Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neurogene Entzündung in einem neuen chronischen Tiermodell für allergisches Asthma bronchiale

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tilman Hottenrott

aus Weimar

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. A. Fischer

2. Prof. Dr. T. Tschernig

3. Prof. Dr. Dr. D. Groneberg

Datum der Promotion: 09.09.2011

INHALTSVERZEICHNIS

A	bkürzu	ingsv	verzeichnis	5
1.	Ein	leitu	ng	7
	1.1.	Astl	hma bronchiale	7
	1.2.	Neu	Irogene Entzündung	8
	1.3.	Tac	hykinine in den Atemwegen	10
	1.3.	.1.	Struktur, Synthese und Inaktivierung	10
	1.3	.2.	Rezeptoren und Wirkung	11
	1.3	.3.	Rolle in der neurogenen Entzündung bei Asthma bronchiale	13
	1.4.	Ner	ve Growth Factor in den Atemwegen	14
	1.4.	.1.	Struktur, Synthese und Inaktivierung	15
	1.4.	.2.	Rezeptoren und Wirkung	15
	1.4	.3.	Rolle in der neurogenen Entzündung bei Asthma bronchiale	16
	1.5.	Astl	hma im Tiermodell	18
	1.6.	Frag	gestellungen	20
2.	Ma	terial	l und Methoden	21
	2.1.	Mat	erialien	21
	2.2.	Ver	suchstiere	24
	2.3.	Tier	rmodell	24
	2.3.	.1.	Versuchsablauf	24
	2.3.	.2.	Sensibilisierung	25
	2.3.	.3.	Provokation	25
	2.3.	.4.	Retrograde Markierung der Atemwegsneurone	26
	2.3.	.5.	Gewebeentnahme	27
	2.3.	.6.	Probenaufarbeitung	28
	2.3.	.7.	Anfertigung der Gewebeschnitte	28
	2.4.	Peri	bronchiale Leukozyteninfiltrate	29
	2.4.	.1.	Periodic acid-Schiff-Färbung	29
	2.4.	.2.	Semiquantitative Beurteilung	30
	2.5.	Zell	en in der Bronchoalveolären Lavage	30

2.	5.1.	Gesamtzellzahlbestimmung	30
2.	.5.2.	Diff-Quick-Färbung	30
2.	.5.3.	BAL-Zell-Differenzierung	31
2.6.	Neu	rotrophine in der Bronchoalveolären Lavage	32
2.	6.1.	Enzyme linked immunosorbent assay	32
2.7.	Sub	stanz P- und p75 ^{NTR} -Immunreaktivität im Ganglion nodosum	34
2.	7.1.	Immunhistochemie mit Doppelimmunfluoreszenz	34
2.	7.2.	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	36
2.8.	Stat	istische Auswertung	36
3. Ei	rgebni	sse	37
3.1.	Peri	bronchiale Leukozyteninfiltrate	37
3.2.	Zell	en in der Bronchoalveolären Lavage	39
3.3.	Neu	rotrophine in der Bronchoalveolären Lavage	41
3.4.	Imn	nunreaktivität der Neurone im Ganglion nodosum	42
3.	4.1.	Retrograd markierte Atemwegsneurone	42
3.	.4.2.	Substanz P- und p75 ^{NTR} -Immunreaktivität	42
4. D	iskuss	ion	45
4.1.	Das	neue chronische Asthma-Tiermodell	45
4.2.	Cha	rakterisierung der Atemwegsentzündung	47
4.3.	Neu	rotrophine in der Bronchoalveolären Lavage	49
4.4.	Tac	hykinin- und p75 ^{NTR} -Immunreaktivität im Ganglion nodosum	52
4.5.	Klir	ische Relevanz und Ausblick	58
5. Zi	usamn	nenfassung	60
Abbild	lungsv	erzeichnis	62
Tabelle	enverz	eichnis	62
Literat	urverz	eichnis	63
Danksa	agung		82
Lebens	slauf		83
Eidess	tattlich	e Erklärung	83

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE	Angiotensin-Converting Enzyme
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BDNF	Brain Derived Neurotrophine Factor
βNGF	β-Dimer von NGF
CGRP	Calcitonin-Gene-Related Peptide
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FVC	Forcierte Vitalkapazität
FEV_1	Forciertes expiratorisches Volumen in 1 s
HE	Hämatoxilin-Eosin
IFN-γ	Interferon γ
IL-1β	Interleukin 1 ^β
IR	Immunreaktivität
KG	Körpergewicht
МАРК	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mNGF	Mature NGF
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NaCl	Natriumchlorid
NANC	nicht-adrenerg, nicht-cholinerg
NEP	Neutrale Endopeptidase
NF-κB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NGF	Nerve Growth Factor
NK ₁₋₃	Tachykinin-Rezeptor 1-3
NKA	Neurokinin A
NKB	Neurokinin B
NPK	Neuropeptid K
NPY	Neuropeptid Y
NT-3/4	Neurotrophin 3/4
ОТ	Objektträger
p75 ^{NTR}	Pan-Neurotrophin-Rezeptor p75
PA	Primärantikörper

PAS	Periodic acid-Schiff
PBS	Phosphatpuffer
PLI	Peribronchiales Leukozyteninfiltrat
PPT-A	Präprotachykinin-Gen A
PPT-B	Präprotachykinin-Gen B
proNGF	NGF-Vorstufe
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SA	Sekundärantikörper
SEM	Standardfehler der Stichprobenverteilung
SP	Substanz P
TACR	Tachykinin-Rezeptor-Gen
tPA	Tissue-Plasminogen-Activator
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TrkA	Tropomyosin-related Kinase-Rezeptor A
TrkB	Tropomyosin-related Kinase-Rezeptor B
TrkC	Tropomyosin-related Kinase-Rezeptor C
TNFα	Tumornekrosefaktor α
VIP	Vasoactive Intestinal Polypeptide
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

1.1. ASTHMA BRONCHIALE

Asthma bronchiale (*im Folgenden kurz Asthma*) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege. Charakteristisch sind eine bronchiale Hyperreagibilität und eine variable Atemwegsobstruktion, welche wiederkehrende Attacken mit Husten und Dyspnoe hervorrufen (1). Man unterscheidet zwei Asthma-Formen: extrinsisches (*syn. allergisches*) und intrinsisches (*syn. nicht allergisches*) Asthma, Mischformen sind häufig.

Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge sind weltweit insgesamt ca. 300 Mio. Menschen an Asthma erkrankt, allein 2005 starben 255 000 an der Erkrankung. Bei Kindern ist Asthma die häufigste chronische Erkrankung überhaupt (2), in Deutschland sind ungefähr 10 % der kindlichen und 5 % der erwachsenen Bevölkerung betroffen (3; 1).

In der Pathophysiologie spielen verschiedene Entzündungszellen (v.a. eosinophile Granulozyten), Atemwegsstrukturzellen und sensible Atemwegsneurone eine wesentliche Rolle (4). Sie alle tragen zur charakteristischen Atemwegsentzündung mit peribronchialer Infiltratbildung und Atemwegseosinophilie, zur bronchialen Hyperreagibilität und zur (teil)reversiblen Atemwegsobstruktion bei.

Das klinische Bild wird durch anfallsartige Atemnot mit Husten und Engegefühl in der Brust dominiert. Auslöser können einerseits bestimmte Allergene, aber auch unspezifische Atemwegsreize wie z.B. Rauch, Staub, Kaltluft oder körperliche Anstrengung sein.

Diagnostisch wegweisend sind neben der Anamnese Hinweise auf eine Atemwegsobstruktion in der körperlichen Untersuchung (Lungen-Auskultationsbefunde wie Giemen und Brummen v.a. während des verlängerten Exspiriums) und in der Spirometrie. Zur Diagnosesicherung werden entweder Bronchospasmolyse-Tests zum Nachweis der Reversibilität der Atemwegsobstruktion durchgeführt oder die bronchiale Hyperreagibilität mittels Provokations-Test bzw. Peak-flow-Variabilität nachgewiesen (1).

Neben der prophylaktischen Meidung von Auslösern stehen als symptomatische Therapie in erster Linie bronchiendilatierende β_2 -Sympathomimetika und antiinflammatorische Glukokortikosteroide zur Verfügung. Gezielte Diagnostik und optimale symptomatische Therapie können der Mehrzahl der Erkrankten zwar ein weitgehend beschwerdefreies Leben ermöglichen, eine kausale Behandlung ist jedoch auch aufgrund der komplexen und bislang nicht vollständig geklärten neuroimmunologischen Pathogenese zurzeit nicht möglich (5).

1.2. NEUROGENE ENTZÜNDUNG

Schon seit einigen Jahrhunderten wird diskutiert, inwiefern Neurone an Entzündungsprozessen beteiligt sind. Bereits im 17. Jhdt. wurde auch über eine neuronale Beteiligung an der Asthma-Pathogenese spekuliert (6). Aus zahlreichen Untersuchungen ist mittlerweile bekannt, dass die Entstehung und Aufrechterhaltung von Asthma wahrscheinlich weder rein immunologisch, noch ausschließlich durch neuronale Veränderungen zu erklären ist. Vielscheint ein komplexes Wechselspiel zwischen Entzündungszellen, mehr Atemwegsstrukturzellen und sensiblen Atemwegsneuronen eine wichtige Rolle in der Asthma-Pathogenese zu spielen (4). Dabei ruft die Entzündung in den Atemwegen Veränderungen im sensiblen Nervensystem hervor, die wiederum die Entzündung verstärken bzw. aufrechterhalten können. Diese Wechselwirkung zwischen Immunsystem und Nervensystem wird auch als Prinzip der neurogenen Entzündung (NE), ein erstmals 1967 von Jancsó et al. erwähnter Begriff (7), bezeichnet. Der Grundmechanismus der NE besteht in der Ausschüttung proinflammatorischer Neuropeptide durch primär afferente Neurone, welche neben zentralen Effekten auch das Entzündungsgeschehen im peripheren Gewebe modulieren können. Auslösender Reiz können dabei verschiedenste mechanische, chemische oder elektrische Noxen sein. Das hierdurch evozierte Signal wird durch das afferente Neuron zunächst orthodrom in Richtung des Perikaryons geleitet. Von dort aus kommt es dann über Axonkollateralen zur antidromen welche schließlich den peripheren Nervenendigungen Leitung, an zur Neuropeptidausschüttung führt (4). Zu den dort freigesetzten Neuropeptiden gehören u.a. die Tachykinine Substanz P (SP), Neurokinin A (NKA) und Neurokinin B (NKB), sowie das Calcitonin-Gene-Related Peptide (CGRP) und das Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP). Die im Innervationsgebiet des afferenten Nervs freigesetzten Neuropeptide bewirken eine Entzündungsreaktion mit den typischen Elementen Rötung, Schwellung (Ödem) und Schmerz. Diese Hypothese wurde auch als "Axon-Reflex" bekannt. Gemäß diesem Konzept beschrieb Barnes 1986 Asthma erstmals als einen Axon-Reflex (8; 9; 10).

