N. Hunzelmann

2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. M. Krönke

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Köln, den 26. November 2008

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Mitarbeiter der immuntoxikologischen Labors der Bayer HealthCare AG und durch wissenschaftliche Mitarbeiter des Fraunhofer Institutes, Hannover von mir selbst ausgeführt worden.

Die Herstellung und Bewertung der lungenhistologischen Schnittpräparate erfolgte von Herrn Prof. Dr. Rosenbruch und Mitarbeitern in der Pathologie der Bayer HealthCare AG, Wuppertal.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. N. Hunzelmann möchte ich mich für die Offenheit, das Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Erstreferats sehr herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. H.-W. Vohr als Betreuer dieser Arbeit gebührt mein besonderer Dank für die fortwährende theoretische und praktische Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit.

Für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Forschungstoxologie des Pharmaforschungszentrums der Bayer AG Wuppertal durchzuführen, danke ich Herrn Dr. Dr. H. J. Ahr als Leiter der Abteilung Spezielle Toxikologie.

Besonders möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Rosenbruch für die Erstellung und Bewertung der Lungenschnittpräparate bedanken.

Darüber hinaus bin ich Frau M. Schmidt dankbar für die verlässliche und kompetente Unterstützung bei der tierexperimentellen Arbeit.

Auch die fachliche und kollegiale Unterstützung von Frau. S. Dörfling, Frau P. Leidenfrost, Frau A. Rauh Herrn., H. Spiecker, Frau M. Wingenroth, Frau M. Arens hat mir den Laboralltag erleichtert.

Außerdem bedanke ich mich sehr herzlich bei Maja Henjakovic, Dr. Katerina Sewald, und Priv. Doz. Dr. Armin Braun für die sehr interessante und fruchtbare Zusammenarbeit im Fraunhofer Institut Hannover.

Dank für die Unterstützung bei der Korrektur steht außerdem Hans Riedinger, Dr. Björn Podola, Jutta Bennecke und Lydia Köper zu, die mir durch ihre Anmerkungen wertvolle Dienste erwiesen.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	8
1. EINLEITUNG	10
1.1. Das Immunsystem im Überblick.....	10
1.2. Hypersensitivitätsreaktionen	13
1.3. Anatomie und Physiologie der menschlichen Lunge	14
1.4. Das Immunsystem der Lunge	17
1.5. Asthma	19
1.5.1 Die Immunpathologie des Asthma bronchiale.....	20
1.5.2 Das berufsbedingte Asthma.....	24
1.6. Testverfahren zur Bestimmung des sensibilisierenden Potentials chemischer Substanzen in der Lunge.....	25
1.6.1 In vivo Tiermodelle.....	25
1.6.2 In vitro Zellsysteme.....	30
1.7. Ziel der Arbeit	32
2. MATERIAL & METHODEN	33
2.1. Versuchstiere.....	33
2.2. Das rekonstruierte Schleimhautmodell MucilAir	33
2.3. Standardlabormaterial und Laborgeräte.....	34
2.4. Geräte und Gebrauchsmaterial für die Lungenfunktionsmessung	35
2.5. Kulturmedien, -zusätze und Verbrauchsmaterialien	36
2.6. Methoden und Versuchsprotokolle	39
2.6.1 Der lokale Lymphknotentest (LLNA/IMDS):	39
2.6.2 Die intratracheale Applikation von Substanzen in vivo.....	41
2.6.3 Die Applikation der Testsubstanz in vivo	42
2.6.4 Lungenfunktionsmessung.....	43
2.6.5 Lungenlavage:	44
2.6.6 Herstellung und Bewertung der Lungenschnittpräparate	45

2.6.7 In vitro Restimulation von Lymphozyten-, Milzzellkulturen	45
2.6.8 Titration der Testsubstanzen zur Bestimmung des "Lowest Observed Effect Level" (LOEL) in vivo und in vitro	46
2.6.9 Messung der Zellviabilität und -proliferation.....	47
2.6.10 Kultivierung des 3-dimensionalen rekonstruierten humanen Schleimhautmodells MucilAir und Applikation der Testsubstanz:.....	50
2.6.11 Analyse der Zellkulturüberstände anhand der Bestimmung freigesetzten Zytokin- und Chemokinmenge mittels CBA.....	51
2.6.12 Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Subpopulationen von Lymphozyten und Zellen der Lavage auf Aktivierung.....	52
3. ERGEBNISSE	53
3.1. Der lokale Lymphknotentest an der Brown Norway Ratte.....	53
3.2. Der lungenhistologische Befund nach intratrachealer Applikation	54
3.3. Brown Norway versus Wistar - zwei Rattenstämme im Vergleich.	58
3.4. Der lokale Lymphknotentest - Ereignisse in der Lunge und im Lymphknoten nach intratrachealer TMA-Applikation.....	61
3.4.1 Ereignisse im Lymphknoten - Gewicht und Zellzahl.....	62
3.4.2 Durchflusszytometrische Analysen	63
3.4.3 Ereignisse in der Lunge – Untersuchungen des Bronchoalveolar-Fluids.....	65
3.5. Die zytotoxische Reaktion in der Lunge – Vergleich der Testsubstanzen Trimellithanhydrid (TMA), Methylen Diisocyanat (MDI) und Sodium Dodecylsulfat (SDS).....	68
3.5.1 Die zeitabhängige zytotoxische Reaktion am Beispiel TMA.....	68
3.5.2 Die dosisabhängige Reaktion am Beispiel TMA	71
3.6. Multiplex Zytokinanalyse im Bronchoalveolar-Fluid nach TMA-, MDI- und SDS- Applikation	74
3.6.1 BALF - Neutrophile und Eosinophile.....	77
3.7. Bestimmung der konzentrationsabhängigen inflammatorischen Reaktion durch TMA und MDI im Vergleich zu SDS.....	79
3.8. Induktion und Boost	81
3.9. Die allergische Frühphasereaktion nach inhalativer TMA-Provokation.....	83
3.10. Ex vivo und in vitro Modellsysteme	87
3.10.1 Ex vivo Restimulation in vivo aktivierter Lymphozyten.....	87

3.10.2	<i>In vitro</i> Zytokinexpressionsanalysen und Viabilitätsbestimmung am Schleimhautmodell MucilAir nach Substanzapplikation.....	92
4.	DISKUSSION.....	94
4.1.	<i>Der lokale Lymphknotentest an der Brown Norway Ratte.....</i>	<i>94</i>
4.2.	<i>Der lungenhistologische Befund nach intratrachealer Applikation</i>	<i>96</i>
4.3.	<i>Brown Norway versus Wistar - zwei Rattenstämme im Vergleich.....</i>	<i>98</i>
4.4.	<i>Der lokale Lymphknotentest - Ereignisse in der Lunge und im Lymphknoten nach intratrachealer TMA-Applikation.....</i>	<i>100</i>
4.5.	<i>Die zytotoxische Reaktion in der Lunge – Vergleich der Testsubstanzen Trimellithanhydrid (TMA), Methylen-Diisocyanat (MDI) und Sodium-Dodecylsulfat (SDS).....</i>	<i>105</i>
4.6.	<i>Multiplex Analyse intrazellulärer und sezernierter Proteine im Bronchoalveolar Fluid</i>	<i>107</i>
4.7.	<i>Induktion und Boost</i>	<i>110</i>
4.8.	<i>Die allergische Frühphasereaktion nach inhalativer TMA-Provokation.....</i>	<i>113</i>
4.9.	<i>Ex vivo und in vitro Modellsysteme</i>	<i>116</i>
4.9.1	<i>Ex vivo Restimulation in vivo aktivierter Lymphozyten.....</i>	<i>116</i>
4.9.2	<i>MucilAir - Viabilität und Zytokinexpression nach Substanzexposition</i>	<i>117</i>
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	120
6.	LITERATURVERZEICHNIS	122

ABKÜRZUNGEN

AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BALF	Broncho-Alveolar Lavage Fluid
BALT	Broncho-Alveolar Lymphoid Tissue
CBA	Cytometric Bead Array
CD	Cluster of Differentiation
DC	Dendritische Zelle
DI	Differenzierungsindex
DTH	Delayed-Type-Hypersensitivity
ECP	Eosinophil Cationic Protein
FEV ₁	Forciertes Expiratorisches Volumen in einer Sekunde
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GPMT	Guinea Pig Maximization Test
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDS	Integrated Model for the Differentiation of Chemical-induced Allergic and Irritant Skin Reaktion
ITAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
LLNA	Local Lymph Node Assay
LPS	Lipopolysaccharid
MBP	Major Basic Protein
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MDI	4-4'-Methylenbis (phenylisocyanat)
MEST	Mouse Ear Swelling Test
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1
MMAD	Masse-Median-Aerodynamic-Diameter
MTT-Test	Mikrotiter Tetrazolium Test
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle

OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OVA	Ovalbumin
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphat Buffered Saline
PGD 2	Prostaglandin D2
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
RFU	Relative Fluorescent Unit
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _H 1	T-Helferzelle Typ-1
T _H 2	T-Helferzelle Typ-2
TLR	Toll-like Receptor
TMA	Trimellithsäureanhydrid
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α

1. EINLEITUNG

1.1. *Das Immunsystem im Überblick*

Das Immunsystem dient der körpereigenen Abwehr von Pathogenen wie Bakterien, Viren und Parasiten sowie der Elimination von Tumorzellen und Toxinen.

Der Mensch wird schon mit einem wichtigen Teil des Immunsystems geboren, welches ihn befähigt, unspezifisch auf Keime aus der Umwelt zu reagieren. Bei diesem Teil handelt es sich um die sogenannte angeborene Immunität. Sie wird hauptsächlich von Granulozyten getragen, zu denen die phagozytotischen Zellen, wie Neutrophile gehören. Zusammen mit den Makrophagen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) übernehmen sie den überwiegenden Teil der Bekämpfung bzw. Beseitigung von Krankheitserregern. Basophile und Eosinophile sind ebenfalls granulozytären Ursprungs. Im Rahmen der angeborenen Immunität sind basophile Zellen zum Schutz der Schleimhäute aktiv, Eosinophile sind an der Parasitenabwehr beteiligt, übernehmen aber auch bei anderen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem Asthma bronchiale, wichtige Effektorfunktionen. Die Hauptabwehrmechanismen bei der angeborenen Immunantwort bestehen in der Beseitigung von Erregern mittels Phagozytose durch Neutrophile im Blut und Makrophagen im Gewebe oder durch Vernichtung der infizierten Zelle durch NK-Zellen.

Mit dem Heranwachsen reift das gesamte Immunsystem. Die erworbene oder adaptive Immunität bildet ihre Spezifität aus. Hier übernehmen die Lymphozyten, zu denen T-Zellen und B-Zellen gehören, entscheidende Funktionen. T-Zellen verschiedener Spezifität werden durch Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) aktiviert und zur Proliferation angeregt. Dabei werden Antigene (Substanzen oder Partikel von Mikroorganismen oder veränderte Proteine, gegen die Antikörper (Ak) gebildet werden können) über den T-Zell-Rezeptor (TCR) auf speziellen Oberflächenproteinen der APCs, den sog. Haupt-Histokompatibilitätskomplexen (MHC), erkannt. Diese erste Aktivierung der T-Zellen führt zur Proliferation in den Lymphknoten und wird Induktion oder Priming genannt. Nach der klonalen Expansion können diese T-Zellen dann entweder direkt über die Lymphbahnen zu ihrem Wirkort im betroffenen Gewebe wandern und dort ihre speziellen Effektorfunktionen entfalten, oder sie können, im Falle der TH-2 Zelle, B-Zellen zur Produktion von Antikörpern anregen. Effektorzellen

sind z.B. zytotoxische T-Zellen, die zu einer direkten Beseitigung infizierter Zielzellen beitragen (direkte Lyse oder Induktion von Apoptose). Weitere sind die sog. T_H-1 Zellen, die zur Ausschüttung von Zytokinen und zur Aktivierung von Makrophagen stimuliert werden. Man nennt diese Art der Reaktion auch die zellvermittelte Immunität. Sie wird der humoralen Immunität entgegengestellt, die über verschiedene antikörperabhängige Mechanismen verläuft. Antikörper (Immunglobuline) können durch Opsonisierung eine Aufnahme des Pathogens durch Makrophagen erleichtern. Sie wirken neutralisierend auf bakterielle Toxine und Viren. Ihre Bindung kann z.B. das Eindringen von Viren in gesunde Zellen verhindern. Sie aktivieren das Komplementsystem (Aktivierung einer Kaskade von Plasmaproteinen), was letztendlich entweder dazu führt, dass die infizierte Zelle zerstört wird, oder, und das ist überwiegend der Fall, dass die Aufnahme und Entfernung des Erregers aus dem Organismus durch Makrophagen erleichtert wird. Fünf unterschiedliche Klassen von Immunglobulinen, IgG, IgA, IgM, IgD und IgE, ermöglichen es, dieses große Wirkspektrum abzudecken. So ist z.B. IgA mit hauptsächlich neutralisierender Funktion in den Schleimhäuten von Darm und Respirationstrakt zu finden.

Sind B- und T-Zellen einmal aktiviert worden, bildet ein Teil der Zellen das sogenannte immunologische Gedächtnis (memory) spezifisch für das Antigen aus. Solche Gedächtniszellen sind dann in der Lage, bei erneutem Antigenkontakt mit höherer Spezifität, die bei Antikörperreaktionen als Affinitätsreifung bezeichnet wird, schneller und effizienter zu reagieren.

Das Immunsystem bildet ein Abwehr-Netzwerk über den gesamten Körper. So gehören verschiedene Organe zum Immunsystem sowie Blut und Lymphbahnen, die diese Organe untereinander und mit den Einsatzorten bei Abwehrreaktionen verbinden. Das Knochenmark z.B. stellt den Entstehungsort der verschiedenen Leukozytenpopulationen aus pluripotenten Stammzellen dar. T-Zellen bilden dabei allerdings eine Ausnahme, da ein Großteil der Selektion und Reifung im Thymus stattfindet. Die T-Zellen durchlaufen eine Selektion im Thymus, welche dazu führt, dass nur diejenigen T-Zellen überleben, welche nicht auf körpereigene, sondern nur auf körperfremde Antigene reagieren. Dies ist von besonderer Bedeutung, da T-Zellen darüber entscheiden, ob eine adaptive Immunantwort stattfindet oder nicht, ob ein Antigen also als fremd und gefährlich oder körpereigen und ungefährlich eingestuft wird. Milz und Lymphknoten beherbergen B- und T-Zellen und schaffen ein Mikromilieu zur klonalen Expansion. Dort präsentieren

APCs ihre Antigene und lösen bei T-Zellen mit "komplementären" Rezeptoren ein Priming aus. Die Folge eines solchen Primings ist die klonale Expansion und die Bildung spezifischer Gedächtniszellen. Wichtige Faktoren bei der Vernetzung der einzelnen Organe des Immunsystems und der Körperregionen sowie der Modulation des Immunsystems sind Zytokine und Chemokine. Hierbei handelt es sich um Proteine in der Größenordnung von 6 bis 70 kD. Sie werden von Gewebezellen und Immunzellen sezerniert und entfalten ihre Wirkung über die entsprechenden Zytokin- oder Chemokinrezeptoren auf den Zielzellen. Zu ihren vielfältigen Aufgaben gehört u.a. die Stimulation von Zellen zur Proliferation oder Antikörperbildung. Darüber hinaus sind sie aber auch an der Beendigung von Immunreaktionen beteiligt oder induzieren im Knochenmark, der Produktionsstätte von Immunzellen, dass bestimmte Zelltypen vermehrt heranreifen und in das Lymph- oder das Blutsystem entlassen werden.

Des Weiteren ermöglichen besonders Chemokine über die Entstehung von Gradienten innerhalb des Gewebes, die für die Abwehr erforderlichen Immunzellen anzulocken, welche sich entlang eines solchen Chemokingradienten zum Zielort bewegen. Dieses Phänomen wird als Chemotaxis bezeichnet und ermöglicht gezielte Zellmigration aus Lymph- oder Blutbahnen in das betroffene Gewebe. Mittlerweile sind 50 Chemokine und 18 Chemokinrezeptoren bekannt (Moser & Loetscher, 2002). Im Allgemeinen dienen sie der Koordination des Immunsystems und der Vernetzung der Kompartimente. Verschiedene Regionen und Gewebe im Körper haben ihr eigenes Set an Gewebe- und Immunzellen, was man auch als lokales Immunsystem bezeichnet.

Neben den genannten Abwehrreaktionen zum Schutz des Körpers gibt es jedoch auch Krankheiten, die aufgrund von Fehlfunktionen des Immunsystems entstehen. Die verbreitesten Krankheiten gehen auf die Fehlinterpretation von Selbst und Fremd bzw. von gefährlich und ungefährlich zurück. So entstehen Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose oder Diabetes durch Abwehrreaktionen gegen körpereigene Strukturen. Hypersensitivitätsreaktionen sind überschießende Reaktionen des Immunsystems auf ungefährliche Substanzen von außen. Weit verbreitet sind Reaktionen gegen Pollen, Hausstaub oder Nahrungsmittel, die dann zu bekannten Erkrankungen wie Heuschnupfen, Asthma oder Nahrungsmittelallergien führen. In Abschnitt I.2 werden die unterschiedlichen Hypersensitivitätsreaktionen nach Coombs und Gell zusammengefasst.

1.2. *Hypersensitivitätsreaktionen*

Hypersensitivitätsreaktionen sind Überreaktionen des Immunsystems gegen ungefährliche Umweltstoffe im Fall der Allergie oder gegen Selbstantigene bei der Autoimmunität.

Allergien lassen sich immunologisch gesehen nach Coombs und Gell (1968) in vier Gruppen unterteilen. Man unterscheidet den Typ I der Sofortreaktion, welcher IgE-vermittelt ist und neben der Aktivierung basophiler Zellen die Degranulation von Mastzellen bewirkt. Dies hat u.a. die Freisetzung von Prostaglandinen, Histamin und Leukotrienen zur Folge und äußert sich physiologisch durch erhöhte Gefäßdurchlässigkeit und Flüssigkeitseinstrom ins Gewebe sowie durch Kontraktion der glatten Muskulatur. Äußerlich treten die bekannten Symptome wie Quaddelbildung, Niesen, Juckreiz oder Giemen (Asthma) auf. Bekannte Allergene, die eine Typ-I Reaktion auslösen können, sind Pollen, der Kot der Hausstaubmilben oder auch Bestandteile von Nahrungsmitteln.

Charakteristisch für eine Typ-II Reaktion ist eine antikörperabhängige Zytotoxizität. IgG und IgM Antikörper werden gegen zell- oder matrixassoziierte Antigene gerichtet. Es kommt hauptsächlich zur Aktivierung von NK-Zellen und des Komplementsystems. Bekannte Beispiele für diese Art der Überreaktion stellen arzneimittelinduzierte hämolytische Anämien dar.

Bei der Typ-III Reaktion hingegen wird überwiegend IgG nicht gegen Membranassoziierte Proteine, sondern gegen lösliche Proteine gebildet. IgG aktiviert bevorzugt das Komplementsystem, was sich in der Anhäufung von Immunkomplexen (Antigen-Antikörperkomplexen) insbesondere in Niere, Lunge und Gefäßen äußert. Solche Komplexe häufen sich in engen Kapillaren oder im Filtrationsapparat der Niere, dem Glomerulum, an. Dort wird über die Antikörper verstärkt Komplement aktiviert, und angelockte Makrophagen entlassen im sogenannten "oxidativen burst" Sauerstoffradikale und Stickstoffverbindungen, die ebenfalls starke Gewebeschädigung verursachen. Das durch diese Prozesse entstehende Krankheitsbild ist daher durch Vasculitis, (Glomerulo-) Nephritis und Fieber gekennzeichnet. Arthus zeigte, dass durch wiederholte Injektion nichttoxischer Substanzen, wie z.B. Pferdeseren, Gewebeschäden und Nekrosen verursacht werden können. Daher bezeichnet man diese Art der Überreaktion auch als Arthus-Reaktion, eine weitere Ausprägung der Typ-III Reaktion.

Die Aktivierung antigenspezifischer T_H1 -Zellen ist charakteristisch für die Typ-IV Reaktion, einer entzündlichen Reaktion der zellvermittelten Immunität vom verzögerten Typ (Delayed-Type-Hypersensitivity, DTH). Etwa 24-72 Stunden nach Antigenkontakt kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion. Die Zeit entspricht der Dauer, die antigenpräsentierende Zellen benötigen, um vor Ort die voraktivierten T-Gedächtniszellen zu reaktivieren. Die Hauptaufgabe der T-Zellen liegt in der Aktivierung von Makrophagen. Während der Induktionsphase einer solchen Typ-IV Reaktion spielen ebenfalls zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) eine Rolle. Es ist bis heute nicht genau bekannt, welchen Anteil diese Zellen bei einer Reexposition mit Antigenen haben. Die bekanntesten und klinisch auch bedeutendsten Beispiele der Typ-IV Reaktion sind die Kontaktallergien.

1.3. Anatomie und Physiologie der menschlichen Lunge

In der Lunge können die luftleitenden Organe von den gasaustauschenden Organen unterschieden werden. Zu den luftleitenden Organen zählen die Nase, der *Pharynx* und der *Larynx*, die Luftröhre und der Bronchialbaum. Ihre Aufgabe ist es, klimatisierte, das

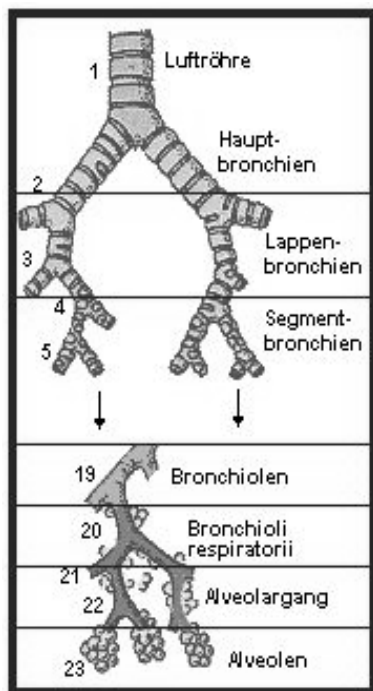


Abbildung 1: Schematischer Aufbau von Lunge und Bronchien. (aus www.medizininfo.de).

heißt körperwarme und wassergesättigte Luft, zu den Alveolen zu leiten. Die respiratorischen, gasaustauschenden Atemwege werden von den *Brochioli respiratori*, den *ducti alveolares* und den *sacculi alveolares* gebildet. Insgesamt besteht die Lunge aus fünf Lungenlappen, deren Gasaustauschfläche etwa 80-100 m² beträgt.

Die Aufspaltung der Trachea an der *bifurcatio tracheae* führt in die zwei Hauptbronchien, die sich wiederum in drei rechte und zwei linke Lappenbronchien (*bronchi lobares*) aufzweigen und jeweils einen Lungenlappen versorgen (rechte Körperseite: *lobus cranialis dexter*, *lobus medius* und *lobus caudalis dexter*; linke Körperseite: *lobus sinister* und *lobus accessorius*). Die Lappenbronchien teilen sich weiter in Segmentbronchien, die distal einen geringeren

Durchmesser bilden und schließlich in die *bronchioli terminales* und *Bronchioli respiratori* münden. Die *bronchioli respiratori* besitzen einen alveolären Anteil und bilden den Übergang zum rein gasaustauschenden Teil der Lunge, dem *ductus alveolares* (Alveolargang) mit den *sacculi alveolares*. Das Alveolarepithel besteht zu 90 % aus Pneumozyten vom Typ I, die die Luft-Blut-Schranke bilden und den Gasaustausch vermitteln. 5-10 % der Pneumozyten sind vom Typ II. Sie stellen wichtige Proteinphospholipide her, die einen Surfactantproteinfilm auf der Alveolarwand bilden. Diese oberflächenaktive Substanz bewirkt eine Herabsetzung der Oberflächenspannung, die notwendig für den effizienten Gasaustausch ist. Durch Kompression dieser monomolekularen Schicht bei der Expiration und Dehnung bei der Inspiration wird die Compliance der Lunge positiv beeinflusst. Das Stützgewebe der Luftröhre und der Hauptbronchien sowie der intrathorakalen Bronchien wird hauptsächlich von Knorpel gebildet. *Trachea* und Hauptbronchien besitzen C-förmige „Knorpelspangen“, die einen Kollaps der Luftröhre oder das Verschließen durch Muskelkontraktion verhindern. Die intrathorakalen Bronchien weisen zwar kleine Knorpelplatten auf, können aber, genauso wie die knorpellosen Bronchiolen durch Kontraktion der zirkulär angeordneten subepithelialen glatten Muskulatur, vollständig verschlossen werden. Dieses passiert bei der Atemwegsobstruktion während eines asthmatischen Anfalls. Kollagen- und elastische Fasern bilden das Stützgewebe der Bronchiolen, dienen aber genauso wie die elastischen Fasern der Alveolen der Atmung, indem sie den passiven Vorgang der Expiration unterstützen.

Die gesamten Atemwege sind von einer dünnen Schleimschicht bedeckt, die von seromukösen Drüsen, den *glandula bronchiales*, den Becherzellen, die sich im Oberflächenepithel der leitenden Atemwege befinden, und von Clara-Zellen in den Bronchiolen produziert wird. Täglich werden bis zu 100 ml Schleim gebildet, die wieder abtransportiert werden müssen. Das respiratorische Epithel mit Kinozilien (Flimmerepithel) sorgt für den Schleimtransport Richtung Kehlkopf und übernimmt somit eine wichtige Funktion bei der Reinigung der Lunge. Veränderungen des Flüssigkeitshaushaltes in den Atemwegen durch Überproduktion von Schleim und schlechtem Abtransport können daher zur Obstruktion führen. Bei Erkrankungen wie Asthma stellt dies ein ernstzunehmendes klinisches Phänomen dar.

Die treibende Kraft der Atmung wird über den transthorakalen Druck bzw. transpulmonalen Druck vermittelt. Die Druckdifferenz zwischen dem Pleuralspalt und

den Alveolen ermöglicht so die Überwindung der Gewebeelastizität und des Strömungswiderstandes während der Atmung. Werden die Druckänderungen mit der Menge an geatmetem Volumen in Beziehung gesetzt, so lassen sich über ein Druckvolumendiagramm Rückschlüsse auf die Gewebeeigenschaften und die Strömungsverhältnisse ziehen. Die Dehnbarkeit der Lunge, die sogenannte Compliance [C] ergibt sich aus dem transpulmonalen Druck, der nötig ist, um ein bestimmtes Volumen zu bewegen, und entspricht $C = \Delta \text{ Volumen } [V] / \Delta \text{ Druck } [P]$. Unter physiologischen Bedingungen wird die Dehnbarkeit der Lunge durch die elastischen Fasern in den Alveolarwänden und um die Bronchien limitiert. Unter pathophysiologischen Gesichtspunkten ist es entscheidend, wie groß das mobilisierbare Lungenvolumen bezogen auf das Gesamtvolumen ist, und ob es in einer adäquaten Zeit geatmet werden kann. Gemessen werden kann dieses durch die Bestimmung des 1-Sekunden-Wertes (FEV₁). Der Wert entspricht dem Volumen, das nach maximaler Inspiration bei forcierter Expiration in einer Sekunde geatmet werden kann. Krankheitsbedingt werden Ventilationsstörungen in obstruktive und restriktive Störungen unterteilt. Strömungen, die der Gasströmung entgegengerichtet sind, werden als obstruktive Ventilationsstörungen bezeichnet, jene, die die Füllung der Lunge mit Gas vermindern, heißen restriktiv. Jede Art der Verengung der Bronchien führt demnach in eine Obstruktion. Funktionell und anatomisch bestimmen verschiedene Faktoren die Bronchusweite und damit den Strömungswiderstand. Den größten Einfluss darauf hat der Tonus der glatten Muskulatur. Weitere Faktoren sind der Zustand der Bronchialschleimhaut, die Beschaffenheit und Menge des Schleimes und die Spannung des Gewebes zwischen Pleura und Bronchien. Der Strömungswiderstand in der Lunge kann über die sogenannte Resistance [R] bestimmt werden. Zur Herstellung einer statischen Umgebung, in der das Produkt aus Druck und Volumen konstant ist, erfolgen die Messungen in einer Druckkammer. Die Bestimmung des Atemflussvolumens und der Druckveränderung in der Messkammer ermöglichen die Errechnung der Resistance, wobei $R = \Delta P / \Delta V$ ist.

1.4. *Das Immunsystem der Lunge*

Der Respirationstrakt mit einer Oberfläche von etwa 100 m² kommt täglich mit bis zu 10.000 Litern Luft in Berührung. Dabei hat die Lunge ständigen Kontakt mit luftgetragenen, apathogenen und fakultativ pathogenen Keimen sowie Toxinen und anderen Umweltstoffen. Effektiven Schutz gegen potentiell gefährliche Keime zu gewährleisten und eine übertriebene Entzündungsreaktion gegenüber harmlosen Antigenen zu vermeiden, stellt eine große Herausforderung an das Immunsystem. Wie an der Hautoberfläche gibt es in der Schleimhaut der Lunge eine so genannte erste Verteidigungslinie, (first line of defense) gegen biologische Schädlinge oder chemische Noxen. Hierzu gehören die Luft- und Flüssigkeitsströme entlang des Epithels, die mukoziliäre Reinigung sowie die mechanische Barriere durch so genannte „tight junctions“, die das Eindringen von Partikeln oder Pathogenen in die Lunge verhindern. Wird diese erste Barriere überwunden, trägt das angeborene Immunsystem in hohem Maße zur Beseitigung diverser Pathogene bei. Auf zellulärer Ebene wirken natürliche Killerzellen, Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, Basophile und Mastzellen gegen fremde Substanzen und Pathogene. Dabei wird der größte Teil der Erkennung und Beseitigung von Fremdkörpern durch interstitielle und alveolare Makrophagen in Form von Phagozytose und der Induktion verschiedener Entzündungsparameter durchgeführt (Zaas et al., 2005). Des Weiteren sind epitheliale Zellen durch antimikrobiell wirkende Proteine wie Defensine und Surfactantproteine (Lawson et al., 2000) auf chemische Weise oder auch durch Expression von Rezeptoren, wie z.B. Toll-Like-Rezeptoren (TRL), die durch Erkennung von sogenannten Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP) für den Schutz des Organismus sorgen (Bals et al., 2004), von Bedeutung. Inzwischen sind eine Reihe von Mustererkennungsrezeptoren bekannt, die sowohl extrazelluläre, membranständige Rezeptoren als auch sezernierte Proteine und zytosolische Rezeptoren umfassen (Delbridge et al., 2007). Andere molekulare Komponenten des angeborenen Immunsystems sind Chemokine und Zytokine. Sie fungieren als Entzündungsmediatoren, ermöglichen die Kommunikation zwischen Leukozyten und anderen Zellen und üben eine direkte Effektorfunktion aus. Die adaptive Immunantwort der Lunge unterscheidet sich in ihren Effektorzellen nicht von den bekannten Bestandteilen des humoralen und zellulären Immunsystems im übrigen

Organismus. Je nach Erkrankung werden unterschiedliche Subtypen von T-Zellen in die Lunge rekrutiert und entfalten dort die bekannten Effektorfunktionen.

Anatomisch und pathophysiologisch lässt sich das Immunsystem der Lunge in zwei Kompartimente unterteilen: Das bronchialmukosa-assoziierte und das alveolär-interstitielle Kompartiment. Das mukosa-assoziierte Kompartiment beinhaltet intraepitheliale Lymphozyten (IEL), welche vorrangig durch CD8⁺ zytotoxische T-Zellen repräsentiert werden (Erle et al., 2000), die üblicherweise mit dem seltenen $\gamma\delta$ Rezeptor ausgestattet sind (Hayday, 2000). Ihr Zusammenspiel mit den Bronchialepithelzellen (z.B. über MHC Antigenpräsentation seitens epithelialer Zellen) trägt entscheidend zur lokalen Immunantwort der Lunge bei (Goto et al., 2000). Das Bronchus-Assoziierte-Lymphatische Gewebe (BALT) befindet sich ungleich verteilt, jedoch häufig in der Nähe von Bifurkationsstellen sowie zwischen Epithel und Gefäß (Gould et al., 1993). Morphologisch betrachtet stellt das BALT eine locker organisierte, follikelartige Akkumulation von Lymphozyten dar, die weder über Kapsel noch Keimzentrum verfügt. Es bietet ein Mikromilieu für die Expansion von Lymphozyten und reguliert u.a. auf diese Weise die lokale Immunantwort (Bienenstock et al., 2005). Die Entwicklung und Ausprägung von BALT ist unter den Spezies verschieden. Bei der Ratte finden sich die ersten lymphatischen Aggregationen nach der 4. Lebenswoche und sind nach zwölf Wochen regelmäßig zu sehen. Eine keimfreie Aufzucht vermag diesen Entwicklungsprozess zu verlangsamen, aber nicht zu unterbinden, was für eine antigenunabhängige Entwicklung des BALT spricht. Jede weitere Entwicklung scheint jedoch antigenabhängig. So nimmt die Anzahl und Größe der BALT-Follikel mit steigendem Lebensalter bei konventioneller Haltung zu (Gregson et al., 1979).

Im humanen System ist anzunehmen, dass es keine natürliche Entwicklung zum BALT gibt, sondern dass die Entstehung stark an chronische Entzündungsprozesse durch mikrobielle Infektionen oder Antigenkontakt gebunden ist (Pabst et al., 1990; Tschernig et al., 2000). Auch wenn Forscher davon ausgehen, dass die Generation der primären Immunantwort gegenüber inhalierten Antigenen hauptsächlich in den drainierenden mediastinalen Lymphknoten abläuft, stellt das BALT einen Raum zur Interaktion zwischen antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen zur Verfügung und bietet insbesondere Gedächtnis-B-Zellen einen Bereich zur klonalen Expansion (Xu et al., 2003) und der Produktion von Antikörpern. Die Antikörper tragen maßgeblich zum Schutz der oberen Atemwege bei und sind vom Isotyp IgA (Twigg, 2005) oder aber

auch IgG. Da das BALT als kapsellooses Zellagglomerat über keine afferenten lymphatischen Bahnen verfügt, nimmt man an, dass Lymphozyten über „high endothelial venuels“ (HEV) durch Chemotaxis gesteuert aus den Blutgefäßen in die Bronchialschleimhaut einwandern. Efferente lymphatische Gefäße drainieren die regionalen Lymphknoten (Bienenstock, 2005).

Das alveolär-interstitielle Kompartiment wird als diffus bezeichnet, da es durch das Zusammenwirken von alveolären Makrophagen und Lymphozyten, die verstreut im Gewebe vorliegen, seine Wirkung entfaltet. In der gesunden Lunge enthält es wenige Zellen des Immunsystems. Bei Entzündungsreaktionen jedoch kommt es zur intra-alveolaren und interstitiellen Akkumulation von Neutrophilen, Makrophagen und auch T-Zellen im Alveolarraum, abhängig von der Art der Inflammation, wodurch lokale, humorale und zelluläre Immunreaktionen induziert werden (Semenzato et al., 2000).

1.5. *Asthma*

In der Klinik sind verschiedene Asthmatypen bekannt. Man unterscheidet das intrinsische Asthma, welches alle nicht allergischen Formen zusammenfasst, und das extrinsische Asthma, das durch eine immunologische Sensibilisierung gekennzeichnet ist. Zum intrinsischen Asthma zählen das Anstrengungs-Asthma, das bei körperlicher Belastung auftritt, das durch reizende Stoffe wie Tabakrauch oder Ozon hervorgerufene Asthma oder aber das durch Virusinfektionen ausgelöste Asthma. Zudem sind pseudoallergische Reaktionen, wie z.B. das „Aspirin-sensitive Asthma“, die durch nicht-steroidale Antiphlogistika ausgelöst werden, sowie das glucocorticoid-resistente Asthma bekannt. Die Gruppe des extrinsischen Asthmas umfasst alle allergischen Formen, wobei die häufigste Pathogenese die einer Typ-I Reaktion ist und somit im allergischen, IgE generierten Kontext steht (Kiley et al., 2007).

Ein ätiologisch anerkannter Faktor für eine erhöhte Anfälligkeit des Individuums für die Entwicklung allergischen Asthmas ist die genetische Disposition. Andere Einflüsse, die eine allergisch oder atopisch generierte Erkrankung begünstigen, sind vor allem die Allergenexposition über die Nahrung und die Luft als Träger von Pollen, Tierhaaren oder anderen chemischen Noxen (z.B. im Berufsalltag). Darüber hinaus begünstigt die sogenannte Adjuvansexposition, z.B. durch Luftverschmutzung oder andere Umweltfaktoren, eine Sensibilisierung. So scheinen die veränderten

Lebensbedingungen der letzten Jahrzehnte in den Industrieländern einen starken Einfluss auf die Initiation dieser Erkrankung zu haben (D'Amato, 2000). Die Hygiene-Hypothese nennt als Grund für die steigende Prävalenz allergischer Erkrankungen umweltbedingtes „falsches oder fehlendes“ priming der T_H-0 Zelle zu einer T_H-1 Zelle. Die Theorie besagt, dass besonders in der frühen Kindheit die Umgebung mit einer normalen mikrobiellen Flora zu einer gesunden T_H-1 Antwort führt, wohingegen ein „steriles Umfeld“ die pathologische Entwicklung der Immunantwort begünstigt und sich in einer Entwicklung T_H-2 spezifischer Zellen manifestiert (Renz et al. 2006). Aufgrund vieler epidemiologischer Studien findet die Hygiene-Hypothese breite Anerkennung, wird aber aufgrund unterschiedlicher Auffassung der Mechanismen, welche diese T_H-1/T_H-2 Ungleichgewichte hervorrufen, immer wieder kontrovers diskutiert.

Einige Erklärungsansätze beziehen sich auf den Einfluss der dendritischen Zelle auf die T-Zelle beim priming, andere messen der Aktivierung verschiedener Toll-like Rezeptoren als initialem Induktor spezifischer Zytokinmuster eine entscheidende Rolle bei der T_H-1/T_H-2 Entscheidung zu (Romagnani, 2007). Die Frage, inwieweit genau virale und bakterielle Infektionen oder mikrobielle Komponenten der Umgebung alleine oder im Zusammenspiel die allergische Reaktion beeinflussen, steht weiterhin zur Diskussion (Schaub et al., 2006).

Viele neuere Studien zeigen gerade im Zusammenhang mit der Entwicklung allergischer Reaktionen eine Beteiligung regulatorischer T-Zellen bei der Immunmodulation. Eine Eigenschaft dieser Zellen ist es, Immunreaktionen zu suprimieren und somit Überfunktionen des Immunsystems, sei es im Sinne einer Allergie oder einer Autoimmunerkrankung, zu kontrollieren. Forscher gehen deshalb nicht mehr ausschließlich davon aus, dass ein Ungleichgewicht in der Entwicklung T_H-1 und T_H-2 spezifischer Zellen Grund für die Zunahme von Allergien ist, sondern dass das Fehlen der natürlichen Toleranzentwicklung durch regulatorische T-Zellen gestört sein könnte (Tournoy et al., 2006).

1.5.1 Die Immunpathologie des Asthma bronchiale

Die pathophysiologischen Charakteristika des Asthma bronchiale umfassen die reversible bronchiale Obstruktion, die durch vermehrten Atemwegswiderstand und reduzierte ventilatorische Kapazität ausgelöst wird, und sich in den für Asthma

typischen Disпноeanfällen und Giemen äußert. Außerdem zählen die bronchiale Hyperreagibilität, eine u. U. chronische Atemwegsentszündung und das „airway remodeling“ (Gewebeumstrukturierung) zu den typischen Merkmalen. Im Stadium der Chronifizierung werden Veränderungen wie eine Verdickung der Basalmembran, eine Fibrosierung des Gewebes sowie eine Hyperplasie der glatten Muskulatur und der Glandula bronchiales festgestellt. Diese Veränderungen sind zudem grundlegend für eine partielle Irreversibilität der Obstruktion im chronischen Stadium. Histologische Untersuchungen der asthmatischen Lunge zeigen eine starke Entzündung der Luftwege, gekennzeichnet durch Gewebseosinophile und mononukleäre Zellen, einen ausgeprägten Verlust des bronchialen Epitheliums, Hyperplasie der schleimproduzierenden Zellen sowie Schleim und zelluläres Debris im Lumen.

Während des Verlaufs eines akuten Asthmaanfalls zeigen 50 bis 60 % der erwachsenen Asthmatiker 6-12 Stunden nach einer Frühphasereaktion eine Spätreaktion. Die Frühphase tritt unmittelbar nach der Antigenexposition auf. Eine Schlüsselfunktion übernehmen hierbei die Mastzellen. Nach der Vernetzung spezifischer IgE Antikörper auf der Zelloberfläche durch Antigen kommt es zur Sekretion präformierter, histaminhaltiger Granula und zur de novo Synthese von Arachidonsäuremetaboliten, Prostaglandin (PGD₂) und Leukotrienen. Diese niedermolekularen Mediatoren führen zur Kontraktion der glatten Muskulatur und zu erhöhter vasculärer Permeabilität. Die Folge derart ausgelöster Bronchokonstriktion und Ödembildung ist eine Erhöhung des Atemwegswiderstandes, resultierend in dem für den Asthmatiker typischen Giemen. Darüber hinaus vermag die aktivierte Mastzelle verschiedene proinflammatorische Zytokine zu produzieren, zu denen u.a. TNF- α , IL-6, IL-8 gehören. Sie begünstigen die Entzündung und leiten die Spätphasereaktion ein, indem sie Lymphozyten, hauptsächlich T_H-2 Zellen und andere Entzündungszellen wie Eosinophile, anlocken.

Eosinophile sind ein weiteres charakteristisches Merkmal von Asthmatikern. Sie können nicht nur in den Bronchialschleimhäuten und in der bronchoalveolaren Flüssigkeit der Lunge nachgewiesen werden, sondern finden sich auch in erhöhter Anzahl im Blut. An der Rekrutierung zum Entzündungsort ist eine Reihe von Faktoren beteiligt. Auf der Zytokinebene wirken die T_H-2 Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 (Moser et al., 1992; Sher et al., 1990; Horie et al., 1997) und indirekt fördern IL-4 und IL-13 durch Induktion von Eotaxin (Blanchard et al., 2005) die Rekrutierung eosinophiler Zellen. Eosinophile entfalten ihre Effektorfunktion über verschiedene

Sekretionsprodukte wie Prostanoiden und eine Vielzahl von Zytokinen (Kita, 1996), insbesondere IL-3, IL-5 und GM-CSF, basische Proteine, zu denen das Major Basic Protein (MBP) und Eosinophil Cationic Protein (ECP) gehören, reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) sowie Eosinophile Peroxidase (EPO). Nach Ausschüttung der Lipidmediatoren wird erneut ein Bronchospasmus in der Spätphase ausgelöst (Evans et al., 1996). Durch die Freisetzung der hohen Konzentrationen an granulären basischen Proteinen sind die Eosinophilen maßgeblich an der Zerstörung des Bronchialepithels beteiligt (Virchow et al., 1992). Die Synthese von IL-5 führt in einem autokrinen Rückkopplungsmechanismus zur Verzögerung der eigenen Apoptose (Chung et al., 1998) und damit letztendlich zur Prolongation der inflammatorischen Reaktion. Die Zerstörung des Epitheliums und die anhaltende Entzündung fördern durch Reparaturmechanismen die Proliferation der glatten Muskulatur. Bei Chronifizierung kann eine Aktivitätsveränderung der Muskelzelle vom kontraktile zum synthetischen Zustand erfolgen. Dieser Pathomechanismus führt im Endeffekt zur Muskelatrophie, was ein Zeichen für den begonnenen Umbau der Atemwege (airway remodeling) ist (Hakonarson et al., 2001).

Da das allergische Asthma eine typische Sofortreaktion vom Typ I darstellt, nimmt man an, dass eine Verschiebung des T_H-1 / T_H-2 - Gleichgewichts zu T_H-2 zur pathologischen Ausprägung der Allergie führt. Eine Beteiligung T_H-1 spezifischer Lymphozyten wird diskutiert, da verschiedene T_H-1 spezifische Zytokine wie $IFN-\gamma$ in Asthmapatienten nachgewiesen wurden. Diese T_H-1 Zellen scheinen jedoch eher an der Gewebsschädigung beteiligt zu sein, da sie die Entwicklung zur T_H-2 Antwort nicht zu unterbinden vermögen (Hansen et al., 1999). Andere Studien geben Hinweise auf die Beteiligung T_H-1 spezifischer Zellen bei chronischen und schweren Asthmaverläufen (Heaton et al., 2005; Cazzola et al., 2006).

Die erhöhte Anzahl von T_H-2 Zellen in der Lunge und die Nachweisbarkeit sogenannter T_H-2 Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13) in der Lavage (Robinson et al. 1992) bestätigen das Paradigma, das besagt, dass ein grundlegendes Problem der Allergieentwicklung in der Dysbalance zwischen T_H-1 und T_H-2 dominierter Immunantwort zugunsten T_H-2 vorliegt. Eine Vielzahl von Faktoren, die Einfluss auf die Entscheidung T_H-1 / T_H-2 nehmen, sind heute bekannt: So spielen Eigenschaft und Dosis des Allergens (die Anwesenheit niedriger Allergendosen begünstigt die Entwicklung zur T_H-2 Zelle), die dendritischen Zellen und ihr Aktivierungsstatus, T-Zellabhängige Faktoren wie

Zytokine und costimulatorische Moleküle, die Anwesenheit infektiöser Agenzien und letztendlich der genetische Background des Individuums eine Rolle bei der Entwicklung zur T_H-2 typischen Immunantwort (Tournoy et al., 2002).

In diesem Zusammenhang kommt T_H-2 Zellen eine zentrale Rolle bei der Immunpathogenese zu. Die Ausschüttung sämtlicher sogenannter T_H-2 Zytokine wird für die Einleitung und Aufrechterhaltung bestimmter immunologischer Prozesse während der Immunantwort benötigt. Ein Gencluster auf Chromosom 5 ist in diesem Zusammenhang besonders wichtig. Es codiert für die T_H-2 dominanten Proteine IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, IL-9 sowie granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Eine herausragende Stellung kommt IL-4 zu, da die Entscheidung, in welche Richtung sich die Immunantwort entwickelt, also ob eine T_H-1 oder T_H-2 Reaktion eingeleitet wird, unter anderem von IL-4 bestimmt wird (Mosmann et al., 1998). Die zentrale Aufgabe der T_H-2 Zelle besteht in der Aktivierung und Modulation der B-Zellantwort. IL-4 wird als T_H-2 Zytokin für den Isotypwechsel von der IgM- zur IgE-sekernierenden B-Zelle benötigt (Naddel et al., 1998). Es verstärkt die klonale Expansion IgE exprimierender memory B-Zellen (Romagnani, 2004) und erhöht die Expression costimulatorischer Moleküle auf B-Zellen. Darüber hinaus treibt es die Immunreaktion voran, indem es die verstärkte Expression von MHC II und damit die Antigenpräsentation fördert. Ein weiterer wichtiger Beitrag von IL-4 besteht in der Induktion des vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 auf vasculären Endothelzellen (Naddel et al., 1998), welches ein wichtiges Adhäsionsmolekül zur Rekrutierung eosinophiler und anderer inflammatorischer Zellen ist (Robinson, 1998). Die Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors (FcεRI) auf Mastzellen und Basophilen wird ebenfalls angeregt. Unterstützt wird die biologische Aktivität von IL-4 durch IL-13, ein IL-4 Homolog. Wie eingangs erwähnt, übernimmt IL-13 die Anregung der Eotaxin Expression in epithelialen Zellen (Kelly-Welch, 2005; Wills-Karp, 2004) und aktiviert das Lungengewebe für den nachfolgenden Bronchospasmus. IL-4 und IL-13 sind potente Induktoren von Eotaxin, vermittelt über den STAT-6 Signaltransduktionsweg. Dieses erklärt das Auftreten der eosinophilen Entzündung im Zusammenhang mit einer T_H-2 Immunantwort (Rosenberg et al., 2007). Eotaxin entfaltet zusammen mit IL-5 seine chemotaktische Wirkung auf Eosinophile in der allergen-provozierten Lunge (Simons et al., 2000; Pope et al., 2001). Darüber hinaus fördert es die Expression von VLA-4 auf Eosinophilen. Die Interaktion zwischen VLA-

4 und VCAM-1 ermöglicht eine selektive Adhäsion von Eosinophilen jedoch nicht Neutrophilen) und somit deren Migration zum Entzündungsherd (Jia, et al. 1999; Sung et al., 2000). IL-5 ist das wichtigste Zytokin für die Eosinophilopoese. Es trägt zur Proliferation und Verlängerung der Lebensdauer von eosinophiler Zellen bei, hat chemotaktische Funktion und führt zur Expression von Integrinen, die mit VCAM auf Gefäßendothelzellen interagieren. IL-5 reguliert die Eosinophilen-Rekrutierung und -Lebensdauer (Collins et al., 1995). Aus der Klasse der Adhäsionsmoleküle, die die Migration von Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen in das Lungengewebe ermöglichen, ist insbesondere ICAM zu nennen, das bei Asthma bronchiale erhöhte epitheliale Expression aufweist und mit dem Ausmaß der Inflammation sowie Hyperreaktivität korreliert (Wegener et al., 1990). Aber auch E-Selectin und VCAM spielen eine Rolle bei der Eosinophilen-Rekrutierung. TNF- α zählt zu den besonders potenten Induktoren genannter Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen.

Das pulmonale Makrophagensystem besteht aus verschiedenen Populationen von Makrophagen, die in den Luftwegen, im Alveolarraum und im Lungengewebe lokalisiert sind. Als antigenpräsentierende Zellen nehmen Alveolarmakrophagen nur eine untergeordnete Rolle ein, sind aber ein Hauptbestandteil bronchoalveolarer Lavage und können bei asthmatischen Patienten in erhöhter Anzahl in Biopsien nachgewiesen werden.

1.5.2 Das berufsbedingte Asthma

Eine Großzahl der Asthmaerkrankungen hat berufsbedingte Ätiologie. Es ist anzunehmen, dass über 10% des Erwachsenenasthmas durch Berufsnoxen hervorgerufen werden (Mapp et al., 2005; Jeebhay et al., 2007). In einigen Berufszweigen sind sogar bis zu 20% der exponierten Arbeiter sensibilisiert. Mittlerweile sind etwa 350 Agenzien bekannt, die berufsbedingtes Asthma auslösen (Internetseite: European Academy of Allergology and Clinical Immunology). Immerhin entfallen 40 bis 60 ätiologisch wichtige Substanzen auf die Gruppe der Chemikalien mit niedermolekularer Masse (Bernstein, 2003). Säureanhydride, Diisocyanate, Kolophonium, Platinsalze u. a. bilden hier die wichtigsten Substanzklassen. Aber auch Getreide- und Holzstäube oder Latex lösen berufsbedingte Allergien aus. Der pathologischen Immunreaktion können unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. So gibt es die „klassische“ IgE-vermittelte Reaktion, die hauptsächlich bei

hochmolekularen Stoffen wie Proteinen auftritt, aber auch bei einigen Haptenen wie z.B. dem Säureanhydrid TMA oder Platinsalz. Andererseits kann eine IgE unabhängige Reaktion ausgelöst werden, wie sie z. B. durch Kolophonium oder Isocyanate induziert werden kann. Unter isocyanat-sensibilisierten Arbeitern konnten nur bei 5-10% Antikörper gegen einen Komplex aus Isocyanat und humanem Protein nachgewiesen werden. Außerdem scheint ein begünstigender Faktor wie die Atopie hier keine Prädisposition darzustellen. Die Reaktionsverläufe können zudem entweder dual sein, dass heißt eine Früh- und Spätreaktion hervorrufen, oder isoliert auftreten (Bauer, 1999).

Die Symptome entwickeln sich typischerweise nach einer Latenzperiode von wenigstens einigen Monaten dann, wenn wieder erneut Kontakt zum auslösenden Stoff hergestellt wird.

Ist die Erkrankung erst einmal etabliert und tritt sie im Zusammenhang mit bronchialer Hyperreaktivität auf, so ist es in der Klinik schwierig, die eigentlichen Ursachen zu ergründen, da die Symptome dann auch nach Exposition gegenüber Irritantien außerhalb des Arbeitsplatzes auftreten können z.B. durch hohe Ozonbelastung oder Abgase (Bauer, 1999).

1.6. Testverfahren zur Bestimmung des sensibilisierenden Potentials chemischer Substanzen in der Lunge

1.6.1 In vivo Tiermodelle

Die Fähigkeit und die Empfindlichkeit von Tests, potentielle Gefahrenstoffe für die menschliche Lunge zu ermitteln, sind von besonderer Bedeutung für ein Klassifizierungssystem der Toxizität im Gesundheitswesen.

Es wurden vielfach experimentelle Studien an Meerschweinchen durchgeführt. Die herkömmlichste Methode ist die anaphylaktische Bronchokonstriktion in sensibilisierten Meerschweinchen. Im Laufe der Zeit konnten jedoch zunehmend artspezifische Nachteile dieses Testsystems zur Beurteilung von Substanzen aufgedeckt werden. Die im Vergleich zum Menschen deutlich stärker ausgeprägte glatte Muskulatur der Bronchien des Meerschweinchens führte zu überdimensionierter Bronchokonstriktion (Pauluhn, 1996) und damit zu sehr heftigen Reaktionen. Zudem ist

die asthmatische Frühreaktion stark histamingesteuert, wodurch es beim Meerschweinchen häufig zum anaphylaktischen Schock während der asthmatischen Frühreaktion kommt. Eine weitere Eigenart dieser Spezies ist die stark IgG1-getriggerte Reaktion anstelle einer IgE-vermittelten Immunantwort wie beim Menschen (Pauluhn et al., 2005). Mittlerweile ist die Bedeutung der Meerschweinchen in der Erforschung des experimentellen Asthmas daher eher gering einzuschätzen. Dafür wird die Ratte als toxikologisches Standard-Tiermodell zunehmend eingesetzt. In der Brown Norway Ratte lassen sich unterschiedliche charakteristische Merkmale des Asthma bronchiale experimentell induzieren. Hierzu zählen die allergische Früh- und Spätreaktion, bronchiale Hyperreaktivität und Eosinophilie sowie die Bestimmung von IgE Antikörpern. Letzteres wies in der Brown Norway Ratte eine große Ähnlichkeit zum Menschen auf (Hoymann et al., 2001).

Die Maus als Versuchstier findet ebenfalls zunehmend Einsatz in der toxikologischen und pharmazeutischen Asthmaforschung. Mäuse reagieren in einer Vielzahl von Parametern in ähnlicher Weise wie der Mensch. So können Interleukine wie IL-4, IL-5 und IL-13 nach Allergenexposition nachgewiesen werden, es erhöhen sich die IgE-Werte in der Maus und ein Anstieg eosinopiler Granulozyten kann gemessen werden. Neben diesen typischen Befunden, wie erhöhten IgE-Werten, Mastzelldegranulation, Zytokinseznierung und Eosinophilie, die im Blut, in der Lavage oder an Schnittpräparaten bestimmt werden, übernimmt die Messung der Lungenfunktion zur Bestimmung der asthmatischen Früh- und Spätreaktion eine entscheidende Rolle bei der Klassifizierung asthmaauslösender Substanzen. Hierzu können Messparameter, wie die Veränderung des Atmungswiderstandes (Resistance) und der dynamischen Compliance, erhoben werden, die als Gold-Standard für eine veränderte Bronchokonstriktion angesehen werden. Die Hyperreaktivität der Lunge nach einer Sensibilisierung wird durch Metacholinprovokation ausgelöst. Die Reaktionsstärke gegenüber cholinergen Stimuli bestimmt das Maß der vorhandenen Hyperreagibilität. Außerdem wird die Korrelation vom Ausmaß der T_H-2 Zellinfiltration mit der Ausprägung der Atemwegsüberempfindlichkeit (AHR) gegenüber cholinergen Agonisten (Whitehead, 2003) zur Bestimmung des allergenen Potentials des eingesetzten Antigens herangezogen.

Eine systemische Immunisierung, die zur Auslösung einer allergenspezifischen T_H-2 Antwort führt, und eine anschließende Inhalation des Antigens bilden die üblichen

Versuchsprotokolle. Die Versuchsdauer und Applikationsart sowie -häufigkeit wird jedoch sehr variabel gehandhabt. In den meisten Fällen erfolgt die Induktion der Immunantwort über intraperitoneale Gabe eines Proteinpräzipitates alleine oder in Kombination mit einem Adjuvant, wie z. B. $\text{Al}[\text{OH}]_3$, durch intratracheale oder intranasale Instillation oder auch durch antigengepulste Makrophagen oder DCs, die intraperitoneal verabreicht werden. Ebenfalls werden subkutane, epikutane und intrakutane Behandlungsweisen zur Induktion vorgenommen. Nach der Induktion, die üblicherweise ein bis drei Behandlungen beinhaltet, werden häufig die so genannten Boosterungen durchgeführt, die ein- oder mehrfach in etwa einwöchigen Abständen stattfinden. Diese Anwendungen haben zum Ziel, eine stärkere Veränderung der Messparameter der substanzbehandelten Versuchstiere im Vergleich zu den Kontrolltieren zu erzielen und damit robustere Versuchsmodelle zu schaffen. Die Allergenprovokation, das sogenannte Challenge, erfolgt inhalativ und wird in der Regel zwei bis vier Wochen nach der ersten Sensibilisierung bzw. ein bis zwei Wochen nach der letzten Behandlung durchgeführt. Je nach Fragestellung werden aber auch wesentlich längere Protokolle angewendet. Die inhalative Provokation kann als nicht invasive Methode im wachen Zustand in Ganzkörperplethysmographen oder als head-out body-Plethysmographie durchgeführt werden. Als invasive Methoden wird bevorzugt die orotracheale Inhalation unter narkotisierten Bedingungen im Ganzkörperplethysmographen eingesetzt.

Das meistverwendete Protein für solche Inhalationsversuche ist Ovalbumin. Zur Untersuchung von Substanzen niedermolekularer Masse werden häufig TMA oder MDI als Modellallergene eingesetzt.

Die Untersuchung verschiedener Krankheitsstadien im Asthma bronchiale erfordert die Anwendung unterschiedlicher Versuchsprotokolle. So werden Modelle, die die chronische Entzündungssituation bis zum Airway remodelling darstellen, andere Untersuchungen und Versuchsanforderungen stellen als Akutmodelle der allergischen Frühphase- oder Spätphasereaktion. Aus diesem Grund gibt es etliche experimentelle Ansätze zur Evaluierung der asthmatischen Situation, die jedoch immer nur einzelne Aspekte des menschlichen Asthmas widerspiegeln. Nach wie vor sind derzeit keine einheitlichen Testverfahren zur Bestimmung der respiratorischen Sensibilisierung verfügbar. Es mangelt an einer ausreichenden Validierung prädiktiver Methoden. Ein Grund sind die durchaus hohen Anforderungen an derartige Testsysteme. Eine

vollständige Risikobewertung erfordert nicht nur die Identifizierung sensibilisierender Substanzen, sondern muss auch die Unterscheidung zwischen allergeninduzierten und reizinduzierten Reaktionen ermöglichen.

Prüfungen von Substanzen zur Bestimmung der Hautsensibilisierung werden seit 1981 gemäß OECD Richtlinien durchgeführt. Die 1992 überarbeitete Version dieser Prüfrichtlinien „TG 406 Skin Sensitisation“ gibt die Verwendung des Guinea Pig Maximization Test (GPMT), entwickelt von Magnusson und Kligman im Jahre 1969 (Magnusson & Kligman, 1969), wie auch den Buehler Occluded Patch Test (1965) (Buehler, 1980; Buehler, 1994) als bevorzugte Testsysteme an. Beide Tests werden an Meerschweinchen durchgeführt und gliedern sich, ähnlich wie eingangs für die Lunge beschrieben, in drei Phasen: Induktions-, Dosisfindungs- und Provokationsphase. Die Induktion wird über epikutane Behandlung im Bühler-Test bzw. intrakutane Applikation mit komplettem Freudschem Adjuvant beim GPMT erreicht. Dabei wird die schwächste noch reizende Konzentration für die Induktion benutzt. Die in der zweiten Phase bestimmte, höchste, gerade nicht mehr reizende Dosis wird dann in der Provokationsphase appliziert. Die visuelle Auswertung der Hautreaktion beider Tests erfolgt nach dem Bewertungsschema von Magnusson und Kligman. Um eine Substanz als sensibilisierend zu bewerten, müssen beim Buehler Occluded Patch Test mindestens 15% der Versuchstiere positiv reagiert haben, beim GPMT liegt der Schwellenwert bei 30%, da mit komplettem Freudschem Adjuvant gearbeitet wird. Ende der 1980er Jahre übertrug man dieses Testverfahren auf Mäuse und entwickelte den Mouse Ear Swelling Test (MEST) (Gad, 1994). Das 3-Phasen-Konzept dieses Tests ist vergleichbar mit den oben genannten Meerschweinchentests. In der Initiationsphase werden die Flanken der Tiere mit der Testsubstanz behandelt, in der Provokationsphase jedoch wird ein Ohrücken epikutan mit der Substanz und der zweite Ohrücken mit dem Vehikel behandelt. Die Messung der Ohrdicke als Endpunkt zeigt, ob die Testsubstanz eine Ohrschwellung im Vergleich zur Kontrolle hervorgerufen hat, und macht so eine Einschätzung des sensibilisierenden Gefahrenpotentials möglich. Dieser Test wird zwar erfolgreich zur Bestimmung einer Sensibilisierung eingesetzt, da aber bisher keine Validierung erfolgte, ist er weiterhin nur als Screening Test anerkannt.

Ein weiteres Verfahren an der Maus ist der einphasige Local Lymph Node Assay (LLNA) (Kimber und Weisenberger, 1998), der im Gegensatz zu allen anderen Tests ohne Provokationsbehandlung auskommt. Dieser Test macht sich die Tatsache zunutze,

dass Sensibilisierungsreaktionen nach dem Priming von T-Zellen im Lymphknoten stets mit klonaler Expansion einhergehen. Die Bestimmung der proliferativen Antwort in den drainierenden aurikulären Lymphknoten nach epikutaner Behandlung der Ohren an drei aufeinanderfolgenden Tagen stellt daher den Endpunkt dar. Eine Substanz wird dann als allergen definiert, wenn die Proliferation in den drainierenden Lymphknoten größer als Faktor drei im Vergleich zur Kontrollgruppe ist (Kimber et al., 2003). Die Kategorisierung der Stärke einer sensibilisierenden Substanz erfolgt nach der eingesetzten Konzentration, die notwendig ist, um eine Erhöhung der Lymphozytenzahl auf das Dreifache zu bewirken. Man nennt diesen Schwellenwert EC3-Wert. Je geringer die Konzentration ist, die benötigt wird, um den EC3-Wert zu erreichen, desto stärker ist das sensibilisierende Potential. Dieses Verfahren ermöglicht eine objektivere Interpretation der Ergebnisse als der Meerschweinchentest, da beim LLNA keine subjektive Beurteilung der Hautrötung vorgenommen wird, sondern Zahlenwerte ermittelt werden.

Die Erweiterung des LLNA zum so genannten IMDS-Test (**I**ntegrated **M**odel for the **D**ifferentiation of Chemical Induced Allergic and Irritant Skin Reaction) (Homey et al., 1998) stellt ein solches Modell dar, mit dessen Hilfe die Differenzierungsproblematik zwischen sensibilisierenden und irritierenden Substanzen gelöst und die genauere Beurteilung chemischer Substanzen in Bezug auf ihre irritativen und sensibilisierenden Eigenschaften ermöglicht wird. Grundlage des Tests ist die Annahme, dass Irritationen lediglich lokale inflammatorische Muster zeigen, während bei dem Auslösen von Allergien die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen im Lymphknoten grundlegend an der Entstehung beteiligt sind. Das Abgreifen zweier Endpunkte, der Ohrdicke als Maß für die lokale Entzündung, also Irritation, und die Bestimmung der Zellzahl in den drainierenden Lymphknoten als Zeichen einer Sensibilisierung ermöglichen es, die intrinsischen Eigenschaften einer Substanz genauer zu erfassen. Aus dem Verhältnis beider Reaktionen wird schließlich ein Quotient, der Differenzierungsindex DI, ermittelt, der eine Aussage über die Gewichtung der genannten Substanzeigenschaften bei der untersuchten Konzentration macht und so eine Differenzierung zulässt.

1.6.2 *In vitro* Zellsysteme

Das „tissue engineering“ oder die Gewebetechnologie beinhaltet die Rekonstruktion organotypischer Gewebeäquivalente von Haut und Schleimhaut. Dieses Verfahren ermöglicht nicht nur das Studium zellregulatorischer Mechanismen *in vitro*, sondern auch die Möglichkeit der präklinischen Beurteilung von Substanzen. Neben der immer wieder erwähnten ethisch motivierten Dringlichkeit, Tierversuche zu reduzieren bzw. abzuschaffen, wird in Europa die Verwendung von Tieren zu experimentellen Zwecken rechtlich zunehmend stärker kontrolliert. Die kosmetische Directive 76/768/EEC beispielsweise schreibt ein Verbot der Verwendung von tierexperimentell getesteten Zusätzen oder Produkten bis 2013 vor. Darüber hinaus wird die Verwendung von *in vitro* Testsystemen durch die Einführung von REACH (Registration Evaluation Authorisation & Restriction of Chemicals) zusätzlich vorangetrieben.

In der Toxikologie konnten einige dieser Testsysteme etabliert und verstärkt in behördliche Zulassungsverfahren aufgenommen werden. Zum Beispiel sind Tests an epidermalen Hautmodellen zur Bestimmung der Phototoxizität und Hautkorrosion von Substanzen (OECD, 2004a; OECD, 2004b) bereits zugelassen. Andere, wie der Hautirritation-Tests befinden sich der Pre-Validierungsphase.

Zur immuntoxikologischen Evaluierung von Substanzen in der Lunge wird an verschiedene Testsysteme geforscht. Bisher stehen jedoch keine validierten Modelle oder Testprotokolle zur Verfügung. Die ersten Modellsysteme beschränkten sich auf Flüssig-Zellkultursystem. Die am häufigsten verwendete Zelllinie ist die A549 Zelllinie, eine humane alveolar Typ II Zelllinie.

Durch das Fehlen der nativen Schleimhaut, der Barrierefunktion, tight-junctions und der Bipolarität eignen sich Flüssigkultursysteme jedoch, wenn überhaupt, nur für high through-put screenings. Durch 3-dimensionale Kulturbedingungen konnten Caterson et al. (2005) die positive Veränderung des A549 Phänotyps demonstrieren: Epithel-spezifische Marker wie tight-junctions wurden vermehrt, krebs-spezifische Marker weniger stark ausgeprägt. Andere humane Bronchial-Zelllinien sind BEAS-2B, 16 HBE 14o⁺ und Calu-3. Die Zelllinie 16 HBE 14o⁺ formt polarisierte Zellschichten und erhält somit Morphologie und Funktion durch tight-junctions, Cilien und transepitheliale Resistance, bei Calu-3 handelt es sich um eine Zelllinie mit zusätzlich stark entwickelten sekretorischen Eigenschaften.

Das erste 3-dimensionale gewebebasierte System wurde von Skinethic eingeführt, bei dem die Zelllinie A549 als mehrschichtiges Gewebe an der Luft-Flüssigkeitsgrenze kultiviert wurde. Simultan wurden auch rekonstruierte Gewebemodelle für andere Organe, wie Haut und Schleimhäute von Auge, Lunge und Mund, entwickelt. Bekannte Nachteile derartiger Testsysteme liegen häufig in der fehlenden Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Faktoren wie die unterschiedliche Anzahl der Zellschichten, Variabilität der Hydrophilie der apikalen Seite der Zellmembran und die Instabilität der verwendeten Zelllinie sind ein häufiger Grund für die große Varianz der Daten.

Zur Erforschung umwelttoxikologischer Effekte z.B. durch Abgase und Zigarretenrauch auf die Lunge wurde Cultex, ebenfalls ein 3-dimensionales Modell der Zelllinie A549, vom Fraunhofer Institut entwickelt. Die Besonderheit dieses Modellsystems besteht in der Expositionstechnik: Die Kultivierung adherenter Zellen an der Luft-Flüssigkeits-Phasengrenze ermöglicht in speziellen Messkammern die Exposition gegenüber Gasen. So können z.B. schadstoffhaltige Luftgemische, die kontrolliert über die Zelloberfläche geleitet werden, genauer untersucht werden. Auf diese Weise kann die Applikation von Flüssigkeiten, wie sie üblicherweise erfolgt, vermieden werden.

MucilAir ist eines der jüngsten Schleimhautmodelle der Firma Cellsystems/Epithelix, das gewebe-technologisch sehr weit entwickelt ist. Das funktionsfähige Gewebe humaner Primärzellen der Bronchien besteht aus einer basalen Zellschicht, die Epithelzellen, zilienträgende Epithelzellen und mucusproduzierende Zellen ausdifferenziert. Epithelix garantiert eine Lebensdauer von bis zu einem Jahr, während sich derartige Modelle meist nur wenige Tage oder Wochen halten. Daher könnte MucilAir insbesondere für den Einsatz bei Langzeitstudien an Bedeutung gewinnen. Mittlerweile werden auch spezielle Modelle, z.B. zum Studium der zystischen Fibrose, angeboten. Die Biopsien zur Rekonstruktion der Schleimhaut stammen dann von Patienten mit entsprechendem Gendefekt.

Bei den Precision Lung Cut Slices (PLCS) handelt es sich um *ex vivo* Gewebekulturen von 250 µm dicken Lungenschnittenpräparaten. Diese Modelle reflektieren die *in vivo*-Situation besonders gut und es wurden vielversprechende Ergebnisse bei Untersuchungen der Bronchokonstriktion gezeigt. Eine *in vivo* induzierte Lungensensibilisierung kann durch Restimulation *in vitro* mikroskopisch oder andere bildgebenden Verfahren im Hinblick auf eine Bronchokonstriktion bei Asthma bronchiale untersucht werden.

1.7. Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Induktionsphase des Asthma bronchiale in der Brown Norway Ratte näher zu untersuchen und die Eignung von Kurzzeitverfahren zur Identifikation asthmaauslösender Substanzen zu erforschen.

Analog zum LLNA wurde die Wirkung der Modellsubstanz TMA auf die Lunge unter Einbeziehung der lokalen Reaktion in der Lunge und der drainierenden Lymphknoten genauer untersucht. Um aufzuklären inwieweit eine spezifische Immunreaktion in den drainierenden Lymphknoten nach zweimaliger intratrachealer Substanzapplikation nachweisbar ist werden neben der Messung von Lymphknotengewicht und Zellzahl verschiedene Aktivierungsmarker auf Lymphozyten, wie CD4/CD45 , CD4/CD25 und der Expression costimulatorischer und antigenpräsentierender Moleküle im Durchflusszytometer näher untersucht.

Um die Spezifität der Eosinophileninfiltration für die asthmatischen Reaktion während der Induktionsphase genauer zu analysieren, aber auch substanzklassenspezifische Reaktionen aufzudecken, wird die Infiltration eosinophiler, neutrophiler Granulozyten sowie die Zytokinexpression in der Lunge nach Applikation der allergenen Standardsubstanzen TMA und MDI im Vergleich zur irritierenden Substanz SDS bestimmt.

Ein weiterer zentraler Punkt der Arbeit ist die Untersuchung der Lungenfunktion nach inhalativer Provokation mit der sensibilisierenden Substanz TMA. Dabei ist die heftig diskutierte Abhängigkeit der Sensibilisierung von der Applikationsroute von besonderer Bedeutung für diese Arbeit. Die Lungenfunktion nach inhalativer TMA-Provokation wird nach epikutaner und intratrachealer Induktion bestimmt, zusätzlich werden Parameter wie die Zellinfiltration und die Zytokinexpression in der Lavage analysiert. Diese Versuche in Verbindung mit den Ergebnissen der Induktions- und Boostphase sollen schließlich zu einem umfangreicheren Verständnis der immunologischen Mechanismen beitragen, die zur Sensibilisierung führen.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1. Versuchstiere

Die *in vivo* Versuche zur Induktion des Asthma bronchiale wurden an weiblichen Wistar Ratten von Winkelmann (180-220 g) und an weiblichen, 140-170 g schweren Brown Norway Ratten von Charles River durchgeführt. Für die Inhalationsstudie wurden männlichen Brown Norway Ratten eingesetzt. Die Haltung der Tiere erfolgte gruppenweise in Käfigen des Typs III aus Makrolon. Die Nahrung bestand aus Haltungsallesfutter für Ratten und Mäuse von Provimi KLIBA SA (Kaiseraugust, Schweiz) und Wasser *ad libitum*. Die Haltung der Tiere und die Durchführung der *in vivo* Experimente erfolgten nach den allgemeinen Bestimmungen des Tierschutzgesetzes.

Zur Akklimatisierung der Tiere an die neue Umgebung wurden die Experimente frühestens 6 Tage nach ihrer Lieferung durchgeführt.

2.2. Das rekonstruierte Schleimhautmodell MucilAir

MucilAir, das *in vitro* rekonstruierte Lungenschleimhautmodell von CellSystems®/Epithelix, ist ein 3-dimensionales Epithelmodell, das an der Luft-Flüssigkeits-Phasengrenze kultiviert wird. Es stellt ein organotypisches Abbild des nativen Respirationstraktes dar und wurde speziell für die klinische und pharmazeutische Forschung entwickelt. Die aus humanen Biopsien stammenden primären Zellen, die in sogenannten Inserts mit einer Fläche von 0,62 cm² auf einer Polycarbonatmembran kultiviert werden, entwickeln neben einer basalen Zellschicht mucusproduzierende Zellen sowie funktionsfähige Cilien und bilden somit ein differenziertes Lungenepithelium aus. Das Zellkultursystem in Inserts und die schematische Darstellung der Zelltypen ist in Abbildung 2 dargestellt.



Abbildung 2: MucilAir Zellkultursystem von CellSystems/Epithelix

2.3. Standardlabormaterial und Laborgeräte

Material	Hersteller
12-, 24-, 96-well-Platten, steril	Corning incorporated Costar®
12-well-Platten mit Siebeinsatz, steril, 74 µm Mesh	Corning incorporated Costar®
Analysewaage AT 261	Mettler
Bechergläser 80 ml, 120 ml, 200 ml, 1800 ml	Fisherbrand
Seraflex (3/0), chirurg. Faden	Serag Wiessner
Combitips, steril	Eppendorf
Cup Filcons 200 µm (Filter Aufreinigung, Milzzellsuspension)	Becton Dickinson
Cytofunnel	Thermo Electron Corporation
Cytospin	Shandon
Einweg Injektionskanüle(0,45 x 23mm)	Braun, Melsungen; Terumo
Eppendorf Gefäße 1,5 ml	Eppendorf
Eppendorf Pipetten	Eppendorf
FACS Calibur	BD Biosciences
FACS Röhrchen 5 ml	BD Falcon
Falconröhrchen 15 ml, 50 ml	BD Falcon

Färbekammer	Wertheim
Feinwaage	Mettler AE 200
Inkubator (95 % Luftfeuchte, 5 % CO ₂ ; 37 °C)	Kendro
Leukodiff 700	Instrumentation Laboratory
Metallsiebe	Firmen interne Herstellung
Mikroskop	Zeiss Axioplan
Neubauer -Zählkammer	Braun
Objektträger	Menzel GmbH CoKG
Partikelzählgerät	Coulter
Per os Kanüle	Acufirm
Petrischalen, steril, Ø 94mm	Greiner
Präparierbesteck	Escolab
Spektralphotometer EL 808	Bio-Tek Instruments, Inc.
Spritzen	Ersta
Vertikalschüttler MTS 4	Janke&Kunkel, IKA®-Labortechnik
Vortex-Gerät REAX 2000	Heidolph

2.4. Geräte und Gebrauchsmaterial für die Lungenfunktionsmessung

Material	Hersteller
Aerosolgenerationssystem	Bronchy Typ III, Fraunhofer ITEM
Aerosolphotometer: Reinluftmantelphotometer mit zwei integrierten HE-Filtern	Fraunhofer ITEM, Filter: DIF-N-70, Franke
Analog-Digital-Umwandler	DT 302 Data Translation, Marlboro,
Differenzialdruckaufnehmer	DP 45-14, Validyne, HSE/Harvard
Druckaufnehmer	Pressure Transducer P-75, Typ 379, HSE/Harvard
Flussmessgerät	Dry-Cal, Fraunhofer ITEM
Ganzkörperplethysmograph für die intubierte Ratte	Fraunhofer ITEM und Hugo-Sachs-Elektronik/Harvard Apparat GmbH

Inhaliergerät	PariMaster®, LC-Star, MMAD 2,8µm, Pari-Werke
Mass-Flow-Controller	MFC-Box, Fraunhofer ITEM, Firma Mättig
Ösophaguskatheter	Polyethylenschlauch PE-90 (Länge 90 mm; Ø aussen 1,27mm; Ø innen 0,86 mm)
Pneumotachometer	HSE/Harvard
Sauerstoffmonitor	5-Gas-Monitor Oxyanga, Anamed
Trachealtubus	20G-intravenöser Abbocath-T- Katheter (Länge 32 mm; Ø aussen 1,1 mm; Ø innen 0,8 mm) Abbott
Verneblerdüse	Fraunhofer ITEM
Verstärker	CFBA Plugsys Typ 677, HSE/Harvard
Verstärker	DBA Plugsys Typ 660, HSE/Harvard

2.5. Kulturmedien, -zusätze und Verbrauchsmaterialien

Kulturmedium	Hersteller
MTT- Medium	CellSystems
Maintenance Medium	CellSystems
RPMI	Gibco™

Zusätze für Zellkulturmedien	
Zusatz	Hersteller
β-Mercaptoethanol, 0,4 µM	Sigma
FCS 5 %	Sigma
Glutamin, 2 mM	Gibco™
MEM (non essential amino acids) 1x	Gibco™
Penicillin, 100 U/ml; Streptomycin, 0,1 mg/ml	Gibco™
Sodium Pyruvat 1 mM	Gibco™

Mitogene/ Proliferationsstimulantien	
Zusatz	Hersteller
Anti-CD3 Antikörper	BD Pharmingen
Concanavalin A (ConA)	Sigma
Lipopolysaccharide (E.coli)	Sigma

Verbrauchschemikalien, Puffer und Lösungen	
Chemikalien	Hersteller
2-Propanol	Merck KGaA
Aceton	Merck
Ethanol 70 %	Sigma
Ethanol abs	Sigma
Giemsa-Stammlösung	Sigma
Isoton II	Coulter
May-Grünwald-Lösung	Sigma
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-Phenyl-tetrazolium bromid)	Sigma
N,N- Dimethylacetamid	Sigma
Olivenöl	Fluka
PBS (Phosphate buffered saline)	Gibco TM
Trypanblaulösung 0,4 %	Sigma
Weise Puffer	Merck
Zap-O-Globin	Coulter

Vehikelsubstanzen	
Substanz	
Aceton 5 % in PBS (Phosphate buffered saline)	
Aceton in Olivenöl (4:1)	
DAE 433 (Dimethylacetamid 40%; Aceton 30%; Ethanol 30%)	
PBS (Phosphate buffered saline)	

CBA (Cytometric Bead Array) Ratte	Hersteller
Rat Cytokine 6 Plex (IL-1 α ; MCP-1; TNF α ; IFN γ ; GM-CSF; IL-4)	Bender MedSystems
CBA (Cytometric Bead Array) Human	Hersteller
Human Chemokine Kit I (IL-6, IL-8; RANTES; MCP-1; IP-10, IL-12p70)	BD Biosciences
Applikationssubstanzen	
Substanz	Hersteller
Benzoquinon	
MDI (4,4-Methlen-bis(phenylisocyanat))	Aldrich
SDS (sodium dodecyl sulfat), 95 %	Sigma
TMA (Trimellithsäureanhydrid)	Aldrich

Antikörper Ratte für durchflusszytometrische Analysen	
Antikörper	Hersteller
CD4 PE (1:200)	BD Pharmingen
CD11bc PE (1:600)	BD Pharmingen
CD80 PE (1:200)	BD Pharmingen
CD86 PE (1:100)	BD Pharmingen
CD8 FITC (1:400)	BD Pharmingen
CD25 FITC (1:200)	BD Pharmingen
CD45 FITC (1:200)	BD Pharmingen
CD28 FITC (1:200)	BD Pharmingen
CD11bc FITC (1:800)	BD Pharmingen

Testkits (Zellviabilität/Proliferation)	
Testkit	Hersteller
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche
Cytotoxicity Detection kit ^{Plus} LDH	Roche Applied Science
TOX 8, Resazurin based assay kit	Sigma

2.6. Methoden und Versuchsprotokolle

2.6.1 Der lokale Lymphknotentest (LLNA/IMDS):

Applikation der Testsubstanzen

Jeweils fünf Brown Norway Ratten werden pro Testsubstanz und Vehikel an drei aufeinanderfolgenden Tagen behandelt. Die Applikation von je 50 µl der Substanzen erfolgt mittels einer Spritze epicutan auf der dorsalen Seite beider Ohren.