In der Folge untersuchten zahlreiche Arbeitsgruppen verstärkt die neurogene Beteiligung an der Asthma-Pathogenese (4). Eine zentrale Kaskade ist hierbei offenbar die Allergen-Expositions-bedingte Steigerung der Neurotrophin-Konzentration in den Atemwegen, welche über eine Tachykinin-Induktion in Atemwegsneuronen zur Asthma-typischen Atemwegsentzündung, bronchialen Hyperreagibilität und Obstruktion beiträgt (*s. Abb. 1.1*) (11; 12; 13; 14; 15; 16).

Die Relevanz der NE für Asthma wurde bereits in verschiedenen Tiermodellen (v.a. in Meerschweinchen, Ratte und Maus) gezeigt. Bei diesen scheint der *Axon-Reflex* allerdings ausgeprägter als bei Asthma-Patienten zu sein (17). Für den Menschen existieren hierzu bislang nur wenig und teilweise widersprüchliche Daten, sodass die Bedeutung der NE für das humane Asthma nicht abschließend beurteilt werden kann (18). Möglicherweise variiert die Relevanz der NE auch zwischen den verschiedenen Asthma-Schweregraden und -Formen (10).

Bisher konnten die aus Tiermodellen gewonnenen Erkenntnisse zur NE bei Asthma noch nicht für Asthma-Patienten therapeutisch nutzbar gemacht werden, weshalb weitere Forschung auf diesem Gebiet erforderlich ist.



Abbildung 1.1 – Konzept der neurogenen Entzündung.

Eine zentrale Kaskade der neurogenen Entzündung ist offenbar die Allergenexpositions-bedingte Steigerung der Neurotrophin-Konzentration in den Atemwegen, welche über eine Tachykinin-Induktion in sensiblen Atemwegsneuronen zur Entzündung in den Atemwegen sowie zur Entstehung von Asthma-Symptomen wie bronchialer Hyperreagibilität und akuter bronchialer Obstruktion beiträgt.

1.3. TACHYKININE IN DEN ATEMWEGEN

Substanz P (SP) wurde erstmals 1931 beschrieben (19) und 1971 vollständig sequenziert (20). SP wurde u.a. in sensiblen Vagus-Neuronen von Mensch (21; 22; 23; 24), Meerschweinchen (25), Katze, Kaninchen, Rind und Ratte (26; 27) nachgewiesen. SP gehört wie die Neurokinine A (NKA) und B (NKB) (28) sowie die Neuropeptide K (NPK) (29) und γ (30) zur Familie der Tachykinine (*syn. Neurokinine*). Diese Tachykinine werden u.a. neben dem Calcitonin gene-related peptide (CGRP), dem Neuropetid Y (NPY) und dem Vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP) zur Gruppe der Neuropeptide gezählt. Neuropeptide besitzen ein sowohl peripher- als auch zentralnervöses, neuromediatorisches Wirkungspotential, welches unter dem Begriff des nicht-adrenergen, nicht-cholinergen (NANC-)Systems (31) subsummiert wird. Speziell SP und NKA stellen dabei wichtige die Exzitation modulierende Vertreter des NANC-Systems dar (32).

Tachykinine wie SP oder NKA werden u.a. nach Aktivierung sensibler Atemwegsneurone durch Allergene in die Atemwege freigesetzt und zeigen dort bronchokonstriktorische und proinflammatorische Effekte (33). Auf diesem Weg können sie zur neuroimmunologischen Entstehung von chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen wie Asthma beitragen.

1.3.1. STRUKTUR, SYNTHESE UND INAKTIVIERUNG

Alle Tachykinine weisen an ihrem C-terminalen Ende eine fast identische Aminosäuresequenz (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂) auf. Das Polypeptid SP besteht aus folgenden elf Aminosäuren: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂.

Die in den Atemwegen vorkommenden Tachykinine SP, NKA, NPK und Neuropetid γ werden vom gleichen Gen, dem Präprotachykinin A(PPT-A)-Gen, kodiert (34).

Tachykinine werden sowohl in neuronalen als auch von nicht-neuronalen Zellen gebildet. In den Atemwegen werden Tachykinine in erster Linie in den Perikaryen sensibler Atemwegsneurone synthetisiert und in Vesikeln axonal bidirektional nach peripher in die Lunge sowie ins zentrale Nervensystem (ZNS) transportiert (35). Die Perikaryen dieser pseudounipolaren, Tachykinin-immunreaktiven Atemwegsneurone liegen bei Meerschweinchen und Ratten in den sensiblen vagalen Ganglien nodosum und jugulare sowie in thorakalen Spinal-Ganglien (36; 37). In den Atemwegen projizieren Tachykinin-immunreaktive Nervenfasern u.a. zu submukosalen Drüsen, glatter Atemwegsmuskulatur und Gefäßen (38). Außer in Knorpelspangen gibt es in allen Kompartimenten der unteren Atemwege Tachykinin-haltige Nervenfasern (39). Auch bei Menschen wurde Tachykinin-Immunreaktivität (IR) in Nervenfasern in den Atemwegen (38; 40; 41; 42; 43) sowie in sensiblen vagalen Atemwegsganglien (23) nachgewiesen.

Zur Freisetzung von Tachykininen an den peripheren Nervenendigungen kommt es nach Aktivierung der primär afferenten Nervenfasern z.B. durch Stimulation mit Capsaicin, Bradykinin, Prostaglandin, Histamin, hyperosmotischer Salzlösung, Zigarettenrauch, Allergenen, Ozon oder kalter trockener Luft (33; 17).

Aber auch in diversen nicht-neuronalen Geweben von Säugetieren wurden Tachykinine bzw. deren mRNA nachgewiesen, z.B. in Speicheldrüse, Schilddrüse, Herz, Haut, Milz, Niere, Nebenniere, Skelettmuskel, Uterus, Hoden und Gefäßen (44; 45). Nicht-neuronale Tachykinin-Bildung findet auch in den Atemwegen von Mensch und Nagetieren u.a. in Tracheal- und Bronchialgewebe wie Endothelzellen sowie eosinophilen Granulozyten, Alveolarbzw. Sputum-Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und Dendritischen Zellen statt (45; 46).

Inaktiviert werden Tachykinine in den Atemwegen in erster Linie durch die neutrale Endopeptidase (NEP) und das Angiotensin-umwandelnde Enzym (ACE) (47). NEP wird in Atemwegsmukosazellen exprimiert und scheint daher die Hauptinaktivierungsfunktion in den Atemwegen zu haben, während ACE vorwiegend intravasal sowie im Liquor cerebrospinalis zu finden ist und somit eher dort für den Peptidabbau in Frage kommt (48). Nach proteolytischer Inaktivierung werden die Fragmente durch in den Atemwegen ubiquitär exprimierte Peptid-Transporter wie z.B. PEPT2 entfernt (46).

1.3.2. REZEPTOREN UND WIRKUNG

In den Atemwegen freigesetzte Tachykinine zeigen bronchokonstriktorische und verschiedene pro-inflammatorische Effekte wie Vasodilatation, Plasmaextravasation, Mukus-Hypersekretion sowie Chemotaxis und Stimulierung von Entzündungszellen (17).

Vermittelt werden diese Effekte über die drei bekannten Tachykinin-Rezeptor-Typen NK_1 , NK_2 und NK_3 (49; 50; 51). Sie gehören zu den G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren der Klasse 1 und werden von den Tachykinin-Rezeptor-Genen (TACR) *1-3* kodiert (45). Tachykinin-Rezeptoren wurden u.a. in Atemwegsmuskelzellen, submukosalen Drüsen und im respiratorischen Epithel immunhistochemisch nachgewiesen (52), die einzelnen Rezeptor-Typen sind allerdings sehr heterogen verteilt. Während der NK₁-Rezeptor (NK₁) insgesamt überwiegend im Epithel, in den Drüsen und an den Gefäßen der Atemwege lokalisiert ist, wird der NK₂-Rezeptor (NK₂) eher in der glatten Atemwegsmuskulatur gefunden (53; 54). Die Tachykinin-Rezeptoren weisen eine moderate Liganden-Selektivität auf. SP, NKA und

NKB haben prinzipiell zwar auf alle 3 Rezeptor-Typen eine agonistische Wirkung (*via Erhöhung des intrazellulären Calciums*), zeigen aber jeweils zu einem Rezeptor-Typ eine besonders hohe Affinität: SP zu NK₁, NKA zu NK₂ und NKB zu NK₃ (45; 39).

Vasodilatation und Plasmaextravasation sind weitestgehend abhängig von NK₁. Die Aktivierung von NK₁ stimuliert überdies epitheliale Becherzellen zur Mukussekretion (55; 56) und bewirkt eine Chemotaxis von Entzündungszellen (32). Untersuchungen in NK₁-Deletionsmodellen zeigten für die Atemwege u.a. eine veränderte Antwort auf Hypoxie (57) sowie eine verminderte durch elektrische Feld-Stimulation erzeugte Atemwegskonstriktion von NK₁-deletierten Mäusen mit Allergen-induzierter Atemwegsentzündung (58). SP induziert im Meerschweinchen-Modell außerdem eine Histamin-Ausschüttung, was sowohl NK₁als auch NK₂-abhängig (59) ist. Außerdem scheint die durch NGF-induzierte bronchiale Hyperreagibilität gegenüber Histamin NK₁-abhängig zu sein (16). Einer Studie zufolge wird NK₁ in der Lunge von Asthma-Patienten vermehrt exprimiert (60).

Tachykinine sind zudem potente Konstriktoren der glatten Atemwegsmuskulatur, was in erster Linie NK₂-vermittelt geschieht (61). Hierfür spricht auch, dass inhaliertes oder intravenös verabreichtes NKA bei Asthma-Patienten eine Bronchokonstriktion (62) auslöst. Die bronchokonstriktorische Wirkung der Tachykinine wird im Tiermodell durch Epithelschäden in den Atemwegen sogar noch weiter verstärkt (63).

Darüberhinaus wurde gezeigt, dass Tachykinine die Acetylcholin(Ach)-Ausschüttung parasympatischer Nervenfaserendigungen beschleunigen (64) und somit indirekt zur Achinduzierten bronchialen Hyperreagibilität beitragen können. Dies scheint zumindest bei Maus und Meerschweinchen in erster Linie NK₂ bzw. NK₃-abhängig (53) zu sein. Ebenfalls NK₃sowie NK₁-abhängig ist beim Meerschweinchen offenbar die Histamin-induzierte mikrovaskuläre Gefäßpermeabilitätssteigerung (53).

Abgesehen von den peripheren Effekten in den Atemwegen werden die im Perikaryon gebildeten Tachykinine zudem ins ZNS transportiert, wo sie u.a. die Schmerzwahrnehmung im somatosensorischen System (65; 66) sowie verschiedene zentrale Atemregulationsmechanismen wie beispielsweise den Hustenreflex (67; 68) modulieren können.