Es werden folgende Testsubstanzen eingesetzt: SDS 40%, MDI 40%, TMA 25% und Benzoquinon 0,2%. DEA 433 wird als Lösungsmittel und Kontrollsubstanz verwendet.

Bestimmung der Ohrdicke

Die Ohrdickenbestimmung erfolgt unmittelbar vor der ersten Substanzapplikation und 24 Stunden nach der letzten Ohrbehandlung an Tag drei mit einer Mikrometerschraube am äußeren Rand der Ohren.

Präparation der aurikulären Lymphknoten

An Tag fünf werden die Ratten mittels CO₂ abgetötet. Die Entnahme der aurikulären Lymphknoten, die sich auf dem Kreuzpunkt der *Vena facialis* und der *Vena maxillaris* befinden, erfolgt unter semisterilen Bedingungen. Nach der Präparation werden sie vom Fettgewebe befreit und paarweise in 1 ml RPMI Medium überführt.

Bestimmung von Lymphknoten-Gewicht und Lymphknoten-Zellzahl

Um Flüssigkeitsreste zu entfernen, werden die Lymphknoten vor der Messung auf einem Filtertuch abgetropft. Die Bestimmung des Gewichtes erfolgt anschließend paarweise.

Zur Messung der Zellzahl werden die Lymphknoten eines jeden Tieres mechanisch homogenisiert. 40 µl der so gewonnenen Einzelzellsuspension werden mit Isoton II 1:500 verdünnt. Bis zur Messung wird die Zellsuspension auf Eis gelagert. Zur Lyse der Erythrozyten werden etwa eine Minute vor dem Messvorgang 60 µl Zap-O-Globin hinzugefügt. Die Messung erfolgt unter Ausschluss einer Partikelgröße $\leq 4,34 \mu\text{m}$.

Berechnung der Stimulationsindices [SI_O] und [SI_C] (LLNA Ratte)

Der Index für die Ohrdickenzunahme [SI_O] und die Zellproliferation [SI_C] ergibt sich aus dem Verhältnis dieser beiden Parameter im Vergleich zur Kontrolle.

$$SI_O = \frac{\text{Ohrdicke [mm] der substanzbehandelten Tiere an } d_4}{\text{Ohrdicke [mm] der vehikelbehandelten Tiere an } d_4}$$

$$SI_C = \frac{\text{Zellzahl der Lymphknoten der substanzbehandelten Tiere an } d_5}{\text{Zellzahl der Lymphknoten der kontrollbehandelten Tiere an } d_5}$$

Berechnung des Differenzierungsindex [DI] (relevant für den LLNA/IMDS im validierten Maussystem)

Zur Berechnung des Differenzierungsindex [DI] wird zunächst der Prozentsatz der maximal möglichen Ohrschwellung bzw. maximal möglichen Zellproliferation errechnet. Hierzu werden empirisch ermittelte Werte einbezogen, die den Index der maximalen Zunahme der Ohrdicke auf 2 und den der maximalen Zunahme der Zellzahl auf 5 festlegen.

$$\%SI_{Omax} = \frac{SI_O - 1}{1} \times 100$$

$$\%SI_{Cmax} = \frac{SI_C - 1}{4} \times 100$$

Der Differenzierungsindex [DI] gibt Aufschluss über das irritative bzw. sensibilisierende Potential einer Testsubstanz. SI_C als Maß für die antigenabhängige Aktivierung der Zellproliferation und somit Ausdruck des sensibilisierenden Potentials und SI_O als Maß der Ohrschwellung und somit als Maß für die irritative lokale Hautreaktion werden ins Verhältnis gesetzt:

$$DI = \frac{SI_{Cmax}}{SI_{Omax}}$$

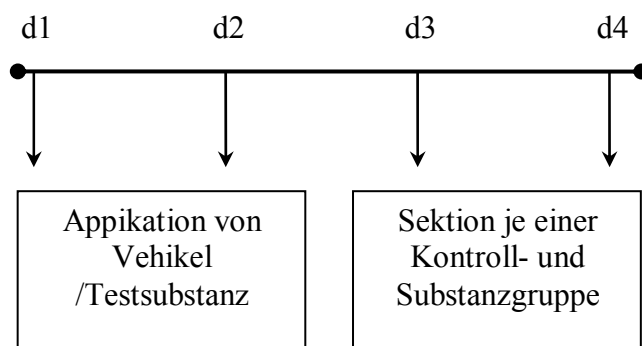
Irritative Substanzen ergeben DI-Werte von: $0 < DI < 1$

Bei sensibilisierenden Substanzen ergeben sich DI-Werte von: $DI > 1$

2.6.2 Die intratracheale Applikation von Substanzen in vivo

Induktionsschema

An zwei aufeinander folgenden Tagen (d1 und d2) werden je zwei Gruppen (n = 3 bis 5) mit Vehikel oder Modellsubstanz intratracheal behandelt. Die Sektion je einer Kontroll- und Substanzgruppe erfolgt an d3 und d4. Die Konzentration der eingesetzten Testsubstanz, sowie die Gewinnung der biologischen Proben richten sich nach der experimentellen Fragestellung.

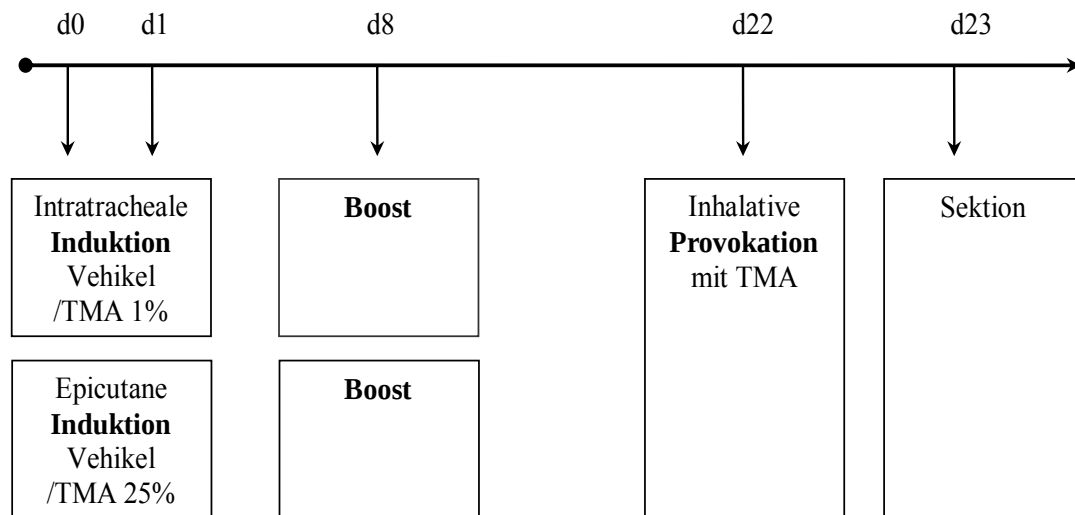


Es werden die mediastinalen Lymphknoten und Bronchoalveolar-Lavage-Fluid entnommen. Die pathohistologische Beurteilung der Lunge erfolgt entweder makroskopisch oder mikroskopisch durch Hämalaun-Eosin gefärbte Schnittpräparate.

Induktion einer respiratorischen Hyperreaktion

Zur Untersuchung asthmaauslösender Parameter nach wiederholter Substanzgabe wird nach folgender Versuchsanordnung gearbeitet:

Die Induktion erfolgt in Gruppen von 6 Tieren entweder intratracheal oder epikutan an zwei aufeinander folgenden Tagen, d0 und d1. Nach einer Woche, an d8, wird eine einmalige Behandlung („Boost“) entsprechend der Induktion durchgeführt. Die Provokation mit der Modellsubstanz TMA erfolgt an d22 durch inhalative Applikation von TMA. 24 Stunden nach der inhalativen Provokation erfolgt die Sektion der Tiere zur Gewinnung des bronchoalveolaren Lavagefluids.



2.6.3 Die Applikation der Testsubstanz in vivo

Narkotisieren der Versuchstiere für die intratracheale Substanzapplikation

Brown Norway Ratten werden mittels intraperitonealer Gabe eines Domitor/Ketavet Gemisches (1:12,5) narkotisiert. Die Dosierung entspricht einer arzneiwirksamen Verabreichung von 0,056 mg/kg KGW Medetomidinhydrochlorid (Domitor®) und von 74,3 mg/kg KGW Ketaminhydrochlorid (Ketavet®).

Intratracheale Substanzapplikation

Nach Eintreten der Reflexfreiheit wird das Versuchstier zur Applikation aufrecht an den Schneidezähnen am Applikationstisch befestigt. Unter zur Hilfenahme eines Otoskops wird die Applikationskanüle in die Trachea bis zur Bifurcatio tracheae eingeführt. 100 µl der Testsubstanz oder des Vehikels werden auf diese Weise in die Lunge appliziert.

Beendigung der Narkose

Zur Verkürzung der Narkosephase werden 0,3 mg/kg KGW Atipamezolhydrochlorid (Antisedan®) intraperitoneal verabreicht. Während der Aufwachphase werden die Ratten unter einer Infrarotlampe vor Unterkühlung geschützt.

Inhalative Substanzapplikation

Zur Intubation werden die Tiere in einer Narkose-Box mit 4%igem Halothan-Luft-Gemisch betäubt, so dass der Tubus in die Trachea eingeführt werden kann. Die Narkose wird während des gesamten inhalativen Prozesses in der Messkammer mit

einem 1,5%igem Halothan-Sauerstoff-Gemisch aufrechterhalten. Das TMA wird über ein Aerosolgenerationssystem als Trockenaerosol vernebelt. Der Massendurchmesser (Mass Median Average Diameter (MMAD)) der TMA-Aerosolpartikel beträgt $3,2\ \mu\text{m}$ und kann über eine Mikrodüse variabel eingestellt werden. Während des Expositionszeitraums von 12 Minuten erhalten die Ratten $40\ \mu\text{g}$ TMA-Aerosol. Die TMA-Konzentration wird über einen Mass-Flow-Controller, der den Verdünnungsluftstrom regelt, konstant gehalten.

2.6.4 Lungenfunktionsmessung

Als Maß für die Lungenobstruktion wird der Atemwegswiderstandes (Resistance [R_L]) in der Lunge während und nach der Inhalation bestimmt. Die Resistance leitet sich aus zwei Primärparametern ab, dem Atemfluss und dem transpulmonalen Druck. Die Messung des Atemflusses wird über ein Pneumotachometer, welches mit dem Trachealtubus verbunden ist und die Druckdifferenzen aufzeichnet, bestimmt. Die gemessene Druckdifferenz im Pneumotachometer ist proportional zum Atemfluss F .

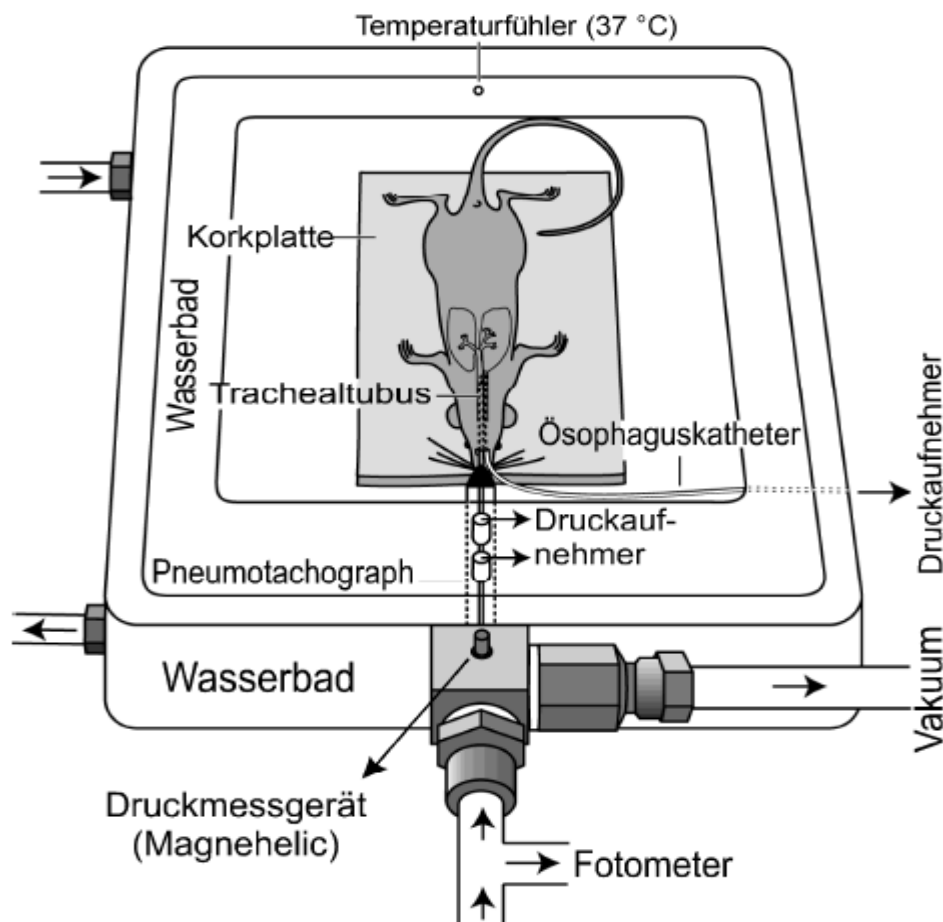


Abbildung 3: Messung im Ganzkörperplathysmographen

Der transpulmonale Druck P_{TP} wird über einen Ösophaguskatheter bestimmt.

R_L ist definiert als Quotient aus Druckdifferenz und Flussdifferenz:

$$R_L = \Delta P_{TP} / \Delta F$$

Die Bestimmung der Lungenfunktionsparameter erfolgt während der Inhalationszeit von 12 Minuten und weitere 15 Minuten danach.

2.6.5 Lungenlavage:

Nach Abtöten der Tiere durch intraperitoneale Gabe des Narkotikums Ketavet oder Narcoren werden Lunge und Luftröhre freigelegt. Eine Inzision der Trachea zwischen den Knorpelspangen ermöglicht das Einführen der per os (p.o.) Kanüle. Die Lunge wird dreimal mit je 5 ml gekühlter physiologischer Kochsalzlösung gespült, wobei die erste Spülung für die spätere Zytokinanalyse separat aufgefangen wird.

Die Anfertigung von Cytospots aus Zellen der Lavage

Nach Zusammenführen der zellulären Fraktion der Lavage wird die Zellzahl pro ml der gewonnenen Zellen im Coulter Counter bestimmt. Zur Fertigung der Zytospots werden 2×10^5 Zellen durch Zentrifugalkraft im Cytospin auf den Objektträger gebracht.

Nach Trocknung der Objektträger können die Zellen mit einem Methanol/Aceton Gemisch (2:3) fixiert werden. Die Färbung erfolgt nach Pappenheim. Hierzu werden die Objektträger zunächst 5 Minuten in May-Grünwald-Lösung eingetaucht und anschließend zwei Minuten in PBS gewaschen. Es folgt eine 15-minütige Färbung in Giemsa-Färbelösung (Giemsa Stammlösung im Verhältnis 1:20 mit Weise-Puffer verdünnt) und abschließendes Abspülen mit Aqua dest.. Nach Lufttrocknung können die Objektträger mikroskopisch ausgewertet werden.

Mikroskopische Auswertung der Cytospots

Die mikroskopische Auswertung der Zytospots erfolgt bei einer Vergrößerung von 63 x 10. Es wird die Eosinophilen-, Neutrophilen-, Makrophagen- Anzahl bestimmt. Pro Objektträger werden 300 Zellen ausgezählt. Zur Erfassung der Zelltypen wird der Leucodiff 700 Zellzähler eingesetzt.

2.6.6 Herstellung und Bewertung der Lungenschnittpräparate

Die Herstellung der Schnittpräparate wurde in der Pathologie der BayerHealthCare AG durchgeführt. Die histopathologische Beurteilung der Lungen wurde von Herrn Prof. Rosenbruch vorgenommen.

24 h nach der Applikation von Vehikel und TMA an zwei aufeinanderfolgenden Tagen erfolgt die Entnahme der Lungen. Die Lungen werden mit 10% Formalin instillationsfixiert. Nach ausreichender Fixierung werden die Lungenlappen zugeschnitten und in Paraffin eingebettet. Die Färbung erfolgt mit Hämalaun und Eosin. Die histopathologische Auswertung wird semiquantitativ unter Anwendung folgender Graduierung der Schädigung durchgeführt:

0 = keine Veränderung	3 = mittelgradig
1 = minimal	4 = hochgradig
2 = geringgradig	5 = massiv

Pro Tier werden jeweils 5 Lungenschnitte (entsprechend der Lungenlappen) bewertet und ein sog. „Lung-Inflammation-Index“ (LI I) pro Tier und für jede Versuchsgruppe (n = 5) berechnet.

2.6.7 In vitro Restimulation von Lymphozyten-, Milzzellkulturen

Herstellen der Zellsuspension von Lymphknoten und Milz

Die Organentnahme der mediastinalen Lymphknoten bzw. Milz erfolgt 24 Stunden nach der zweiten Substanzbehandlung an Tag 3. Die Organe werden bis zur Weiterverarbeitung in sterilem PBS auf Eis aufbewahrt. Zur Herstellung der Zellsuspension werden die Lymphknoten mit dem Stempel einer 1 ml Einwegspritze durch Netzeinsatz einer 12-Well Platte mit 1 ml Medium/Well PBS gedrückt. Entnommene Milzen werden ebenfalls mit dem Stempel einer 8 ml Einwegspritze durch ein Metallsieb gerieben. Die Milzzellsuspension wird in einer Petrischale mit Medium aufgefangen, zur weiteren Aufreinigung über eine Einwegfiltereinheit (200 µm) gegeben und im Probenröhrchen (15 ml Falcon) aufgefangen. Die mit Medium aufgefüllten Röhrchen werden 10 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert.

Bestimmung der Zellzahl

20 µl der jeweiligen Zellsuspension werden mit 180 µl Trypanblau (1:10 in PBS) versetzt.

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgt in einer Neubauer-Zählkammer. Es wird ein 16-er Quadrat ausgezählt. Somit entspricht die gezählte Anzahl $\times$ Verdünnungsfaktor $\times 10^4$ der Zellzahl pro ml der zu bestimmenden Probe.

Kultivierung der Zellen zur Restimulation

Pro Well einer 96-er Well-Platte werden 1×10^6 Zellen kultiviert. Die Restimulation erfolgt mit ConA (4 µg/ml), LPS (30 µg/ml) oder mit Anti-CD3-Antikörpern, mit denen die Platten zuvor beschichtet wurden (30 µg/ml). Es wird in einer 4-fach Bestimmung je ein Ansatz der *in vivo* behandelten Kontroll- und Substanztiere sowohl mit und ohne Proliferationsstimulanz als auch mit bzw. ohne der *in vivo* verwendeten Testsubstanz kultiviert. Die Konzentration der zugesetzten Substanzmenge zur Bestimmung einer spezifischen Restimulation wurde so gewählt, dass eine Viabilität von 90% nicht unterschritten wurde. Die Zellen werden für 48 h im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.6.8 Titration der Testsubstanzen zur Bestimmung des "Lowest Observed Effect Level" (LOEL) *in vivo* und *in vitro*

Der Lowest Observed Effect Level (LOEL) bezeichnet in der Toxikologie die niedrigste Dosis oder Konzentration, die einen statistisch messbaren, toxischen oder anderen Effekt auf den Organismus ausübt. Zur Bestimmung der Konzentration für die spezifische *in vitro* Restimulation von Lymphozyten wird der LOEL für die Zytotoxizität der Testsubstanzen festgelegt. Der Schwellenwert für die Substanzkonzentrationen von MDI, SDS und TMA in Zellkultur wurde auf eine Viabilität $\geq 90\%$ zur unbehandelten Kontrolle titriert. Somit kann sowohl eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit verschiedenen Testsubstanzen garantiert als auch eine Verfälschung der spezifischen proliferativen Zellantwort durch zytotoxische Effekte verhindert werden. Die Titration der Substanzen in *in vivo* Versuchen hat ebenfalls zum Ziel, einen geeigneten toxikologischen Endpunkt festzulegen, der es ermöglicht, die Testsubstanzen für weitere Versuche bei vergleichbarer Zytotoxizität

einzusetzen. Die Zellschädigung in der Lunge wurde mit dem LDH-Test quantifiziert und auf eine Induktion von Faktor 2 im Vergleich zur Kontrolle festgelegt.

In vitro

1×10^6 Zellen pro Well werden mit der Testsubstanz (MDI, SDS, TMA) in einer 4-fach Bestimmung kultiviert. Die Testsubstanzen werden jeweils mit oder ohne ConA (4 µg/ml), pro Versuchsansatz in 4 verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Nach 24 h und 48 h wird die Viabilität mittels MTT und Resazurin Test bestimmt.

In vivo

Die Lungenschädigung durch die Substanz wird je nach Versuchsprotokoll 1, 3, 6 oder 12 Stunden nach der intratrachealen Applikation mit dem LDH-Test bestimmt. Gemessen wird die durch Zellschädigung freigewordene Menge an LDH im Bronchoalveolar-Fluid. Außerdem werden die Anzahl neutrophiler Zellen und die MCP-1 Konzentration in der Lavage bestimmt.

2.6.9 Messung der Zellviabilität und -proliferation

MTT

Beim MTT-Test handelt es sich um ein kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der Zellviabilität. Dringt MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazoliumbromid) in die Zelle ein, so wird es von der in der Mitochondrienmembran befindlichen Succinat-Dehydrogenase (Teil des Citratzyklus und der Atmungskette) zu Formazan reduziert. Da nur lebende Zellen Enzymaktivität zeigen, kann die wasserstoffabhängige Konversion von gelbem MTT zu violetten Formazankristallen als Maß für die Viabilität angesehen werden. Die Messung der optischen Dichte erfolgt bei 570 und 630 nm im Spektralphotometer.

Lymphozytenkulturen

Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 300 g wird der Kulturüberstand abpipettiert und verworfen. 100 µl frisches Medium und 10 µl MTT (5mg/ml) werden in jedes Well pipettiert. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) für 4 h. Anschließend werden die Platten 2 min bei 300 g zentrifugiert. Der MTT Überstand wird vorsichtig abgenommen und es werden zur Formazanextraktion 10 µl

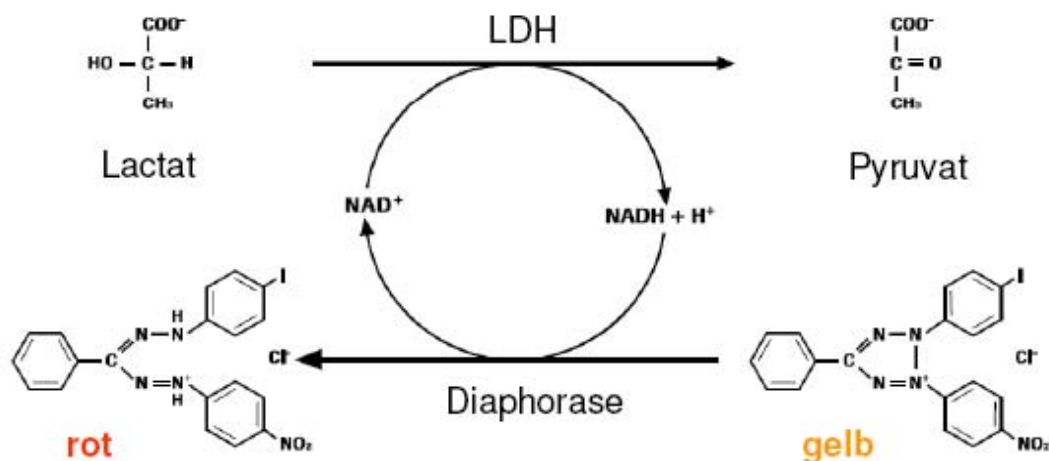
SDS (3%) und 50 µl Isopropanol pro Well hinzu pipettiert. Die Zellen werden zur Lyse und Extraktion 30 min auf dem Vertikalschüttler inkubiert. Die Messung erfolgt im Anschluss bei 570 nm und 630 nm im Photometer.

MucilAir

5 mg/ml MTT Stammlösung werden 1:10 in Kulturmedium verdünnt. Eine 24-Well Platte wird mit je 500 µl/Well MTT-Medium befüllt und die MucilAir Inserts werden nach der Inkubation auf diese übertragen. Weitere 200 µl einer 1:10 MTT/ PBS Lösung werden direkt auf die Schleimhaut pipettiert. Die Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit erfolgt für eine Stunde. Dann wird die MTT-Lösung vom Insert entfernt. Zur Formazanextraktion werden die Inserts auf eine neue 24-Well-Platte übertragen. 100 µl Lyse-Puffer (DMSO, 1% Essigsäure, 10% SDS) werden auf jedes Insert pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min werden die Zellen durch Pipettieren aufgebrochen. 400 µl Isopropanol werden den Inserts zugefügt. Je 200 µl des Formazanextraktes werden in einer Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte übertragen und die OD wird im Photometer bei 570 nm und 630 nm bestimmt.

LDH (Lactat-Dehydrogenase-Assay)

Das Testprinzip dieses Assays beruht auf der Bestimmung der Lactatdehydrogenase-Aktivität. Als Enzym der Glykolyse kommt LDH in allen Körperzellen vor. Bei Beschädigung der Zellintegrität wird LDH freigesetzt und kann somit nachgewiesen werden. Der Test macht sich die Fähigkeit des Enzyms zur Oxidoreduktion zunutze. In einem zweistufigen enzymatischen Prozess entsteht zunächst durch die Aktivität von LDH Pyruvat aus Laktat unter Reduktion von NAD⁺ zu NADH+ H⁺. Im zweiten Schritt wird das Substrat, Tetrazoliumsalz (gelb) in einer Redoxreaktion durch das Enzym Diaphorase zu Formazansalz.



Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgt mittels des Cytotoxicity Detection Kit^{Plus}. 50 µl der zellfreien Überstände der Lavage werden 1:2 mit PBS verdünnt und auf eine 96-Well-Platte aufgetragen, mit 100 µl Reaction Mix versetzt und zur enzymatischen Farbreaktion 20 min im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion werden 50 µl Stop Solution in die Wells pipettiert. Die Messung der Absorption erfolgt bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 590 nm im Photometer.

Resazurin Test

Lebende Zellen sind in der Lage, durch Reduktion den Indikatorfarbstoff Resazurin (blau) in die reduzierte Form Resorufin (rot) umzuwandeln. Die Stärke des Farbumschlages in der Zellsuspension kann sowohl photometrisch über die Absorption als auch über die Fluoreszenz bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde das TOX8 Kit (Resazurin based in vitro toxicology assay kit) von Sigma verwendet.

Die Zellen werden 2 min bei 300 g zentrifugiert, dann wird der Kulturüberstand vorsichtig abgenommen. Es folgt die Zugabe von 100 µl 10%iger Resazurininlösung in Medium. Nach dreistündiger Inkubation wird die Fluoreszenz bei 540 nm und einer Referenzwellenlänge von 590 nm bestimmt.

Berechnung der Viabilität:

Die Viabilität wird in Bezug auf die Kontrolle (Viabilität = 100%) bestimmt und wird wie folgt errechnet:

Viabilität [%] = Mittelwert ΔOD 570/630 der Testsubstanz / Mittelwert ΔOD 570/630 der Kontrolle $\times 100$

BrdU-ELISA -Messung der Zellproliferation

Bei der Kultivierung der Zellen mit 5-Bromo-2-Deoxyuridin (BrdU) wird dieses als Thymidin-Analogon bei der Replikation in die DNA eingebaut. Durch Zugabe eines peroxidase-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörpers, welcher die Umsetzung eines zugesetzten Substrates katalysiert und in einer Farbreaktion sichtbar macht, kann das Maß der Proliferation dargestellt und durch Messung im Photometer quantifiziert werden.

2.6.10 Kultivierung des 3-dimensionalen rekonstruierten humanen Schleimhautmodells MucilAir und Applikation der Testsubstanz:

Die zur Kultivierung von CellSystems® bereitgestellten 6-Well Platten werden mit je 1ml gekühltem Maintenance Medium befüllt. Die Inserts mit den Schleimhautkulturen werden mit einer Pinzette aus dem Nähragar befreit und auf die 6-Well Platte luftblasenfrei übertragen. Alle Arbeitsschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen.

Die Inkubation erfolgt bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ im Brutschrank.

Das Applikationsvolumen von Testsubstanz und Vehikel auf das Schleimhautmodell MucilAir beträgt 100 µl. Die Inkubation mit der applizierten Substanz erfolgt im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit für 2 Stunden. Nach Entfernung der Substanz durch 10-maliges Waschen mit sterilem PBS werden die Kulturen weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

2.6.11 Analyse der Zellkulturüberstände anhand der Bestimmung freigesetzten Zytokin- und Chemokinmenge mittels CBA

CBA (Cytometric Bead Array) - Analysen:

Dieses Multiplex-Verfahren lässt eine simultane Analyse unterschiedlicher Proteinpartikeln aus einer Analysequelle wie Serum oder Zellüberstand zu. Es handelt sich hierbei um ein sowohl quantitatives als auch qualitatives Verfahren. Sog. Beads sind mit Antikörpern für das zu detektierende Protein bedeckt und binden dieses. Die Unterscheidung der Spezifitäten der Beads wird durch die Markierung mit einer für das Protein definierten Fluoreszenzintensität innerhalb der Beads realisiert.

Durch Zugabe eines zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörpers, der mit dem Bead Antikörper und dem eingefangenen Protein einen Sandwich-Komplex bildet, wird eine Bestimmung der Proteinmenge ermöglicht. Die Klassifizierung der markierten Partikeln sowie deren Quantifizierung erfolgt durchflußzytometrisch über die zweidimensionale Auswertung der Fluoreszenzen. Folgende CBA-Analyse-Kits zur Untersuchung der in den Kultur-Überstand sezernierten Chemokine und Zytokine wurden verwendet:

CBA (Cytometric Bead Array)

Ratte	
Rat Cytokine 6 Plex (IL-1 α ; MCP-1; TNF α ; IFN γ ; GM-CSF; IL-4)	Bender MedSystems
Human	
Human Chemokine Kit I (IL-6, IL-8; RANTES; MCP-1; IP-10, IL-12p70)	BD Biosciences

2.6.12 Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Subpopulationen von Lymphozyten und Zellen der Lavage auf Aktivierung

Aufarbeitung der Zellen und Bestimmung der Zellzahl

Die mediastinalen Lymphknoten werden zu Zellsuspensionen weiterverarbeitet. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt im Partikelzählgerät (Coulter Counter). Hierzu werden 40 µl der Zellsuspension in 20 ml Isoton gegeben und zur Lyse der Erythrozyten mit 60 µl Zap-O-Globin versetzt.

Antikörperfärbung von Oberflächenmarkern

Pro Färbeansatz werden 5×10^5 Zellen in FACS-Röhrchen überführt und 10 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 200 µl des Färbeansatzes (PBS 0,02% Na-Acid mit Antikörper) resuspendiert. Die 15 minütige Inkubation erfolgt bei RT. Um nicht gebundene Antikörper vor der Messung zu entfernen, werden die Proben mit je 2 ml PBS Na-Acid aufgefüllt und 10 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und die Zellen zur Messung in 500 µl FACSFlow resuspendiert. Folgende Antikörperfärbungen wurden vorgenommen:

PE	FITC	Zelltyp
CD4	CD8	T-Helfer vs cytotox. T-Zellen
CD4	CD25	Aktivierte T-Zellen, regulatorische T-Zellen
CD4	CD45	Aktivierte T-Zellen
CD4	CD28	Costimulation
CD11bc	MHC II	Antigenpräsentation
CD80/86	CD11bc	Costimulation

3. ERGEBNISSE

3.1. Der lokale Lymphknotentest an der Brown Norway Ratte

Der lokale Lymphknotentest (Local Lymph Node Assay; LLNA) ist ein für die Maus validiertes Testverfahren zur Bestimmung des sensibilisierenden Potentials von Substanzen auf der Haut. In der vorliegenden Arbeit wurde das Prinzip dieser Methode auf die Brown Norway Ratte übertragen. Die Bestimmung der Ohrdicke erfolgte am Tag 4, die Entnahme der aurikulären Lymphknoten und die Bestimmung der Zellzahl am Tag 5. Die Berechnung des DI, wie sie im LLNA bei der Maus durchgeführt wird, kann hier nicht erhoben werden, da notwendige Angaben zur Berechnung, wie etwa die maximal erreichbare Ohrdicke und die maximal erreichbare Zellzahl, für diese Spezies nicht validiert sind. Daher werden in Abbildung 4 die Indices für Ohrdicke und Zellzahl in Zusammenhang gebracht.

Die Abbildung 4 zeigt, dass bei den drei verwendeten sensibilisierenden Substanzen Benzoquinon, 4-4'-Methylenbis(phenylisocyanat) (MDI) und Trimellithsäureanhydrid (TMA) die Erhöhung der Zellzahl relativ größer ist als die Zunahme der Ohrdicken, während es sich bei der

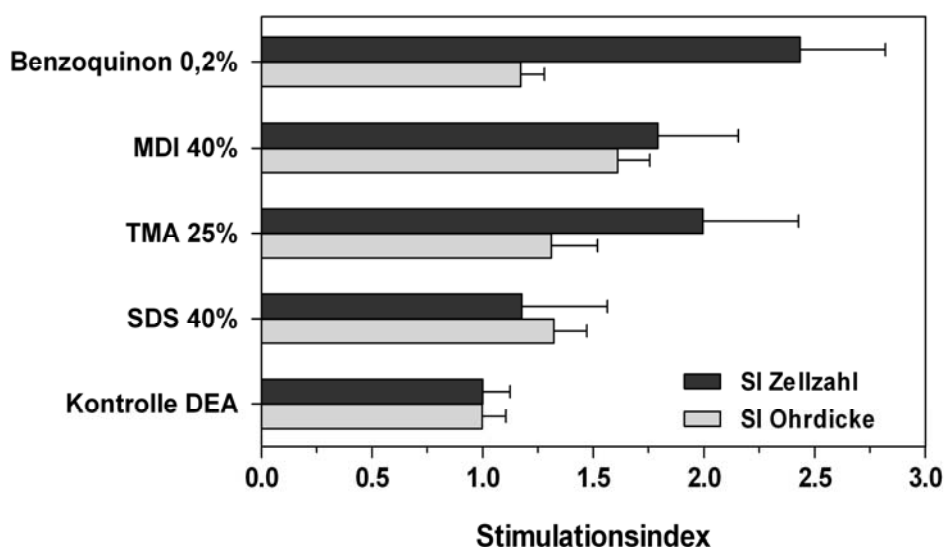


Abbildung 4: Lokaler Lymphknotentest an der Brown Norway Ratte. Bestimmung der Stimulationsindices (SI). Nach der Behandlung an drei aufeinanderfolgenden Tagen wurde an Tag 4 die Ohrdicke bestimmt. An Tag 5 erfolgte die Entnahme der aurikulären Lymphknoten zur Bestimmung der Zellzahl. Die Ergebnisse sind angegeben als das n-fache der Kontrolle (Stimulationsindex).

irritierenden Substanz SDS umgekehrt verhält: Dort nimmt die Ohrdicke relativ stärker zu als die Zellzahl. Die stärkste Zunahme der Zellzahl mit fast 150% (Index = 2,5) bewirkt die sensibilisierende Substanz Benzoquinon während die Ohrdicke nur um etwa 20% (Index = 1,2) im Vergleich zur Kontrolle zunimmt. Beim Vergleich TMA- und MDI- behandelte Tiere ergibt sich für MDI mit einem Index von 1,6 für die Ohrdickenzunahme ein deutlich stärkeres irritatives Reaktionspotential als für TMA mit einem Index von 1,3. Das relativ stärker sensibilisierende Potential wird dagegen bei TMA ermittelt mit einem Zellzahlindex von 2 gegenüber 1,8 für MDI. Bei der Applikation von SDS, einem Standardirritanten, ist die Ohrdickenzunahme stärker als die Zunahme der Zellzahl. Mit einem Zellzahlindex von 1,2 liegt der Wert mit 20% nur geringfügig über der Kontrolle. Die Zunahme der Ohrdicke hat einen Index von 1,35. Die lokale Reaktion am Ohr der Ratte ist bei der reizenden Substanz SDS verhältnismäßig stärker ausgeprägt als die Zunahme der Zellzahl im Lymphknoten. Damit entsprechen diese Ergebnisse an der Ratte im Prinzip den Befunden, wie sie für Mäuse beschrieben wurden.

3.2. *Der lungenhistologische Befund nach intratrachealer Applikation*

Die Instillation von Stoffen durch intratrachealer Verabreichung stellt zwar eine weit verbreitete Methode der Substanzapplikation *in vivo* dar, findet jedoch als exklusive Behandlungsweise bei der toxikologischen Bewertung des experimentellen Asthmas bisher keine Anwendung. Um die Eignung dieser Applikationsart zur Induktion des Asthma bronchiale bezüglich der Substanzverteilung in den Lungenlappen zu untersuchen, aber zugleich auch das Maß der Schädigung durch die Testsubstanz TMA zu bestimmen, wurden die Lungen der Ratten nach zweimaliger intratrachealer Behandlung mit 0,6% TMA histologisch untersucht. Die Abbildung 5 gibt das Maß der Schädigung in den einzelnen Lungenlappen für die Gruppe der Vehikel- und TMA-behandelten Ratten an. In den gesamten fünf *lobi* zeigt sich eine Zunahme der Schleimhautschädigung und der entzündlichen Reaktion durch die Testsubstanz. Am geringfügigsten ist der Unterschied in der Schädigung beim *lobus cranialis dexter*. Die durchschnittliche substanzabhängige Veränderung im Vergleich zur Kontrolle beträgt hier nur 13%. Die entzündliche Schädigung des *lobus accessorius* und des *lobus*

caudalis dexter liegt bei einer Erhöhung von 40% im Vergleich zur Kontrolle. Die stärkste Gewebeschädigung wurde mit einer Erhöhung um 60% bei den Lungenlappen *l. sinister* und *l. medius* festgestellt. Die zugrunde liegende histopathologische Graduierungsskala bewertet den mikroskopischen Befund zwischen 2 und 3 als geringe bis mittelgradige Veränderung. Dies trifft für die *Lobi sinister*, *caudalis dexter* und *medius* zu. Für den *lobus cranialis dexter* wurde eine minimale bis geringgradige und für den *lobus accessorius* eine geringgradige Schädigung festgestellt.

Auch die Kontrolltiere weisen eine minimale bis geringgradige Schädigung der fünf Lungenlappen auf. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die intratracheale Behandlung mit TMA an zwei aufeinanderfolgenden Tagen insgesamt zu einer geringen bis mittelgradigen Schädigungen der Lunge führt (siehe Abbildung 5 und 6) die sich signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden und konzentrationsabhängig nachweisbar sind. Außerdem wurde gezeigt, dass die Testsubstanz durch intratracheale Applikation jedem Lungenlappen zugänglich ist.

Die lungenhistologischen Untersuchungen umfassen die Bewertung verschiedenen Gewebeveränderungen wie die Schädigung des Epithels, die Infiltration von Makrophagen, eosinophilen- und neutrophilen- und T-Zellen sowie histopathologische Veränderungen, denen die Verdickung des Epithels und das Entstehen von Riesenzellen

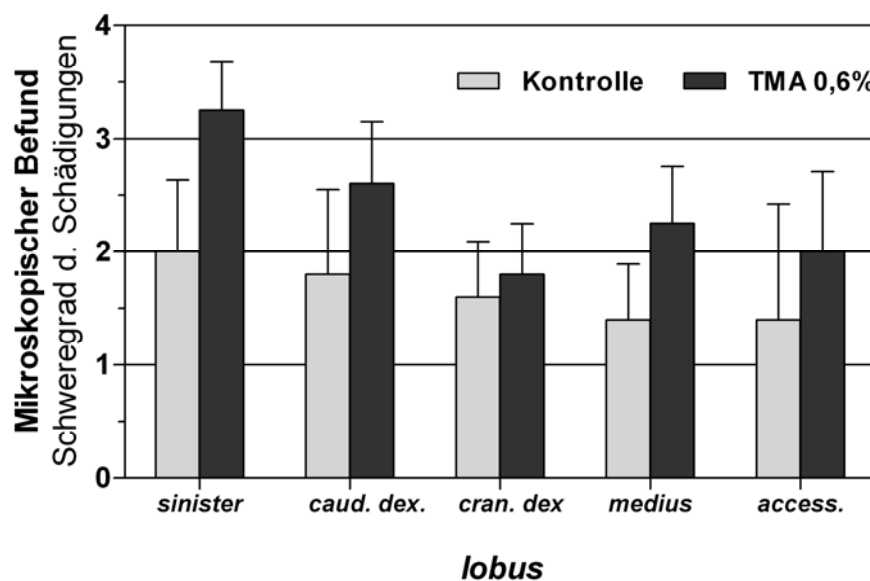


Abbildung 5: Histopathologische Bewertung der Lungenschädigung nach TMA Behandlung. Lungenhistologischer Befund nach Applikation von 100µl Vehikel (Aceton 5% in PBS) und 0,6% TMA an zwei aufeinander folgenden Tagen. An Tag 3 wurden die Lungen zur Untersuchung in Formalin fixiert. Zur mikroskopischen Bewertung wurden die Lungenschnitte mit Hämalaun und Eosin gefärbt. Versuchstiere n = 5.