1.3.3. ROLLE IN DER NEUROGENEN ENTZÜNDUNG BEI ASTHMA BRONCHIALE

Es gibt verschiedene Hinweise aus Tiermodellen und Untersuchungen mit Asthma-Patienten darauf, dass eine allergische Atemwegsentzündung die Bildung und Ausschüttung von Tachykininen wie SP induziert. So wurden in einem Meerschweinchen-Modell 24 h nach Allergenexposition drei- bis vierfach erhöhte Tachykinin-Konzentrationen im Lungengewebe gemessen (69). Korrespondierend hierzu wurde in einer Studie bei Allergikern nach Allergenprovokation ein zusätzlicher Anstieg der im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen ohnehin schon erhöhten Tachykinin-Konzentration in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) gemessen (70). Eine andere Untersuchung zeigt, dass NKA das in der humanen BAL am meisten vorhandene Tachykinin ist (71). Erhöhte Tachykinin-Konzentrationen wurden darüber hinaus ebenfalls im Plasma von Patienten mit akut exazerbiertem Asthma nachgewiesen (72). In einer Autopsie-Studie wurden in den Atemwegen von Asthma-Patienten vermehrt vorhandene Tachykinin-immunreaktive Nervenfasern beobachtet (41), allerdings erbrachten nachfolgende Untersuchungen diesbezüglich gegenteilige Befunde (73; 74; 75).

Neben spezifischen Allergenen können auch unspezifische Atemwegsreize wie z.B. Ozon zu erhöhten Tachykinin-Konzentrationen in der humanen BAL führen (76). Ein weiteres Beispiel hierfür ist die Inhalation mit hypertoner Natriumchlorid(NaCl)-Lösung, was bei Asthma-Patienten eine im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte Tachykinin-Konzentration im Sputum induzierte. Dies korrelierte invers mit dem Quotienten aus forciertem exspiratorischen Volumen in 1 s (FEV₁) und der forcierten Vitalkapazität (FVC) (77). Die Tachykinin-Induktion durch unspezifische Atemwegsreize könnte somit ebenfalls zur Asthma-typischen Hyperreagibilität beitragen.

Tachykinine werden also einerseits unter asthmatischen Bedingungen vermehrt in den Atemwegen freigesetzt und zeigen dort andererseits proinflammatorische sowie bronchokonstriktorische Effekte. Somit ist eine Beteiligung an der Entstehung und Aufrechterhaltung von chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen wie Asthma sehr wahrscheinlich.

Verschiedene Versuche mit Tachykinin-Rezeptor-Antagonisten zeigten allerdings bislang überwiegend nicht den erwarteten klinischen Nutzen. Eine Übersicht über die heterogenen Resultate verschiedener Studien zum klinischen Einsatz von NK-Antagonisten liefert die Arbeit von Butler et al. 2007 (18).

1.4. NERVE GROWTH FACTOR IN DEN ATEMWEGEN

Nerve Growth Factor (NGF) wurde vor ca. 60 Jahren von Rita Levi-Montalcini und Stanley Cohen entdeckt (78; 79), wofür beide 1986 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet wurden. NGF wird neben Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) sowie Neurotrophin(NT)-3 und NT-4 zur Familie der Neurotrophine gezählt. Neurotrophine werden sowohl von neuronalen Zellen als auch u.a. von Entzündungs- und Strukturzellen synthetisiert. Alle Neurotrophine binden mit geringer Affinität an den Pan-Neurotrophinrezeptor p75 (p75^{NTR}) und jeweils mit hoher an einen Tropomyosin-related Kinase(Trk)-Rezeptoren: NGF bevorzugt an TrkA, BDNF sowie NT-4 an TrkB und NT-3 v.a. an TrkC (80) (*Abb. 1.2*).



Abbildung 1.2 - Neurotrophine und ihre Rezeptoren.

Alle Neurotrophine (Nerve Growth Factor (NGF), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) sowie Neurotrophin(NT)-3 und NT-4) binden mit hoher Affinität (dicke Pfeile) an jeweils einen Tropomyosin-related Kinase(Trk)-Rezeptoren und mit niedriger Affinität (dünne Pfeile) an den Pan-Neurotrophinrezeptor p75.

Zunächst zeigten Untersuchungen, dass NGF in erster Linie für Überleben, Wachstum und Differenzierung von sensiblen und sympathischen Neuronen eine wichtige Rolle spielt (81; 82; 83), was später auch speziell in den Atemwegen nachgewiesen wurde (84). Neurotrophine werden während der Entwicklung des Nervensystems primär von den Zielgeweben freigesetzt, in die sensible Nervenfasern daraufhin aussprossen, NGF am peripheren Nervenende aufnehmen und retrograd ins Perikaryon transportieren. Neuere Studien erbrachten davon abgesehen zahlreiche Hinweise auf eine Beteiligung an chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen (80; 14; 13; 85; 86).

1.4.1. STRUKTUR, SYNTHESE UND INAKTIVIERUNG

Beim Menschen liegt aktives NGF stets in Form des β -Dimers (β NGF) vor (87; 88). Die anderen beiden Untereinheiten α und γ wurden bisher lediglich in der Speicheldrüse von Mäusen und Ratten nachgewiesen. β NGF besteht aus zwei Ketten von maximal 118 Aminosäuren (89). Das β NGF-kodierende Gen liegt bei Mäusen auf Chromosom 3 (90) und bei Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (91). Die Struktur des β NGF-Gens ist stark konserviert (92).

NGF wird in erster Linie im Innervationsgebiet von sensiblen Neuronen gebildet, welches deren Überleben und Proliferation moduliert (81). Aber auch in zahlreichen Entzündungszellen wie Lymphozyten (93), Mastzellen (94), Eosinophilen (95) oder Makrophagen (96) sowie in Strukturzellen wie Fibroblasten (97), Epithel- (98) oder glatten Muskelzellen (99; 100) wurde *in vitro* eine NGF-Synthese nachgewiesen.

Die Umwandlung der NGF-Vorstufe (proNGF) zu biologisch aktivem NGF (mNGF) wird durch eine Proteasen-Kaskade reguliert, in der Tissue-Plasminogen-Aktivator (tPA), Plasminogen und Plasmin eine Rolle spielen. Abgebaut wird NGF hingegen u.a. von der Matrix-Metalloproteinase(MMP)-9 (101).

1.4.2. REZEPTOREN UND WIRKUNG

Die NGF-Effekte werden durch die Aktivierung von zwei verschiedenen Rezeptoren vermittelt: TrkA und p75^{NTR}.

TrkA ist der Neurotrophinrezeptor, zu dem NGF von allen Neurotrophinen die höchste Affinität zeigt. TrkA wird im zentralen und peripheren Nervensystem (102), aber auch in nicht-neuronalen Zellen wie z.B. Immun- oder Strukturzellen exprimiert (82; 103). Speziell in den Atemwegen wurde TrkA in Mastzellen (104) sowie in Strukturzellen nachgewiesen (105). Die TrkA-Aktivierung kann in diesen Zellen Überleben, Proliferation, Differenzierung bzw. Aktivierung bewirken (82).

NGF bindet wie alle Neurotrophine mit niedriger Affinität an $p75^{NTR}$. Dieser Pan-Neurotrophin-Rezeptor ist 75kDa schwer und besteht aus 399 Aminosäuren, das kodierende Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 17 (106). $p75^{NTR}$ gehört zur Familie der sogenannten Todesrezeptoren, welche eine Apoptose-Kaskade induzieren können (107). Die Aktivierung von $p75^{NTR}$ führt entweder zur Apoptose oder zum Überleben der Zelle, abhängig vom Signalweg sowie den involvierten Bindungs-Proteinen und Co-Rezeptoren (108; 109). Apoptose wird dabei durch Aktivierung einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), Überleben via Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells) induziert. Außerdem kann p75^{NTR} Proneurotrophine mit hoher Affinität binden sowie mit dem hoch-affinen TrkA interagieren (110). Die Co-Expression von TrkA und p75^{NTR} in neuronalen Zellen führt beispielsweise zu einer noch höheren Affinität von NGF zu TrkA (111). Darüberhinaus blockiert die Co-Expression von TrkA bei NGF-Bindung an p75^{NTR} die Apoptose-Induktion und aktiviert den Überlebens-Signalweg in dieser Zelle (112). Andererseits verzögert die Präsenz von p75^{NTR} die Internalisierung und den Abbau von TrkA und ermöglicht so dessen prolongierte Aktivierung (113).

Außerdem gibt es verschiedene Hinweise dafür, dass NGF für die Tachykinin-Bildung in sensiblen parasympathischen Neuronen sowohl unter physiologischen (114; 115) als auch unter entzündlichen Bedingungen (116) eine wichtige Rolle spielt.

1.4.3. ROLLE IN DER NEUROGENEN ENTZÜNDUNG BEI ASTHMA BRONCHIALE

In den Atemwegen wurde eine verstärkte NGF-Synthese unter entzündlichen Bedingungen *in vivo* u.a. in Entzündungszellen aus Bronchialbiopsien von Asthmatikern (117), bei Eosinophilen aus der BAL im Tiermodell (118) und von Asthma-Patienten (119) sowie für Strukturzellen im Tiermodell (120) und beim Menschen (117; 121) gezeigt. Verschiedene proinflammatorische Zytokine wie Interleukin(IL)-1 β , Tumornekrosefaktor(TNF)- α , oder Transforming Growth Factor(TGF)- β induzieren *in vitro* eine vermehrte NGF-Expression in Atemwegs-Strukturzellen, z.B. in Lungenfibroblasten (122), Atemwegsepithel- (123) (124) oder glatten Muskelzellen (125). Andere proinflammatorische Zytokine können zudem synergistisch mit den oben genannten eine zusätzliche Steigerung der NGF-Synthese bewirken, was u.a. für TNF- α in Kombination mit IL-4 in Astrozyten (126) oder für IL-1 β und Interferon(IFN) γ in Fibroblasten (127) gezeigt wurde.

Diese NGF-Induktion unter entzündlichen Bedingungen in den Atemwegen wurde auch *in vivo* beobachtet, so z.B. im Meerschweinchen-Modell nach einmaliger Allergenprovokation (11). Korrespondierend hierzu zeigen auch Asthma-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen höhere NGF-Basiskonzentrationen in der BAL (117) sowie einen Anstieg nach einmaliger Allergen-Provokation (128). Dementgegen steht allerdings die Arbeit von Kassel et al. (121), in der 12 Asthmapatienten nach achtmaliger Allergen-Provokation keinen Anstieg der NGF-Konzentration in der BAL aufwiesen.

Die NGF-Induktion im Rahmen von Atemwegsentzündungen bleibt jedoch nicht lokal begrenzt. So konnte beispielsweise auch in Monozyten im Blut von Allergikern eine erhöhte NGF-RNA-Expression nachgewiesen werden (129). Darüberhinaus wurde im Serum von Asthma-Patienten eine erhöhte NGF-Konzentration festgestellt, die zusätzlich mit der Schwere der klinischen Ausprägung der Erkrankung assoziiert war (130).

Neben zahlreichen im Tiermodell und am Menschen *in vitro* nachgewiesenen NGF-Effekten auf Entzündungszellen wie z.B. der Degranulation von Mastzellen (131) und Proliferation von glatten Muskelzellen (132), stellt die Induktion von Tachykininen (v.a. Substanz P) in Atemwegsneuronen einen wahrscheinlich zentralen Mechanismus der NGF-Partizipation an Entzündung, bronchialer Hyperreagibilität und Remodelling dar (133). Diese NGFvermittelte SP-Induktion unter Asthma-Bedingungen wurde *in vivo* in verschiedenen Tiermodellen (Meerschweinchen (11; 15; 16; 12), Maus (134) und Frettchen (135)) nachgewiesen. Außerdem wurde *in vitro* gezeigt, dass NGF bronchiale Hyperreagibilität auch in Abwesenheit von den Perikaryen der sensiblen Atemwegsneurone – wahrscheinlich durch bloße Freisetzung von SP aus deren distalen Axonenden – induzieren kann (136). Zusätzlich erhöht NGF die Erregbarkeit sensibler parasympathischer Atemwegsneurone und könnte auch auf diese Weise zur bronchialen Hyperreagibilität beitragen (137).