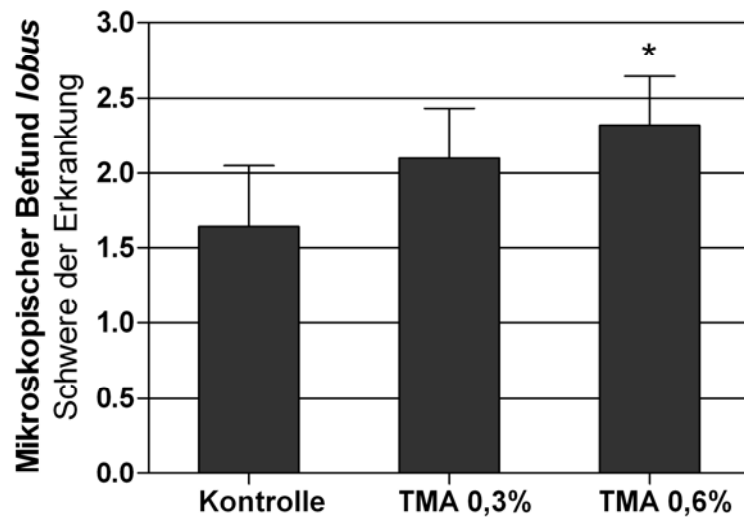


Abbildung 6: Dosisabhängige Schädigung der Lunge nach zweitägiger intratrachealer Behandlung. Semiquantitative, histopathologische Bewertung von mit Hämalaun und Eosin gefärbten Schnittpräparaten. (n = 5). Lungenhistologischer Befund nach Applikation von 100 µl Vehikel (Aceton 5% in PBS) und 0,6% TMA an zwei aufeinander folgenden Tagen. An Tag 3 wurden die Lungen entnommen. * = p < 0,05.

zuzuordnen sind.

Die lungenhistologischen Befunde sind beispielhaft in Abbildung 7A/B dargestellt. Im Kontrolltier (Abbildung 7A) ist der überwiegende Teil histologisch unauffällig. Die mit 1) gekennzeichnete Fläche zeigt eine Akkumulation von Lymphozyten, zu der, wie eingangs erwähnt, auch unbehandelte Brown Norway Ratten neigen. Infolge einer spontanen entzündlichen Reaktion in der Lunge.

Nach TMA-Behandlung (Abbildung 7B) sind weitere Kennzeichen einer entzündlichen Veränderung sichtbar. Hierzu gehören die Verdickung des Epithels (1), die Infiltration von Eosinophilen (2) und die Bildung von Riesenzellen. Einige Merkmale werden zwar auch im Kontrolltier gefunden, aber die Häufigkeit und Ausbreitung ist jedoch wesentlich geringer als im substanzexponierten Tier.

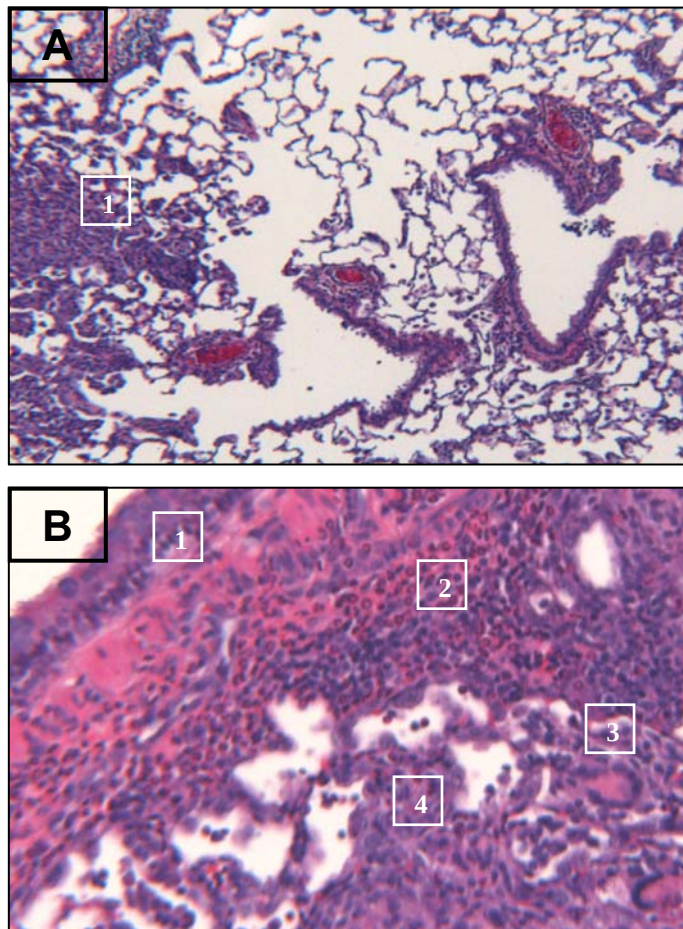


Abbildung 7: Histologische Hämalaun und Eosin gefärbte Schnittpräparate der Brown Norway Lunge nach intratrachealer Applikation von Vehikel und TMA 0,6% an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. A) Kontrolltier 1: Lymphozyten B) TMA-behandeltes Tier 1: erhöhtes Epithel. 2: Eosinophile 3: Riesenzelle 4: Lymphozyten

3.3. *Brown Norway versus Wistar - zwei Rattenstämme im Vergleich.*

Die unterschiedliche Eignung verschiedener Rattenstämme für spezielle Versuchsvorhaben ist bekannt. Zum einen kann die historische Datenlage ein Kriterium für die Wahl eines bestimmten Tierstammes sein, zum anderen können aber auch die zugrunde liegenden genetischen oder physiologischen Unterschiede verschiedene Tierstämme besonders geeignet für spezifische experimentelle Fragestellungen machen. In der nachfolgenden Tabelle wurden die Ergebnisse aus Vergleichstudien mit dem Rattenstamm Brown Norway (BN) und Wistar (WU) zusammengefasst.

Neutrophile		Kontrolle		TMA 0,3%	
		Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
BN	d3	0,2	0,2	34,0	17,0
	d4	0,2	0,2	19,3	6,3
WU	d3	2,8	1,1	28,5	14,0
	d4	0,7	0,2	5,6	5,7
Eosinophile		Kontrolle		TMA 0,3%	
		Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
BN	d3	0,5	0,5	10,4	0,3
	d4	1,7	3,5	16,9	8,9
WU	d3	0,0	0,0	0,0	0,0
	d4	0,3	0,2	0,7	0,9
MCP-1		Kontrolle		TMA 0,3%	
		Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
BN	d3	61,9	14	1909,0	572
	d4	102,7	18	1505,4	566
WU	d3	9,4	2,7	699,2	220
	d4	18,4	9,9	119,9	64

Tabelle 1: Vergleich der Neutrophilen- und Eosinophilenanteile [% Lavage], sowie der MCP-1 Ausschüttung [pg/ml] in der bronchoalveolaren Lavage der Rattenstämme Brown Norway [BN] und Wistar [WU]. Nach zweimaliger intratrachealer Applikation an Tag 1 und Tag 2 wird je eine Kontroll- und TMA-Gruppe (n = 3) an Tag 3 (d3) und Tag 4 (d4) lavagiert.

Nach zweimaliger intratrachealer Behandlung der Tiere mit 0,3% TMA an den Versuchstagen 1 und 2 wurde der prozentuale Neutrophilen - und Eosinophilenanteil in der Lavage ausgezählt sowie der Gehalt verschiedener Zytokine (MultiPlex) in der Lavage ermittelt.

Die Bestimmung der Neutrophilen an Tag 3 zeigt für beide Tierstämme mit 28% (WU) und 34% (BN) eine starke Zunahme dieser Zellpopulation, die an Tag 4 rückläufig ist. Wistar Ratten weisen an Tag 4 nur noch 5,6%, Brown Norway Ratten hingegen noch fast 20% Neutrophile in der Lavage auf. Die Kontrollgruppen zeigen mit Werten $< 3\%$ keine vehikelbedingte oder stammspezifische Neutrophilie.

Im Vergleich zu den Neutrophilen, die am Tag 3 verstärkt in der Lunge auftreten, verhält es sich bei den Eosinophilen im Stamm Brown Norway umgekehrt: Am Tag 3 ist mit 10% ein deutlicher Anstieg im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Die Infiltration von Eosinophilen erreicht aber am Tag 4, 48 Stunden nach der zweiten Applikation, einen höheren Wert mit 15% Eosinophilen in der Lavage. Eine Induktion von Eosinophilen bleibt beim Stamm Wistar vollständig aus. Es können am Tag 3 und Tag 4 keine Eosinophilen in der Lavage nachgewiesen werden. In den Kontrolltieren konnte mit Werten $< 3\%$ kein eosinophiler Hintergrund festgestellt werden. Erfahrungen mit dem Rattenstamm Brown Norway zeigen, dass die Neigung zu einer latenten eosinophilen Entzündung vorhanden ist (Daten nicht gezeigt).

Die Bestimmung des Monocyte Chemoattractant Protein-1-Gehalts (MCP-1) in der Lavageflüssigkeit zeigt im Brown Norway Stamm ein erhöhtes Niveau von MCP-1 von 60 pg/ml und 100 pg/ml in den Kontrolltieren im Vergleich zu den Wistar Ratten, die MCP-1-Werte < 20 pg/ml aufweisen. Die Induktion von MCP-1 nach TMA Applikation führt in den Brown Norway Ratten zu einem drastischen Anstieg auf 1900 pg/ml am Tag 3 und 1500 pg/ml am Tag 4. Die Wistar Ratten reagieren ebenfalls mit einem starken Anstieg der gemessenen MCP-1 Konzentration, die am Tag 3 bei 700 pg/ml und am Tag 4 nur noch bei 120 pg/ml liegt. Ähnlich wie die Ergebnisse der Neutrophilen zeigt sich auch bei MCP-1 eine starke Zunahme am Tag 3, die am Tag 4 rückläufig ist. Bei Wistar Ratten ist jedoch die verhältnismäßige Induktion von MCP-1 am Tag 3 weniger stark ausgeprägt als bei den Brown Norway Ratten, die Abnahme von Tag 3 auf Tag 4 hingegen größer.

Die Brown Norway Ratten reagieren demnach insgesamt mit einer stärkeren Induktion von Entzündungsparametern wie MCP-1 und Neutrophilen. Darüber hinaus zeigen sie

auch die asthmaassoziierte Infiltration von Eosinophilen in die Lunge, die bei Wistar Ratten vollkommen ausbleibt. Ein entzündliches Grundmilieu scheint bei Brown Norway Ratten in der Lunge gegeben zu sein, was zu einer erhöhten Grundpotenz der Expression entzündlicher und asthmaassoziiierter Parameter führt. Diese Tatsache macht den Brown Norway Rattenstamm für die in der Arbeit durchgeführten Experiment zu einem vielversprechenden Tiermodell.

3.4. Der lokale Lymphknotentest - Ereignisse in der Lunge und im Lymphknoten nach intratrachealer TMA-Applikation.

Das Prinzip des LLNA zur Untersuchung der Kontaktallergie, einer TYP IV Reaktionen, wird an dieser Stelle hinsichtlich der Unterteilung lokaler entzündlicher Prozesse und spezifischer sensibilisierender Ereignisse aufgegriffen und an der Ratte nach intratrachealer Behandlung und Auslösung einer TYP I Reaktion untersucht.

Das Kurzzeitmodell zur Induktion des Asthma bronchiale mit zwei Behandlungs- und zwei Sektionstagen soll es ermöglichen, einerseits Parameter zu bestimmen, die das Ausmaß der entzündlichen Reaktion an der Schleimhaut charakterisieren, andererseits aber auch Ereignisse im Zusammenhang mit einer spezifischen Immunantwort - sprich Sensibilisierung - darzustellen.

Am Applikationsort stattfindende inflammatorische Prozesse können nicht, wie im LLNA, über äußerliche Endpunkte wie der Messung der Ohrdicke oder der visuellen Begutachtung der Haut (Guinea Pig Maximisation Test, Bühler) erhoben werden. Stattdessen müssen sie direkt in der Lunge evaluiert werden. Die Proteinanalyse verschiedener Zyto- und Chemokine im bronchoalveolar Fluid oder in der zellulären Fraktion der Lavage dient hier als Methode, um näheren Aufschluss über eine Beteiligung dieser Immunmodulatoren an den entzündlichen Prozessen oder aber einer spezifischen T_H-2 Antwort zu erhalten. MCP-1 und IL-1 α scheinen eine bedeutende Funktion für entzündliche Prozesse zu übernehmen.

Auf zellulärer Ebene werden in den folgenden Versuchen die Infiltration von Neutrophilen als Indikator der Entzündung sowie die Infiltration von Eosinophilen im Zusammenhang mit Asthma bronchiale genauer untersucht. Die spezifische Reaktion im Lymphknoten als Merkmal einer Sensibilisierung wird über die Charakterisierung von Lymphozytensubpopulationen im FACS näher analysiert. Andere Parameter, wie das Lymphknotengewicht und die Zellzahl werden ebenfalls bestimmt.

3.4.1 Ereignisse im Lymphknoten - Gewicht und Zellzahl

Nach intratrachealer Behandlung der Versuchstiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit der lungensensibilisierenden Substanz TMA werden die lungendrainierenden Lymphknoten entnommen und deren Zellzahl und das Gewicht bestimmt.

Abbildung 8a stellt das durchschnittliche Lymphknotengewicht der Kontrollgruppe und der mit 0,3% TMA behandelten Gruppe an den Versuchstagen Tag 3 und Tag 4 dar. An beiden Tagen zeigt sich eine deutliche Erhöhung des Lymphknotengewichts. Das durchschnittliche Gewicht der Lymphknoten der Kontrollgruppen liegt an beiden Tagen bei 8,3 mg. Am Tag 3 wurde für die TMA-Gruppe ein mittleres Gewicht von 12,8 mg gemessen, am Tag 4 durchschnittlich 13,8 mg. Mit einer Zunahme um 50% am Tag 3 und 70% am Tag 4 wird eine deutliche Erhöhung des Lymphknotengewichts durch die Behandlung mit TMA induziert.

Die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung in Abbildung 8b zeigen die gleiche Tendenz. Die mittlere Zellzahl der Kontrolltiere am Tag 3 beträgt $6,7 \times 10^6$ Zellen/ml und am Tag 4 $8,2 \times 10^6$ Zellen/ml. Für die TMA behandelten Tiere ergibt die Messung $12,1 \times 10^6$ und $14,9 \times 10^6$ Zellen/ml, was einer Erhöhung um 80% im Vergleich zur Kontrolle entspricht.

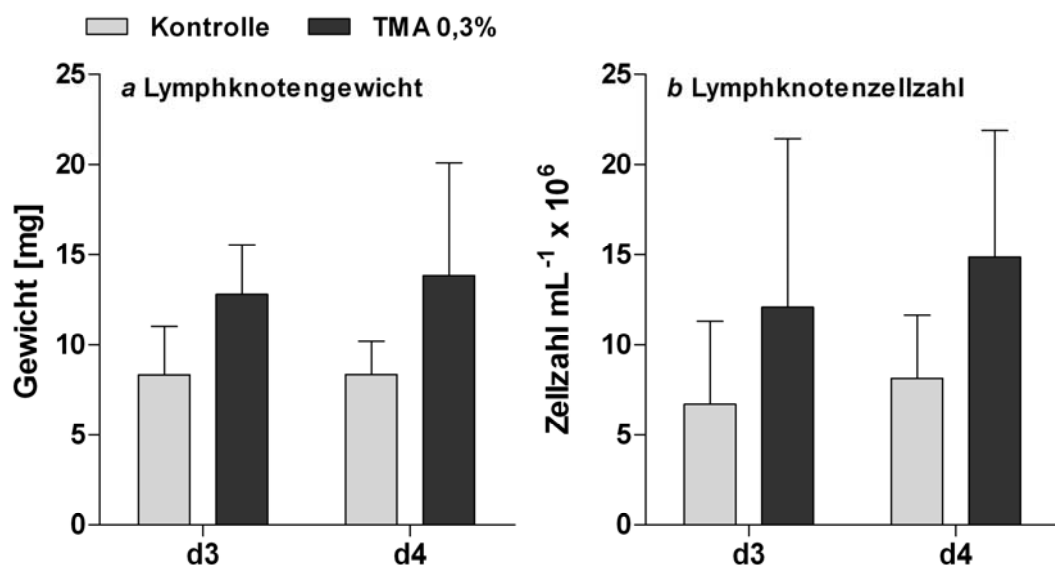


Abbildung 8: Bestimmung von Gewicht und Zellzahl der Lymphknoten nach zweimaliger intratrachealer Behandlung mit 0,3 % TMA. An Tag 3 und Tag 4 wurden die lungendrainierenden Lymphknoten von Brown Norway Ratten (n = 3) entnommen und Gewicht und Zellzahl bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Versuchen.

3.4.2 Durchflusszytometrische Analysen

Die Induktion einer spezifischen Immunantwort, die schließlich zu einer Sensibilisierung führt, findet bei lokalen Reaktionen zwangsläufig zu einem bestimmten Zeitpunkt im Lymphknoten statt. Die Aktivierung spezifischer Immunreaktionen kann über die Klassifizierung verschiedener Lymphozyten-Subpopulationen im FACS näher untersucht werden. Andere Veränderungen in den Lymphozyten, wie die Expression costimulatorischer Moleküle oder anderer Aktivierungsmarker wie MHC II oder CD45, werden ebenfalls bestimmt.

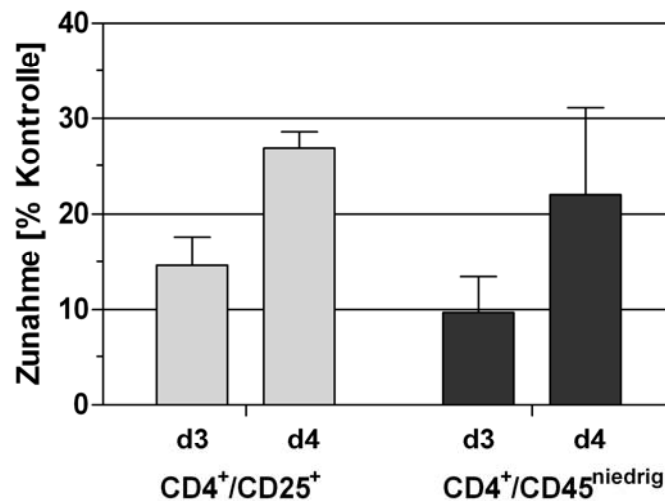


Abbildung 9: Zunahme [%] an CD4⁺/CD25⁺ und CD4⁺/CD45^{niedrig} Lymphozyten nach zweimaliger intratrachealer Applikation von 0,3% TMA im Vergleich zur Kontrollgruppe. An Tag 3 und Tag 4 wurden die lungendrainierenden Lymphknoten je einer Kontroll- und TMA-Gruppe (n = 3) entnommen und im FACS analysiert. Die Ergebnisse stammen vier unabhängigen Versuchen.

In Abbildung 9 ist die Expression von CD4⁺/CD25⁺ und CD4⁺/CD45^{niedrig} T-Zellen dargestellt. CD4⁺/CD45^{niedrig} exprimierende Zellen sind ein Kennzeichen für eine T-Zell-Aktivierung. CD4⁺/CD25⁺-regulatorische T-Zellen (T_{regs}) stehen im Zusammenhang mit der Regulation der Immunantwort. Das Diagramm stellt die prozentuale Erhöhung der CD4⁺/CD25⁺ und CD4⁺/CD45^{niedrig} T-Zellen dar. Für beide Lymphozyten-Subpopulationen liegt am Tag 3 eine geringere Zunahme im Vergleich zur Kontrolle vor als am Tag 4. Bei den CD4⁺/CD25⁺ Zellen zeigt sich eine Zunahme von 14,5% auf 27%. Die Expression von CD4⁺/CD45^{niedrig} Zellen ist am Tag 3 10% stärker als in der Kontrollgruppe, am Tag 4 wird eine Zunahme von 22% bestimmt.

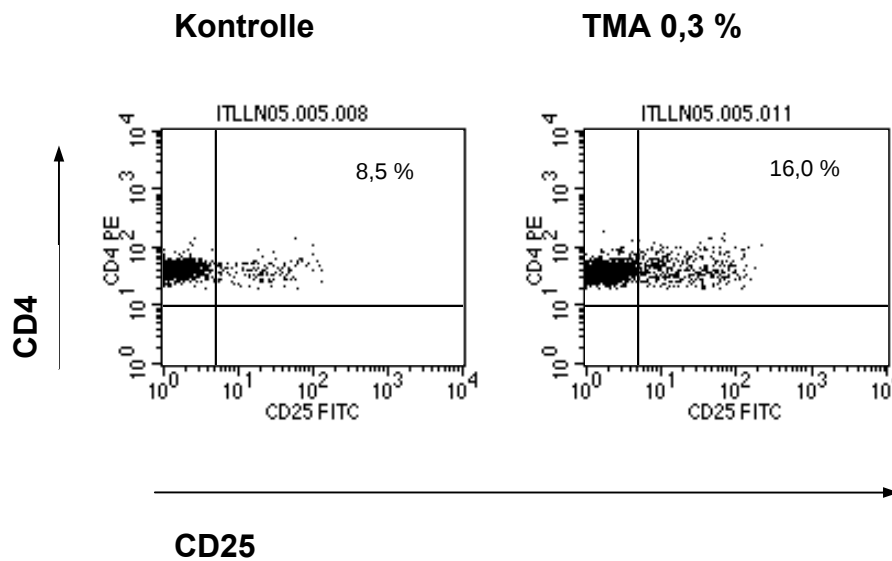


Abbildung 10: Dotplot der FACS-Analyse von CD4^{PE} und CD25^{FITC} gefärbten Lymphozyten am Tag 4 nach intratrachealer Behandlung von Brown Norway Ratten mit Vehikel und TMA 0,3 % an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Der Dotplot links zeigt das Ergebnis eines Vehikel- behandelten Tieres, rechts eines TMA 0,3% behandelten Tieres. gated auf CD4⁺

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen liegen in einem nicht aktivierten Lymphknoten in einem definierten Verhältnis vor. Bestimmte Erkrankungen oder Immunreaktionen führen dazu, dass sich das Verhältnis dieser beiden Subpopulationen verschiebt. In Abbildung 11 ist das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen an Tag 3 und Tag 4 nach zweimaliger intratrachealer Behandlung dargestellt. Ein markanter Unterschied zeigt sich zwischen den beiden Rattenstämmen Wistar (WU) und Brown Norway (BN). Das Verhältnis bei Wistar Ratten liegt sowohl bei den Kontrollen als auch bei den TMA behandelten Tieren bei 2,4, dies entspricht etwa 50% CD4⁺ und 20% CD8⁺ T-Zellen im FACS (Daten nicht angegeben). Es zeigt sich darüber hinaus keine Veränderung durch die TMA Behandlung. In den Brown Norway Ratten hingegen ist das CD4/CD8 Verhältnis wesentlich größer. Die Kontrollgruppen haben einen Quotienten von 12 bis 13 an Tag 3 und Tag 4. Das Verhältnis entspricht etwa 60% CD4⁺ und 5% CD8⁺ T-Zellen in der FACS-Analyse (Daten nicht gezeigt). Außerdem zeigen die Brown Norway Ratten eine TMA-induzierte Erhöhung des Verhältnisses auf 15. Dies bedeutet eine Zunahme der CD4⁺ Zellpopulation. Wie schon in Tabelle 2 gezeigt, reagieren die Brown Norway Ratten stärker auf eine Substanzapplikation als Wistar Ratten. Grundsätzlich zeigt sich durch das Verhältnis von CD4/CD8 zugunsten von CD4 eine T_H-2-lastige Reaktionstendenz des Immunsystems.

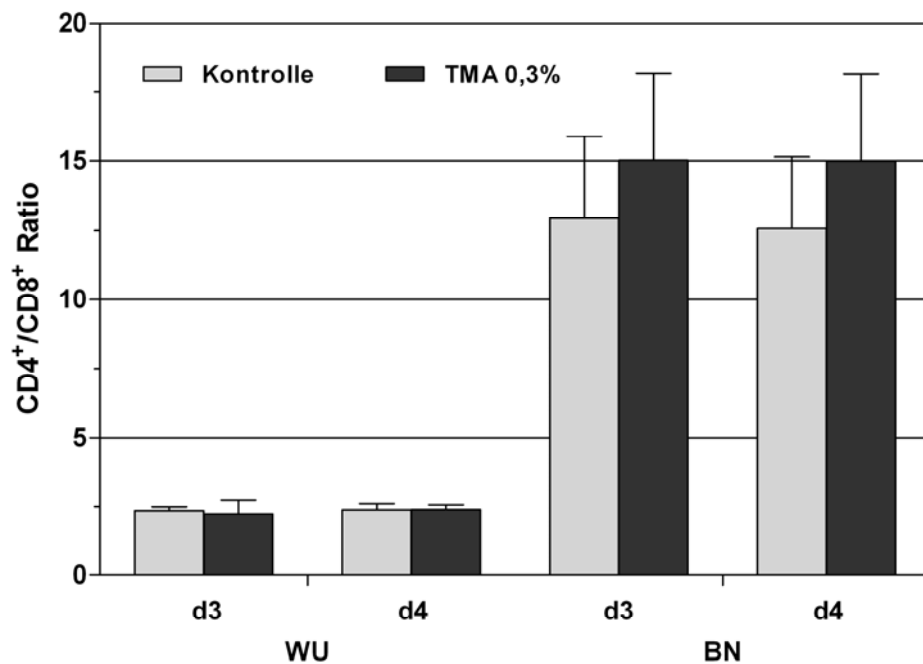


Abbildung 11: Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ Lymphozyten am Tag 3 und Tag 4 nach zweimaliger intratrachealer Behandlung mit Vehikel und TMA 0,3 %. Untersucht wurden die Rattenstämme Wistar (WU) und Brown Norway (BN). Lymphozyten der lungendrainierenden Lymphknoten je einer Kontroll- und TMA-Gruppe (n = 3) wurden im FACS analysiert. Die Ergebnisse wurden aus vier unabhängigen Versuchen bestimmt.

3.4.3 Ereignisse in der Lunge – Untersuchungen des Bronchoalveolar-Fluids

Die Analyse der Zellen aus der Lavage im FACS ist in Abbildung 12 dargestellt. Untersucht wird die Infiltration von Lymphozyten (CD4⁺/CD8⁺), Monozyten, Makrophagen und antigenpräsentierenden Zellen (APC) (CD11bc sowie die Expression von MHC II (RT1-B)) und regulatorischen T-Zellen (CD4⁺/CD25⁺). In der CD4/CD8 Färbung zeigt sich durch TMA Behandlung eine Zunahme an CD4⁺ T-Zellen in der Lunge. Am Tag 3 steigt der Prozentsatz an CD4⁺ T-Zellen von 26 auf 31%, am Tag 4 von 22 auf 34%. Die Infiltration von Monozyten, Makrophagen und APCs nimmt ebenfalls nach TMA Behandlung im Vergleich zur Kontrolle zu. Am Tag 3 steigt der Anteil der CD11bc⁺ Population von 11% um 16% auf 27% zu. Am Tag 4 wird eine Erhöhung von 6% um 11% auf 17% gemessen. Die Induktion von MHC II (RT1-B) als Merkmal aktivierter APC ist nicht gegeben.

Ebenfalls in vermehrtem Maße treten CD4⁺/CD25⁺ Zellen nach TMA Applikation auf. Am Tag 3 steigt der Anteil von 17 % auf 27 %, am Tag 4 von 18 % auf 25 %.

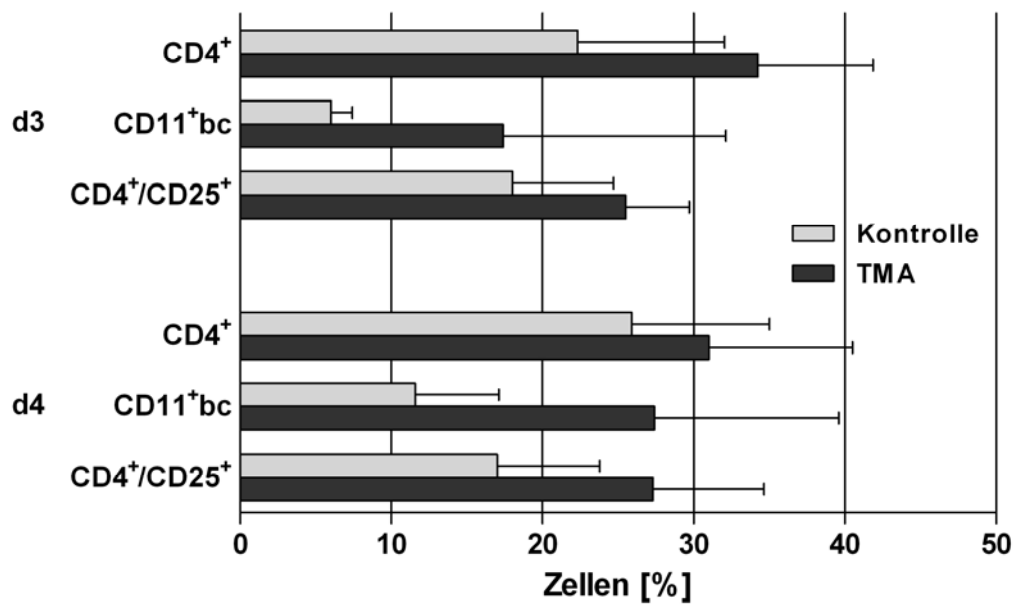


Abbildung 12: Analyse von CD4/CD25, CD11bc/RT1B (MHCII) und CD4/CD8 gefärbten Zellen aus der bronchoalveolar Lavage am Tag 3 und Tag 4 nach intratrachealer Behandlung von Brown Norway Ratten (n = 5) mit Vehikel und TMA 0,3 % an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Die dargestellten Ergebnisse ergeben sich aus fünf unabhängigen Versuchen.

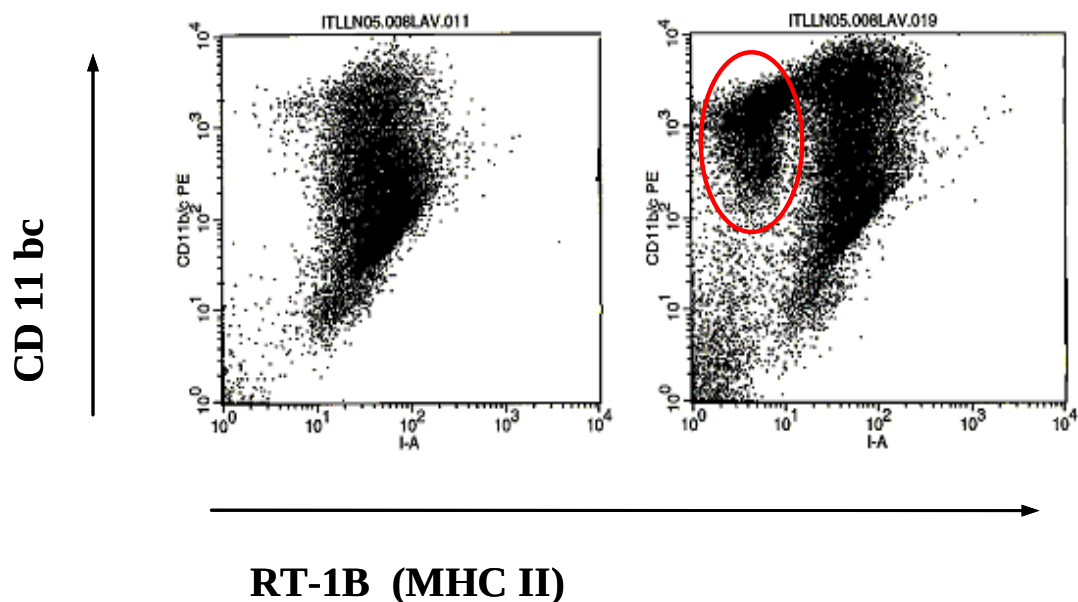


Abbildung 13: Dotplot der Facs-Analyse von CD11bc^{PE} und RT-1B^{FITC} (MHC II) gefärbten Zellen der Bronchoalveolaren Lavage am Tag 3 nach intratrachealer Behandlung von Brown Norway Ratten mit Vehikel und TMA 0,3 % an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Der Dotplot links zeigt das Ergebnis eines Vehikel-behandelten Tieres, rechts eines TMA 0,3%-behandelten Tieres.

In Tabelle 2 sind die durchgeführten FACS-Färbungen mit Angaben des jeweiligen Zelltyps angegeben, der generell oder hinsichtlich seines Aktivierungszustandes untersucht wurde. Die Induktion der Oberflächenmarker oder die Infiltration eines Zelltyps ist für Lunge und Lymphknoten nach TMA-Behandlung dargestellt.

CD4⁺/CD45^{niedrig} Zellen konnten im Lymphknoten nach TMA-Applikation gemessen werden, in der Lunge konnten jedoch keine Effektorzellen mit diesem Aktivierungsmerkmal nachgewiesen werden. CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen hingegen werden vermehrt an beiden Reaktionsorten nach TMA-Applikation gefunden: Lokal in der Lunge und in den drainierenden Lymphknoten. Auch die CD4⁺ Population nimmt in der Lunge und in den Lymphknoten nach Behandlung zu. CD11bc⁺ Zellen werden gering bis mittelstark induziert. Eine Erhöhung der MHC Expression auf diesem Zelltyp ist jedoch nicht oder nur teilweise als Aktivierungsmarker nachzuweisen. Die costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen wurden weder im Lymphknoten noch in der Lunge bestimmt. Das costimulatorische Molekül CD28 auf T-Zellen wird nach TMA-Behandlung ebenfalls nicht vermehrt auf Zelloberflächen nachgewiesen. Die Aktivierung von Lymphozyten in der Lunge und im Lymphknoten kann über einige Parameter wie CD4/CD25, CD4/CD45^{niedrig} CD4/CD8 nachgewiesen werden. Die Induktion von Parametern, die jedoch bei der APC-T-Zell-Interaktion bei der Antigenpräsentation und beim Lymphozytenpriming eine entscheidende Rolle spielen, konnte in diesen Versuchen nicht nachgewiesen werden.

Zelltyp/Funktion	Färbung	Induktion: Lunge	Induktion: Lymphknoten
Aktivierte T-Zellen	CD4/ CD45	-	+ / ++
Aktivierte T-Zellen	CD4/ CD25	+	+
T-Helfer vs. zytotox. T-Zelle	CD4/ CD8	CD4 +/++	CD4 +/++
Antigenpräsentation	CD11bc/ MHC II	++/-	+/-
Aktivierte T-Zelle/ Costimulation	CD11bc/ CD80 CD86	-	-
Aktivierte T-Zelle/ Costimulation	CD4/ CD28	-	-

Tabelle 2: Zusammenfassung der durchgeführten FACS-Analysen mit Angaben zur Nachweisbarkeit der aufgeführten Oberflächenmarker auf lungendrainierenden und BALF-Lymphozyten. Analyse an Tag 3 und Tag 4 nach in vivo Behandlung mit TMA 0,3%. Induktion +++ stark; ++ mittel; + geringfügig; +/- teilweise; - keine. Durchführung siehe Material Methoden, Kurzzeitprotokoll.

3.5. *Die zytotoxische Reaktion in der Lunge – Vergleich der Testsubstanzen Trimellithanhydrid (TMA), Methylen Diisocyanat (MDI) und Sodium Dodecylsulfat (SDS)*

Das Zusammenspiel irritativer und sensibilisierender Substanzeigenschaften kann für die toxikologische Bewertung aufgrund der Differenzierungsproblematik eine Erschwernis darstellen. Um zu verhindern, dass mögliche irritative und zytotoxische Effekte die Messparameter einer Sensibilisierung überlagern, wurde die TMA-Konzentration in allen bisherigen Experimenten im minimal irritativen Bereich gewählt. Die Vergleichbarkeit von unterschiedlichen Substanzen kann hergestellt werden, indem Konzentrationen eingesetzt werden, die für alle Substanzen gleich starke zytotoxische Effekte hervorrufen. Die irritierende Substanz Sodiumdodecylsulfat (SDS), sowie Methylen-diisocyanat (MDI) und Trimellithanhydrid (TMA), beides allergene Substanzen, werden hier auf ihre zytotoxischen Effekte *in vivo* untersucht. Die direkte Schädigung der Zellintegrität wird mit Hilfe des Lactatdehydrogenasetests (LDH) quantifiziert. Ziel der Titration ist es, den geeigneten Zeitpunkt zur Bestimmung der Zytotoxizität festzulegen und eine Schädigung, gemessen am LDH-Wert, von Faktor 2 zu erzielen.

3.5.1 Die zeitabhängige zytotoxische Reaktion am Beispiel TMA

Die Bestimmung der LDH-Freisetzung durch Zellschädigung in der Lunge nach Behandlung mit 1% TMA zeigt eine kontinuierliche Zunahme der LDH-Menge [OD 450/570] im Vergleich zur Kontrolle nach einer, drei und sechs Stunden (siehe Abbildung 14). Die prozentuale Erhöhung bezogen auf die Kontrolle beträgt nach einer Stunde 30%, nach drei Stunden 45% und nach sechs Stunden 120%. 12 Stunden nach Applikation ergibt sich keine weitere Erhöhung, die Zunahme, bezogen auf die Kontrolle, beträgt ebenfalls 120%.

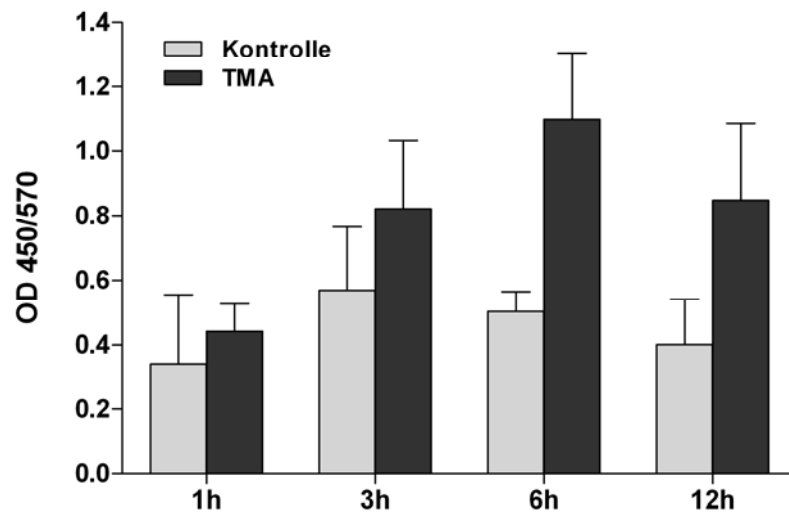


Abbildung 14: Bestimmung der Zytotoxizität anhand des Lactatdehydrogenase (LDH) Tests nach einmaliger intratrachealer Behandlung mit TMA 1 %. 1, 3, 6 und 12 h nach Substanzapplikation wurden die Lungen lavagiert und die LDH Menge im Bronchoalveolar-Fluid bestimmt. Die Zellschädigung ist proportional zur LDH Menge und wird indirekt über die optische Dichte (OD 450/570) bestimmt.

Des Weiteren wurden Zytokine mittels 6-Plex-Analyse am FACS und die Neutrophilenanzahl in der Lavage bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15a dargestellt. Die Menge an MCP-1 im Lavagefluid nimmt zu, je länger die Substanz in der Lunge verbleibt. Nach einer und drei Stunden liegt der Wert für die TMA-behandelten Gruppen auf dem Niveau der Kontrollgruppen. Nach sechs Stunden zeigt sich eine deutliche Zunahme um das 1,8-fache im Vergleich zur Kontrolle. 12 Stunden nach der Behandlung werden 1400 pg/ml nachgewiesen, das dem 7-fachen der Kontrolle entspricht.

Die Infiltration neutrophiler Zellen in die Lunge zeigt sich ebenfalls als Resultat entzündlicher Reaktionen auf die TMA-Applikation und ist in Abbildung 15b dargestellt. Eine deutliche Erhöhung der Neutrophilen in der Lunge um 8,5% stellt sich sechs Stunden nach Gabe der Testsubstanz ein. Eine weitere Zunahme auf 12,7% ist nach 12 Stunden erkennbar. Die durchschnittliche Neutrophilenanzahl beträgt Die Hinzunahme dieser Parameter, neben der Bestimmung der LDH-Freisetzung, zeigt die Notwendigkeit eines 12-stündigen Reaktionszeitraums *in vivo*. Die Testsubstanzen TMA, MDI und SDS wurden daher in unterschiedlichen Konzentrationen zur Titration (LDH = 2x Kontrolle) eingesetzt.

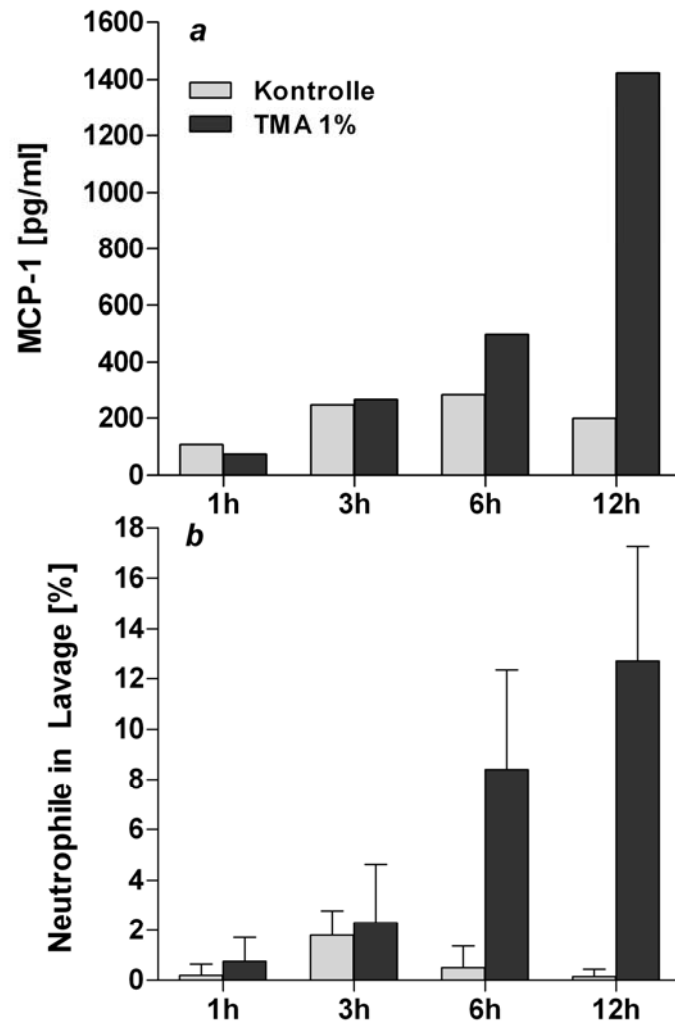


Abbildung 15: Bestimmung des MCP-1 Gehalts (15a) und der Neutrophilenanzahl [% Lavage] (15b) in der Lavage, 1, 3, 6 und 12 h nach Applikation von Vehikel und TMA 1 %.

3.5.2 Die dosisabhängige Reaktion am Beispiel TMA

In Abbildung 16 ist die Titrationskurve zur Bestimmung der dosisabhängigen Reaktion am Beispiel von TMA dargestellt. 12 Stunden nach der Applikation zeigt sich mit steigender TMA-Konzentration eine Erhöhung der Messparameter LDH [OD 450/570] und Neutrophile (Abb. 16a) sowie MCP-1 (Abb. 16b). Bei TMA 1% wird die Erhöhung

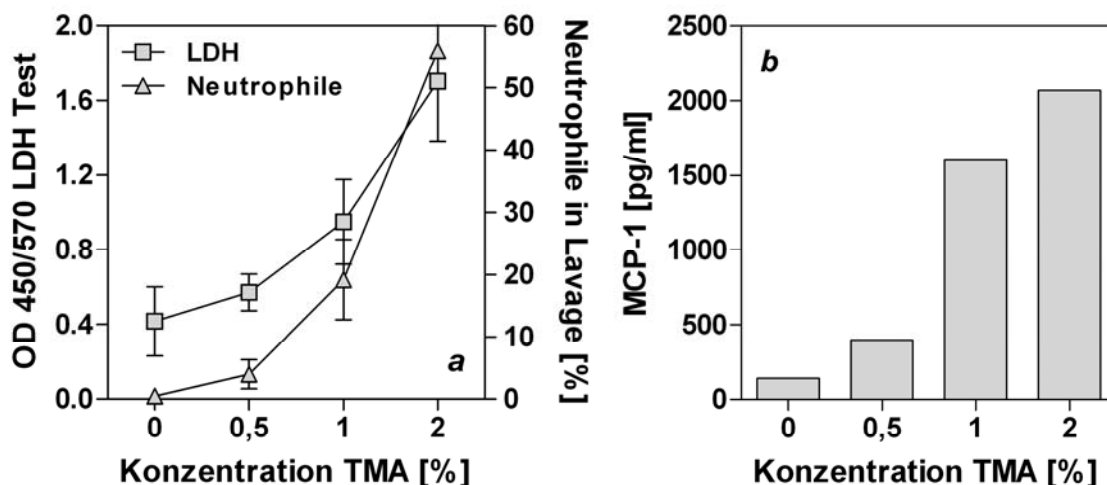


Abbildung 16: Titration der Testsubstanz TMA 12 h nach intratrachealer Instillation von TMA 0,5 %, 1 %, 2 % und Vehikel. Abb. 16.a: Dosisabhängige Induktion der LDH-Freisetzung [OD 450/570] und der Neutrophileninfiltration ([%] Lavage). Abb 16.2: MCP-1 Konzentration in der Lavage

von LDH [OD 450/570] um das 2-fache gegenüber der Kontrolle erreicht.

Die Titration der Substanzen MDI und SDS wurde in gleicher Weise durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst. MDI 1% erreicht einen LDH-Index von 2,3 und SDS 0,3% einen Index von 2,0. Die Entzündungsparameter MCP-1 und die Neutrophilen [%] ergeben bei allen drei Substanzen den gleichen Grad der entzündlichen Reaktion. Die Indices für MCP-1 liegen bei 7 bis 8,5, die der Neutrophilen bei 12 bis 14. Für alle weiteren Versuche wurden ebenfalls die angegebenen Konzentrationen eingesetzt.

	Vehikel	TMA 1%	Vehikel	MDI 1%	Vehikel	SDS 0,3%
LDH [OD 450/570]						
Mittelwert	0,40	0,85	0,59	1,35	0,72	1,42
Stabw	0,14	0,24	0,21	0,21	0,14	0,26
Index		2,1		2,3		2,0
MCP-1 [pg/ml]						
Mittelwert	199	1423	120	902	129	1075
Stabw	135	524	118	193	92	217
Index		7,2		7,5		8,3
Neutrophile [%]						
Mittelwert	1,0	12,7	1,3	15,3	1,3	17,3
Stabw	0,3	4,6	0,4	8,1	1,0	2,8
Index		12,7		12,2		13,8

Tabelle 3: Ergebnisse der Zytotoxizitätsbestimmung anhand des LDH-Tests für die Substanzen TMA 1%, MDI 1% und SDS 0,3%, 12 h nach einmaliger intratrachealer Instillation von Vehikel und Testsubstanz, sowie Bestimmung des MCP-1 Gehalts [pg/ml] und der Neutrophilen [%] in der Lavage. Die Mittelwerte sind aus zwei unabhängigen Versuchen mit n = 4 berechnet. Die Indices geben das n-fache im Vergleich zur Kontrolle an.

Da die folgenden Experimente eine Applikation an zwei aufeinanderfolgenden Tagen vorsehen und ein kumulativer zytotoxischer Effekt durch zweimalige Applikation ausgeschlossen werden soll, wurde am Tag 3, also 24 Stunden nach der zweiten Substanzgabe, eine erneute LDH-Bestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 angegeben und zeigen für die drei Testsubstanzen ebenfalls eine Erhöhung der LDH-Freisetzung (OD450/570) um etwa das 2-fache gegenüber der Kontrolle. Somit können kumulative zytotoxische Effekte durch wiederholte Substanzgabe ausgeschlossen werden.

	Vehikel	TMA 1%	Vehikel	MDI 1%	Vehikel	SDS 0,3%
LDH [OD 450/570]						
Mittelwert	0,46	1,00	0,50	0,91	0,53	1,09
Stabw	0,09	0,19	0,05	0,08	0,03	0,33
Index		2,16		1,83		2,07

Tabelle 4: Ergebnisse der Zytotoxizitätsbestimmung anhand des LDH-Tests für die Substanzen TMA 1%, MDI 1% und SDS 0,3% am d3 nach zweimaliger intratrachealer Instillation von Vehikel und Testsubstanz an d1 und d2.

3.6. *Multiplex Zytokinanalyse im Bronchoalveolar-Fluid nach TMA-, MDI- und SDS-Applikation*

Die Analyse von Proteinen in der Lavage und innerhalb von Zellen der Lavage gibt einen Einblick in die lokalen Ereignisse der Induktionsphase einer allergischen Primärantwort, gekoppelt an die inflammatorischen Prozesse am Applikationsort. Der Vergleich der sensibilisierenden Testsubstanzen TMA und MDI mit dem reinen Irritanten SDS wurde im Hinblick auf die Differenzierungsproblematik gewählt, um die Unterschiede beider Substanzklassen voneinander abzugrenzen zu können. Die Zyto- bzw. Chemokine IL-1 α , IL-4, GM-CSF, MCP-1, IFN- γ und TNF- α wurden mit einem Multiplex Analyseverfahren durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. Die Diagramme 17a und 17b zeigen den MCP-1 und IL-1 α Gehalt [pg/ml] im Bronchoalveolar Fluid (BALF). MCP-1 ist bei allen drei Testsubstanzen am Tag 3 in höheren Konzentrationen nachzuweisen als am Tag 4. Die höchste am Tag 3 TMA-induzierte MCP-1 Konzentration beträgt 824 pg/ml, was einer 4,3-fachen Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle entspricht. Am Tag 4 fällt die Konzentration auf 740 pg/ml ab, mit einem Index von nur noch 2,7. Die Induktion von MCP-1 durch MDI fällt in Bezug auf die Absolutwerte am geringsten aus, liegt aber am Tag 3 bei einer Erhöhung um das 6-fache bezogen auf die Kontrollgruppe und am Tag 4 bei einer Zunahme von 2,3. Der Irritant SDS zeigt die stärkste Erhöhung von MCP-1 im Bronchoalveolar Fluid: am Tag 3 werden 1600 pg/ml nachgewiesen, das bedeutet eine Zunahme im Vergleich zur Kontrolle um das 9-fache. Die Analyse von IL-1 α ergibt für alle Gruppen (außer TMA Tag 4) eine geringfügige Erhöhung der IL-1 α Konzentration nach Substanzgabe.

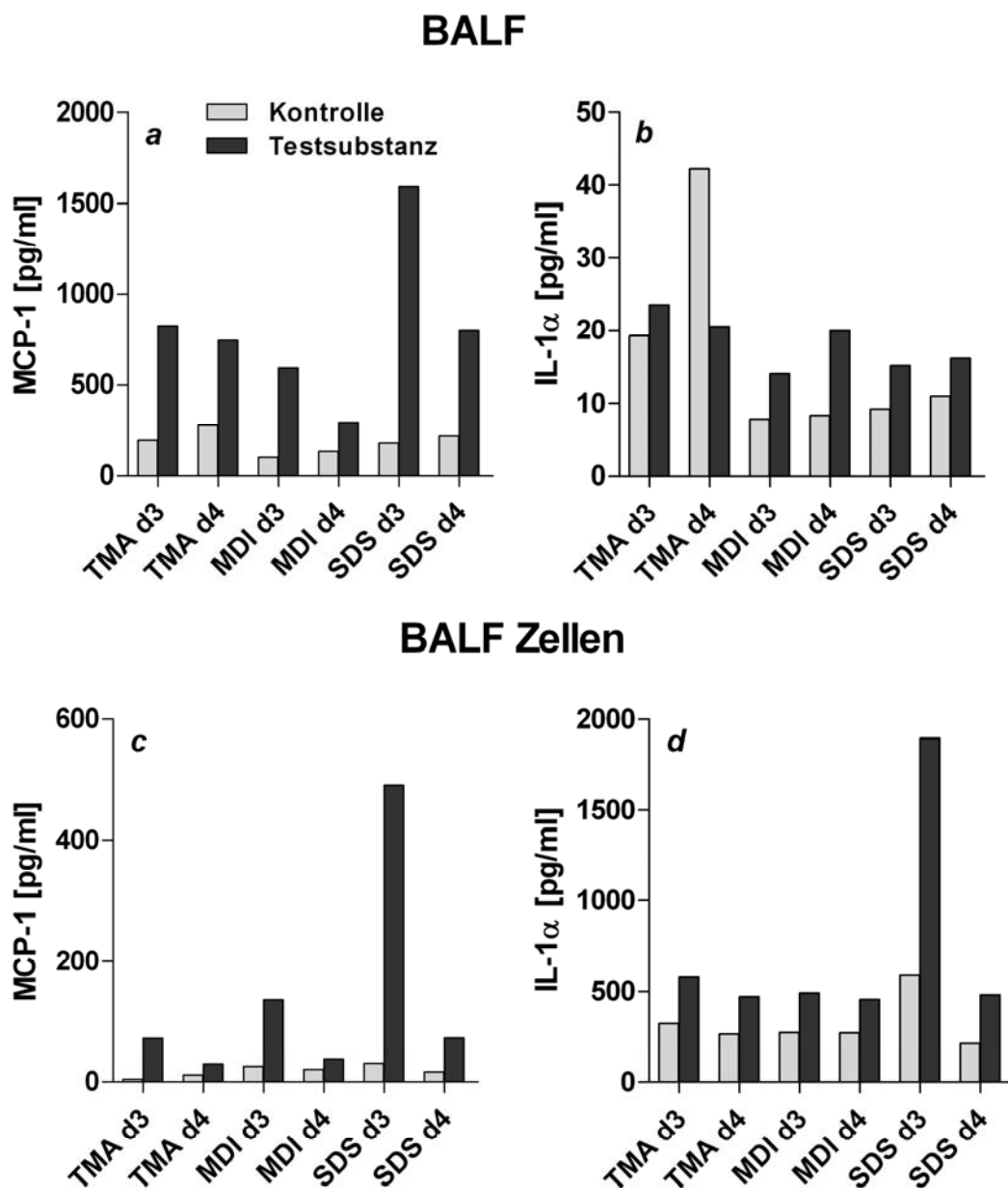


Abbildung 17: MCP-1 und IL-1 α Bestimmung im Bronchoalveolar -Fluid (BALF) und BALF -Zellen. Nach zweimaliger intratrachealer Applikation der Testsubstanz (TMA 1%, MDI 1%, SDS 0,3%) an Tag 1 und Tag 2 wurden die Lungen je einer Vehikel und Substanzgruppe (n=5) an Tag 3 und Tag 4 lavagiert. Fluid und Zellen (6×10^6 /ml) wurden mit einer Multiplex Analyse im FACS auf IL-1 α , IL-4, GM-CSF, MCP-1, IFN- γ und TNF- α untersucht.

Die Untersuchungen der intrazellulären Zytokin- und Chemokin-Konzentration in Zellen der Lavage sind in den Diagrammen Abb. 17c und Abb. 17d dargestellt. Die intrazelluläre Konzentration von MCP-1 steigt bei allen Substanzen am Tag 3 deutlich im Vergleich zur Kontrolle an. Die verhältnismäßig stärkste Induktion wird bei SDS

pg/ml im Vergleich zur Kontrolle zunimmt. MDI induziert nur eine Erhöhung um das 5-fache der Kontrolle. Die Abnahme der gemessenen pg/ml Konzentration am Tag 4 ist deutlich stärker als im Lavagefluid (Diagramm oben, 17b). Bei TMA und MDI werden Werte von unter 40 pg/ml und bei SDS von 75 pg/ml ermittelt. Für IL-1 α ergibt die Analyse eine deutliche Zunahme der intrazellulären Konzentration nach Substanzapplikation. Am Tag 3 erhöht sich die Konzentration an IL1 α nach TMA- und MDI-Behandlung um das 1,8-fache. Am Tag 4 wird eine 1,7-fache Induktion gemessen. Es zeigt sich hier eine geringere zeitliche Begrenzung der IL-1 α Expression als bei MCP-1. Die Induktion von IL-1 α durch SDS ist am stärksten, da eine Erhöhung um das 3,2-fachen der Kontrolle auf 1900 pg/ml erreicht wird.

3.6.1 BALF - Neutrophile und Eosinophile

Nach zweimaliger intratrachealer Behandlung wurden die Neutrophilen und Eosinophilen Zellen in der Lavage für die Substanzen TMA, MDI und SDS am Tag 3 und Tag 4 bestimmt. In Abbildung 18 ist gezeigt, dass am Tag 3 (d3) bei den drei Substanzen eine Erhöhung des Neutrophilenanteils um 11% bis 13% auftritt und am Tag 4 (d4) die Zunahme bei allen Substanzgruppen nur noch 4% beträgt. Mit Werten $\leq 1\%$ zeigen die Kontrolltiere keine Neutrophile Entzündung.

Das Ergebnis der Bestimmung der Eosinophilen ist in Abbildung 19 dargestellt. Eosinophilie ist ein besonderes Merkmal des Asthma bronchiale. Daher soll die Untersuchung von Eosinophilen Aufschluß über ihre Rolle bei der Entwicklung des Asthma geben. Alle drei Testsubstanzen bewirken im Vergleich zur Kontrolle, eine erhöhte Nachweisbarkeit eosinophiler Zellen in der Lunge. Am Tag 4 nimmt die Zahl im Verhältnis zur Kontrolle stärker zu. Die Indices ([%] Eosinophile der Substanz-

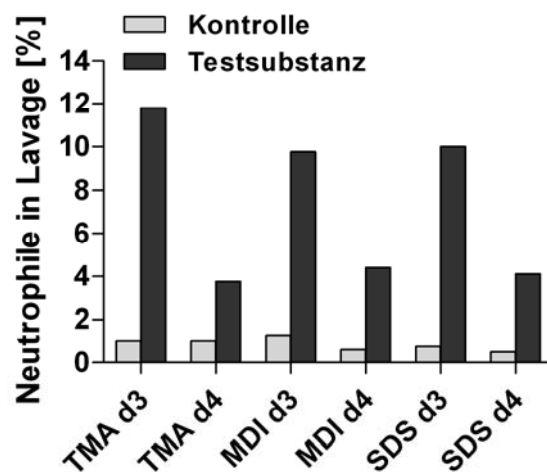


Abbildung 18: Neutrophilen [%] der Lavage an Tag 3 und Tag 4 nach der Applikation von TMA 1%, MDI 1% und SDS 0,3%.

behandelten Tiere / [%] Eosinophile der Kontrolltiere) liegen für TMA bei 1,5 am Tag 3 und 1,7 am Tag 4. Eine ähnliche Veränderung wird für MDI bestimmt. Am Tag 3 liegt der Index bei 1,7 und am Tag 4 bei 2,0. SDS zeigt mit 3,0 am Tag 3 und 3,9 am Tag 4 die stärkste Erhöhung von Eosinophilen. Beachtenswert ist der stark erhöhte

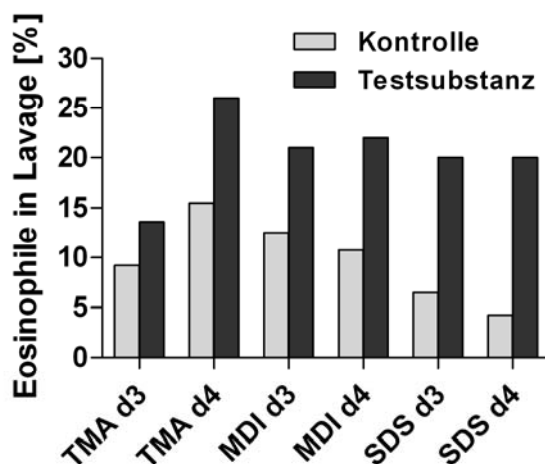


Abbildung 19: zeigt die Eosinophilen [%] der Lavage an Tag 3 und Tag 4 nach der Applikation von TMA 1%, MDI 1% und SDS 0,3%.

eosinophile Hintergrund der Kontrolltiere. Die Kontrollgruppen MDI- und TMA-behandelter Tiere zeigen jedoch mit Werten um 9% bis 15% eine deutlich überhöhte Grundeosinophilie, während mit Zunahmen von 7% und 4% die Kontrolle für SDS knapp über dem durchschnittlichen Wert für Eosinophile liegt.

3.7. *Bestimmung der konzentrationsabhängigen inflammatorischen Reaktion durch TMA und MDI im Vergleich zu SDS*

Zeit- und konzentrationsabhängige Reaktionsverläufe stellen ein wichtiges Instrument zur Bewertung biologischer Prozesse dar. In diesen Experimenten wird die Gewebeschädigung und Entzündung in Abhängigkeit zur eingesetzten Konzentration bestimmt. Die Reaktionskinetik der sensibilisierenden Substanzen TMA und MDI im Vergleich zur irritierenden Substanz SDS wird anhand der LDH-Freisetzung und Neutrophileninfiltration untersucht.

In der Abbildung 20 sind die Messparameter LDH [OD450/570] und neutrophile Zellen in Abhängigkeit zur Substanzkonzentration von TMA, MDI und SDS dargestellt. Mit sich erhöhender Konzentration nehmen die LDH-Freisetzung und die Neutrophilenanzahl bei allen drei Substanzen zu. Auch wenn sich die maximal erreichten Endwerte der einzelnen Substanzen stark unterscheiden, so ist zu erkennen, dass beide Substanzen aus der Klasse mit allergenem Potential einen konkav progressiven Verlauf bewirken. Das heißt, dass die Kurven in niedrigen Konzentrationsbereichen zunächst gering ansteigen und stärker in höheren Konzentrationsbereichen. Dagegen bedingt die Konzentrationserhöhung bei der irritierenden Substanz SDS eine konvex regressive Zunahme (bei LDH) und eine proportionale Zunahme der Neutrophilenzahl. Die Zunahme der Neutrophilen nach SDS-Behandlung erreicht bei der höchsten Konzentration 22% und liegt somit zwischen den Höchstwerten für TMA mit 56% und MDI mit 15%. Dennoch ist deutlich zu erkennen, dass schon die geringste Konzentration von 0,1% SDS eine Erhöhung der Neutrophilen auf 11,5% bewirkt.

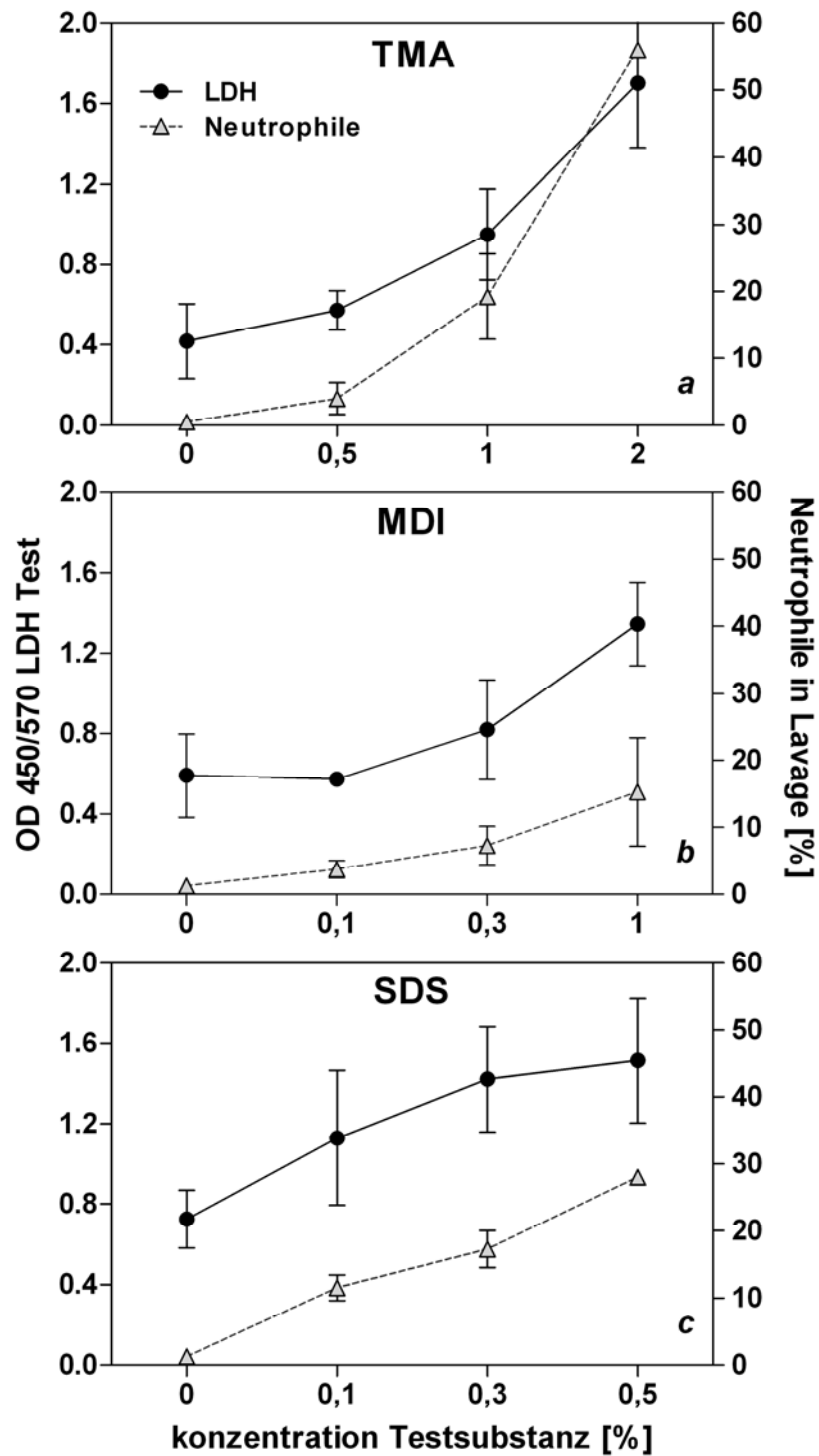


Abbildung 20: Neutrophile [%] der Lavage und LDH-Freisetzung [OD450/570] bei unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen TMA (0,5; 1 und 2%), MDI 0,1; 0,3 und 1% und SDS 0,1; 0,3 und 0,5%, 12 h nach einmaliger intratrachealer Instillation.

3.8. Induktion und Boost

Der sogenannte „Boost“, eine zusätzliche Konfrontation der Versuchstiere mit dem sensibilisierenden Agens, wird herkömmlicherweise eingesetzt, um die Atemwegsreaktion in der Auslösephase (Challenge) zu verstärken. Das in dieser Arbeit angewandte Versuchsprotokoll sieht eine zweimalige Behandlung zur Induktion an Tag 1 und Tag 2 vor, auf die an Tag 8 der Boost mit wiederholter Substanzapplikation erfolgt. Die Lungenlavage zur Untersuchung der extra- und intrazellulären Zytokinkonzentration sowie der Neutrophilen- und Eosinophileninfiltration wird am Tag 9, 24 Stunden nach der letzten Applikation, durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 21 als Index (Vielfaches der Kontrolle) dargestellt.

Die Daten zeigen nach diesem Protokoll eine verstärkte Reaktion der Eosinophileninfiltration mit einem Index von 8 im Vergleich zur Neutrophileninfiltration mit einem Index von 4. Intra- und extrazellulär konnten die Zytokine MCP-1 und TNF- α nachgewiesen werden. IL-1 α wurde durch dieses Behandlungsprotokoll nicht induziert. Die TNF- α Konzentration liegt in der Lavage bei

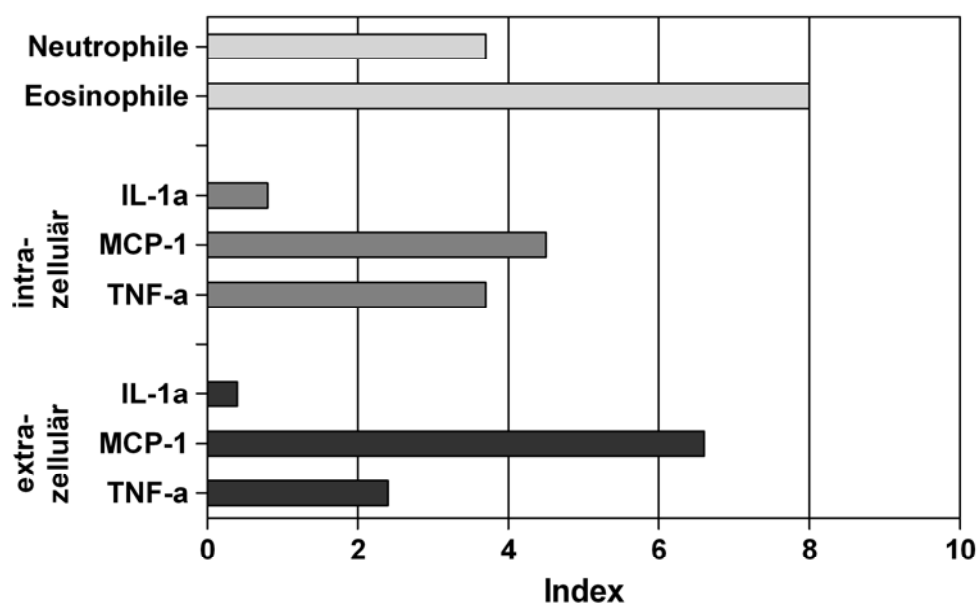


Abbildung 21: Bestimmung der Zytokine im Bronchoalveolar Fluid (extrazellulär) und den Zellen (intrazellulär) sowie der Neutrophilen und Eosinophilen in der Lavage an Tag 9 nach dreimaliger Behandlung an Tag 1, Tag 2 und Tag 8 (Boost) mit TMA 1%. Die Zytokine wurden in einem Multiplex-Analyseverfahren (IL-1 α , IL-4, GM-CSF, MCP-1, IFN- γ und TNF- α) im FACS analysiert. Zur Bestimmung der intrazellulären Zytokine wurde 6×10^6 Zellen eingesetzt. Neutro- und Eosinophile wurden in der Lavage gemessen. Die Ergebnisse sind als **das n-Fache (INDEX) der jeweiligen Kontrolle dargestellt.**

90 pg/ml in der Kontrolle, nach Applikation der Testsubstanz TMA werden 170 pg/ml nachgewiesen. Innerhalb der Zellen wird eine Erhöhung der TNF- α Konzentration vom Faktor 2,7 erreicht, die Menge in den Kontrollen beträgt 20 pg/ml und in den behandelten Tieren 54 pg/ml. Die MCP-1 Konzentration in der Lavage steigt um das 6,6-fache zwischen Kontrolle und TMA-Gruppe. In absoluten Zahlen ist dies eine Erhöhung von 130 pg/ml auf 870 pg/ml. Intrazellulär nimmt die MCP-1 Menge um das 4,3-fache von 25 pg/ml auf 115 pg/ml zu. IL-4, GM-CSF und IFN- γ wurden nicht detektiert.

In allen vorangegangenen Versuchen konnte 24 Stunden nach der letzten Applikation stets ein höherer Neutrophilen- als Eosinophilengehalt in der Lavage bestimmt werden. Die Untersuchung der Boosterung (Abbildung 22) zeigt aber eine starke Erhöhung der Eosinophilen um das 8-fache der Kontrolle, aber nur eine 4-fache Zunahme der Neutrophilen. MCP-1 erreicht 12 Stunden nach einmaliger Applikation die stärkste Induktion. 24 bis 48 Stunden nach der Behandlung fällt die Konzentration wieder auf das 3- bis 4-fache ab. Die MCP-1 Bestimmung nach der Boosterung wiederum zeigt eine stärkere Expression von MCP-1 um das 6-fache der Kontrolle.

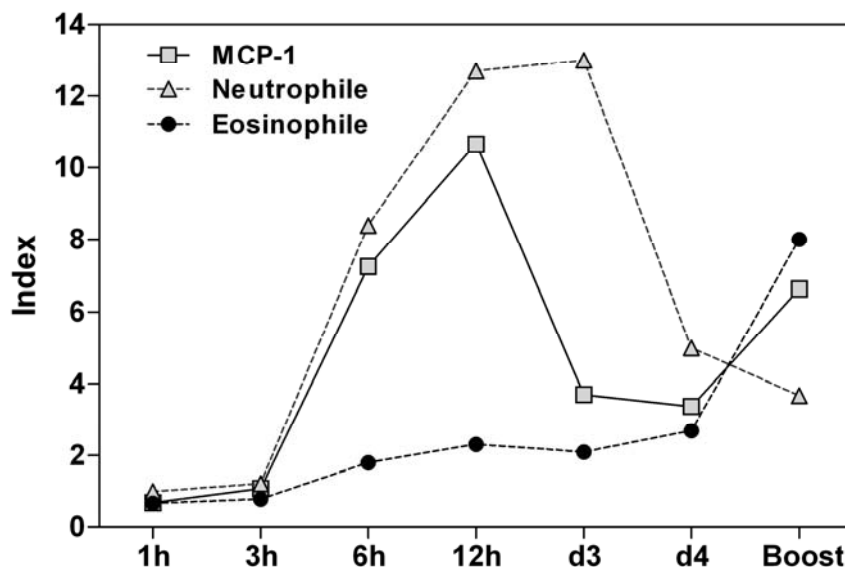


Abbildung 22: Darstellung von MCP-1, Neutrophilen und Eosinophilen als **das n-fache der Kontrollgruppe [Index]** zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Substanzapplikation. Den Ergebnissen nach 1, 3, 6, und 12 h liegt eine einmalige intratracheale Substanzgabe zugrunde, bei Tag 3 und Tag 4 werden die Versuchstiere an Tag 1 und Tag 2 behandelt. Der Boost umfasst eine dreimalige Substanzapplikation an Tag 1, Tag 2 und Tag 8, die Bestimmung der Parameter erfolgt an Tag 9.

3.9. *Die allergische Frühphasereaktion nach inhalativer TMA-Provokation*

Die gängigste Methode zur Beurteilung des Asthma bronchiale ist die Untersuchung der Lungenfunktion, zu der unter anderem die Bestimmung der Resistance gehört. In diesem Versuchsmodell wird erforscht, inwieweit sich die Vorbehandlung der Versuchstiere mit intratrachealer Behandlung am Tag 1 und Tag 2 sowie einem „Boost“ am Tag 8 auf die abschließende inhalative Provokation auswirkt. Ist die Induktion der immunologischen Sekundärantwort durch dieses Protokoll möglich und in welcher Weise zeigt sich dieses in Hinsicht auf die Zytokinexpression und die Neutro- und Eosinophileninfiltration in der Lunge? Eine zweite Testgruppe, welche die gesamte Induktionsbehandlung epicutan über die Flanke erhält und nur in der Auslösephase durch inhalative Applikation direkt in der Lunge mit der Substanz in Berührung kommt, wird mitgeführt. Ziel ist es hier, neben der Untersuchung der allergischen Reaktion intratracheal behandelte Tiere, mögliche Unterschiede in immunologischen Mechanismen, die in der Applikationsroute gründen näher zu untersuchen. Die Frage, ob eine Lungensensibilisierung über die Haut stattfinden kann, ist bis heute nicht vollständig geklärt.

In Abbildung 23 ist die Resistance [% RL] (Atemwiderstand) der intratracheal vorbehandelten Vehikel- und TMA-Gruppe sowie der epikutan vorbehandelten Vehikel und TMA-Gruppe nach inhalativer Challenge dargestellt. In der intratracheal vorbehandelten Gruppe zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Resistance von 20% auf 140%. In der über die Flanke vorbehandelten Gruppe steigt die Resistance von 22% in der vehikelbehandelten Gruppe auf 55% in der mit TMA vorbehandelten Gruppe.

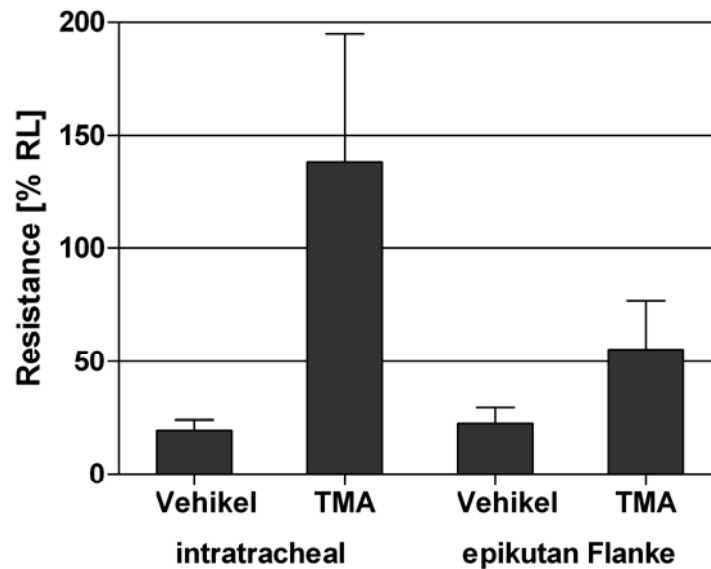


Abbildung 23 Zunahme der Resistance [%] als Parameter der Lungenfunktion nach inhalativer TMA Challenge an Tag 21. Die Versuchstiere (n = 6) wurden an Tag 1, Tag 2 und Tag 8 intratracheal mit TMA 1% bzw. epicutan auf die Flanke mit TMA 25% behandelt. An Tag 21 erfolgte die inhalative Challenge der Vehikel- und TMA-Gruppe mit TMA (40µg) mit Bestimmung der Lungenfunktion.

Die Auswertung der Lungenlavage mit Bestimmung der Neutro- und Eosinophilen, 24 Stunden nach TMA Challenge, ist in Abbildung 24 dargestellt. Zu erkennen ist deutlich die wesentlich stärkere Reaktion der epicutan mit TMA vorbehandelten Gruppe im Vergleich zur intratracheal mit TMA vorbehandelten Gruppe. Eosinophile erreichen einen Wert von 33%, Neutrophile sind über 26% in der Lavage vorhanden. Die mit TMA intratracheal behandelte Gruppe zeigt nur 5% Neutrophile und 8% Eosinophile in der Lavage. Die Induktion bezüglich zellulärer Parameter ist somit stärker bei Tieren ausgeprägt, die keine Lungenapplikation vor der Auslösephase erhalten haben, sondern epicutan über die Flanke sensibilisiert wurden.

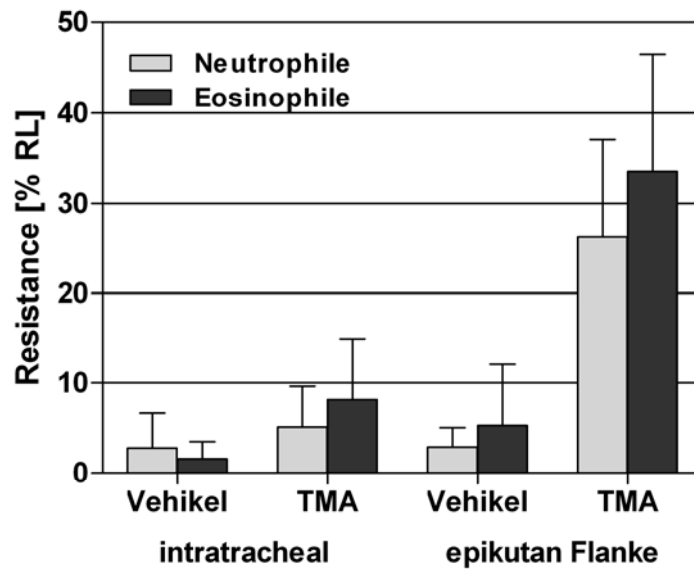


Abbildung 24: Bestimmung der Neutrophilen und Eosinophilen in der Lavage 24 h nach inhalativer TMA Challenge an Tag 21. Die Versuchstiere (n = 6) wurden an Tag 1, Tag 2 und Tag 8 intratracheal mit TMA 1% bzw. epicutan auf die Flanke mit TMA 25% behandelt. An Tag 21 erfolgte die inhalative Challenge mit TMA (40µg). Die Angaben in % beziehen sich auf 500 ausgezählte Zellen/Cytospot.