Es wurde zudem *in vivo* gezeigt, dass intravenös appliziertes NGF die Histamininduzierte Bronchokonstriktion und die bronchiale Hyperreagibilität gegenüber Histamin potenziert (16). Zusätzlich konnte die Entstehung von bronchialer Hyperreagibilität nach Allergen-Provokation in verschiedenen Tiermodell-Studien durch Anti-NGF-Vorbehandlung inhibiert werden (118; 138).

Davon abgesehen gibt es Hinweise für eine Beteiligung beider NGF-Rezeptoren an der Induktion von Atemwegsentzündung und bronchialer Hyperreagibilität, was für p75^{NTR} bisher vorwiegend am Mausmodell untersucht wurde. Dieses zeigt, dass die genannten Effekte bei p75^{NTR}-Knockout-Tieren (139) bzw. nach Vorbehandlung mit p75^{NTR}-Antikörpern nicht eintreten (140). Auch mittels trkA-Antagonisten konnte die Entwicklung bronchialer Hyperreagibilität sowie die SP-Induktion im Ganglion nodosum und im Lungengewebe auch bei Meerschweinchen weitestgehend verhindert werden (11).

Glukokortikoide wie Dexamethason wirken antiinflammatorisch und werden u.a. bei allergischem Asthma eingesetzt. Dexamethason führte *in vitro* zu einer Reduktion der basalen NGF-Expression sowie des Entzündungs-induzierten Expression-Anstiegs in Atemwegsepithelzellen (124) und Lungenfibroblasten (122). Auch *in vivo* wurden ähnliche Effekte beobachtet, so sank beispielsweise die NGF-Serumkonzentration bei Asthma-Patienten nach Glukokortikoid-Inhalation (141). Zusätzlich reduzierte eine Dexamethason-Vorbehandlung die NGF-Expression in Eosinophilen von Allergikern (142). Insgesamt zeigen diese Forschungsergebnisse, dass NGF unter asthmatischen Bedingungen nicht nur von neuronalen, sondern auch von zahlreichen Entzündungs- und Strukturzellen in den Atemwegen vermehrt gebildet wird. NGF hat neben einigen direkten proinflammatorischen Effekten eine SP-Induktion zur Folge, wodurch u.a. die bronchiale Hyperreagibilität moduliert wird. Die Bedeutung von NGF für die klinische Manifestation bei Asthma-Patienten und damit als potentiell therapeutisch nutzbares Ziel kann derzeit allerdings noch nicht abschließend bewertet werden.

1.5. ASTHMA IM TIERMODELL

Die Pathogenese von Asthma bronchiale kann prinzipiell entweder *in vivo* an Asthma-Patienten bzw. im Tiermodell oder *in vitro* an Zellkulturen erforscht werden.

Für Aspekte der komplexen neuroimmunologischen Asthma-Pathogenese sind *in vitro*-Methoden nicht ausreichend geeignet. Dies liegt v.a. daran, dass der parallele Verlauf der Atemwegsentzündung und der Veränderungen in Atemwegsneuronen nur in einem ganzen Organismus untersucht werden kann.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Rückschlüsse auf pathophysiologische Vorgänge direkt aus Untersuchungen von Asthma-Patienten zu ziehen. Üblich sind hierfür z.B. venöse Blutentnahmen, Lungenfunktionstests, Bronchoskopie mit Biopsien und BAL. Es gibt jedoch keine Möglichkeit für die Gewinnung geeigneter Gewebeproben zur Untersuchung von Perikaryen sensibler Atemwegsneurone bei Asthma-Patienten. Die Perikaryen sensibler Atemwegsneurone liegen zusammen mit denen zahlreicher anderer viszeroafferenter Neurone unmittelbar unterhalb des Foramen jugulare im vagalen Ganglion inferius (distale), weshalb eine Probenentnahme nur postmortal möglich ist. Die einzigen Daten zur Tachykinin-IR von Asthma-Patienten stammen daher aus endobronchialen Biopsie- (74; 75) bzw. Autopsie-Studien (73), in denen periphere Nervenfasern ohne vorherige Markierung der Atemwegsneurone untersucht wurden, weshalb sie eine eingeschränkte Aussagekraft besitzen.

Aus diesen Gründen werden zur Untersuchung neuronaler Veränderungen im Rahmen von Asthma fast ausschließlich Tiermodelle angewendet. Da kein bekanntes Tiermodell spontan Asthma-typische Veränderungen entwickelt (143), wird in Studien zumeist durch Sensibilisierung und anschließende Provokation mit einem Allergen eine Art "experimentelles allergisches Asthma" künstlich induziert. Insgesamt werden Asthma-Tiermodelle seit über 100 Jahren neben pathophysiologischen Fragestellungen v.a. auch zur Erprobung neuer therapeutischer Optionen verwendet (144). Die gängigsten Asthma-Tiermodelle sind Meerschweinchen (145; 146), Ratte (147; 148) und Maus (149; 150). Aber auch Frettchen, Pferde, Schafe, Affen, Hunde und Katzen wurden vereinzelt in der Asthmaforschung verwendet (151; 152).

Kein Tiermodell kann alle Aspekte des humanen Asthmas vollständig abbilden. Meerschweinchen sind jedenfalls das in präklinischen Asthma-Studien am häufigsten verwendete Tiermodell (153). Ein Grund hierfür ist, dass Anatomie und Physiologie der Meerschweinchen-Lunge der humanen stärker als oben genannte Tiermodelle entsprechen. Insbesondere für Untersuchungen von Veränderungen in sensiblen Atemwegsneuronen ist dabei relevant, dass sich die autonome Atemwegsinnervation sowie die Lokalisation und Anteil Tachykininimmunreaktiver Nervenfasern in der Lunge von Mensch und Meerschweinchen sehr ähneln. Einer der größten Vorzüge dieser Tiermodell-Spezies liegt zudem in der dem Menschen sehr ähnlichen klinischen Reaktion auf Allergenexpositionen, welche sich z.T. deutlich von der anderer Nager wie Maus oder Ratte unterscheidet (145). Auch die erzeugte Atemwegsentzündung, bei der Histamin und Eosinophile große Bedeutung haben, ist mit der von Asthma-Patienten gut vergleichbar (146). Histamin spielt dagegen z.B. bei Mäusen pathophysiologisch nahezu keine Rolle (144). Neuere Studien konnten darüberhinaus in chronischen Meerschweinchenmodellen Atemwegs-Remodelling induzieren, wie es auch bei Asthma-Patienten beobachtet wird (146). Abgesehen davon stellt die fast identische Rezeptor-Pharmakologie in den Atemwegen von Mensch und Meerschweinchen einen wichtigen Vorteil für Interventionsstudien dar (145). Außerdem entstammen die für die Forschung verfügbaren Meerschweinchen im Gegensatz zu Mäusen überwiegend keinem Inzucht-Verfahren, was deren Aussagekraft für humane Erkrankungen eher erhöht.

Im Vergleich zu anderen Tiermodellen gibt es bei der Verwendung von Meerschweinchen nur sehr wenige Nachteile wie das Fehlen von transgenen Methoden oder die begrenzte Anzahl ausreichend unterschiedlicher Stämme.

Ein relevanter Unterschied zum Menschen betrifft den sogenannten *Axon-Reflex*. Gemäß diesem von Barnes et al. beschriebenen Phänomen reagieren sensible Atemwegsneurone auf die Stimulierung ihrer freigelegten peripheren Endigungen durch Entzündungsmediatoren mit der Freisetzung von Neuropeptiden, die wiederum Asthma-typische Phänomene wie Bronchokonstriktion, Schleimsekretion oder Rekrutierung von Entzündungszellen induzieren können (8). Dieser *Axon-Reflex* ist bei Meerschweinchen und Ratten recht ausgeprägt, für sein Vorhandensein in der humanen Lunge gibt es dagegen bisher keine eindeutigen Belege (145). Dies ist, v.a. im Hinblick auf das Konzept der neurogenen Entzündung, eine prinzipielle Einschränkung der Tiermodell-Relevanz für humanes Asthma. Auch im Hinblick auf die bronchiale Hyperreagibilität von Asthma-Patienten sind Meerschweinchen - wie allerdings alle

Tiermodelle - inadäquat. Ein Grund hierfür ist, dass es für kein Tiermodell ein mit der Spirometrie vergleichbar gut geeignetes Verfahren zur Bestimmung des wichtigsten Parameters für bronchiale Hyperreagibilität, des forcierten exspiratorischen Volumen in 1 s (FEV₁), gibt (145). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit trotz klinischer Relevanz keine Daten zur bronchialen Hyperreagibilität erhoben.

Insgesamt gilt das Meerschweinchen in vielerlei Hinsicht als das geeignetste Tiermodell für Studien zu chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen wie Asthma (145; 146).

1.6. FRAGESTELLUNGEN

Es sind zahlreiche Studien zur neurogenen Entzündung (NE) am Beispiel von Asthma im Tiermodell mit akuter Provokation durchgeführt worden. Deutlich weniger ist dagegen über diese Entzündungsvorgänge im Rahmen mehrfacher Allergenexpositionen bekannt. Deshalb wurde die NE in der vorliegenden Arbeit in einem neuen chronischen Provokationsmodell an Meerschweinchen untersucht. Dabei lag der Fokus auf drei Kernaspekten der NE:

- 1) der lokalen Entzündung in den Atemwegen,
- sensiblen Atemwegsneuronen, welche u.a. über die Bildung und Ausschüttung von Tachykininen die Entzündung in den Atemwegen beeinflussen können, sowie
- Neurotrophinen als wichtigem Bindeglied zwischen Atemwegsentzündung und Tachykinin-Freisetzung in den Atemwegsneuronen.

Zu diesen drei Kernaspekten der NE wurden folgende drei Fragestellungen während und nach mehrfachen Allergenexpositionen untersucht:

- *ad* 1) Wie verändern sich Anzahl und Zusammensetzung der BAL-Zellen sowie die peribronchialen Leukozyten-Infiltrate als Marker für das lokale Entzündungsgeschehen in den Atemwegen?
- *ad* 2) Wie entwickelt sich die Immunreaktivität für Tachykinine und den Pan-Neutrophin-Rezeptor p75 in sensiblen Atemwegsneuronen im Ganglion nodosum?
- *ad* 3) Wie hoch sind die Konzentrationen der Neurotrophine NGF, BDNF und NT-4 in der BAL?