Die Multiplex-Analyse der Zytokine IL-1 α , IL-4, GM-CSF, MCP-1, IFN- γ und TNF- α im Bronchoalveolar Fluid ergibt einen Nachweis für die Analyte IL-1 α , MCP-1, IFN- γ und TNF- α . (siehe Abbildung 25 a und b) Es zeigt sich, dass in der Gruppe epikutaner TMA-Applikation die höchsten Zytokinkonzentrationen erreicht werden. Für IL-1 α werden über 45 pg/ml, für TNF- α 115 pg/ml, IFN- γ 22 pg/ml und MCP-1 2000 pg/ml gemessen. Nach intratrachealer Vorbehandlung mit TMA zeigt sich eine geringfügige Erhöhung für die Proteine IL-1 α und MCP-1.

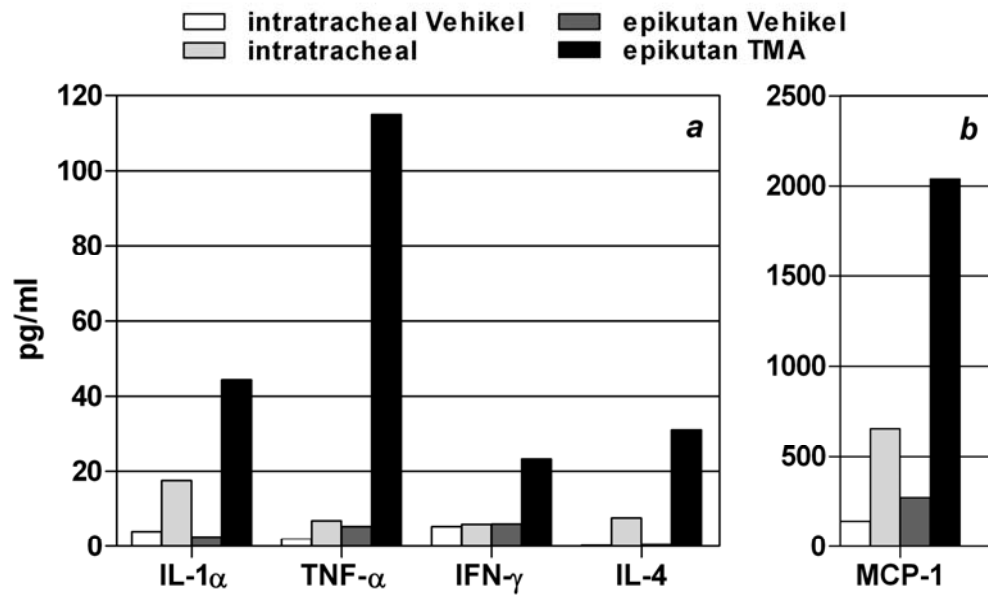


Abbildung 25: Zytokinbestimmung im Bronchoalveolar Fluid 24 h nach inhalativer TMA Challenge an Tag 21. Die Versuchstiere (n = 6) wurden an Tag 1, Tag 2 und Tag 8 intratracheal (i.t.) mit TMA 1% bzw. epicutan (e.c.) auf der Flanke mit TMA 25% behandelt. An Tag 21 erfolgte die inhalative Challenge mit TMA (40 μ g). Die Zytokine wurden in einem Multiplex Analyseverfahren mit folgenden Analyten IL-1 α , IL-4, GM-CSF, MCP-1, IFN- γ und TNF- α im FACS bestimmt.

3.10. *Ex vivo und in vitro Modellsysteme*

3.10.1 *Ex vivo Restimulation in vivo aktivierter Lymphozyten*

Ziel ist es, durch eine *ex vivo* Restimulation von Lymphozyten, die Effektivität der *in vivo* provozierten Lymphozytenaktivierung durch MDI näher zu untersuchen.

Zur Restimulation wurden die Lymphozyten aus den lungendrainierenden Lymphknoten und der Milz am Tag 3 (nach zweimaliger intratrachealer Behandlung) in Kultur genommen. Da eine substanzspezifische Stimulation mit dem *in vivo* verwendeten sensibilisierenden Agens MDI erfolgt, wurde zunächst in verschiedenen Titrationsversuchen der Lowest-Observed-Effect-Level (LOEL) von MDI bestimmt. Ziel ist die Restimulation *in vivo* geprimter Lymphozyten durch Verfügbarkeit der Antigenendeterminante *in vitro* unter Vermeidung einer cytotoxischen Aktivität auf die Zielzelle. Für die Restimulation wurde die Konzentration eingesetzt, die eine Viabilität > 90% nach Inkubation mit der Testsubstanz erreicht. Die Titration wurde für alle drei Substanzen (MDI, TMA und SDS) durchgeführt, beispielhaft, ist die Titration für MDI in Abbildung 26 dargestellt.

Die Abbildung zeigt deutlich die Abnahme der Parameter Fluoreszenz und Absorption mit Erhöhung der eingesetzten MDI-Konzentration. Sowohl der Resazurin- als auch der

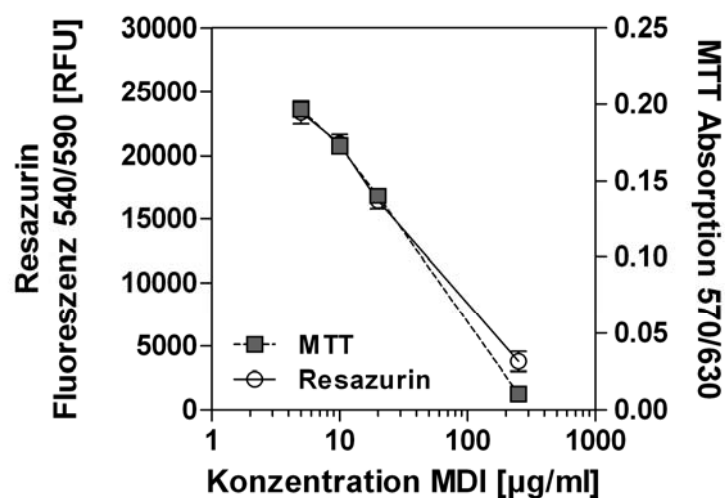


Abbildung 26: Titration von MDI zur Bestimmung des LOEL (Viabilität > 90%). Lymphozyten wurde in Zellkultur mit MDI in den Konzentrationen 0, 5, 10, 20, 250 µg/ml für 48 h kultiviert. Die Viabilität der Zellen wurde mittels Resazurin- und MTT-Tests an vier Replikaten bestimmt.

		Konzentration MDI [mg/ml]				
		0	5	10	20	250
Resazurin	Mittelwert [RFU 540/590]	24955	23366	20916	16411	3791
	Stabw [%]	1,4	3,8	3,5	3,9	20,6
	Viabilität [% Kontrolle]	100	94	84	66	15
MTT	Mittelwert [OD 570/630]	0,21	0,20	0,17	0,14	0,01
	Stabw [%]	2,5	2,6	1,1	1,5	28,2
	Viabilität [% Kontrolle]	100	94	83	67	5

Tabelle 5: Viabilität der Lymphozytenzellkultur nach 48 h Inkubation mit MDI (0, 5, 10, 20, 250 µg/ml). Die Viabilität ist angegeben in [% der Kontrolle]. Die Mittelwerte werden aus vier Replikaten bestimmt

MTT-Test zeigen die gleichen Testergebnisse bei den unterschiedlichen Substanzkonzentrationen. In Tabelle 5 sind die Messwerte aus Abbildung 26 zusammengefasst und die Viabilität [% der Kontrolle] berechnet. Der LOEL wird bei einer Viabilität > 90% der Kontrolle und einer statistischen Signifikanz von $p < 0,02$ für Resazurin und MTT bei 5µg/ml festgelegt. Nach Bestimmung der geeigneten Substanzkonzentration von MDI erfolgt die Restimulation. Es werden mitogene Stimulationen wie LPS und ConA, aber auch Anti-CD3 Antikörper mit und ohne Zusatz von MDI zur Restimulation der Lymphozyten aus den Lymphknoten und der Milz eingesetzt. Die Zunahme der Proliferation im Anti-CD3-Assay wurde im BrdU-ELISA bestimmt, die Viabilität nach LPS und ConA Stimulation wurden mittels Resazurin- und MTT-Test ermittelt. In Abbildung 27 ist die Proliferation der Lymphozyten aus den lungendrainierenden Lymphknoten nach Restimulation mit Anti-CD3 Antikörper dargestellt.

Die Ergebnisse der Lymphozytenkulturen, der *in vivo* behandelten Tiere zeigen eine signifikante Zunahme der optischen Dichte [OD 450/630] im Resazurin-Test und damit eine höhere Viabilität als die Zellkulturen der *in vivo* Kontrolltiere. Die Zunahme der Viabilität bei zusätzlicher MDI Stimulation fällt im Vergleich zur MDI-freien Kultur, mit 10% nur schwach aus.

Die Ergebnisse der Restimulation der Lymphozyten aus der Milz sind in Abbildung 28 a) und b) angegeben. Die LPS-Stimulation wirkt hauptsächlich über den Toll-Like-Rezeptor-4 (TLR-4) und zeigt daher in erster Linie eine B-Zell Stimulation an. ConA hingegen wirkt über die direkte Bindung an den T-Zell-Rezeptor und stimuliert somit T-Zell Populationen. Sowohl die vier Versuchsansätze der LPS-Stimulation als auch die der ConA-Stimulation zeigen eine Erhöhung der Fluoreszenz im Resazurintest aller *in vivo* MDI-behandelten Kulturen. Durch den Zusatz von MDI in das Medium wird jedoch keine weitere substanzspezifische Erhöhung der Viabilität verursacht. Darüberhinaus ist zu bemerken, dass die Stimulation bei Mitogenzusatz im Verhältnis zur Kontrolle geringer ausfällt als die Viabilitätsunterschiede unstimulierter Zellkulturen.

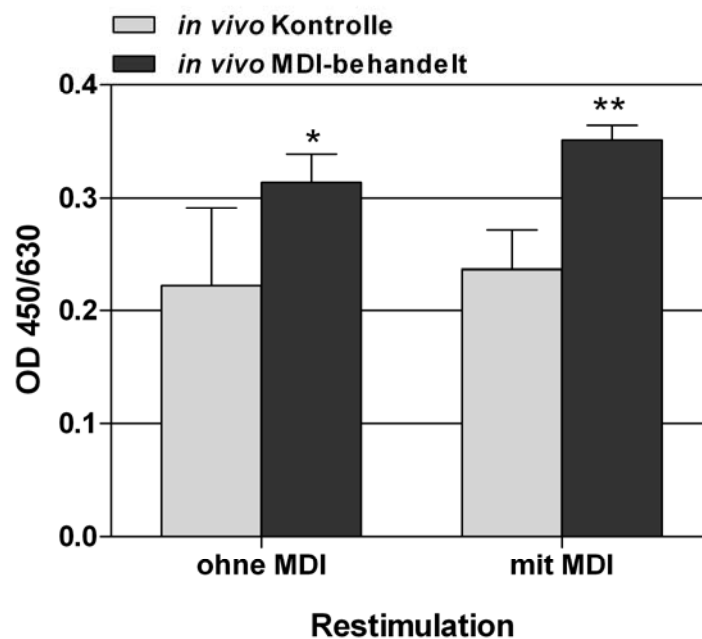


Abbildung 27: Proliferation nach Restimulation von Lymphozyten der lungendrainierenden Lymphknoten mittels Anti-CD3 Antikörper nach 48 h Zellkultur. Die Werte wurden aus 4 Replikaten ermittelt und haben eine statistische Signifikanz von ★ $p < 0,05$ und ★ ★ $p < 0,01$.

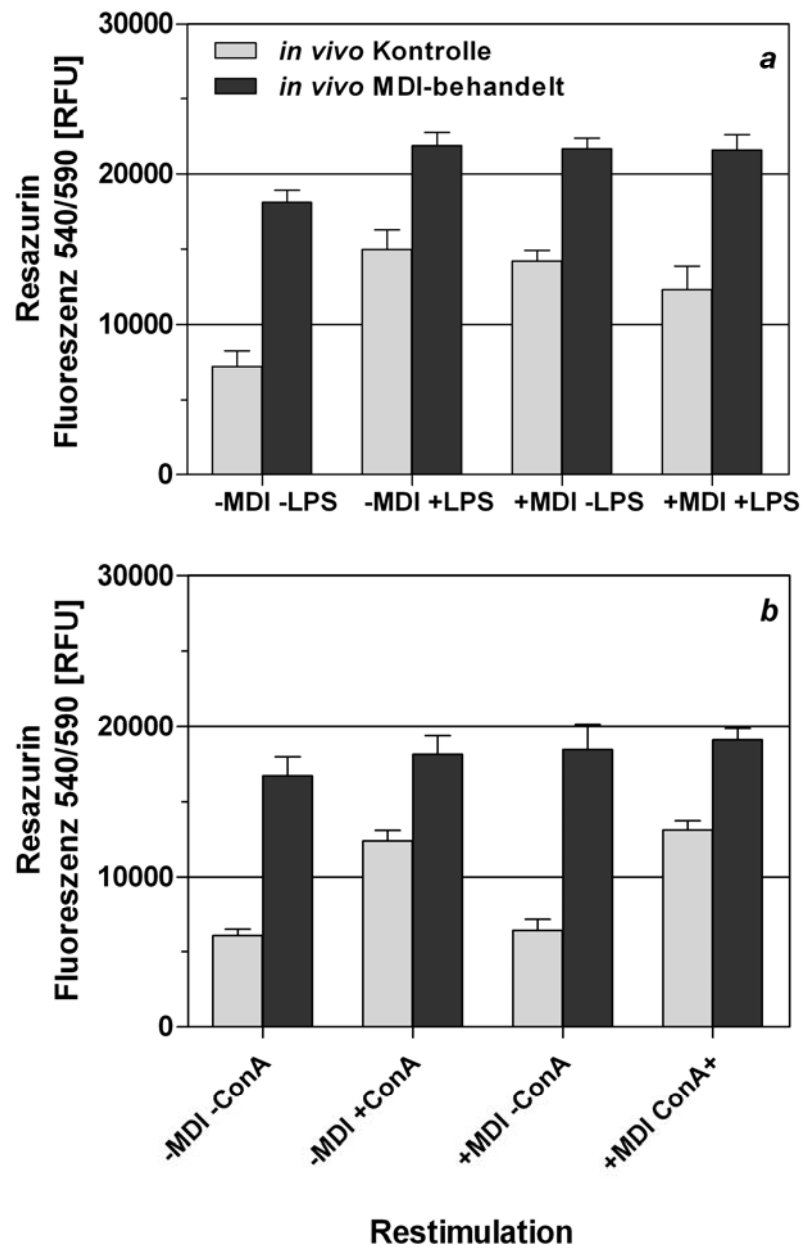


Abbildung 28: a) Viabilität *in vivo* MDI geprimter Lymphozyten aus der Milz nach LPS-Restimulation. Es werden vier verschiedene Ansätze der Milzellkulturen für 48 h inkubiert: 1) – MDI – LPS 2) – MDI + LPS 3) + MDI – LPS 4) + MDI + LPS. b) Viabilität *in vivo* MDI geprimter Lymphozyten aus der Milz nach ConA-Restimulation. Es werden vier verschiedene Ansätze der Milzellkulturen für 48 h inkubiert: 1) – MDI – ConA 2) – MDI + ConA 3) + MDI – ConA 4) + MDI + ConA.

- = ohne Zusatz; + = mit Zusatz

Zusammenfassen ist festzustellen, dass die intratracheale Behandlung mit MDI an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zu einer erhöhten Stimulierbarkeit der Lymphozyten *in vitro* führt. Die erhöhte Aktivierung ist sowohl in den drainierenden Lymphknoten als auch in der Milz nachweisbar, wird aber ausschließlich durch die *in vivo* Voraktivierung ausgelöst, nicht aber spezifisch durch MDI oder mitogene Stimulantien.

3.10.2 *In vitro* Zytokinexpressionsanalysen und Viabilitätsbestimmung am Schleimhautmodell MucilAir nach Substanzapplikation

Das Schleimhautmodell MucilAir wird in diesen Versuchen erstmals im Hinblick auf eine Irritation und Sensibilisierung anhand der Modellsubstanzen SDS und TMA untersucht.

Grundlage einer Untersuchung zur Bestimmung des sensibilisierenden Potentials einer Testsubstanz ist zunächst immer die Bestimmung der reizenden Eigenschaften dieser Testsubstanz. Hierzu wird die Substanz so titriert, dass der Lowest-Observed-Effekt-Level (LOEL) bestimmt werden kann. Bisher gibt es keine einheitlichen Richtlinien welcher Viabilität [% der Kontrolle] dieser LOEL entspricht. In den Untersuchungen wurde zum einen die Viabilität nach Applikation unterschiedlicher Substanzkonzentrationen bestimmt, zum anderen eine Analyse der sezernierten Zytokine im Zellüberstand mittels Cytometric Bead Array (CBA) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt und zeigen die Korrelation von Viabilität und Zytokinexpression der Zytokine IL-8, MCP-1 und IL-6 nach Exposition gegenüber SDS und TMA. Der LOEL von TMA mit einer Viabilität von 94% wird bei einer Substanzkonzentration von 0,03% erreicht. Gegenüber SDS scheint MucilAir weniger empfindlich zu sein. Bei 0,1% sind die Zellen noch nahezu unbeschadet. Mit zunehmender Konzentration steigt auch die zytotoxische Reaktion an. In beiden Substanzklassen wird bei zunehmender Konzentration und abnehmender Viabilität eine Erhöhung der IL-8- und IL-6- Konzentration gemessen. Die MCP-1-Menge nimmt hingegen bei TMA ab, wobei die Menge nach SDS-Behandlung bei niedrigen Konzentrationen ansteigt und erst bei starker Zytotoxizität vermindert nachgewiesen wird.

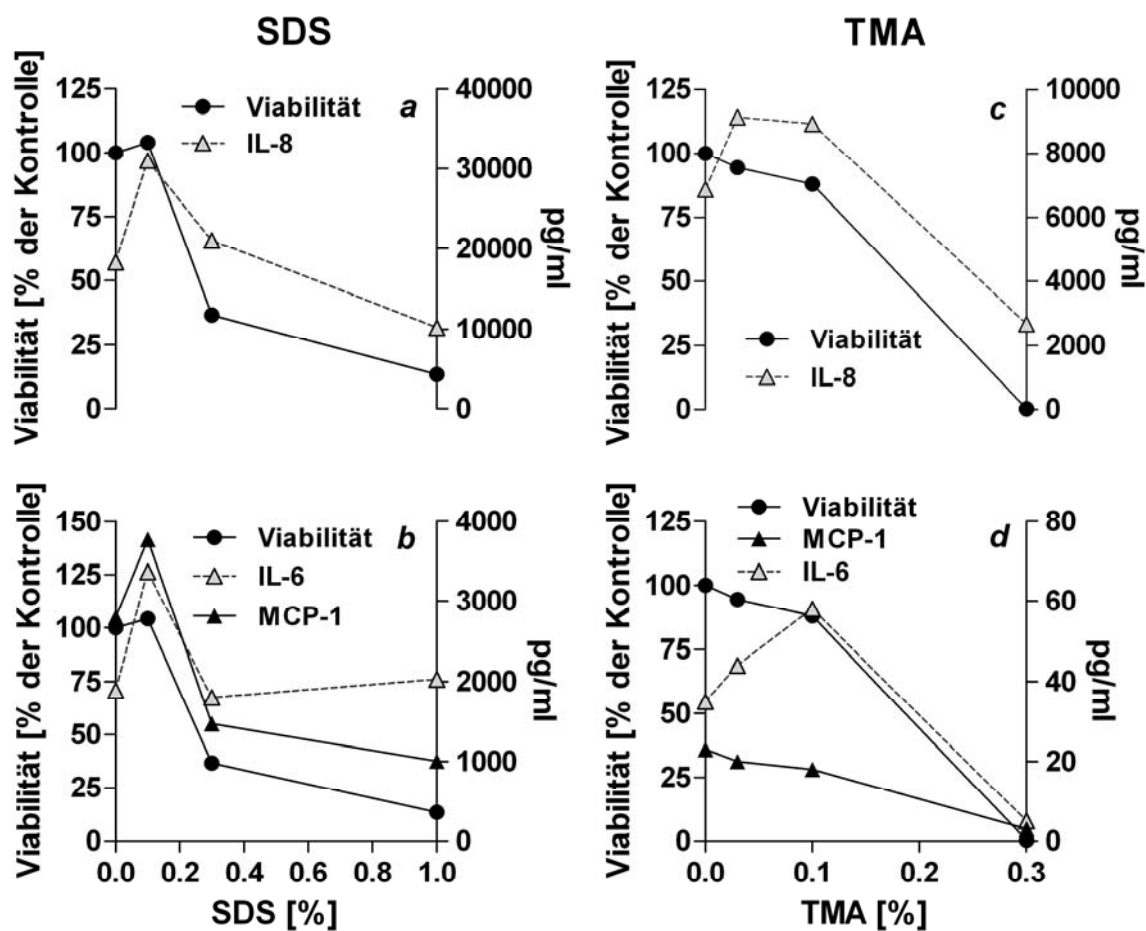


Abbildung 29: Viabilität [% der Kontrolle] und Zytokinexpression von MucilAir nach SDS (0%; 0,1%; 0,3%; 1%) und TMA (0%; 0,03%; 0,1%; 0,3%) Behandlung. Die Substanzexposition erfolgt für 2h und weitere 24h nach Entfernen der Testsubstanz im Brutschrank. Die Mittelwerte werden aus Triplikaten bestimmt.

4. DISKUSSION

4.1. *Der lokale Lymphknotentest an der Brown Norway Ratte*

Schon seit geraumer Zeit beschäftigt sich die toxikologische Forschung mit der Differenzierungsproblematik von Sensibilisierung und Irritation. Grundlegende Unterschiede liegen aus immunologischer Sicht in der unspezifischen zytotoxischen Hautreaktion bei der Irritation und der antigenspezifisch induzierten Immunantwort bei der Sensibilisierung. Trotz dieser fundamentalen Unterschiede in der Entstehung beider Reaktionstypen ist die Diskriminierung dieser Immunantworten bisher nur *in vivo* möglich. Hierfür steht der LLNA, entwickelt von Kimber & Weisenberger (1989) und modifiziert von Vohr et al. (1994), als einphasiges *in-vivo*-Testverfahren bei ekzematoiden Hauterkrankungen zur Verfügung.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Ratte-LLNA-Experimente konnten erneut den lokalen inflammatorischen Reaktionsschwerpunkt der Haut bei der Irritation durch die gemessene Ohrschwellung als Maß der unspezifischen, zytotoxischen Reaktion bestätigen. Bei der Sensibilisierung liegt der Reaktionsschwerpunkt dagegen in den Lymphknoten, gekennzeichnet durch die Proliferation von T-Zellen als Maß für die antigenspezifische Sensibilisierung.

Durch die Verwendung der Standard Testsubstanzen Benzoquinon, MDI, TMA aus der Klasse der sensibilisierenden und SDS aus der Gruppe der irritierenden Substanzen konnte eine proportionale Abhängigkeit zwischen Ohrdickenzunahme nach Substanzapplikation und Stärke der irritativen Reaktion gezeigt werden. Die allergenen Substanzen verursachen eine verhältnismässig geringere Ohrdickenschwellung im Vergleich zur verhältnismässigen Erhöhung der Zellzahl im Lymphknoten. Die irritierende Substanz SDS hingegen löst einen lokalen Reaktionsschwerpunkt an den Ohren aus in Kombination mit einer verhältnismässig geringeren Zunahme der Zellzahl im Lymphknoten. Die Aktivierung der aurikulären Lymphknoten als dominierendes Merkmal der Induktionsphase der Kontaktallergie wurde durch die mit sensibilisierenden Substanzen behandelten Ratten demonstriert.

Von Kimber und Weisenberger (1998) wurde die Korrelation zwischen der Lymphknoten-Zellproliferation und dem sensibilisierenden Potential einer Testsubstanz in einem einfachen Maussystem erstmals nachgewiesen. Dabei war der Test allerdings

im Prinzip bereits 1969 von De Sousa und Parrott beschrieben worden. Besonders deutlich wird diese Tatsache (Abhängigkeit der Zellproliferation und Stärke der sensibilisierenden Substanz) beim Vergleich der Zellzahlen bei den MDI- und Benzoquinon-behandelten Tieren: Bereits die geringe Konzentration von 0,2% Benzoquinon verursacht eine wesentlich stärkere Proliferationsaktivität als 40% MDI. Die reizende Substanz SDS löst mit 20% die geringste Proliferation aus. Auch wenn die Zuordnung zur Klasse der irritierenden und sensibilisierenden Substanzen, wie sie im LLNA/IMDS anhand der Bestimmung des Differenzierungsindex vorgesehen ist, hier nicht vorgenommen werden kann, wird dennoch deutlich, dass auch in der Ratte das Verhältnis beider Endpunkte (Ohrdicke und Zellzahl) das Reaktionspotential der Testsubstanz anzeigt. So liegt der Reaktionsschwerpunkt nach SDS-Applikation eindeutig in der Haut, bei den sensibilisierenden Substanzen hingegen im Lymphknoten.

4.2. *Der lungenhistologische Befund nach intratrachealer Applikation*

Auch wenn die Methodik der intratrachealen Applikation häufig eingesetzt wird, findet sie bisher keine Anwendung in einphasigen Protokollen zur Induktion des Asthma bronchiale. Obwohl bei Hauttests anhand des LLNA nachgewiesen wurde, dass der maßgebende Einfluss auf die gemessenen Immunreaktion nicht die Größe der behandelten Hautfläche, sondern die Konzentration der aufgetragenen Testsubstanz (Vohr) ist, ist die Verteilung der Testsubstanz im Atemtrakt beim Auslösen von immunologischen Reaktionen von Bedeutung. Hier ist eine großflächige Verteilung der Substanz wichtig. Nur so kann sichergestellt werden, dass eine Sensibilisierung nicht durch irritative Effekte infolge der Kumulation der Testsubstanz in einem Lungenlappen mögliche Reaktionen, die zur Sensibilisierung führen, überlagert oder das Gleichgewicht zwischen irritativen und sensibilisierenden Parametern zugunsten der Irritation verschoben werden und dadurch eine mögliche Identifikation der tatsächlichen Substanzeigenschaften eingeschränkt oder verhindert wird. In den histologischen Untersuchungen wurden verschiedene Gewebeveränderungen wie die Infiltration von Makrophagen, eosinophilen und neutrophilen Zellen sowie die Schädigung des Epithels oder andere histopathologische Veränderungen wie eine Verdickung der Basalmembran und das Vorkommen von Riesenzellen untersucht. Die Ergebnisse der histologischen Befunde belegen eine Wirkung durch die Testsubstanz in jedem einzelnen Lungenlappen. Merkmale dieser Effekte sind insbesondere die Infiltration von Makrophagen und eosinophilen Zellen, die Entstehung von Riesenzellen und die Bildung erhöhten Epithels. Demnach kann eine Verteilung flüssiger Substanzen oder Suspensionen durch intratracheale Applikation als exklusive Behandlungsweise zur Induktion des Asthma bronchiale genutzt werden. Die Ausprägung der Substanzeffekte ist jedoch nicht in allen Lungenlappen gleich stark. Aufgrund der Ergebnisse tritt die geringste Beeinflussung im *lobus cranialis dexter* auf, mit einer histologischen Veränderung von 13% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Begründung könnte in der unterschiedlichen anatomischen Lage der Lungenlappen zum Applikationsort, der Bifurkationsstelle der Trachea, liegen. Da der *Lobus cranialis* rechtsseits und am weitesten cranial angeordnet ist, ist er vermutlich am schwersten zugänglich für die Testsubstanz, die im vertikal gestellten Tier verabreicht wird.

Bemerkenswert ist darüber hinaus, dass auch die Kontrolltieren histologisch geschädigt sind. Auch andere Forschergruppen beschrieben eine granulomatöse Entzündung der Lunge in der Brown Norway Ratte (Singh et al., 2003; Germann et al., 1998). Die histopathologischen Abbildungen weisen diesbezüglich nicht nur Anzeichen der akuten Entzündung durch die applizierte Substanz TMA auf, sondern auch Merkmale einer geringgradigen, chronischen Entzündung. Diese für Brown Norway typische Inflammation scheint jedoch keinen Einfluss auf die dosisabhängige Entwicklung der Entzündung zu haben. Eine Korrelation der histologischen Entzündungsanzeichen mit Zunahme der Substanzkonzentration kann eindeutig bis zur statistischen Signifikanz ($p < 0,05$) bei nur 0,6% TMA nachgewiesen werden. Mit diesen Versuchen wird die Eignung dieser Applikationsart für die folgenden Versuchsvorhaben bestätigt: Eine nur zweimalig durchgeführte intratracheale Behandlung führt zur histologischen Veränderung in allen fünf Lungenlappen der Brown Norway Ratte und ist zudem konzentrationsabhängig nachweisbar.

4.3. Brown Norway versus Wistar - zwei Rattenstämme im Vergleich.

Die Ratte ist ein Standard-Versuchstier in der toxikologischen Forschung. In den durchgeführten Vergleichstudien zwischen Wistar und Brown Norway Ratten wird jedoch deutlich, dass zwischen verschiedenen Rattenstämmen signifikante Unterschiede in den Messparametern auftreten können, die auf stammspezifische Eigenschaften zurückzuführen sind. Die durchgeführten Versuche zeigen, bei zwar gleicher Reaktionskinetik bezüglich der Zu- und Abnahme von MCP-1 an Tag 3 und Tag 4, eine eindeutig stärkere Reaktion in der Expression von MCP-1 in den Brown Norway Ratten nach TMA-Behandlung. Die Infiltration der Entzündungszellen als Reaktion auf die TMA-Behandlung ist bei Brown Norway Ratten ebenfalls stärker ausgeprägt. Eine Infiltration neutrophiler Zellen ist bei Wistar Ratten eindeutig induzierbar, Eosinophile können jedoch im Vergleich zur Brown Norway Ratte nicht nachgewiesen werden. Wie auch schon aus den histologischen Untersuchungen ersichtlich, weisen die Brown Norway Ratten eine stammspezifische Entzündung der Atemwege auf, die dazu führt, dass nach Induktion entzündlicher Prozesse (hier durch TMA) eine stärkere Reaktion durch Zytokin und zelluläre Infiltration nachweisbar ist. Eine Neigung zur Eosinophilie ist diesem Rattenstamm ebenfalls eigen. Die gezeigten Daten der Kontrolltiere weisen zwar keine ausdrückliche eosinophile Entzündung auf, dieses Phänomen wird aber häufig beobachtet.

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse CD4/CD8 gefärbter Lymphozyten aus den lungendrainierenden Lymphknoten von Wistar und Brown Norway Ratten wird über die Neigung zu entzündlichen Reaktionen hinaus deutlich, dass ebenfalls eine Reaktionspräferenz des adaptiven Immunsystems in der Brown Norway Ratte vorliegt. Ein CD4/CD8 Quotient von etwa 2,5 bei Wistar Ratten und ein Quotient von 12 bis 13 bei Brown Norway Ratten weist auf eine CD4-lastige Ausprägung des Immunsystems hin. Fournié et al. verglichen in ihren Studien die Entwicklung von T_H-1 und T_H-2 abhängigen Autoimmunerkrankungen in Brown Norway und Lewis Ratten und stellten in diesem Zusammenhang eine gleiche Menge an CD4 Zellen in der Brown Norway Ratte fest, die aber in Verbindung mit einer dreifach geringeren Menge an CD8 Zellen zu einer starken Veränderung des CD4/CD8

Quotienten in der Brown Norway Ratte im Vergleich zur Lewis Ratte führte (Fournié et al. 2001).

Auch die Tatsache, dass bei Brown Norway Ratten eine Erhöhung des Quotienten (gleichbedeutend mit einer Erhöhung der CD4 Population) durch die TMA-Behandlung induziert wird, weist auf eine Reaktionspräferenz des Immunsystems zu einer T_H-Zellreaktion hin, die auch schon Fournié et al. (2001) in den Vergleichsstudien zeigen konnten. Diese Tatsache macht den Rattenstamm Brown Norway zu geeigneten Versuchstieren für eine allergische, T_H-2-gesteuerte Immunreaktion. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu bedenken, dass es durch die erhöhte Sensitivität des Individuums zu einer Überinterpretation der Ergebnisse oder sogar zu „falsch positiven“ Testergebnissen kommen könnte, wenn die Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden. Ähnliche Problematiken sind z.B. bei den Bronchokonstriktionstests an Meerschweinchen bekannt, die zu einer überdimensionierten Reaktion neigen.

Bisher deuten die experimentellen Ergebnisse an Brown Norway Ratten jedoch auf eine eher bessere Eignung dieses Tierstammes für die Evaluation von Asthma hin, da viele asthmaspezifische Parameter in der Brown Norway Ratte im Vergleich zu anderen Rattenstämmen gut induzierbar sind. Bei diesen Überlegungen muß auch berücksichtigt werden, dass es bei einem Screeningmodell in erster Linie um die Bestimmung des Gefahrenpotentials einer Substanz (Hazard Identification) und noch nicht um die Risikoabschätzung (Risk Assessment) gehen muß.

4.4. Der lokale Lymphknotentest - Ereignisse in der Lunge und im Lymphknoten nach intratrachealer TMA-Applikation.

In Anlehnung an den murinen Lokalen Lymphknoten Test zur Induktion einer Typ IV Reaktion an der Haut wurden in den Studien an Brown Norway Ratten nach intratrachealer Applikation der Substanz die drainierenden Lymphknoten der Lunge gewogen und ihre Zellzahl bestimmt. Die Ergebnisse zeigen eine Erhöhung der Parameter Zellzahl und Lymphknotengewicht nach Substanzapplikation im Vergleich zur Kontrolle. Das zeigt, dass eine entzündliche Reaktion durch die Behandlung nicht nur lokal ausgelöst wird, sondern sich durch das lymphatische System bis zu den drainierenden Lymphknoten ausbreitet. Die Spezifität der Immunreaktion kann jedoch auf diese Weise nicht eindeutig bestimmt werden. Durch verschiedene Untersuchungen im lokalen Lymphknotentest wurde gezeigt, dass eine entzündliche Reaktion durch eine Zunahme der Zellzahl im Lymphknoten gekennzeichnet sein kann, jedoch nicht zwangsläufig mit einer Bildung spezifischer Effektor- und Gedächtniszellen einhergehen muss (Cumberbatch et al., 1993; Loveless et al., 1996; Basketter et al., 1994; Montelius et al., 1998). Um die Spezifität der Immunreaktion näher zu charakterisieren, wurden daher zusätzlich durchflusszytometrische Analysen durchgeführt, die den Aktivierungszustand von Lymphozyten oder antigenpräsentierenden Zellen kennzeichnen.

CD45 ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, die als positiver Regulator an der Signalweiterleitung über den IL-4 Rezeptor beteiligt ist. Die hohe Empfindlichkeit der naiven T-Zelle gegenüber IL-4 ist eine Grundvoraussetzung für ihre Aktivierung, Entwicklung zur T_H-2 Zelle und Proliferation (Stütz et al., 2005) sowie für die Entwicklung von der naiven zur Effektor-T-Zellen erforderlich (Lynch et al. 2000; Kristensson et al., 1992).

Die Ergebnisse der CD4⁺/CD45^{niedrig} Färbung zeigen eine Zunahme der CD4⁺/CD45^{niedrig} Population durch die TMA-Behandlung. Am Tag 3, 24 Stunden nach der zweiten Applikation, werden 10% mehr CD4⁺/CD45^{niedrig} exprimierende Zellen in den drainierenden Lymphknoten nachgewiesen als in der vehikelbehandelten Kontrolle, an Tag 4 sind es sogar 22%. Diese Daten korrelieren mit den Forschungsergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen (Stütz et al., 2005; Arlettaz et al., 1999; Bunce et al., 1997; Hargreaves et al., 1997), die zeigen, dass eine Aktivierung von naiven T-Zellen

mit einer verminderten Expression der hochmolekularen Form von CD45RC einhergeht, und bei Gedächtniszellen schließlich kein oder nur noch sehr wenig CD45 auf der Zelloberfläche nachweisbar ist. Deans et al. (1998) zeigten in *in vitro* Versuchen, dass die Verminderung der CD45-Expression 24 Stunden nach der Aktivierung beginnt und nach zwei bis vier Tagen die maximale Ausprägung erreicht. Xu et al. (2002) wiesen eine verminderte Expression der hochmolekularen Isoform von CD45 drei bis fünf Tage nach Aktivierung der T-Zelle nach (Xu et al. 2002). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine Stimulation der CD4⁺ T-Zellpopulation durch TMA-Verabreichung stattgefunden hat, und dass, aufgrund des Zusammenwirkens von CD45 bei der Signalübertragung über den IL-4 Rezeptor sowie der Beteiligung an der Rezeptivität der CD4⁺ Zelle gegenüber IL-4 (Stütz et al. 2005), eine T_H-2 Antwort eingeleitet wurde.

Die Beteiligung regulatorischer T-Zellen an der Entstehung und Unterdrückung allergischer Reaktionen ist unumstritten. Es ist bekannt, dass bei der Aktivierung spezifischer T_H-2 Zellen, die zur Entstehung einer allergischen Reaktion führt, auch die Aktivierung regulatorischer Zellen erfolgt (Carson et al, 2008; Skripuletz et al., 2007). Verschiedene Subpopulationen regulatorischer CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen sind mittlerweile bekannt. Man unterscheidet die natürlichen regulatorischen Zellen (Treg), die sich thymusabhängig entwickeln, von den in der Peripherie entstandenen regulatorischen T-Zellen (Tr-1 und T_H-3), die sich aus konventionellen T-Zellen entwickeln und keine gesonderte Zelllinie darstellen. Unabhängig davon, auf welche Weise die regulatorischen T-Zellen generiert werden, können sie eine immunmodulatorische Suppressorfunktion übernehmen (Tournoy et al. 2006). Die in der Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen eine Induktion der CD4⁺/CD25⁺ Zellpopulation durch die zweimalige intratracheale TMA-Behandlung. Am Tag drei wird eine Zunahme um 15% in Bezug zur Kontrolle gemessen, am Tag vier beträgt die Zunahme 27%. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit neueren Untersuchungen von Skripuletz et al. (2007), die in Ovalbumin (OVA) sensibilisierten Fischer Ratten eine dosisabhängige Induktion CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen sowohl in den Lymphknoten als auch in der Lunge nachwiesen (Skripuletz et al. 2007).

Die Entwicklung und Aktivierung regulatorischer Tr-1 und T_H-3 Zellen wird unter anderem durch „suboptimale“ Antigenstimulation hervorgerufen, weshalb diese Zellpopulation auch als induzierbare regulatorische T Zellen bezeichnet werden.

Faktoren, die zur Generation dieser regulatorischen T-Zellpopulationen führen, sind der Kontakt mit dendritischen Zellen, die geringe Mengen costimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 oder CD40 auf der Zelloberfläche exprimieren (Jonuleit et al., 2000; Hultkrantz et al. 2005).

Durch die Tatsache, dass zwar eine T-Zellaktivierung stattgefunden hat, aber keine costimulatorischen Moleküle nachgewiesen werden konnten, kann der Schluss gezogen werden, dass eine Induktion regulatorischer T-Zellen aus konventionellen T-Zellen stattgefunden hat. Skripuletz et al (2007) konnten neben der dosisabhängigen Zunahme von $CD4^+/CD25^+$ Zellen überdies, insbesondere im Lymphknoten, den Aktivierungsmarker Foxp3 nachweisen, was wiederum die Anwesenheit von thymusabhängigen Tregs nahelegt.