Für die Untersuchung dieser Fragestellungen wurde ein neues chronisches Asthma-Tiermodell mit bis zu sechsmaliger inhalativer Provokation entwickelt. Dieses wurde anhand der beobachteten Allergenexpositionssymptomatik und der oben erwähnten Parameter für die lokale Atemwegsentzündung evaluiert.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIALIEN

Tabelle 2.1 Antikörper für Immunhistochemie

Antikörper	Produktname	Firmenname	Firmensitz
Cy2-Sekundärantikörper	Cy [™] 2-konjugiertes AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) [111-485-003]	Jackson Immuno Research Labora- tories, Inc.	West Grove, USA
Cy3-Sekundärantikörper	Cy [™] 3-konjugiertes AffiniPure Donkey Anti-Rat-IgG (H+L) [712-165-150]	Jackson Immuno Research Labora- tories, Inc.	West Grove, USA
p75 ^{NTR} -Antikörper	p75 Neurotrophin Receptor Polyclonal Antibody [PRB-602C]	Covance	Princeton, USA
Tachykinin-Antikörper	Rat Anti-Substance P Mo- noclonal Antibody [MAB356]	Chemicon	Pittsburgh, USA

Tabelle 2.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Produktname	Firmenname	Firmensitz
Aluminiumhydroxid (Al(OH) ₃)	Imject® Alum	Pierce Biotechnology	Rockford, USA
BDNF-ELISA-Kit	Human BDNF DuoSet®	R & D Systems	Minneapolis, USA
Color Reagent A (H ₂ O ₂) + Color Reagent B (Tetrame- thylbenzidine)	Substrate Reagent Pack	R & D Systems	Minneapolis, USA
Diff-Quick-Kit	DIFF QUIK STAIN SET	Medion Diagnos- tics	Düdingen, Schweiz
Dinatriumhydrogenphosphat	Disodium hydrogen phosphate	Merck	Darmstadt
Dulbecco's Phosphate Buf- fered Saline (DPBS)	Dulbecco's Phosphate Buf- fered Saline (DPBS)	PAA	Pasching, Österreich
Ethanol	Ethanol absolut EMPLU- RA TM	Merck	Darmstadt
Hämalaun	Mayers Hämalaunlösung	Merck	Darmstadt
Hydroxystilbamidine	Fluoro-Gold	Biotrend	Köln
Kaliumchlorid	Potassium chloride	Merck	Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Potassium dihydrogen phosphate	Merck	Darmstadt
Ketaminhydrochlorid (50 mg / ml)	Ketamin®	Delta Select	Pfullingen
Milchpulver	Skim Milk Powder	Fluka Chemie GmbH	Buchs, Schweiz
Natriumcarbonat	Sodium carbonate	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	Sodium chloride	Merck	Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat	Sodium dihydrogen phosphate	Merck	Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Sodium bicarbonate	Merck	Darmstadt
NGF-ELISA-Kit	NGF E _{max} [®] ImmunoAssay System	Promega	Madison, USA
NT-4-ELISA-Kit	Human NT-4 DuoSet®	R & D Systems	Minneapolis, USA
Ovalbumin (OVA)	Albumin from chicken egg white [®] , Grade V	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Formaldehyde solution	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Periodsäure	Periodsäure	Merck	Darmstadt
Pikrinsäure	Picric acid solution	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Proteaseninhibitor	Complete Mini®	Roche	Basel, Schweiz
Reagent Diluent	Reagent Diluent Concentrate 2	R & D Systems	Minneapolis, USA
Saccharose	Saccharose	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Salzsäure (1 N)	Hydrochloric acid	Merck	Darmstadt
Schiffsches' Reagenz	Schiff's reagent	Merck	Darmstadt
Stop-Lösung (2 N H ₂ SO ₄)	Stop Solution 2N Sulfuric Acid	R & D Systems	Minneapolis, USA
Tissue Tek	Tissue Freeze Medium®	ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES	Fort Washington, USA
Tween 20			St. Louis
(Polyoxyethylenesorbitan	Tween [®] 20	Sigma-Aldrich	IISA
monolaurate)			USA
Vitro-Clud	Vitro-Clud [®]	R. Langenbrinck Labor- und Me- dizintechnik	Teningen
Xylazinhydrochlorid (2%)	Rompun®	Bayer AG	Leverkusen
Xylol	Xylene	Merck	Darmstadt

Tabelle 2.3 Geräte und Apparaturen

Gerät/Apparatur	Produktname	Firmenname	Firmensitz	
ELISA-Reader	Fluostar OPTIMA	BMG LABTECH	Offenburg	
Epifluoreszenzmikroskop	Leica DM RA2	Leica Microsys- tems	Wetzlar	
Druckluftvernebler	Pari Boy Type 37.00	Pari Werk GmbH	Starnberg	
Laborabzug	Abzug	Köttermann	Hänigsen	
Laborschüttler	KS 250 basic	IKA Labortech- nik	Staufen	
Lichtmikroskop	Primo Star	Zeiss	Jena	
Neubauer Zählkammer	Neubauer Zählkammer (Bright-Line)	LO-Laboroptik GmbH	Friedrichsdorf	
Zentrifuge	Shandon Cytospin 4 Cytocentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA	

Tabelle 2.4 Verbrauchsmaterialien

Material	Produktname	Firmenname	Firmensitz
10 µl-Mikrospritze	701N Micro-Syringe Pipet	Hamilton	Bonaduz, Schweiz
ELISA-Platten	Immuno 96 MicroWell TM Plates (<i>MaxiSorp</i> TM)	Nunc	Langenselbold
ELISA-Plattenversieglung	Sealing Tapes	Nunc	Langenselbold
Filterkarten	Shandon TPX Filter Cards	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Filterpapier	Rundfilter (Ø 35 mm)	Schleicher & Schuell	Dassel
Membran-Filter	MF Membran hydrophil 0.22µm 25mm weiß glatt	Millipore	Billerica, USA
Objektträger	SuperFrost Plus- Objektträger	R. Langenbrinck Labor- und Medizin- technik	Teningen
Venenverweilkanüle	Neoflon	Becton Dickinson	Helsingborg, Schweden
Vicryl Naht	7-0 bzw. 4,0 Vicryl Naht	Ethicon	Norderstedt

Tabelle 2.5 Lösungen

Lösung	Bestandteile und Mischungsverhältnisse
Aluminiumhydroxid-Lösung	Aluminiumhydroxid,
(für die Sensibilisierung)	1:3 in Natriumchlorid-Lösung (0,9%) verdünnt
Aluminiumhydroxid_Ovalbumin_	Aluminiumhydroxid-Lösung (s.o.),
Lösung (für die Sensibilisierung)	$120 \ \mu$ l / ml Ovalbumin in Natriumchlorid-Lösung (0,9%),
Losung (jur die Sensibilisterung)	1 : 1 gemischt
Blocklösung	5 % Milchpulver,
	in Aqua dest.
Coating-Puffer (pH 9 7)	0.025 M NaHCO ₃
Coamg-runer (prr 9,7)	0.025 M Na ₂ CO ₃
Ethanol-Reihe	Ethanol,
(99 %, 96 %, 80 %, 70 %)	in Aqua dest.
	273,8 mmol / 1 NaCl,
	2,7 mmol / 1 KCl,
Inkubations-Lösung	$10,1 \text{ mmol} / 1 \text{ Na}_2\text{HPO}_4,$
	1,8 mmol / 1 KH ₂ PO ₄ ,
	in Aqua dest.
Ovalhumin-Lösung	Ovalbumin,
Ovarbuilin-Losung	in NaCl-Lösung (0,9%)
$\mathbf{Periods}$	0,5 % Periodsäure,
	in Aqua dest.
	230 ml 0,2 M NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O) ₂ -Lösung,
0,1 M Phosphatpuffer (PBS)	770 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ (H ₂ O) ₂ - Lösung,
	in Aqua dest. 1 : 2 verdünnen (pH 7,4)
Saccharose-Lösung (18%)	180g Saccharose,
Saccharose-Losung (1070)	auf 11 PBS
Salzsäure-Lösung (1 N)	82,7 ml HCl,
Salzsaure-Losung (111)	917,3 ml Aqua dest.
Waschnuffer	0.05 % (v/v) Tween $@ 20,$
wasenpuller	in DPBS
	2% Paraformaldehyd,
Zamboni-Lösung (pH 7,4)	15% Pikrinsäure,
	in PBS

2.2. VERSUCHSTIERE

Für die Experimente wurden 30 weibliche, 300 - 400 g schwere Meerschweinchen vom Stamm Dunkin Hartley von der Firma Charles River Wiga (Kieslegg, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden in der Tierexperimentellen Einrichtung des Campus Virchow Klinikum der Charité in einem 12-Stunden hell-dunkel-Lichtzyklus in pathogenfreier Umgebung sowie in Übereinstimmung mit dem geltenden Tierschutzgesetz gehalten. Sie wurden mit Ovalbumin(OVA)-freiem Futter und Trinkwasser ad libitum versorgt.

Die vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin bei Genehmigung der Tierversuche vergebene Projektnummer lautet G-0059/01.

2.3. TIERMODELL

2.3.1. VERSUCHSABLAUF

Die Versuche begannen nach einer Akklimatisierungsphase von 3 Tagen nach Ankunft der Tiere. Die Meerschweinchen wurden zunächst nach dem Zufallsprinzip in sechs Gruppen zu je fünf Tieren aufgeteilt, Gruppe 1 wurde zur Kontrollgruppe bestimmt (*Tab. 2.6*). Der Versuchsablauf ist in *Abb. 2.1* dargestellt. Sensibilisierung, retrograde Fluoreszenzfarbstoff-Markierung und Entnahme erfolgten nach einem etablierten Protokoll (69). Um chronische Asthma-Bedingungen zu erzeugen, wurden in der vorliegenden Arbeit im Unterschied zu bisherigen Studien sechs OVA-Provokationstermine an aufeinanderfolgenden Tagen angesetzt.

Gruppen	Sensibilisierung	Anzahl durchgeführ-	Tage zwischen letzter Pro-
		ter Provokationen (p)	vokation und Entnahme (d)
Gr. 1 (KTL p1 + d1)	ohne OVA	1	1
Gr. 2 (OVA p1 + d1)	mit OVA	1	1
Gr. 3 (OVA p3 + d1)	mit OVA	3	1
Gr. 4 (OVA p6 + d1)	mit OVA	6	1
Gr. 5 (OVA p6 + d3)	mit OVA	6	3
Gr. 6 (OVA p6 + d6)	mit OVA	6	7

Tabelle 2.6 – Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Alle Tiere außer der Kontrollgruppe (KTL) wurden vor den Provokationen mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Die einzelnen Gruppen (Gr.) unterscheiden sich zudem in der Anzahl der täglich durchgeführten OVA-Provokationen (p) sowie in der Anzahl der Tage zwischen letzter Provokation und Entnahme (d).



Abbildung 2.1 – Versuchsanordnung. Beginn der Versuche (Tag 1) nach 3 Tagen Akklimatisierungsphase. Gruppenaufteilung: 6 Gruppen (Gr.) mit je 5 Tieren, Gr. 1 = Kontrollgruppe. Dreimalige Sensibilisierungen (Sens) innerhalb von 28d, Kontrollgruppe ohne, Gr. 2-6 mit Ovalbumin (OVA). Die erste OVA-Provokation (Provo) erfolgte 7 Tage nach der letzten Sensibilisierung. Das retrograde Markieren der Atemwegsneurone mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoro-Gold wurde jeweils 7 Tage vor Entnahme durchgeführt.