Letztendlich ist die Balance zwischen regulatorischen Zellen und aktivierten T_H -2 Zellen entscheidend für die Einleitung oder Unterdrückung der allergischen Immunreaktion (Tournoy et al. 2006). Die Ergebnisse der durchgeführten FACS-Analysen zeigen eine Aktivierung regulatorischer T-Zellen, die in ihrem Anteil an der gesamten aktivierten T-Zell-Population jedoch zu gering ist, um sich auf die Induktion der Sensibilisierung auszuwirken. Auch in der Lunge werden vermehrt regulatorische Zellen nach TMA-Applikation nachgewiesen. Die stärkste Ausprägung der Induktion ist wiederum am Tag vier zu messen. In den Kontrolltieren werden 17%, in den TMA-behandelten Tieren 27% $CD4^+/CD25^+$ Zellen bestimmt. So wie Skripuletz et al. (2007) zeigten auch Carson et al. (2008) und Haczku et al. (1995) eine Anhäufung T-regulatorischer Zellen im bronchoalveolaren Lavagefluid nach Antigenstimulation. Es ist demnach festzustellen, dass regulatorische Zellen eine für die asthmatische Reaktion kennzeichnende T-Zellpopulation sind, die in dieser Arbeit erstmals während der Induktionsphase nachgewiesen wurde. Ob es sich aber hierbei um einen zielgerichtete Aktivierung regulatorischer Zellen in Bezug auf die Entwicklung der allergischen Reaktion handelte oder um einen sogenannten „bystander Effekt“, der als Folge der allgemeinen Immunaktivität auftritt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Bestimmung des CD4/CD8 Verhältnisses bei Brown Norway Ratten zeigt eine Zunahme der CD4 Population im Lymphknoten, mit einer Zunahme des Quotienten von etwa 12 auf 15. Die relative Erhöhung der Lymphozytenpopulation im drainierenden Lymphknoten nach der TMA Behandlung ist zwar nur geringfügig, steht aber dennoch im Einklang mit den Ergebnissen der CD4/CD45 Zellanalyse und zeigen erneut eine

CD4 Aktivierung des Immunsystems in Richtung T_H-Immunantwort durch die TMA-Behandlung.

Eine weitere Bestätigung für die CD4⁺-Reaktion ergibt sich aus der durchflusszytometrischen Analyse der Zellen aus der Lunge. Die CD4⁺ T-Zellpopulation nach intratrachealer Applikation von TMA nimmt zu. Am Tag drei, 24 Stunden nach der zweimaligen TMA-Applikation, können in der Kontrollgruppe durchschnittlich 26% CD4⁺ Zellen bestimmt werden, in der TMA-behandelten Gruppe sind es 31%. Am Tag vier ist die Zunahme der CD4⁺ Zellpopulation noch größer: In der Kontrollgruppe werden 22% und in der TMA-Gruppe 34% CD4⁺ Zellen gemessen. Diese Beobachtung bestätigt die Vermutung, dass die im Lymphknoten aktivierten CD4⁺ T-Zellen erwartungsgemäß zum Entzündungsherd, also zur Lunge migrieren und dort ihre Effektorfunktion ausüben. Aber nicht nur Lymphozyten werden in die Lunge rekrutiert und aktiviert, sondern auch CD11bc⁺ Zellen. In der FACS-Analyse wurde deutlich eine durch TMA induzierte CD11bc⁺/MHCII⁻ Zellpopulation gezeigt. Somit handelt es sich hierbei nicht um eine professionell antigenpräsentierende Population, sondern um Monozyten, die -ausgelöst durch die entzündliche Reaktion- aus dem Blut in die Lunge infiltrieren. CD11b und CD11c spielen als Adhäsionsmoleküle eine Rolle bei Anhaftungsvorgängen während der Zellmigration von aktivierten Monozyten. Durch MCP-1 wird dieser Vorgang vorangetrieben (Boitelle et al., 1997). Auch Schneider et al. (1997) zeigten in ihren Untersuchungen die Zunahme von Monozyten in der Lunge von Brown Norway Ratten nach zwei bis sechs Tagen nach einer OVA-Challenge. Auch in der Lunge können weder costimulatorische noch MHC II Moleküle (wichtig für die Antigenpräsentation) nachgewiesen werden, was mit den Ergebnissen im Lymphknoten übereinstimmt.

Die nur geringfügige Erhöhung der Anzahl antigenpräsentierender Zellen im Lymphknoten, bestimmt durch die CD11bc Färbung im FACS, ist vermutlich durch die verhältnismäßig geringe Dichte antigenpräsentierender Zellen im Lymphknoten zu begründen, die einen Nachweis ohne vorherige Aufreinigungsschritte zur Konzentration antigenpräsentierender Zellen erschwert. Daher stammt der größte Teil der Forschungsergebnisse, die sich auf die Untersuchung der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 beziehen, von *in vitro* aufgereinigten dendritischen- oder auch von *ex vivo* Zellkulturen atopischer oder sensibilisierter Individuen. So zeigten Hochweller et al. (2005) in verschiedenen *ex vivo* Versuchen die Induktion von CD80 und CD86 auf

dendritischen Zellen nach Aktivierung mit OVA und LPS. Die Nachweisbarkeit von CD80 ist bis zu zwei Tagen nach der Aktivierung gegeben, CD86 fällt nach drei Tagen wieder auf das Basislevel der Kontrolle zurück. Durchflusszytometrische Analysen von alveolaren Makrophagen asthmatischer Patienten wiesen eine erhöhte CD86 Expression auf der Zelloberfläche auf (Chen et al., 2006). Diese beiden Untersuchungen deuten darauf hin, dass ein Nachweis costimulatorischer Oberflächenmarker dann möglich ist, wenn sich die Immunreaktion in der Lunge ausreichend etabliert hat und genug aktivierte antigenpräsentierende Zellen in der Lunge vorhanden sind, um bei Substanzprovokation spezifische T-Zellen vor Ort zu stimulieren.

4.5. Die zytotoxische Reaktion in der Lunge – Vergleich der Testsubstanzen Trimellithanhydrid (TMA), Methylen-Diisocyanat (MDI) und Sodium-Dodecylsulfat (SDS)

Da die drei Testsubstanzen TMA, MDI und SDS unterschiedlich starke Zytotoxizität verursachen, können sich sensibilisierende Effekte mit zytotoxischen Reaktionen überlagern. Um diese Erscheinung genauer zu analysieren, wurden die Lungen nach einmaliger Applikation der Testsubstanz mittels LDH-Tests auf Kinetik und Ausprägung zytotoxischer Effekte untersucht. Da irritative Effekte aber auch im Sinne eines Adjuvant agieren, indem sie durch die entzündlichen Reaktionen auch die spezifische Immunantwort unterstützen (Siegel et al., 1997; Straube et al., 2005), musste das Ziel sein, eine Low-Effect-Level Irritation (mit LDH Faktor 2 der Kontrolle) durch die Titration zu bestimmen. Die Infiltration neutrophiler Zellen und die Expression von MCP-1 wurden ebenfalls untersucht.

Um einen geeigneten Meßzeitpunkt zur Bestimmung der zellschädigende Wirkung festlegen zu können, ist es wichtig, zuvor die Abhängigkeit zwischen Verweildauer der Testsubstanz in der Lunge und der Erhöhung der zytotoxischen Reaktion zu analysieren. Dieses wurde zunächst anhand von TMA-Applikationen untersucht. Mit zunehmender Inkubationszeit konnte tatsächlich eine Erhöhung der LDH-Freisetzung über die Zeit nachgewiesen werden, die ab sechs Stunden über längere Zeit im Maximum bleibt.

Die MCP-1 Konzentration sowie die Anzahl Neutrophiler in der Lavage nehmen ebenfalls mit der Zeit zu. Beide Parameter nehmen ebenfalls nach sechs Stunden zu. Sie steigen 12 Stunden nach der TMA-Behandlung aber im Vergleich zu den Kontrollgruppen nochmals deutlich an. Da die Messparameter nach 12 Stunden signifikant induziert sind, wurde dieser Zeitpunkt auch für den Vergleich der zytotoxischen Reaktionen der beiden anderen Testsubstanzen MDI und SDS, festgelegt. Die Konzentration wurde so gewählt, dass ein LDH-Index von Faktor 2 erreicht wird. Die Erhöhung der LDH-Konzentration um das 2-fache der Kontrolle kann als Anzeichen einer schwach induzierten Entzündung, im Bereich des LOEL, betrachtet werden. Da eine Akkumulation der LDH-Freisetzung 24 Stunden nach der zweimaligen Behandlung am Tag drei nicht weiter steigt, sondern ebenfalls eine 2-fache Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle anzeigt, bestätigen sie die geringe zytotoxische Reaktion im

Versuch und somit den Low-Observed-Effect-Level als korrekt gewählt. Pauluhn zeigt in seinen extensiven Irritationstudien anhand verschiedener inhalativ verabreichter Polyisocyanate eine zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme von LDH in der Lavage. Die Studien belegen darüber hinaus, dass, wenn LDH > 2 induziert wird, die LDH-Konzentration erst nach mindestens drei Tagen dem Basislevel entspricht, was wiederum bestätigt, dass zu hoch gewählte Konzentrationen zu ungewollt starken kumulativen zytotoxischen Effekten führen. Bei Substanzkonzentrationen, die LDH-Konzentrationen von Faktor 2 der Kontrolle bewirken, sinken hingegen die LDH-Mengen innerhalb von zwei bis drei Tagen auf den Ausgangswert (Pauluhn, 2004).

Gemäß Tabelle 3 entwickeln sich die Parameter MCP-1 und Neutrophile ebenfalls bei den drei Substanzen gleich ausgeprägt. Die Expression von MCP-1 steigt bei allen Substanzen um das 7- bis 8-fache an und die prozentuale Menge an Neutrophilen nimmt im Vergleich zur Kontrollgruppe um das 12- bis 13-fache zu. Die zeitabhängige Kinetik der entzündlichen Reaktion zeigt für alle gemessenen Parameter und getesteten Substanzen nach 12 Stunden die gleiche Ausprägung.

Dagegen verläuft die Reaktionskinetik bei unterschiedlichen Konzentrationen und den verschiedenen Substanzklassen, der irritierenden Substanz SDS und den sensibilisierenden Substanzen TMA und MDI, unterschiedlich. Die Reaktionskurve der sensibilisierenden Substanzen beschreibt einen konvex progressiven Verlauf, das irritierende Agens SDS hingegen bewirkt einen konkav regressiven Verlauf der LDH-Freisetzung und einen proportionalen Verlauf der Neutrophilen. Die maximal erreichbare Zellschädigung durch die eingesetzten Substanzkonzentrationen ist zwar bei allen Testsubstanzen gleich, aber die reizende Chemikalie SDS bewirkt schon bei deutlich niedrigeren Substanzkonzentrationen eine signifikante Zellschädigung.

Bestätigt wird dieser Sachverhalt durch die LDH-Bestimmung nach zweimaliger Substanzapplikation am Tag 3, wonach keine Erhöhung der LDH-Konzentration durch die länger andauernde Entzündung einsetzt, also keine der Testsubstanzen die maximale Zellschädigung zu einem späteren Zeitpunkt herbeiführt. Das heißt, dass bei gleicher irritativer Potenz der Chemikalie bezüglich der maximalen zytotoxischen Ausprägung der irritierenden Substanz SDS bei Konzentrationen von 0,1% bereits erheblich stärker wirkt als die sensibilisierenden Substanzen.

4.6. Multiplex Analyse intrazellulärer und sezernierter Proteine im Bronchoalveolar Fluid

Untersucht wurde die Auswirkung der irritierenden Substanz SDS und der sensibilisierenden Substanzen TMA und MDI auf die Zytokinexpression während der Induktionsphase bei gleicher zytotoxischer Wirkung der Substanzen, wie im vorherigen Kapitel erläutert wurde. Hierzu wurde das Bronchoalveolar-Lavage-Fluid sowie die intrazelluläre Zytokinkonzentration in den Lavage Zellen nach der Substanzapplikation an den Tagen drei und vier bestimmt. Es konnten die Zytokine MCP-1 und IL-1 α nachgewiesen werden, jedoch nicht die Zytokine TNF- α , IFN- γ , IL-4 und GM-CSF.

Die Expression von MCP-1 wurde durch alle drei Testsubstanzen induziert und ist sowohl im Lavage Fluid als auch in den Zellen der Lavage nachweisbar. Die gemessene Konzentration von MCP-1 ist grundsätzlich bei allen drei Testsubstanzen an Tag drei höher als an Tag vier. Die reizende Substanz SDS löst einen drastischen Anstieg der MCP-1 Konzentration im Vergleich zu TMA und MDI aus. Im Fluid der irritierenden Substanz ist die Konzentration von MCP-1 doppelt so hoch wie die durch die sensibilisierenden Substanzen maximal induzierte Menge, intrazellulär sogar viermal höher. Interleukin-1 α wird im Lavage Fluid knapp über der Detektionsgrenze des Assays bestimmt.

Die Messdaten zeigen eine geringfügige, aber konstante Erhöhung der IL-1 α Menge im Fluid nach Substanzapplikation. Die intrazelluläre Expression von IL-1 α hingegen wird stark hoch reguliert. SDS löst wieder eine 4-fach höhere Induktion als die sensibilisierenden Substanzen aus.

Die zur Substanzapplikation zeitnahe Expression von MCP-1 deutet auf die akute Entzündungssituation in der Lunge hin. Ein charakteristisches Kennzeichen der akuten pulmonalen Entzündung ist die Monozytenrekrutierung aus dem Gefäßbett der Lunge, wobei MCP-1 ein Hauptagonist dieses chemotaktischen Vorgangs ist (Rosseau et al. 2000; Fuentes et al, 1995). Dieser Vorgang steht ebenfalls im Einklang mit den durchflusszytometrischen Analysen, die eine verstärkte CD11bc Expression nach Substanzapplikation zeigen. CD11bc ist als Adhäsionsmolekül ein Aktivierungsmarker von migrierenden Monozyten, deren Rekrutierung in erheblichem Maße von MCP-1 gesteuert wird.

Interleukin-1 α wird nur intrazellulär nach Substanzbehandlung in erhöhter Konzentration nachgewiesen. Im Vergleich zu MCP-1 ist IL-1 α in größeren Mengen in

den Kontrolltieren vorhanden. Dieses könnte auf eine ähnliche konstitutive Expression hinweisen, wie sie z.B. bei Keratinozyten der Haut bekannt ist, die ein Reservoir an IL-1 α besitzen (Horiuchi et al., 2003). Darüber hinaus gehört IL-1 α zu den proinflammatorischen Zytokinen, die bei entzündlichen Reaktionen und Zellschädigung auftreten. Die Tatsache, dass IL-1 α kaum im Fluid nachzuweisen ist, lässt vermuten, dass das lösliche IL-1 α entweder überwiegend von Rezeptoren gebunden ist oder aber von Makrophagen oder Monozyten produziert und noch nicht sezerniert wurde. Die Tatsache aber, dass die SDS behandelten Tiere eine starke intrazelluläre IL-1 α Expression aufweisen, zeigt, dass eine irritative Reaktion über die rein zytotoxische Reaktion hinaus (evaluiert durch den LDH-Test) stattgefunden hat. Unterstützt wird diese These durch die hohe Konzentration an MCP-1 bei SDS-behandelten Tieren. Die hohen MCP-1 Konzentrationen im Fluid werden nicht nur durch die MCP-1 Produktion aktivierter Monozyten oder Makrophagen erreicht, sondern es ist bekannt, dass MCP-1 auch bei Reizung der Schleimhaut von epithelialen Zellen sezerniert wird (Ying, 2000; Fischäder et al., 2007; Takizawa, 2005). Grundsätzlich sind eine Reihe von Zelltypen bekannt, die zur MCP-1 Produktion fähig sind (Smit et al., 2005). Endotheliale Zellen tragen beispielsweise durch die MCP-1 Produktion zur chemotaktischen Rekrutierung von Monozyten durch das Gefäßsystem bei, aber auch Fibroblasten und Zellen der glatten Muskulatur sind in der Lage MCP-1 zu sezernieren, gewinnen jedoch erst bei weiter fortgeschrittenen Stadien der Entzündung an Bedeutung (Takizawa, 2005; Smit et al., 2006). Da die hier durchgeführten Versuche die akute Entzündungssituation eines Kurzzeitbehandlungsmodells darstellen, ist davon auszugehen, dass die Reizung des Lungenepithels im Wesentlichen zur Ausschüttung von MCP-1 durch epitheliale Zellen beiträgt. Die IL-1-Expression hingegen beschränkt sich hauptsächlich auf Makrophagen, Monozyten und Granulozyten. Der Vergleich der beiden Substanzklassen legt demnach den Schluss nahe, dass trotz gleicher zytotoxischer Reaktionen eine irritierende Substanz (hier SDS) insbesondere auf das angeborene Immunsystem einwirkt und durch Expression proinflammatorischer (IL-1 α) und monozytenrekrutierender (MCP-1) Zytokine gekennzeichnet ist.

Die Analyse der Infiltration von Neutrophilen und Eosinophilen in die Lunge gibt weiteren Aufschluss über die Wirkung der unterschiedlichen Substanzklassen auf die Lunge. Infiltration von Eosinophilen ist ein typisches Kennzeichen der asthmatischen Situation beim Nager aber auch charakteristisch für den Menschen. Die Untersuchung

der Eosinophilie gibt Aufschluss über die Spezifität der eingeleiteten Immunreaktion. Die entzündliche Reaktion hingegen, gekennzeichnet durch die Neutrophileninfiltration, steht in engem Zusammenhang mit dem zytotoxischen Potential der Testsubstanz. So weisen alle Substanzen am Tag drei eine gleiche Erhöhung der freigesetzten LDH-Konzentration auf. Das Gleiche gilt für die Neutrophilen, die am Tag drei maximal erhöht, aber am Tag vier bereits fast wieder auf dem Ausgangsniveau waren. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Erhebungen überein, die ebenfalls ein Maximum der Neutrophileninfiltration 24 Stunden nach Substanzexposition nachgewiesen haben (Schneider et al., 1997).

Die Bestimmung der Eosinophilen in der Lavage bestätigt in den durchgeführten Versuchen die eingangs erwähnte Eosinophilie von Brown Norway Ratten. Die Kontrolltiere der TMA- und MDI-behandelten Gruppen haben zwischen 10% und 15% Eosinophile Zellen im Lavagefluid, was deutlich über den durchschnittlich erhöhten eosinophilen Anteilen der Brown Norway Ratte zwischen 3% bis 5% liegt. Die Induktion der Infiltration der Eosinophilen ist bei allen drei Substanzen am vierten Versuchstag höher als am Tag drei. Die stärkste Induktion wird durch SDS ausgelöst. Die Ergebnisse zeigen, dass eine asthmaspezifische Induktion von Eosinophilen durch dieses Behandlungsprotokoll in der Brown Norway Ratte nicht induziert werden kann. Vielmehr wird deutlich, dass die Rekrutierung eosinophiler Zellen während der Induktionsphase ein Merkmal der akuten Entzündung darstellt. Dieses verdeutlicht noch einmal die Neigung der Brown Norway Ratte, eine Eosinophilie auch auf eine unspezifische Reizung hin auszubilden. Impliziert jedoch nicht, dass im späteren Verlauf einer asthmatischen Erkrankung eine funktionell allergene Effektorfunktion von Eosinophilen übernommen wird.

Die Analyse des gleichen Zytokin-Sets wurde ebenfalls an Lymphozyten aus den lungendrainierenden Lymphknoten durchgeführt. Es konnten allerdings keine Induktionen der analysierten Parameter (MCP-1, IL-1 α , TNF- α , IFN- γ , IL-4, GM-CSF) gefunden werden. Das bedeutet, dass entweder die Zytokinexpression in einem anderem Zeitfenster liegt und daher zum Messzeitpunkt nicht erfasst werden kann oder die Konzentrationen zu gering sind, um mit dieser Methodik nachgewiesen werden zu können.

4.7. *Induktion und Boost*

Die Analyse der Parameter der Induktionsphase hatte ergeben, dass eine Differenzierung zwischen Irritation und spezifischer Aktivierung einer respiratorischen Sensibilisierung zwar komplex, aber evtl. möglich ist. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, so ein Kurzzeitmodell für die Frage des Einflusses der Applikationsroute auf die Ausprägung einer respiratorischen Hyperreaktion zu nutzen. Wie zuvor erwähnt, wurde aber zusätzlich die Untersuchung der Eosinophilie im Verlauf der Immunreaktion wichtig. Die Standardprotokolle in der Inhalationstoxikologie folgen normalerweise dem Schema: Induktion → Boost → Challenge. Der Verlauf der wichtigsten Parameter sollte deswegen gemäß diesem Schema mit der Modellsubstanz TMA ebenfalls analysiert werden.

Nach dem Boost am achten Versuchstag wurden die Parameter Eosinophile, Neutrophile und die Zytokinexpression hinsichtlich IL-1 α , MCP-1, TNF- α , IFN- γ , IL-4 und GM-CSF an TMA-behandelten Tieren untersucht. Die Ergebnisse belegen eine deutlich höhere Infiltration an Eosinophilen (ca. 4-fach höher als nach der Induktion). Die Reaktionskinetik eosinophiler Zellen zeigt bei allen anderen durchgeführten Untersuchungen am Tag vier die stärkste Erhöhung. Auch andere Arbeitsgruppen wie Schneider et al., (1997) konnten diesen Verlauf ebenfalls etwa 48 h nach Substanzgabe beobachten. Ob die drastische Zunahme eosinophiler Zellen am Tag neun aufgrund einer lang andauernden ersten Reaktion erfolgt muss noch geklärt werden, da ein Abklingen der Eosinophilen Infiltration erst nach mehreren Tagen bzw. Wochen auftritt und folglich kumulative Effekte zur großen Erhöhung der Eosinophilen beitragen, wie beispielsweise von Schneider et al. (1997) gezeigt wurde. Ebenso ist es denkbar, dass die Infiltration eosinophiler Zellen über die Versuchsdauer mit wiederholter Substanzgabe an „immunologischer Spezifität“ gewinnt. Somit wäre sie nicht mehr alleine auf den Auslöser der entzündlichen Situation zurückzuführen, sondern auf eine Zunahme der adaptiven Komponente der Effektorfunktion. Eine Ausprägung der etablierten asthmatischen Immunantwort, die von Eosinophilen durchaus bekannt ist, wäre auf diese Weise angezeigt.

Vergleichsweise gering fällt die Erhöhung der Neutrophilen nach dem Boost aus. Diese Zellpopulation erreicht ihr prozentuales Maximum eindeutig 12 bis 24 Stunden nach der letzten Behandlung. Eine erneute, vergleichsweise starke Erhöhung wird am Tag neun, 24 Stunden nach erneuter Behandlung, nicht mehr erzielt. Dieses deutet wiederum auf

eine verminderte Reaktion des Immunsystems auf die entzündliche Noxe nach wiederholter Applikation hin.

Durch die Boost-Behandlung wird MCP-1 wieder stark induziert. Im Lavagefluid wird eine Erhöhung um das 7-fache im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Die Gegenüberstellung mit den Ergebnisse nach 12 Stunden und am Tag drei, 24 Stunden nach der letzten Substanzgabe, zeigt, dass MCP-1 12 Stunden nach einmaliger Applikation um das 12-fache zunimmt. Am Tag drei hingegen nur um das 3 bis 4-fache. Dies könnte für eine duale Rolle von MCP-1 sprechen. Zum einen ist MCP-1 als CC Chemokin in vermutlich relativ selektiver Funktion für die Chemotaxis und Aktivierung insbesondere von Monozyten, aber nicht von Neutrophilen verantwortlich (Ying, 2000). Es steht also in Verbindung mit der akuten Entzündungssituation, ausgelöst durch die inflammatorische Komponente von TMA, und ist daher bei erstem Kontakt der Lunge nach kurzer Zeit stark erhöht. Neben dieser Funktion übt MCP-1 aber auch chemotaktische Wirkung auf T-Zellen und Eosinophile aus. Berin (2002) zeigte, dass die Inaktivierung von MCP-1 einen negativen Effekt auf die Leukozytenrekrutierung ausübt. Zudem übernimmt MCP-1 eine Funktion bei der Entwicklung von T_H-2 Zellen (Luther et al., 2001; Gu et al., 2000). In verschiedenen *in vivo* Versuchen an transgenen Mäusen mit MCP-1-Defizienz konnte gezeigt werden, dass MCP-1 eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von T_H-0 zu T_H-2 spielt, die sich sogar auf den Ausgang einer Infektion mit *Leishmania major* oder *Shistosoma mansoni* auswirkt (Chensue et al., 1996; Lu et al., 1998).

Andere Untersuchungen von Matsukawa et al. deuten ebenfalls auf eine wichtige Funktion von MCP-1 beim Priming von T_H-2 hin. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von MCP-1 während der Auslösephase keinen Einfluß auf die Entwicklung des T_H-1/T_H-2 Gleichgewichts hat, eine Überexpression von MCP-1 während des Erstkontaktes der T-Zelle mit Antigen aber durchaus eine stärkere Ausbildung der T_H-2 Antwort bewirkt (Matsukawa et al., 2000).

Die Beteiligung von MCP-1 an der Rekrutierung und Entwicklung von T-Zellen zeigt sich im Zusammenhang mit einem neuerlichen Anstieg der MCP-1 Konzentration am Tag neun. Es ist anzunehmen, dass MCP-1 nicht nur aufgrund der wiederholten Entzündung ausgelöst durch TMA exprimiert wird, sondern darüber hinaus an der Generierung der T_H-2 Immunantwort im Hinblick auf die asthmatische Situation mitwirkt. Auch Alam et al. und Sousa et al. zeigten in Untersuchungen von

Asthmapatienten eine Erhöhung von MCP-1 im Bronchoalveolar Fluid (Alam et al., 1996) und im Epithelium von Asthmatikern (Sousa et al., 1994).

Die Immunreaktion nach dem Boost richtet sich demnach eindeutig in Richtung dual agierender Parameter, die einerseits im Zusammenhang mit der Entzündung stehen, aber darüber hinaus eine Verbindung zur adaptiven Immunantwort darstellen, indem sie wie Eosinophile asthmaspezifische Effektorfunktion ausüben oder wie MCP-1 die T-Zellrekrutierung in die Lunge fördern.

Unterstützt wird diese These durch die wenig ausgeprägte Infiltration neutrophiler Zellen am Tag neun. 12 bzw. 24 Stunden nach Substanzgabe wurden prozentuale Zunahmen Neutrophiler um das 12-fache bestimmt, am Tag neun ist die Zunahme nur knapp 4-fach. Demzufolge weicht die Reaktion des Immunsystems von einer rein zytotoxischen und inflammatorischen Immunantwort ab und nimmt vermutlich eine stärker T_H -2 gekennzeichnete Ausprägung an.

Andere Hinweise auf eine asthmaspezifische Funktion von MCP-1 konnten Bernstein et al. und Lummus et al. geben. In verschiedenen Versuchen von *in vitro* MCP-1-Expressionsanalysen mit Monozyten von Diisocyanat-sensibilisierten Arbeitern belegten sie eine spezifische MCP-1 Produktion durch das Antigen Diisocyanat. Überdies weist die MCP-1 Synthese sogar eine höhere Testeffizienz als die Untersuchung spezifischer Antikörper bei der Identifizierung des Diisocyanat-Asthma auf (Bernstein et al., 2002; Lummus et al., 1998).

4.8. Die allergische Frühphasereaktion nach inhalativer TMA-Provokation

Schon seit einigen Jahren wird über die Applikationsroute (Haut versus Lunge) und die damit verbundene Nachweisbarkeit allergener Substanzen in der toxikologischen Routine diskutiert (Kimber, 1996; Holsapple, 2006.; Kimber et al., 2002; Pauluhn, 2002). Diese Thematik gewinnt, abgesehen von toxikologischen Testverfahren, aber auch deshalb an Bedeutung, weil die Beantwortung der Frage, ob eine Sensibilisierung der Lunge durch Hautkontakt ausgelöst werden kann, weitreichende Konsequenzen auf die Risikobewertung einer Substanz hat. Insbesondere niedermolekulare Chemikalien gelten als geeignete Allergene einer Sensibilisierung der Lunge über die Haut. Aus Tierversuchen mit Diisocyanaten und TMA ist die Sensibilisierung der Lunge über die kutane Applikationsroute bekannt (Pauluhn, 2005; Klinker et al., 2003; Sailstad et al., 2003; Pauluhn, 2003).

Dies hatte zur Folge, dass z.B. die Verwendung verschiedener Isocyanate bei Herstellung von Polyurethan und anderen Produkten überwiegend auf die weniger Isocyanat freisetzenden Derivate, wie MDI und andere Polymerenformen, umgestellt wurde. Damit wird zwar das Risiko einer respiratorischen Exposition gesenkt, nicht aber unbedingt das des Hautkontaktes.

Die in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut durchgeführten Inhalationsstudien beinhalten die inhalative TMA-Provokation der asthmatischen Frühphasereaktion intratracheal und epikutan sensibilisierter Brown Norway Ratten. Die Erfassung des Atemwegswiderstandes (Resistance) erfolgte am Tag 21 des Behandlungsprotokolls. 24 Stunden nach der Provokation wurden die Untersuchungen der Zellzusammensetzung im Lavagefluid sowie die Zytokinanalysen von IL-1 α , MCP-1, IL-4, IFN- γ ; GM-CSF, TNF- α im Durchflusszytometer durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Erhöhung des Atemwegswiderstandes in den Lungen der intratracheal vorbehandelten Testgruppe im Vergleich zur epikutan sensibilisierten Testgruppe. Der Erstkontakt mit TMA in der Lunge bewirkt eine durchschnittliche Zunahme um das 11-fache, wohingegen der Erstkontakt über die Haut den Atemwegswiderstand nach TMA-Challenge nur 2-fach erhöht.

Die Zytokinexpression und die Ergebnisse der Eosinophilen und Neutrophilen Infiltration in der Lunge hingegen zeigen Gegenteiliges. Die Zytokine IL-1 α , TNF- α , MCP-1 und IL-4 wurden in der epikutan vorbehandelten Substanzgruppe in etwa dreifach höheren Konzentrationen gemessen als bei der intratracheal sensibilisierten Substanzgruppe. Gleiches gilt für Neutrophilie und Eosinophilie, die ebenfalls in der epikutan vorbehandelten Substanzgruppe stark ausgeprägt sind, aber in der intratrachealen Gruppe nach der Provokation nur marginal ausfallen.

Über die Frage, warum gerade die lungensensibilisierten Tiere eine geringfügige Zytokinreaktion zeigen und niedrige Eosinophilen- und Neutrophilenzahlen aufweisen, kann nur spekuliert werden. Die Untersuchungen nach dem Boost deuten auf eine Abnahme der entzündlichen Reaktion hin. Neutrophile infiltrieren weniger stark, und die MCP-1 Konzentration ist nicht mehr so hoch wie unmittelbar nach dem Erstkontakt. Die Tatsache, dass sich die asthmatische Situation, klar erkennbar an der starken Erhöhung des Atemwegswiderstandes, eindeutig etabliert hat, legt den Schluss nahe, dass die zugrundeliegende T_H-2 Immunantwort eine rein entzündliche Reaktion nicht nur überlagert, sondern auch verhindert. Diese These wird unterstützt durch Untersuchungen von Nomura et al., die in ihren Studien zeigten, dass ein T_H-2 Milieu in der Haut, wie es zum Beispiel bei Neurodermitikern vorkommt, eine Induktion des angeborenen Immunsystems verhindert, was sich in verminderter Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-8, TNF- α und IL-1 äußert (Nomura et al., 2003). Auch in der Lunge konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-8 in der Bronchialmuskulatur (John et al., 1997), in bronchialen Epithelzellen (Fujisawa et al., 2000) und Monozyten (Ameixa et al., 2001) durch eine vorherrschende T_H-2 Immunantwort vermindert wird. Blümel et al. (1999) wiesen an IL-4 transgenen Mäusen eine verminderte T_H-1 Antwort in der Haut als Folge der erhöhten T_H-2 Antwort nach.

Diese Erkenntnisse und die in Verbindung mit der T_H-2-Polung des Immunsystems stehende Eindämmung des Anteils unspezifischer T_H-1 Zellen erklären die verminderte Neutrophilenrekrutierung und Expression der Zytokine.

Für die TMA-provozierten Tiere mit kutaner Applikationsroute bedeutet das, dass eine vollständige Immunisierung der Lunge, mit einer Ausbildung spezifischer lokaler Gedächtniszellen, zu diesem Zeitpunkt noch nicht eingetreten ist. Bestätigt wird dieser Befund durch die geringfügige Reaktion auf die TMA-Inhalation im Challenge, die nur

eine geringe Zunahme des Atemwegswiderstandes zulässt, aber mit hoher lokaler Inflammation einhergeht. Durch die fehlenden Effektorzellen in der Lunge findet demnach auch keine Unterdrückung oder Modulation der proinflammatorischen Immunantwort, die über IL-8 eng mit der Rekrutierung Neutrophiler verknüpft ist, statt. Auch Vohr et al. belegen in einem vergleichbaren Behandlungsprotokoll ebenfalls eine stärkere Reaktion aktivierter Lymphozyten im lungendrainierenden Lymphknoten bei hautsensibilisierten Tieren. In dieser Studie durchgeführte FACS-Analysen zeigten Populationen von $CD4^+/CD25^+$, $PanB^+/I-a^+$ und IL-4 exprimierenden $CD4^+$ Zellen in erhöhtem Maße in epikutan vorbehandelten, nicht aber in inhalativ sensibilisierten Tieren (Vohr et al., 2002). Die stärkere Reaktion ist demnach nicht nur auf die erstmalig auftretende lokale Inflammation in der Lunge zurückzuführen, sondern deutet darüber hinaus auf unterschiedliche Homing-Mechanismen zum Lymphknoten aber evtl. auch zur Lunge hin. In verschiedenen Studien wurde belegt, dass der Status naiver, aktivierter und Gedächtnis-T-Zellen an unterschiedliche Homing-Mechanismen gekoppelt ist. Nach einer T-Zell-Aktivierung werden beispielsweise die Homing-Rezeptoren zum Lymphknoten, wie CD62L und CCR7 herunterreguliert, wohingegen die gewebespezifischen Rezeptoren verstärkt exprimiert werden (Mackay et al, 1990; Hamann et al., 2000, Sallusto et al., 2000; Campbell et al. 2000). Gerade bei T_H -2 Zellen wird einerseits ein Ausschluß vom Lymphknoten und andererseits ein verstärkte Migration zur Milz beobachtet (Iezzi et al, 2001).

Eine weitere Erklärung für die Applikationsrouten abhängige Reaktion könnte auch in einer Generierung unterschiedlicher, „organspezifischer“ Antigen determinanten in der Haut und der Lunge liegen. Die agierenden Zellen und das umgebende Milieu sind lokal unterschiedlich, so dass unterschiedliche Epitope den T-Zellen präsentiert werden können, somit in der Haut generierte Effektorzellen nicht spezifische auf APC der Lunge reagieren können. Solche routenabhängigen Unterschiede wurden z.B. von Bembridge et al (1998) für Viruspartikel und 2000 von Woolhiser et al. für Proteine beschrieben. Diese Effekte könnten ebenfalls dazu beitragen, dass die Immunantwort durch die Lungenprovokation nicht spezifisch genug ist.

4.9. *Ex vivo und in vitro* Modellsysteme

4.9.1 *Ex vivo* Restimulation *in vivo* aktivierter Lymphozyten

Die Stimulierbarkeit von Lymphozyten zur Proliferation hängt unter anderem von ihrer Voraktivierung ab. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente kombinieren eine Vorstimulation der Lymphozyten *in vivo* durch intratracheale Applikation der Testsubstanz MDI mit einer Restimulation der Lymphozyten *in vitro*. Die Restimulation von Lymphozyten aus den lungendrainierenden Lymphknoten erfolgte mittels Anti-CD3 Antikörper, die Restimulation der Lymphozyten aus der Milz mittels LPS und ConA. Darüber hinaus erfolgte eine antigenspezifische Restimulation mit der *in vivo* applizierten Substanz MDI. Sowohl die Lymphozyten der Milz als auch der Lymphknoten reagierten nach *in vivo* Substanzexposition mit einer erhöhten Proliferation bzw. Viabilität im Vergleich zur Kontrolle. Diese Ergebnisse belegen erneut, dass das Kurzzeitmodell mit einer nur zweimaligen Applikation der Testsubstanz an zwei aufeinanderfolgenden Tagen eine nachweisbare Aktivierung von T-Zellen im Lymphknoten ermöglicht.

Die Reaktionen in der Milz sind theoretisch auf eine Ansiedlung aktivierter Lymphozyten zurückzuführen, die sich nach lokaler Reaktion in der Lunge in den lymphatischen Organen verteilen. Es ist aber auch denkbar, dass durch die Applikation eine direkte systemische Reaktion ausgelöst wird. Wie die histologischen Befunde zeigen, ist eine geringfügige Vorschädigung der Lunge typisch für die Brown Norway Ratte. Dieses könnte dazu führen, dass die Testsubstanz in den Blutkreislauf aufgenommen wird und eine systemische Reaktion in der Milz verursacht.

Der Vergleich der Milzzellkulturen mit und ohne mitogenem Stimulus zeigt in der Kultur ohne Zusatz von Mitogen einen verhältnismäßig größere Zunahme der Viabilität zwischen der Kontroll- und *in vivo* behandelten Gruppe. Demnach führt die Vorstimulation *in vivo* zwar zu einer höheren Aktivierung der T- oder B-Zellen im Vergleich zur Kontrolle, die jedoch durch das Mitogen nicht weiter gesteigert wird (die Stimulation der Kontrolle nimmt durch das Mitogen zu, nicht aber die Stimulation der *in vivo* vorstimulierten Lymphozytenkultur).

Es ist bekannt, dass die Beendigung der Immunantwort kein passiver Vorgang ist, sondern gerichtet durch die Expression verschiedener Regulatorproteine stattfindet. Für

die Inhibition der T-Zellantwort ist insbesondere das Oberflächenmolekül CTLA-4 verantwortlich. CTLA-4 interagiert genau wie CD28 mit den costimulatorischen Molekülen CD80 und CD86, inhibiert jedoch die Signalweiterleitung über den T-Zell-Rezeptor. Schon eine Stunde nach T-Zellaktivierung setzt die CTLA-4 Expression ein und erreicht nach etwa 24 Stunden die maximale Ausprägung (Saito et al. 2003). Die Unempfindlichkeit der T- und B-Zellen gegenüber einer Neustimulation mit mitogenen Substanzen oder MDI kann so erklärt werden.

4.9.2 MucilAir - Viabilität und Zytokinexpression nach Substanzexposition

Erstmals wurden Untersuchungen am Schleimhautmodell MucilAir vorgenommen, die auf dem Hintergrund der Substanzklassifizierung zwischen irritierenden und sensibilisierenden Chemikalien durchgeführt wurden. Genauso wie die epithelialen Zellen der Haut, produzieren auch die Lungenepithelzellen eine Reihe wichtiger Zytokine und Chemokine, die einen funktionellen Beitrag zur Homöostase aber auch zur Immunreaktion leisten, indem sie beispielsweise an der Chemotaxis und Reifung von dendritischen Zellen beteiligt sind (Roggen et al., 2006). Im epithelialen Hautmodell z.B. wird an der Validierung von Testprotokollen zur Identifizierung des irritierenden Potentials gearbeitet. Ein entscheidender Endpunkt wird voraussichtlich neben der Viabilität die Bestimmung des Zytokins IL-1 α sein.

Aus diesem Grund ist es von großem Interesse, die modellspezifischen zytokinsezernierenden Eigenschaften von MucilAir genauer zu charakterisieren mit dem Ziel, substanzklassenspezifische Unterschiede im Expressionsmuster zu identifizieren. Das rekonstruierte Schleimhautmodell MucilAir weist aufgrund der Vereinigung verschiedener Zelltypen zu einer funktionellen Einheit viele Vorteile gegenüber herkömmlichen Modellsystemen auf. So kommt dem Modell die Eigenschaft zugute, sowohl metabolisch aktive als auch metabolisch inaktive Zelltypen zu vereinen. Es ist bekannt, dass metabolisch aktive Zellen, zu denen z.B. Clara Zellen, Alveolarzellen vom Typ II gehören, eine deutlich stärkere Sensitivität gegenüber toxischen Stoffen im Vergleich zu den metabolisch inaktiven Zellen aufweisen (Flimmerepithel und Alveolarzellen vom Typ I), die wiederum eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber partikulären Substanzen zeigen. Auf diese Weise ermöglicht es das Modell viele Aspekte in der toxikologischen Forschung abzudecken.