2.3.2. SENSIBILISIERUNG

Für die Allergen-Sensibilisierung wurde den Tieren der Gruppen 2 – 6 dreimal je 5 ml einer Aluminiumhydroxid-OVA-Lösung intraperitoneal injiziert. Aluminiumhydroxid dient als immunogenes Adjuvans, indem es die Immunantwort auf das Allergen unspezifisch verstärkt. Den Tieren der Kontrollgruppe wurden jeweils 5 ml einer Aluminiumhydroxid-Lösung ohne Allergen injiziert.

2.3.3. PROVOKATION

Die Allergen-Provokationen begannen eine Woche nach der letzten Sensibilisierung und fanden an insgesamt sechs aufeinanderfolgenden Tagen statt. Hierfür wurden die Tiere ein-

zeln in 4725 cm³ große Plexiglas-Kammern gesetzt. In diese Kammern wurde eine zuvor durch einen Membran-Filter gereinigte **OVA-PBS-Lösung** mit Hilfe eines Druckluftverneblers aerosoliert. Die Kontrollgruppe (KTL p1) sowie Gruppe 2 (OVA p1) wurden einmal, Gruppe 3 dreimal (OVA p3) und die Gruppen 4 – 6 (OVA p6) sechsmal provoziert. Um einer möglichen Toleranzentwicklung gegenüber den Provokationen vorzubeugen, wurde täglich die OVA-Konzentration oder die Provokationsdauer unter Berücksichtigung der zuvor beobachteten Symptome einer akuten bronchialen Obstruktion erhöht. Diese ließ sich an einer Steigerung der Atemfrequenz, der zunehmenden Tiefe der Atemexkursionen, Husten, Zittern, Pilo-Erektion und Niesen beobachten. Für jeden Provokationsdurchgang wurde die Symptomatik zu einem semiquantitativen Gesamteindruck in drei Kategorien zusammengefasst. Diese Symptomatik-Beurteilungen der einzelnen Provokationen sind zusammen mit der jeweils verwendeten OVA-Konzentration und der Provokationsdauer in Tabelle 2.7 angegeben. Beim Auftreten stark ausgeprägter Symptome einer respiratorischen Insuffizienz wurden einzelne Tiere bereits vor Ablauf der angesetzten Expositionszeit aus der Kammer genommen und mit Sauerstoff versorgt. Aus den Gruppen 2, 3 und 4 war jeweils ein Tier zwischen den Provokationen gestorben.

Provokation	1.	2.	3.	4.	5.	6.
OVA-Konzentration	0,1%	0,1%	0,3%	0,3%	0,5%	0,5%
Provokationsdauer	10min	15min	10min	15min	5min	7min
Symptomatik bei	++	+	++	++	++	++
sensibilisierten Tieren		, i				
Symptomatik bei nicht	0	_	_	_	_	_
sensibilisierten Tieren						

Tabelle 2.7 – Ovalbumin-Konzentration, Provokationsdauer und -symptomatik

Ovalbumin(OVA)-Konzentrationen in Phosphatpuffer (PBS), Provokationsdauer und beobachtete Schwere der Symptomatik in Kategorien: 0 = keine relevanten Symptome einer respiratorischen Insuffizienz; + = gelegentliches Niesen/Husten und leichte Steigerung der Atemfrequenz (AF) bzw. spät einsetzende Symptomatik; ++ = häufiges Niesen/Husten, deutliche AF-Steigerung, Zittern, Pilo-Erektion bzw. früh einsetzende Symptomatik. Bei den Tieren der Kontrollgruppe wurde nur die 1. Provokation durchgeführt.

2.3.4. RETROGRADE MARKIERUNG DER ATEMWEGSNEURONE

Prinzip

Für die retrograde Markierung von Neuronen wird ein Fluoreszenz-Farbstoff so appliziert, dass er von den distalen Axonenden der Neurone aufgenommen werden kann und retrograd ins Perikaryon transportiert wird. Der aktive Transport von Proteinen in Vesikeln erreicht dabei Geschwindigkeiten von bis zu 2 cm pro Tag (154). Mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops können dann die Perikaryen der markierten Neurone auf Ganglienschnitten identifiziert werden.

Durchführung

Um ausreichend Zeit für den retrograden Transport des Farbstoffs in die Perikaryen zu gewährleisten, wurde die retrograde Markierung jeweils sieben Tage vor der geplanten Entnahme durchgeführt. Die Tiere wurden durch eine intramuskuläre Injektion in den Oberschenkel zunächst mit Ketaminhydrochlorid (50mg/kg KG) analgosediert. Kurze Zeit später wurde durch eine Xylazinhydrochlorid-Injektion (5mg/kg KG) an der kontralateralen Seite die Sedierung vertieft und die Tiere zusätzlich etwas relaxiert. Die mittlere zervikale Trachea wurde nach einem medianen Längshautschnitt ventral frei präpariert. Eine 10 µl-Mikrospritze wurde durch eine kleine Inzision zwischen zwei Knorpelspangen bis in den rechten Hauptbronchus vorgeschoben und 5µl des Fluoreszenz-Farbstoffes Fluoro-Gold (5 % Hydroxystilbamidine in 0,9 % NaCl-Lösung) in die rechte Hilusregion appliziert. Anschließend wurde die Inzision in der Trachea mit einer 7-0 Vicryl Naht und der Hautschnitt mit einer 4-0 Vicryl-Naht zugenäht. Die Tiere wurden daraufhin in leichter Kopf-hoch-Lage platziert, wodurch weitgehend gewährleistet wird, dass der Fluoreszenz-Farbstoff auf die untere Trachea und die Lunge begrenzt bleibt. Um einer Unterkühlung vorzubeugen, wurden die Meerschweinchen bis zum Aufwachen unter eine Rotlicht-Lampe gelegt und konnten sich ungestört erholen.

2.3.5. GEWEBEENTNAHME

Die Entnahme erfolgte bei der Kontrollgruppe (KTL p1 + d1) sowie den Gruppen 2 (OVA p1 + d1), 3 (OVA p3 + d1) und 4 (OVA p6 + d1) einen Tag nach der jeweils letzten Provokation. In Gruppe 5 wurden die Proben drei (OVA p6 + d3), in Gruppe 6 sieben Tage (OVA p6 + d7) nach der sechsten Provokation entnommen (*s. Abb. 2.1*). Hierzu erhielten die verbliebenen 27 Tiere jeweils sieben Tage nach dem retrograden Markieren der Atemwegsneurone eine intramuskulär injizierte Überdosis an Ketaminhydrochlorid (50 mg) und Xylazinhydrochlorid (20 mg). Anschließend wurde nach einem medianen Bauch- und Thoraxschnitt die Bauchaorta längs eröffnet, wodurch der Blutgehalt des entnommenen Gewebes gesenkt wird. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde bei jedem Tier jeweils eine Bronchoalveoläre Lavage (BAL) angefertigt sowie der rechte Lungenflügel und das rechte Ganglion nodosum entnommen.

Zur Gewinnung der BAL wurde die Trachea freipräpariert und mit einer Venenverweilkanüle oberhalb des Schildknorpels punktiert. Die Venenverweilkanüle wurde nach kaudal vorgeschoben und dann die Trachea ligiert. Es folgte eine Injektion von 10 ml gekühltem DPBS, in dem vorher jeweils eine Tablette eines Proteaseninhibitors gelöst worden war. Nach mehrmaligem Resuspendieren der injizierten Lösung wurde zuletzt durch maximale Aspiration die BAL gewonnen. Durch die Trachea-Punktionsstelle wurden die bei Eröffnung des Thorax kollabierten Lungen solange mit einer Zamboni-Lösung perfundiert, bis sich auch die peripheren Lungenabschnitte wieder vollständig entfalteten und gelblich verfärbten. Nun folgte die Entnahme des rechten Lungenflügels. Anschließend wurde der Schädel von okzipital eröffnet und das Felsenbein entfernt. Direkt unterhalb des Foramen jugulare wurde jeweils das rechte Ganglion nodosum freipräpariert und entnommen.

2.3.6. PROBENAUFARBEITUNG

Alle entnommenen Gewebeproben wurden direkt im Anschluss an die Entnahme auf Eis gelagert. Die Lungenflügel und die Ganglien wurden in Zamboni-Lösung für mindestens 4 h bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Gewebeproben mit PBS solange gewaschen, bis die Waschlösung wasserklar war und über Nacht bei 4 °C in Saccharose-Lösung zur Kryoprotektion belassen. Am nächsten Tag wurden alle Gewebeproben aus der Saccharose-Lösung entfernt und die Lungenflügel in 3-4 Stücke zerteilt. Diese Lungenstücke und die Ganglien wurden einzeln in Tissue Tek auf Filterpapier eingebettet, in flüssigem Stickstoff (-173 °C) schockgefroren und zur Anfertigung der Gewebeschnitte (*siehe 2.3.7*) bei -80 °C gelagert. Die gewonnene BAL jedes Tieres wurde zur Volumenbestimmung gewogen und auf 2 Portionen (BAL-1 und BAL-2) verteilt. Zur Trennung der zellulären Bestandteile von der flüssigen Phase wurden beide Portionen direkt im Anschluss an die Entnahme zunächst mit 2200 rpm 10 min zentrifugiert (BAL-1 bei 4 °C; BAL-2 bei RT). Die Zellpellets beider Proben wurden für Gesamtzellzahlbestimmung (*siehe 2.5*) in insgesamt 1 ml DPBS resuspendiert und gepoolt. Der flüssige Überstand von BAL-2 wurde verworfen, der von BAL-1 aliquotiert und bis zur Messung der Neurotrophin-Konzentrationen (*siehe 2.6*) bei -20 °C gelagert.

2.3.7. ANFERTIGUNG DER GEWEBESCHNITTE

In einem Kryostaten (-25 °C im Gerät, -23 °C Stempelhalter) wurden 9 µm dicke Lungenschnitte sowie 6 µm dicke Ganglienschnitte angefertigt und auf Serien von je fünf beschichteten SuperFrost Plus-Objektträgern (OT) mit jeweils 4 Schnitten angeschmolzen. Dabei wurden mindestens zwei Schnitte zwischendurch verworfen, sodass OT Nr. 1 Schnitt 1, 16, 31, 46 und OT Nr. 2 Schnitt 4, 19, 34, 49 usw. trugen. Hierdurch resultierte für 2 benachbarte Schnitte auf einem OT ein Abstand von mindestens 126 μ m bei den Lungenschnitten und 84 μ m bei den Ganglienschnitten. Somata von in die Atemwege projizierenden Neuronen im Ganglion nodosum von Meerschweinchen haben einen mittleren Durchmesser von ca. 43 μ m (155). Demzufolge war die Wahrscheinlichkeit einer Doppelauswertung desselben Perikaryons äußerst gering. Alle OT wurden 30 min luftgetrocknet und bis zur Weiterverarbeitung (*siehe 2.4 bzw. 2.7*) bei -20 °C gelagert. Von jedem Tier wurden mindestens je zwei Lungenschnitt- und Ganglienschnitt-Serien angefertigt.

2.4. PERIBRONCHIALE LEUKOZYTENINFILTRATE

2.4.1. PERIODIC ACID-SCHIFF-FÄRBUNG

Prinzip

Bei der Periodic acid-Schiff(PAS)-Färbemethode bindet die Periodsäure an Kohlehydrate und hydrolisiert sie zu Aldehydgruppen. Diese reduzieren die im Schiffschen Reagenz enthaltene, ursprünglich farblose Fuchsinschweflige Säure. Hierdurch werden kohlenhydratreiche Strukturen wie z.B. der Mucopolysaccharide enthaltende hyaline Bronchial-Knorpel pink gefärbt. Als Kontrast färbt Hämalaun die Nukleinsäure-reichen Zellkerne dunkelblau, das Zytoplasma je nach RNA-Gehalt rosa bis bläulich.

Durchführung

Es wurden von jedem Tier zwei OT aus verschiedenen Lungenschnitt-Serien ausgewählt, auf denen möglichst viele Bronchienquerschnitte mit begleitenden Gefäßanschnitten zu sehen waren. Diese OT wurden nach folgendem etablierten Protokoll gefärbt:

1.	OT bei Raumtemperatur (RT) auftauen und trocknen lassen	1 h
2.	0,5 % Periodsäure	8 min
3.	Aqua dest.	2 min
4.	Schiffsches' Reagenz	8 min
5.	Leitungswasser fließend	30 s
6.	filtriertes Hämalaun nach Mayer	3 min
7.	Leitungswasser fließend	30 s
8.	70 % Ethanol	2 min
9.	80 % Ethanol	2 min

10.	96 % Ethanol	2 min
11.	99% Ethanol	2 min
12.	99% Ethanol	2 min
13.	Xylol I	5 min
14.	Xylol II	5 min

15. Eindeckeln mit 2 Tropfen Vitro-Clud (unter einem Laborabzug)

2.4.2. Semiquantitative Beurteilung

Alle gefärbten OT wurden von dem gleichen Untersucher verblindet unter einem Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Dabei wurden in jedem Schnitt Stellen mit Bronchus- und nah gelegenem Gefäßanschnitt identifiziert. Diese wurden anhand der Ausprägung des peribronchialen Leukozyteninfiltrates unter Berücksichtigung der Bronchusgröße mithilfe von sieben Kategorien (0 = kein relevantes Infiltrat, 1 = sehr wenig Infiltrat, 2 = wenig Infiltrat, 3 = mäßiges Infiltrat, 4 = ausgeprägtes Infiltrat, 5 = starkes Infiltrat, 6 = sehr starkes Infiltrat) beurteilt. Aus den einzelnen Schnittbewertungen wurde für jeden OT eine Gesamtergebniskategorie ermittelt.

2.5. ZELLEN IN DER BRONCHOALVEOLÄREN LAVAGE

2.5.1. GESAMTZELLZAHLBESTIMMUNG

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl in der BAL wurden von jedem Tier 8 μ l der resuspendierten Zellpellet-Lösung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die in einem Zählquadrat ermittelte Zellanzahl wurde mit dem Kammerfaktor 10⁴ (für Zellen pro ml) multipliziert.

2.5.2. DIFF-QUICK-FÄRBUNG

Zur Differenzierung der BAL-Leukozyten wurde von jedem Tier ein Cytospin (800 rpm über 10 min) aus 100 µl der resuspendierten Zellpellet-Lösung angefertigt. Dabei wurden die Zellen auf vorher mit 100 µl PBS befeuchtete und mit Filterkarten belegte OT sedimentiert und schließlich über Nacht bei RT getrocknet. Anschließend wurden die OT nach dem Diff-Quick-Prinzip angefärbt.

<u>Prinzip</u>

Eosin färbt eosinophile Granula von Granulozyten rötlich. Zellkerne und basophile Granula werden durch Thiazin dunkelblau gefärbt, während das Zellplasma hellblau erscheint.

Durchführung

Es wurde nach folgendem etablierten Protokoll der Diff-Quick-Färbung vorgegangen:

- 1. OT 1 h bei Raumtemperatur (RT) auftauen und trocknen lassen
- 2. jeweils 5 mal ca. 1 s in Fixierlösung (Fast Green) eintauchen
- 3. jeweils 5 mal ca. 1 s in Färbelösung I (Eosin) eintauchen
- 4. jeweils 5 mal ca. 1 s in Färbelösung II (Thiazin) eintauchen
- 5. 3 s in Aqua dest. eintauchen
- 6. Bei RT über Nacht trocknen lassen
- 7. Eindeckeln mit 2 Tropfen Vitro-Clud (*unter einem Laborabzug*)

2.5.3. BAL-ZELL-DIFFERENZIERUNG

Alle OT wurden von dem gleichen Untersucher verblindet ausgewertet. Dafür wurde jeder OT meanderförmig durchgemustert und jeweils 100 Zellen unter einem Lichtmikroskop anhand von morphologischen Kriterien wie Zellgröße, Zellkern-Zytoplasma-Relation, Zell-kernform sowie Granulierung differenziert. Registriert wurde die Anzahl von Lymphozyten, Makrophagen sowie neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten.

2.6. NEUROTROPHINE IN DER BRONCHOALVEOLÄREN LAVAGE

2.6.1. ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

<u>Prinzip</u>

Der verwendete Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) funktioniert nach dem sog. "Antikörper-Sandwich-Prinzip", wobei das Antigen an unterschiedlichen Epitopen von zwei verschiedenen Primärantikörpern (Primär-Ak) spezifisch gebunden wird. Ein mit einem Reaktionskatalysator gekoppelter Sekundärantikörper (Sekundär-Ak) bindet an einen Primär-Ak und durch Zugabe eines chromogenen Substrates wird eine Farbreaktion initiiert (*Abb*. 2.2). Die Farbveränderung korreliert dabei mit der Konzentration des Antigens und wird als Optische Dichte (OD) photometrisch gemessen.



Abbildung 2.2 Prinzip des Sandwich-ELISA. Ein polyklonaler (pAb) und ein monoklonaler Primärantikörper (mAb) binden das Ziel-Protein (hier NGF). Ein mit einem Reaktionskatalysator (HRP) gekoppelter Sekundärantikörper (Ab) bindet an den mAb und durch Zugabe eines chromogenen Substrats (graue Fläche) wird eine Farbreaktion initiiert. Graphik aus NGF Emax® ImmunoAssay System (Promega).

Durchführung

Die Durchführung des NGF-ELISA erfolgte nach folgendem im Kit (Promega) mitgelieferten NGF $E_{max}^{\mbox{\tiny (B)}}$ ImmunoAssay System-Protokoll:

- 10µl des polyklonalen NGF-Antikörpers in 10ml Coating-Puffer (pH 9.7) lösen; davon 100µl in jedes Well
- Platte versiegeln und über Nacht bei 4° C (ohne Schütteln) inkubieren; dann einmal mit Phosphatpuffer waschen
- 5-fach-Blockpuffer (BP) mit Aqua dest. 1:5 verdünnen; davon 200µl in jedes Well
- 4. Bei Raumtemperatur (RT) 1 h (*ohne Schütteln*) inkubieren; dann einmal mit Phosphatpuffer waschen
- NGF-Standard mit 1-fach-BP auf 1:4000 verdünnen; davon je 200 μl in die beiden ersten Wells der Standardreihe; daraus sechs 1:2 Verdünnungen in die jeweils nächsten beiden Wells der Standardreihe

- 6. Jeweils 100 µl der Proben-Lösung in die Proben-Wells
- Platte versiegeln und 6 h bei RT mit kontinuierlichem Schütteln inkubieren; dann fünfmal mit Phosphatpuffer waschen
- 2,5 μl des monoklonalen NGF-Antikörpers in 10 ml 1-fach-BP lösen; davon 100 μl in jedes Well
- Platte versiegeln und über Nacht bei 4° C (ohne Schütteln) inkubieren; dann fünfmal mit Phosphatpuffer waschen
- 100 μl des konjugierten Sekundärantikörpers in 9,9 ml 1-fach-BP lösen; davon 100 μl in jedes Well
- 11. 2,5 h bei RT mit kontinuierlichem Schütteln inkubieren;dann fünfmal mit Phosphatpuffer waschen;währenddessen Substrat auf RT erwärmen lassen
- 12. In einer bestimmten Reihenfolge 100 µl des Substrats in jedes Well
- 13. 10 min bei RT mit kontinuierlichem Schütteln inkubieren
- 14. In der gleichen Reihenfolge 100 µl HCl in jedes Well
- 15. OD innerhalb von 30 min bei 450 nm / 540 nm messen

Es wurden insgesamt drei Messdurchgänge mit je nach vorhandener BAL-Menge zwei bis drei Einzelproben jedes Tieres durchgeführt. So resultierten für jedes Tier sechs bis sieben NGF-Einzelkonzentrationen. Die OD von einzelnen Proben lag bei der ersten Messung über der oberen Grenze des sensitiven Bereichs des ELISA-Kits von 250 pg / ml. Von diesen BAL-Proben wurden vor der nächsten Messung Verdünnungsreihen angefertigt. Folglich gingen auch höhere NGF-Konzentrationen als 250 pg / ml mit in die Berechnungen ein.

Allerdings war das Verdünnen aufgrund limitierter Probenmengen bei bestimmten Tieren nicht unbegrenzt oft möglich und daher nicht immer erfolgreich. Aus diesem Grund wurde einheitlich für alle Einzelproben mit einer OD über der oberen Grenze des sensitiven Bereichs 250 pg / ml als Konzentrationsergebnis gewertet und in die Berechnungen einbezogen.

Die Durchführung des BDNF-ELISA bzw. des NT-4-ELISA (beide R & D Systems) erfolgte ebenfalls nach dem im Kit mitgelieferten Human BDNF DuoSet®- bzw. Human NT-4 DuoSet®- Protokoll.

2.7. SUBSTANZ P- UND P75^{NTR}-IMMUNREAKTIVITÄT IM GANGLION NODOSUM

2.7.1. IMMUNHISTOCHEMIE MIT DOPPELIMMUNFLUORESZENZ

<u>Prinzip</u>

Bei der immunhistochemischen Untersuchung bindet ein Primär-Ak spezifisch an das Antigen auf einem histologischen Gewebeschnitt. Anschließend bindet ein Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Sekundär-Ak unspezifisch an Antikörper der Primär-Ak-Herkunftsspezies. Unter einem Epifluoreszenzmikroskop kann schließlich das so mit dem Fluoreszenzfarbstoff markierte Antigen detektiert werden. Dieses Prinzip ist auch als Doppelimmunfluoreszenz unter gleichzeitiger Anwendung von zwei aus unterschiedlichen Spezies stammenden Primär-Ak und zwei entsprechenden Sekundär-Ak mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen möglich. Somit können Co-Lokalisationen von zwei Antigenen auf dem gleichen Gewebeschnitt nachgewiesen werden.

Durchführung

Von jedem Tier wurden mindestens vier OT mit möglichst vielen Perikarien-Anschnitten ausgewählt und immunhistochemisch nach folgendem etablierten Protokoll gefärbt. Wegen des lichtempfindlichen Fluoreszenz-Farbstoffes wurde dabei unter Lichtschutz gearbeitet.