Interessanterweise zeigen die Ergebnisse der Substanztitration eine stärkere zytotoxische Wirksamkeit von TMA auf die Zellen als von SDS. Die Erfahrungen mit den gängigen epithelialen Hautmodellen (wie z. B. EST-1000 von Advanced Cellsystems) zeigen, dass bei gleicher Konzentration der Testsubstanz geringere Viabilitätsverluste durch TMA als durch SDS hervorgerufen werden. *In vivo* hatte SDS eine stärkere zytotoxische Wirksamkeit in der Lunge, in der Haut jedoch wurde eine stärkere Reizung durch TMA hervorgerufen. Auch Seyes et al. konnten 2007 in einer groß angelegten Studie mit verschiedenen Substanzen keine Übereinstimmung zwischen *in vivo* und *in vitro* gemessener Zytotoxizität nachweisen. Neben einer veränderten Schleimhautbarriere (durch veränderte Mucusproduktion, Lipidzusammensetzung und Gewebeintegrität in Zellkultursystemen) wird insbesondere das Fehlen von Makrophagen und anderen regulatorischen Zellen als entscheidend angenommen. Wichtige regulatorische Mechanismen wie die Partikelbeseitigung durch Phagozytose, die Rekrutierung anderer inflammatorischer Zellen, und die vollständige Regulation der Entzündungskaskade können in *in vitro* Modellen nicht realisiert werden (Seyes et al. 2007; Roggen et al. 2006). Bei MucilAir, das aus primären Zellen humaner Spender generiert wird, ist darüber hinaus die genetische Varianz und die individuelle Lebensweise des Spenders zu bedenken, die sich auf die Ergebnisse der Tests auswirken können. Auch die Besonderheit von MucilAir, eine ausgesprochen lange Kultivierbarkeit bis zu einem halben Jahr zu gewährleisten könnte dazu führen, dass eine veränderte Oberflächensensitivität in diesem Modell gegeben ist.

Da bisher kaum Erfahrungen mit dem Schleimhautmodell MucilAir vorliegen, ist zu überlegen, ob die Mucusproduktion bei den vorliegenden Ergebnissen eine entscheidende Rolle spielt. Mucusproduzierende Zellen sind in der Lage eine schützende Schicht über dem Epithel zu bilden. Inwieweit Unterschiede in der Dicke der Schleimschicht von MucilAir im Vergleich zur *in vivo* Situation bestehen ist bisher unklar und könnte daher auch die Differenzen in den Ergebnissen erklären.

Ein Vorteil bei der Verwendung mucusproduzierender Testsysteme besteht aber in der Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse, da die schützende Schleimschicht eher der physiologischen Situation *in vivo* entspricht und bei *in vitro* Kulturen von Zellsuspensionen gänzlich fehlt. Darüber hinaus könnte in Zukunft die Bestimmung der

Mucusproduktion und der Flimmerbewegung neben der Zellviabilität ein weiteres Kriterium für die Irritation darstellen.

Die Charakterisierung der Expressionseigenschaften von Zytokinen stellt ein weiteres bewährtes Mittel zur Bewertung zellulärer Vorgänge dar. Die Zytokinanalyse der MucilAir Zellüberstände wies eine steigende Konzentration von IL-6 und IL-8 bei einer geringen Irritation mit geringem Viabilitätsverlust nach, was eine substanzinduzierte Expression anzeigt. Parallel zum Viabilitätsverlust vermindert sich auch die Zytokinexpression mit steigender Substanzkonzentration. Die Expression von MCP-1 nach TMA Exposition wurde direkt eingeschränkt, wohingegen SDS bei geringen Konzentrationen eine Steigerung von MCP-1 auslöst. Die Zytokine IL-12, TNF- α und MIP-1 wurden nicht detektiert. RANTES und IP-10 wurden auf einem sehr niedrigen Expressionsniveau knapp über der Detektionsgrenze nachgewiesen.

Der Nachweis von IL-8 und IL-6 im Zellkultursystem wird mit einer Schleimhautreizung in Verbindung gebracht. Als proinflammatorische Zytokine treiben diese Interleukine *in vivo* den Entzündungsprozess voran, indem sie vor allem verschiedene Effektorzellen rekrutieren. IL-6 ist unter anderem dafür bekannt, entscheidende Funktionen bei Reparaturmechanismen des Gewebes zu übernehmen. In verschiedenen *in vitro* Systemen wie zum Beispiel der humanen epithelialen Zelllinie BEAS-2B und der alveolaren Zelllinie A549 werden sie nach Exposition gegenüber inflammatorischen Stimuli wie z.B. TNF- α oder nach Substanzexposition (Seyes et al. 2007; Veranth et al., 2007; Graness et al., 2002; Steerenberg et al., 1998) nachgewiesen. Die gewonnenen Kenntnisse der Zytokinexpression im bronchialen Schleimhautmodell MucilAir weisen auf eine substanzinduzierte Induktion von IL-8 und IL-6 hin, die im Zusammenhang mit einer Gewebeschädigung steht und substanzklassen-unspezifisch auftritt. Die Findung eines geeigneten Zytokinsets zur Bestimmung komplexer Endpunkte wie der Irritation, aber insbesondere der Sensibilisierung bedarf daher weiterer Forschungsarbeit. Durch die Verwendung von Modellsubstanzen (SDS, TMA) und unter Anwendung bewährter Testprotokolle konnten jedoch wertvolle erste Grundlagen zur Charakterisierung des neuartigen Schleimhautmodells in dieser Arbeit erworben werden. Interessante Aspekte weiterer Untersuchungen stellen die Charakterisierung des Mucus dar, durch die wichtige Informationen über die Barriere- und Penetrationseigenschaften, aber auch Reaktionen auf die reizende Komponente einer Testsubstanz gewonnen werden können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung des Asthma bronchiale stellt ein komplexes immunologisches Geschehen dar. Unterschiedliche, aber immunologisch relevante Mechanismen können zur Sensibilisierung und Ausprägung der obstruktiven Lungenreaktion führen. Aus diesem Grund ist es für die Gefahrenbewertung in der Toxikologie bisher nicht möglich gewesen eine einheitliche Richtlinie zur Identifizierung asthmaauslösender Substanzen im Atemtrakt zu validieren.

In dieser Arbeit wurde zum einen erstmalig die Induktionsphase der Lungensensibilisierung in einem Kurzzeitmodell genauer untersucht, zum anderen die Eignung dieses Kurzzeitmodells zur Identifizierung lungensensibilisierender Substanzen geprüft. Die Anwendung eines Protokolls, analog zum lokalen Lymphknotentest, unter Verwendung der Modells substanz TMA konnte eine Reaktion in den lokalen drainierenden Lymphknoten der Lunge belegen, die sich durch einer Zunahme des Gewichtes und der Zellzahl nachweisen ließ. Darüber hinaus wurden Aktivierungsmarker, wie $CD4^+/CD45^{\text{niedrig}}$, die eine spezifische, T_H -2 gerichtete Immunantwort anzeigen, in durchflusszytometrischen Analysen bestimmt. Inwieweit der Anstieg der $CD4^+/CD25^+$ regulatorischen T-Zell-Population eine immunologische Relevanz für die Ausbildung der allergischen Reaktion darstellt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Ein Vergleich der irritierenden Modells substanz SDS mit den sensibilisierenden Substanzen MDI und TMA verfolgte das Ziel substanzklassenspezifische Unterschiede während der Induktionsphase aufzudecken. Nach Bestimmung des LOEL der Substanzen zeigt die Vergleichsstudie jedoch keine durch die sensibilisierenden Substanzen ausgelöste Infiltration der Eosinophilen, sondern eher einen generellen inflammatorischer Influx eosinophiler und neutrophiler Zellen während der Induktionsphase durch alle drei Testsubstanzen. Das durch SDS induzierte Zytokinmuster jedoch weist durch eine hohe Expression von IL-1 α und MCP-1 auf die irritierende Komponente von SDS über die Zytotoxizität hinaus hin.

Eine weitere zentrale Thematik dieser Arbeit befasst sich mit dem viel diskutierten Einfluss der Applikationsroute auf die Lungensensibilisierung. Hierzu durchgeführte inhalative Provokationsstudien konnten eindeutig den Reaktionsschwerpunkt in der Erhöhung des Atemwegswiderstandes bei intratracheal vorbehandelten Tieren

aufzeigen. Bei der epikutanen Induktion hingegen lag der Reaktionsschwerpunkt, in der Rekrutierung neutrophiler und eosinophiler Zellen in die Lunge sowie einer erhöhten Zytokinexpression.

Zum einen zeigen diese Experimente eindeutig, dass die Entwicklung einer substanzspezifischen Lungenobstruktion in der Provokationsphase nach insgesamt nur dreimaliger intratrachealer Substanzapplikation vollständig entwickelt ist und durch die Erhöhung der Lungenresistance nachgewiesen werden kann. Zum anderen können anhand dieses Modells mechanistische Vorgänge von der Induktion bis zur Sensibilisierung systematisch nachvollzogen werden. So konnte in dieser Arbeit beispielsweise durch die kinetischen Analyse von Induktion, Boost und Challenge, aber auch durch die Untersuchung routenabhängiger Faktoren der Einfluss der induzierten T_H-2 Antwort auf die inflammatorischen Prozesse aufgedeckt werden.

Die Lymphozytenaktivierung *in vivo* konnte überdies durch *in vitro* Restimulation anhand von MDI nachgewiesen werden. Sowohl Lymphozytenkulturen aus den drainierenden Lymphknoten als auch aus der Milz MDI-sensibilisierter Tiere zeigten in Kultur erhöhte Viabilität bzw. proliferative Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Neben der Neu- und Weiterentwicklung von *in vivo* Verfahren, gewinnen *in vitro* Zellkultursysteme zur Identifizierung des Gefahrenpotentials von Substanzen zunehmend an Bedeutung. MucilAir ist als eines der neusten rekonstruierten Schleimhautmodelle wegen seiner mucusproduzierenden und zilientragenden Zellen besonders interessant, da es eine Vielzahl physiologischer Aspekte verwirklicht. MucilAir wurde in dieser Arbeit erstmals im Hinblick auf eine substanzklassenspezifische Untersuchung von irritierenden und sensibilisierenden Substanzen eingesetzt. Die Korrelation von Viabilität und Zytokinexpression nach Substanzexposition stellen erste Schritte bei der Entwicklung eines neuartigen *in vitro* Screening Systems zur Differenzierung zwischen irritierenden und sensibilisierenden Substanzen dar.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. (Internetseite: European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI). <http://www.eaaci.net/site/content.php?artid=792> (besucht am 04.10.07).
2. Alam, R., York, J., Boyars, M., Stafford, S., Grant, J. A., Lee, J., Forsythe, P., Sim, T., Ida, N. (1996). Increased MCP-1, RANTES and MIP-1 α in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthma patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **153**: 1398-1404.
3. Ameixa, C., Fridland, J. S. (2001). Down-regulation of interleukin-8 secretion from Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes by interleukin-4 and -10 but not by interleukin-13. *Infection and Immunity*: **69**: 2470-2476
4. Arlettaz, L., Barbey, C., Dumont-Girard, F., Helg, C., Chapuis, B., Roux, E., Roosnek, E. (1999). CD45 isoform phenotypes of human T cells: CD4⁺CD45RA⁻R0⁺ memory T cells re-acquire CD45RA without losing CD45R0. *European Journal of Immunology*. **29**: 3987-3994.
5. Bals, R., Hiemstra, P.S. (2004). Innate Immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *European Respiratory Journal*. **23**: 327-333.
6. Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization tests. *Journal of Food and Chemical Toxicology*. **36**: 327-333.
7. Basketter, D. A., Scholes, E. W., Kimber, I. (1994). The performance of the local lymph node assay with chemicals identified as contact allergens in the human maximization test. *Journal of Food and Chemical Toxicology*. **32**: 543-547.
8. Bauer, X. (1999). Berufs- und umweltbedingtes Asthma bronchiale. *Der Internist*. **40**: 844-848.
9. Bembridge GP, Garcia-Beato R, Lopez JA, Melero JA, Taylor G. (1998). Subcellular site of expression and route of vaccination influence pulmonary

eosinophilia following respiratory syncytial virus challenge in BALB/c mice sensitized to the attachment G protein. *Journal of Immunology*. **161** (5): 2473-2480.

10. Berin, C. (2002). The role of TARC in the pathogenesis of allergic Asthma. *Drug News Perspective*. **15** (1): 10-16.

11. Bernstein, D. I. (2003). Occupational asthma caused by exposure to low-molecular-weight chemicals. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. **23**(2):221-234.

12. Bernstein, D. I., Cartier, A., Coté, J., Malo, J.-L., Boulet, L.-Ph., Wanner, M., Milot, J., L'Archevêque, J., Trudeau, C., Lummus, Z. (2002). Diisocyanate Antigen-stimulated Monocyte Chemoattractant Protein-1 synthesis has greater test efficiency than specific antibodies for identification of Diisocyanate Asthma. *American Journal of Critical Care Medicine*. **166**: 445-450.

13. Bienenstock, J., McDermott, M., R. (2005). Bronchus- and nasal-associated lymphoid tissues. *Immunological Reviews*. **206**: 22-31.

14. Blanchard, C., Durual, S., Estienne, M., Emami, S., Vasseur, S., Cuber, J. C. (2005). Eotaxin-3/CCL26 gene expression in intestinal epithelial cells is upregulated by interleukine-4 and interleukin-13 via the signal transducer and activator of transcription-6. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **37**: 2559-2573.

15. Blümel, J., Schimpl, A., Ulrich, P., Ahr, H.J. and Vohr, H.-W. (1999) Primary immune response in skin and skin-associated lymphoid tissue of interleukin-4 transgenic mice. *European Cytokine Network*. **10**: 515-524.

16. Boitelle, A., Gosset, P., Copin, M. C., Vanhee, D., Marquette, C. H., Wallaert, B., Gosselin, B., Tonnel, A. B. (1997). MCP-1 secretion in lung from non-smoking

patients with coal worker's pneumoconiosis. *European Respiratory Journal*. **10**: 557-562.

17. Buehler, E.V. (1980). Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Archive of Dermatology*. **6**: 46-50.

18. Buehler, E.V. (1980). Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Archive of Dermatology* **6**: 46-50.

19. Buehler, E.V. (1994). Occlusive patch method for skin sensitisation in guinea pigs: the Buehler method. *Journal of Food and Chemical Toxicology* **32**: 92-101.

20. Buehler, E.V. (1994). Occlusive patch method for skin sensitisation in guinea pigs: the Buehler method. *Journal of Food and Chemical Toxicology* **32**: 92-101.

21. Bunce, C., Bell, E. B. (1997). CD45RC isoform define two types of CD4 memory T cells, one of which depends on persisting antigen. *Journal of Experimental Medicine*. **185** (4): 767-776.

22. Campbell, J. J., Butcher, E. C. (2000). Chemokines in tissue-specific and micro-environment-specific lymphocyte homing. *Current Opinion in Immunology*. **12**: 336-341.

23. Carson, W., F., Guernsey, L. A., Singh, A., Vella, A. T., Schramm, C. M., Thrall, R. S. (2008). Accumulation of Regulatory T cells in Local Draining Lymph Nodes of the Lung Correlates with Spontaneous Resolution of Chronic Asthma in a Murine Model. *International Archives of Allergy and Immunology*. **145**: 231-243.

24. Caterson, A. J., Höner zu Bentrop, K. Ott, C. M., Clarke, M. S., Pierson, D. L., Vanderburg, C. R., Buchanan, K. L., Nickerson, C. A., Schurr M. J (2007). A549 Lung Epithelial Cells Grown as Three-Dimensional Aggregates: Alternative Tissue Culture Model for *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenesis. *Infection and Immunity*. **73**(2): 1129-1140.

-
25. Cazzola, M., Polosa, R., (2006). Anti-TNF- α and Th-1 cytokine directed therapies for the treatment of asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. **6**: 43-50.
26. Chen, Y.-Q., Shi, H.-Z. (2006). CD28/CTLA-4 – CD80/CD86 and ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway in bronchial asthma.
27. Chensue, S. W., Warmington, K. S., Ruth, J. H., Sanghi, P., Lincoln, P., Kunkel, S. L. (1996). Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th-1 (mycobacterial) and Th-2 (schistosomal) antigeninduced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th-1 cell expression and IL-12 production. *Journal of Immunology*. **157**: 4602-4608.
28. Chung, K. F. (1998). Chemokines. In: Barnes, P. J., Rodger, I. W., Thomson, N. C. (Asthma). Basic mechanisms and clinical management. *Academic Press, San Diego, London*. 309-327.
29. Collins, P. D., Marleau, S., Griffith-Johnson, D. A., Jose, P. J., Williams, T. J. (1995). Cooperation between interleukine-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. **182**: 1169-
30. Cumberbatch, M., Scott, R. C., Basketter, D. A., Scholes, E. W., Hilton, J., Dearman, R. J., Kimber, I. (1993). Influence of sodium lauryl sulphat on 2, 4-dinitrochlorbenzene-induced lymph node activation. *Toxicologist*. **77**: 181-191.
31. D'Amato, G., Liccardi, G., D'Amato, M. (2000). Environmental risk factors (outdoor air pollution and climatic changes) increase trend of respiratory allergy. *Journal of Investigative Allergology and Clinical Immunology*. **10** (3): 123-128
32. Deans, J. P., Boyd, A. W., Pilarski, L. M. (1998). Transition from high molecular weight isoforms of CD45 (T200) involve rapid activation of alternate mRNA splicing and slow turnover of surface CD45R. *Journal of Immunology*. **143** (4): 1233-1238.

-
33. Erle, D. J., Pabst, R. (2000). Intraepithelial lymphocytes in the lung. A neglected lymphocyte population. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **22**: 398-400.
34. Evans, D. J., Lindsay, M. A., O'Connor, B. J., Barnes, P. J. (1996). Priming of circulation human eosinophils following late phase response to allergen challenge. *European Journal of Respiratory*. **9**: 703-708.
35. Fischäder, G., Röder-Stölinski, C., Wichmann, G., Nieber, K., Lehmann, I. (2007). Release of MCP-1 and IL-8 from lung epithelial cells exposed to volatile organic compounds. *Toxicology in Vitro*. **22**: 359-366.
36. Fournié, G. J., Cautain, B., Xystrakis, E., Damoiseaux, J., Mas, M., Lagrange, D., Bernard, I., Subra, J.-F., Pelletier, L., Druet, P., Saoudi, A. (2001). Cellular and genetic factors involved in the difference between Brown Norway and Lewis rats to develop respectively type-2 and type-1 immune-mediated diseases. *Journal of Immunological Reviews*. **181**: 145-160.
37. Fuentes, M. E., Durham, S. K., Swerdel, M. R., Lewin, A. C., Barton, D. S., Megill, J. R., Bravo, R., Lira, S. A. (1995). Controlled recruitment of monocyte and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. *Journal of Immunology*. **155**: 5769-5776.
38. Fujisawa, T., Kato, Y., Atsuta, J., Terada, A., Iguchi, K., Kamiya, H., Yamada, H., Nakajima, T., Miyamasu, M., Hirai, K. (2000). Chemokine production by BEAS-2B human bronchial epithelial cells: differential regulation of eotaxin, IL-8 and RANTES by TH2- and TH1-derived cytokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **105**: 126-133.
39. Gad, S.C. (1994). The mouse ear swelling test (MEST) in the 1990s. *Journal of Toxicology* **93**: 33-46.

-
40. Germann, P. G., Häfner, D., Hanauer, G, Drommer, W. (1998). Incidence and severity of granulomatous pneumonia in Brown Norway (BN) rats: breeder related variation. *Journal of Experimental Animal Science*. **39**: 22-33.
41. Goto, E., Kohrogi, H., Hirata, N., Tsumori, K., Hirosako, S., Hamamoto, J., Fujii, K., Kawano, O., Ando, M. (2000). Human bronchial intraepithelial T lymphocytes as a distinct T cell subset: Their long-term survival in SCID-Hu chimeras. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **22**: 405-411.
42. Gould, S.J., Isaacson, P.G. (1993). Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in human fetal and infant lung. *Journal of Pathology*. **196**: 229-234.
43. Graness A, Chwieralski CE, Reinhold D, Thim L, Hoffmann W. (2002). Protein kinase C and ERK activation are required for TFF-peptide-stimulated bronchial epithelial cell migration and tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secretion. *Journal of Biological Chemistry*. **277** (21):18440-18446.
44. Gregson, R.L., Jean Davey, M, Prentice, D.E. (1979). Postnatal development of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in rat, *Rattus norvegicus*. *Laboratory Animals* **13**:231-238.
45. Gu, L, Tseng, S., Horner, R. M., Tam, C., Loda, M., Rollins, B. J. (2000). Control of TH-2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* **404**: 407-411.
46. Haczku, A., Moqbel, R., Jacobson, M., Kay, A. B., Barnes, P. J., Chung, K. F. (1995). T-cells subsets and activation in bronchial mucosa of sensitized Brown-Norway rats after single allergen exposure. *Journal of Immunology*. **85**: 591-597.
47. Hamann, A., Klugewitz, K., Austrup, F., Jablonski-Westrich, D. (2000). Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells. *European Journal of Immunology*. **30**: 3207-3218.

-
48. Hansen, G., Berry, G., De Kruffy, R. H., Umetsu, D. T. (1999). Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. **103**: 175-183.
49. Hargreaves, M., Bell, E. B. (1997). Identical expression of CD45R isoforms by CD45RC⁺ 'revertant' memory and CD45C⁺ naïve CD4 T cells. *Journal of Immunology*. **91**: 323-330.
50. Hayday, A. C., Roberts, S., Ramsburg, E., (2000). $\gamma\delta$ Cells and the regulation of mucosal immune responses. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **162**: 161-163.
51. Heaton, T., Rowe, J., Turner, S., Aalberse, R. C., de Klerk, N., Suriyaarachchi, D., Serralha, M., Holt, B. J., Hollams, E., Yerkovich, S., Holt, K., Sly, P. D., Goldblatt, J., Le Souef, P., Holt, P. G. (2005). An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in vivo response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet*. **365**: 142-149.
52. Hochweller, K., Anderton, S. M. (2005). Kinetics of costimulatory molecule expression by T cells and dendritic cells during the induction of tolerance versus immunity *in vivo*. *European Journal of Immunology*. **35**: 1086-1096.
53. Hokanson, H., Kim, C., Whelan, D., Campbell, M., Grunstein, M. (2001). Bi-directional activation between human airway smooth muscle cells and T lymphocytes: role in induction of altered airway responsiveness. *Journal of Immunology* **166**: 293-303.
54. Holsapple, M. P., Jones, D., Kawabata, T. T., Kimber, I., Sarlo, K., Selgrade, M. J. K., Shah, J., Woolhiser, M. R. (2006). Assessing the potential to induce respiratory hypersensitivity. *Toxicological Science*. **91** (1): 4-13.
55. Homey, B., von Schilling, C., Blümel, J., Schuppe, H.-C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P., Vohr, H.-W. (1998). An integrated model for the differentiation of

chemical-induced allergic and irritant skin reaction. *Journal of Toxicology and Applied Pharmacology* **153**: 83-94.

56. Horie, S., Okubo, Y., Hossain, M., Sato, E., Nomura, H., Koyama, S., Suzuki, J., Isobe, M., Sekiguchi, M. (1997). Interleukine-13 but not interleukine 4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophile chemotaxis. *Internal Medicine*. **36**: 179-185.

57. Horiuchi, Y., Bae, S. J., Katayama, I. (2003). Pro inflammatory cytokine IL-1 potential for tissue repair in chemically and mechanically induced injury in cultured human keratinocytes. *Journal of Dermatological Science*. **35**: 224-226.

58. Hoymann, H.G., Krug, N. (2001). Testverfahren für inhalative Testung auf allergenes Potenzial. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*. **44**: 682-689.

59. Hultkrantz, S., Östman, S., Telemo, E. (2005). Induction of antigen-specific regulatory T cells in the liver-draining celiac lymph node following oral antigen administration. *Journal of Immunology*. **116**: 362-372.

60. Iezzi, G, Schneidegger, D., Lanzavecchia, A. (2001). Migration and Function of Antigen-primed Nonpolarized T Lymphocytes in Vivo. *Journal of Experimental Medicine*. **193**(7): 987-993.

61. Jeebhay, M.F., Quirce, S. (2007). Occupational asthma in the developing and industrialized world: a review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **11** (2):122-133.

62. Jia, G. Q., Gonzalo, J. A., Hidalgo, A., Wagner, D., Cybulsky, M., Gutierrez-Ramos, J. C. (1999). Selective transendothelial migration triggered by eotaxin via modulation of Mac-1/ICAM-1 and VLA.4/VCAM-1 interactions. *International Journal of Immunology*. **11**:1-10.

-
63. John, M., Au, B.-T., Jose, P. T., Liam, S., Saunders, M., Barnes, P. J., Mitchell, J. A., Belvisi, M. G. Fan Chung, K. (1996). Expression and Release of Interleukine-8 by Human Airway Smooth Muscle Cells: Inhibition by Th-2 Cytokines and Corticosteroids. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **18**: 84-90.
64. Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop J., Enk, A. H. (2000). Induction of interleukine 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allergenic immature human dendritic cells in the TCR transgenic mode. *Journal of Immunology*. **164**: 2937- 2946.
65. Jörres, R., Nowak, D., Magnussen, H. (1996). The effect of ozone exposure on allergen responsiveness in subjects with asthma or rhinitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **153**: 56-64.
66. Kelly-Welch, A., Hansen, E. M., Keegan, A. D., (2005). Interleukine-13 (IL-13) pathway. *Science Signal Transduction Knowledge Environment*: **293**: p cm8.
67. Kiley, J., Smith, R., Noel, P. (2007). Asthma phenotypes. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. **13**: 19-23.
68. Kimber, I. (1996). The role of the skin in development of chemical respiratory hypersensitivity. *Toxicology Letters*. **86**: 89-92.
69. Kimber, I., Basketter, D.A., Butler, M., Gamer, A., Garrigue, J.L., Gerberick, G.F., Newsome, C., Steiling, W., Vohr, H-W. (2003). Classification of contact allergens according to potency proposals. *Journal of Food and Chemical Toxicology* **41**: 1799-1809.
70. Kimber, I., Dearman, R. J. (2002). Chemical Respiratory allergy: Role of IgE antibody and relevance of route of exposure. *Toxicology*. **181-182**: 311-315.

-
71. Kimber, I., Weisenberg, C. (1989). A murine local lymph node assay for the identification of contact allergens: assay development and results of an initial validation study. *Archive of Toxicology* **63**: 274-282.
72. Klinke, K. J., Meade, B. J. (2003). Dermal Exposure to 3-Amino-5-Mercapto-1, 2, 4-triazole (AMT) Induces Sensitization and Airway Hyperreactivity in BALB/c Mice. *Journal of Toxicological Science*. **75**: 89-98.
73. Kristensson, K., Borrebaeck, C. A., Carlsson, R. (1992). Human CD4⁺ T cells expressing CD45RA acquire the lymphokine gene expression of CD45RO⁺ T-helper cells after activation in vitro. *Journal of Immunology*. **76** (1): 103-109.
74. Lawson, P. R., Reid, K.B.M. (2000). The role of surfactant protein A and D in innate immunity. *Immunological Reviews*. **173**: 66-78.
75. Loveless, S. E., Ladics, G. S., Gerberick, G.F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Scholes, E. W., House, R. V., Dearman, R. J., Kimber, I. (1996). Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Journal of Toxicology*. **108**: 141-152.
76. Lummus, Z., Alam, R., Bernstein, J. A., Bernstein, D. I. (1998). Diisocyanate antigen-enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8 and tumor necrosis factor- α by peripheral mononuclear cells of workers with occupational asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **102**: 265-273.
77. Luqman, M., Johnson, P., Trowbridge, I., Bottomly, K. (1991). Differential expression of the alternatively spliced exons of murine CD45 in Th1 and Th2 cell clones. *European Journal of Immunology*. **21** (1): 17-22.
78. Luther, S. A., Cyster, J., G., (2001). Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nature Immunology*. **2**: 102-107.

-
79. Lynch, K. W., Weiss, A. (2000). A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 pre-mRNA in T cells implicates Protein Kinase C and Ras. *Journal of Molecular and Cellular Biology*. **20**: 70-80.
80. Mackay, C. R., Marston, W. L. Dudler, L. (1990). Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *Journal of Experimental Medicine*. **171**: 801-817
81. Magnusson, B., Kligman, A.M. (1969). The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *Journal of Investigative Dermatology* **52**: 268-276.
82. Mapp, C. E., Boschetto, P., Maestrelli, P., Fabbri, L.M. (2005). Occupational Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **172**(3):280-305.
83. Montelius, J., Wahlkvist, H., Boman, A., Wahlberg, J. E. (1998). Murine local lymph node assay for predictive testing of allergenicity: two irritants caused significant proliferation. *Acta Dermat-Venerologica*. **78**: 433-437.
84. Moser, R., Fehr, J., Bruijnzeel, P. L. (1992). IL-4 controls the selective endothelium driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. *Journal of Immunology*. **149** (4): 1432-1438.
85. Mosmann, T. R., Coffman, R.L. (1998). Th-1 and Th-2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*. **7**: 145-173.
86. Naddel, J.A., Busse, W.W. (1998). Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **157**: 130-138.

-
87. Nomura, I., Goleva, E., Howell, M. D., Hamid, Q. A., Ong, P. Y., Halal, C. F., Darst, M. A., Gao, B., Boguniewicz, M., Travers, J. B., Leung, D. Y. M. (2003). Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to Psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *Journal of Immunology*. **171**: 3262-3269.
88. OECD (2004a). OECD TG 431 "Entwurf Acute Dermal Irritation/Corrosion".
89. OECD (2004b). OECD TG 404 "Acute Dermal Irritation/Corrosion".
90. Pabst, R., Gehrke I. (1990). Is the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) an integral structure of the lung in normal mammals, including humans? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **3**: 131-135.
91. Pauluhn, J. (1996). Predictive testing for respiratory sensitisation. *Toxicology Letters*. **86**: 177-185.
92. Pauluhn, J. (2003). Respiratory hypersensitivity to trimellitic anhydride in Brown Norway rats: analysis of dose-response following topical induction and time course following repeated inhalation challenge. *Toxicology*. **194** (1-2): 1-17.
93. Pauluhn, J. (2004). Pulmonary irritant potency of polyisocyanate aerosols in rats: Comparative assessment of irritant threshold concentrations by bronchoalveolar lavage. *Journal of Applied Toxicology*. **24**: 231-247.
94. Pauluhn, J. (2005). Brown Norway rat asthma model of Dimethylmethan 4,4-Diisocyanate. *Inhalation Toxicology*. **17**: 729-739.
95. Pauluhn, J., Lewalter, J. (2002). Analysis of markers of exposure to polymeric methylen-diphenyl diisocyanate (pMDI) in rats: a comparison of dermal and inhalation route of exposure. *Experimental and Toxicologic Pathology*. **54** (2): 135-146.

-
96. Pauluhn, J., Mohr, U. (2005). Experimental approaches to evaluate respiratory allergy in animal models. *Experimental and Toxicologic Pathology*. **56**: 203–234.
97. Pope, S. M., Brandt, E. B., Mishra, A., Hogan, S. P., Zimmermann, N., Matthaei, K. I., Foster, P. S., Rothenberg, M. E. (2001). IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5 eotaxin-dependent mechanism. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **108**: 594-601.
98. Renz, H., Blümer, N., Virna, S., Sel, S., Garn, H. (2006). The Immunological Basis of the Hygiene Hypothesis. *Chemical Immunology and Allergy*. **91**: 30-48.
99. Robinson, D. S., (1998). Lymphokins. In: Barnes, P. J., Rodger, I. W., Thomson, N. C. (Asthma). Basic mechanisms and clinical management. *Academic Press, San Diego, London*. 329-342.
100. Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tsiopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., Corrigan, C., Durham, S. R., Kay, A. B. (1992). Predominant Th-2 like bronchoalveolar t-lymphocyte populations in atopic asthma. *New England Journal of Medicine*. **326**: 298-304.
101. Roggen, E. L., Soni, N. K., Verheyen, G. R. (2006). Respiratory immunotoxicity: An in vitro assessment. *Toxicology in Vitro*: **20**: 1249-1264.
102. Roggen, E. L., Lindstedt, M., Borrebaeck, C., Verheyen, G.R. (2006). Interactions between dendritic cells and epithelial cells in allergic disease. *Toxicology Letters*. **162**: 71-82.
103. Rollins (1998). Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*. **187**: 601-608.
104. Romagnani, S. (2001). Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Molecular Immunology*. **38**: 881-885.

-
105. Romagnani, S. (2004). Immunologic influences on allergy and the TH-1/TH-2 balance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **113**: 395-400.
106. Romagnani, S. (2007). Coming back to a missing immune deviation as the main explanatory mechanism for the hygiene hypothesis. *Journal of Clinical Immunology*. **119**: 1511-1513.
107. Rosenberg, H. F., Phipps, S., Foster, P. (2007). Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *Molecular Mechanisms in Allergy and Clinical Immunology*. **119 (6)**: 1303-1309.
108. Sailstad, D.M., Ward, M. D., Boykin, E. H., Selgrade, M. K. (2003). A murine model for low molecular weight chemicals. Differentiation of respiratory sensitizers (TMA) from contact sensitizer (DNFB). *Toxicology*. **194 (1-2)**: 147-161.
109. Saito, T., Yamasaki, S. (2003). Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. *Immunological Reviews*. **192**: 143-160.
110. Sallusto, F., Mackay, C. R., Lanzavecchia, A. (2000). The role of chemokine receptor in primary, effector and memory immune responses. *Annual Review of Immunology*. **18**: 593-620.
111. Sato, A., Hayakawa, H., Uchiyama, H., Chida, K. (1996). Cellular distribution of bronchus-associated lymphoid tissue in rheumatoid arthritis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **154**: 1903-1907.
112. Sayes, C. M., Reed, K. L., Warheit, D. B. (2007). Assessing cytotoxicity of fine nanoparticles: Comparing *in vitro* measurements to *in vivo* pulmonary toxicity profiles. *Journal of Toxicological Science*. **97 (1)**: 163-180.
113. Schaub, B., Lauener, R., von Mutius, E. (2006). The many faces of the hygiene hypothesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **117(5)**: 969-977.

-
114. Schneider, T., van Velzen, D., Moqbel, R., Issekutz, A. C. (1997). Kinetics and Quantitation of Eosinophil and Neutrophil Recruitment to Allergic Lung Inflammation in Brown Norway Rat Model. *American Journal of Respiratory and Cellular and Molecular Biology*. **17**: 702-712.
115. Semenzato, G., Adami, F., Machsio, N., Agostini, C. (2000). Immune mechanisms in intestinal lung diseases. *Allergy*. **55**: 1103-1120.
116. Sher, A., Coffman, R. L., Hieny, S., Cheever, A.W. (1990). Ablation of eosinophile and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against schistosoma mansoni in the mouse. *Journal of Immunology*. **145** (11): 3911-3916.
117. Siegel, P. D., Al-Humadi, N. H., Nelson, E. R., Lewis, D. M., Hubbs, A. F. (1997). Adjuvant effect of respiratory irritant on pulmonary allergic sensitization: time and site dependency. *Journal of Toxicology and Applied Pharmacology*. **144**: 356-362.
118. Simon, L., Foster, P. S. (2000). Chemokine and Cytokine cooperativity: eosinophil migration in the asthmatic response. *Journal of Immunology and Cell Biology*. **78**: 415-422.
119. Singh, P., Daniels, M., Winsett, D. W., Richards, J., Doerfler, D., Hatch, G., Adler, K. B., Gilmour, M. I. (2003). Phenotypic comparison of allergic airway responses to house dust mite in three rat strains. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. **284**: 588-598.
120. Skripuletz, T., Schmiedl, A., Schade, J., Bedoui, S., Glaab, T., Pabst, R., von Hörsten, S., Stephan, M. (2007). Dose-dependent recruitment of CD25⁺ and CD26⁺ T cells in a novel F344 rat model of asthma. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. **292**: 1564-1571.
121. Smit, J. J., Lukacs, N. W. (2005). A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *European Journal of Pharmacology*. **533**: 277-288.

-
122. Sousa, A. R., Lane, S. J., Nakhosteen, J. A., Yoshimura, T., Lee, T. H., Poston, R. N. (1994). Increased expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. *American Journal of Respiratory and Cellular and Molecular Biology*. **10**: 142-147.
123. Steerenberg; P. A., Zonnenberg; J. A., Dormans; J. A., Joon, P. N., Wouters, I. M., van Bree; L., Scheepers, P. T., Van Loveren, H. (1998). Diesel exhaust particles induced release of interleukin 6 and 8 by (primed) human bronchial epithelial cells (BEAS 2B) in vitro. *Experimental Lung Research*. **24 (1)**: 85-100.
124. Straube, F., Grenet, O., Bruegger, Ulrich, P. (2005). Contact allergens and irritants show discrete differences in the activation of human monocyte-derived dendritic cells: consequences for in vitro detection of contact allergens. *Archives of Toxicology*. **79**: 37-46.
125. Stütz, A., Graf, P., Beinhauer, B., Hammerschmid, F, Neumann, Ch., Woitsetschläger, M, Jung, T. (2005). CD45 isoform expression is associated with different susceptibilities of human naive and effector CD4+ T cells to respond to IL-4. *European Journal of Immunology*. **35**: 575-583.
126. Sung, K.P., Yang, L., Kim, J., Ko, D., Stachnick, G., Castaneda, D. Nayar, J., Broide, D. H. (2000). Eotaxin reduces a sustained reduction in the functional adhesive stat of very late antigen 4 for the connecting segment 1 region of fibronectin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **106**: 933-940.
127. Takizawa, H. (2005). Bronchial epithelial cells in allergic reaction. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*. **4**: 305-311.
128. Tournoy, K. G., Kips, J. C., Pauwels, R. A. (2002). Is Th1 the solution for Th2 in asthma? *Clinical and Experimental Allergy*. **32**: 17-29.
129. Tournoy, K. G., Van Hove, C., Grooten, J., Moerloose, K., Brusselle, G. G., Joos, G. F. (2006). Animal models of allergen-induced tolerance in asthma: are T-

regulatory-1 cells (Tr-1) the solution for T-helper-2 cells (Th-2) in asthma? *Journal of Clinical and Experimental Allergy*. **36**: 8-20.

130. Tschernig, T., Pabst, R. (2000). Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is not present in the normal adult lung but in different diseases. *Pathobiology*. **68**: 1-8.

131. Twigg, H. L. 3rd. (2005). Humoral immune defense (antibodies): recent advances. *Proceedings of the American Thoracic Society*. **2**(5): 417-421.

132. Veranth, J. M., Kaser, E., G., Veranth, M. M., Koch, M., Yost, G. S. (2007). Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Particle and Fibre Toxicology*. **4**: 2-20.

133. Virchow, J.C., Holscher, U., Virchow, C. (1992). Sputum ECP levels correlate with parameters of airflow obstruction. *American Journal of Respiratory Disease*. **146**: 604-606.

134. Vohr, H.-W., Pauluhn, J., Ahr, H. J. (2002). Respiratory hypersensitivity to trimellitic anhydride in Brown Norway rats. Evidence for different activation pattern of immune cells following topical and respiratory induction. *Archive of Toxicology* **76**: 538-544.

135. Wegener, C. D., Gundel, R. H., Reilly, P., Hayner, N., Letts, L. G., Rothlein, R. (1990). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* **247**: 456-459.

136. Wills-Karp, M. (2004). Interleukine-13 in asthma pathogenesis. *Immunology Review*. **202**: 175-190.

137. Woolhiser MR, Munson AE, Meade BJ (2000). Immunological responses of mice following administration of natural rubber latex proteins by different routes of exposure. *Toxicological Science*. **55** (2): 343-351.

-
138. Xu, B., Wagner, M., Pham, L. N., Magno, V., Shan, Z., Butcher, E. C., Michie, S. A. (2003). Lymphocyte Homing to Bronchus-associated Lymphoid Tissue (BALT) Is Mediated by L-Selectin/PNAd, Integrin/VCAM-1, and LFA-1 Adhesion Pathways. *Journal of Experimental Medicine*. **197**: 1255-1267.
139. Xu, Z., Weiss, A. (2002). Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spiced isoforms. *Nature Immunology*. **3** (8): 764-771.
140. Ying, S. (2000). C-C Chemokine expression in Atopic and Nonatopic Asthma. *Chemical Immunology*. **78**: 178-188.
141. Zaas, A. K., Schwartz, D.A. (2005). Innate Immunity and the Lung: Defense at the Interface Between Host and Environment. *Trends in Cardiovascular Medicine*. **15**: 195-202.