- OT bei RT lichtgeschützt 30 60 min auftauen und trocknen lassen; mit Ölstift Kreis um jeden Schnitt ziehen
- 2. 50 µl Blocklösung auf jeden Schnitt
- 3. Inkubation für 1 h bei RT in feuchter, lichtgeschützter Kammer
- Primär-Antikörper Anti-SP und Anti-p75^{NTR} mit Inkubationslösung verdünnen; davon 30 μl auf jeden Schnitt (Doppelinkubation)
- 5. Inkubation über Nacht bei RT in feuchter, lichtgeschützter Kammer
- 2 x 5 min mit PBS in Glasbehälter auf Schwenker waschen (zwischen Waschvorgängen PBS auswechseln)
- Sekundär-Antikörper Cy3 und Cy2 zusammen mit Inkubationslösung verdünnen; davon 30 µl auf jeden Schnitt (Doppelinkubation)
- 8. Inkubation für 2 h bei RT in feuchter, lichtgeschützter Kammer
- 2x 5 min mit PBS in Glasbehälter auf Schwenker waschen (zwischen Waschvorgängen PBS auswechseln)

10. OT mit 2 Tröpfchen Glycerol eindeckeln;

bei 4 °C lichtgeschützt trocknen lassen

In *Tabelle 2.8* sind die verwendeten Primär- und Sekundär-Ak mit den jeweils verwendeten Verdünnungen aufgeführt.

Tabelle 2.8 – Antikörper und Verdünnungen für die Immunhistochemie

	Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Nachweis von	monoklonales Anti-SP-IgG,	1:600	Cy TM 3-konjugiertes	1:200
Tachykininen	Ratte, spezifisch für: C-Ende		Anti-Rat-IgG	
Nachweis von	polyklonales Anti-p75 ^{NTR} -IgG,	1:600	Cy TM 2-konjugiertes	1:100
p75 ^{ntr}	Kaninchen, spezifisch für: C-		Anti-Rabbit-IgG	
	Ende			

Antikörper und Verdünnungen für den immunhistochemischen Nachweis von Tachykininen und p75^{NTR} in den Atemwegsneuronen im Ganglion nodosum.

Um die immunreaktive Spezifität zu bestätigen, waren zuvor Präabsorptionskontrollen mit den Primär-Ak und den korrespondierenden Antigenen durchgeführt worden. Nur für den monoklonalen SP-Antikörper hatten frühere Präabsorptionstests eine relevante Kreuzreaktivität mit Neurokinin A (NKA) und B (NKB) ergeben, weswegen er als Pan-Tachykinin-Antikörper klassifiziert wird. Die zum Nachweis von Tachykininen verwendeten Primär-Ak sind spezifisch für den C-Terminus und binden daher neben SP auch NKA bzw. NKB. Deswegen treffen die mit diesem Primär-Ak immunhistochemisch gezeigten Effekte für SP, NKA bzw. NKB. Da NKB jedoch in den Atemwegen nicht vorkommt, sind in der vorliegenden Arbeit mit Tachykinin-IR stets SP und NKA gemeint. Gelegentlich wird im Ergebnisteil aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit SP stellvertretend für diese beiden Tachykinine erwähnt (SP-IR anstelle von Tachykinin-IR).

Negativkontrollen, bei denen jeweils der Primär-Ak durch PBS ersetzt wurde, führten zu keinen spezifischen immunhistochemischen Signalen.

2.7.2. FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG

Prinzip

In einem Epifluoreszenzmikroskop wird durch einen Anregungsfilter kurzwelliges oder UV-Licht erzeugt, mit dem immunhistochemisch gefärbte Gewebeschnitte bestrahlt werden. Das im Gewebe gebundene Fluorochrom wird hierdurch zur Emission von Licht längerer Wellenlänge angeregt, was als Phänomen der *Stokesverschiebung* bezeichnet wird. Ein Sperrfilter blockiert für den Betrachter Licht aller anderen Wellenlängen, sodass im Epifluoreszenzmikroskop nur das Lichtsignal des angeregten Fluorochroms auf dunklem Hintergrund zu sehen ist.

Durchführung

Alle OT wurden von dem gleichen Untersucher verblindet bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Zunächst wurde dabei die Anzahl der auf dem Schnitt insgesamt Fluoreszenzfarbstoff-markierten Neurone ermittelt. Dabei wurden nur Neurone mit einem klar erkennbaren Nukleus gezählt. Dann wurden die so markierten Atemwegsneurone einzeln jeweils mit den entsprechenden Filtern auf IR für Tachykinine und p75^{NTR} hin untersucht. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome und Filtermodule sind in *Tabelle 2.9* dargestellt.

Tabelle 2.9 – Fluorochrome und Filtermodule mit Anregungs- und Sperrfilter

	Fluorochrom	Filtermodul	Anregungsfilter	Sperrfilter
Retrograde	Fluoro-Gold	Modul U1	330-380 nm	418 nm
Markierung	(hydroxystilbamidine)			
p75 ^{NTR} -IR	Cy2 (carbocyanine 2)	Modul B2	470 - 490 nm	515 - 550 nm
Tachykinin-IR	Cy3 (indocarbocyanine)	Modul G1	525 - 560 nm	570 - 650 nm

Fluorochrome und Filtermodule mit deren Anregungs- und Sperrfilter für die Darstellung retrograd markierter Atemwegsneurone sowie deren Immunreaktivität (IR) für Tachykinine und p75^{NTR}.

2.8. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Gruppenergebnisse wurden aus den Mittelwerten der einzelnen Tiere berechnet und unter Verwendung des U-Tests nach Mann-Whitney verglichen. Als statistisch signifikant wurden einseitige p-Werte unter 0,05 gewertet. Das jeweilige Signifikanzniveau wurde mit * für p < 0.05, ** für p < 0.01 und *** für p < 0.001 gekennzeichnet. Als Streuungsmaß für die Stichprobenverteilung wurde der Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes (SEM) bestimmt. Die Berechnungen wurden mit SPSS 10.0.7 durchgeführt.
3. Ergebnisse

3.1. PERIBRONCHIALE LEUKOZYTENINFILTRATE

Das Ausmaß der peribronchialen Leukozyteninfiltrate (PLI) in den verschiedenen Gruppen ist in *Abb. 3.1* dargestellt, *Abb. 3.2* zeigt exemplarisch Fotos von Lungengewebsschnitten aller Bewertungs-Kategorien. Das Ausmaß der PLI war nach einmaliger Provokation in der Kontrollgruppe (KTL p1 + d1; MW: 0,8; SEM: 0,15) deutlich geringer** als bei den sensibilisierten Tieren (OVA p1 + d1; MW: 2,8; SEM: 0,39). Im Vergleich zu Letzteren waren die PLI nach dreimaliger Provokation noch stärker* ausgeprägt (OVA p3 + d1; MW: 4,1; SEM: 0,21). Im weiteren Verlauf blieb das Ausmaß der PLI einen Tag (OVA p6 + d1; MW: 4,5; SEM: 0,34), drei (OVA p6 + d3; MW: 2,8; SEM: 0,34) und auch noch sieben Tage (OVA p6 + d7; MW: 2,8; SEM: 0,34) nach der sechsten Provokation hoch signifikant*** über den Werten der Kontrollgruppe.



Abbildung 3.1 – Peribronchiale Leukozyteninfiltrate. Ausmaß der peribronchialen Leukozyteninfiltrate mit Standardfehler (SEM). Alle Tiere außer der Kontrollgruppe (KTL) wurden vor den Provokationen mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich zudem in der Anzahl der täglich durchgeführten OVA-Provokationen (p) sowie in der Anzahl der Tage zwischen letzter Provokation und Entnahme (d). Infiltrat-Kategorien: 0 = kein relevantes Infiltrat, 1 = sehr wenig Infiltrat, 2 = wenig Infiltrat, 3 =mäßiges Infiltrat, 4 = ausgeprägtes Infiltrat, 5 = starkes Infiltrat, 6 = sehr starkes Infiltrat. Signifikante Gruppenunterschiede sind mit * für <math>p < 0,05, ** für p < 0,01 bzw. *** für p < 0,001 angegeben und, falls nicht anders gekennzeichnet, auf die KTL bezogen.







Abbildung 3.2 – Beispielfotos von peribronchialen Leukozyteninfiltraten

Auswahl von PAS-gefärbten Lungenschnitten mit Gefäß- und Bronchienanschnitt zur semiquantitativen Bewertung der peribronchialen Leukozyteninfiltrate (PLI; \leftarrow). Lichtmikroskop; 400-fache Vergrößerung. a: kein relevantes PLI = Kategorie 0 b: sehr wenig PLI = Kategorie 1 c: wenig PLI = Kategorie 1 c: wenig PLI = Kategorie 3 e: ausgeprägtes PLI = Kategorie 4 f: starkes PLI = Kategorie 5 g: sehr starkes PLI = Kategorie 6

3.2. ZELLEN IN DER BRONCHOALVEOLÄREN LAVAGE

Die BAL-Gesamtzellkonzentrationen sind in *Abb. 3.3* dargestellt. Einen Tag nach einmaliger Provokation war die BAL-Gesamtzellkonzentration bei den mit Allergen sensibilisierten Tieren (OVA p1 + d1; MW: 5,85 x 10^6 / ml; SEM: 1,86 x 10^6) im Vergleich zur Kontrollgruppe (KTL p1 + d1; MW: 1,39 x 10^6 / ml; SEM: 0,17 x 10^6) höher**. Auch nach der dritten Provokation (OVA p3 + d1; MW: 9,62 x 10^6 / ml; SEM: 24,78 x 10^6) sowie einen Tag (OVA p6 + d1; MW: 7,55 x 10^6 / ml; SEM: 1,18 x 10^6) bzw. drei Tage (OVA p6 + d3; MW: 8,68 x 10^6 / ml; SEM: 4,40 x 10^6) nach der sechsten Provokation lag die BAL-Gesamtzellkonzentration auf höherem** Niveau als die Kontrollgruppe. Sieben Tage nach der letzten Provokation (OVA p6 + d7; MW: 3,90 x 10^6 / ml; SEM: 0,42 x 10^6) war die BAL-Gesamtzellkonzentration immer noch höher** als in der Kontrollgruppe.



Abbildung 3.3 – Gesamtzellkonzentration in der BAL. Konzentration von Zellen pro ml Bronchoalveolärer Lavage (BAL). Alle Tiere außer der Kontrollgruppe (KTL) wurden vor den Provokationen mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich zudem in der Anzahl der täglich durchgeführten OVA-Provokationen (p) sowie in der Anzahl der Tage zwischen letzter Provokation und Entnahme (d). Der Standardfehler der Stichprobenverteilung (SEM) ist in dieser Abbildung nicht angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede bezogen auf die KTL sind mit ** für p < 0,01 gekennzeichnet.

Die Zusammensetzung der BAL-Zellen mit den Anteilen von Lymphozyten, Makrophagen sowie neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten ist in *Abb. 3.4* dargestellt. Nach einmaliger Provokation war der Anteil der eosinophilen Granulozyten in der Kontrollgruppe (KTL p1 + d1; MW: 50,0 %; SEM: 136,4) im Vergleich zu den mit Allergen sensibilisierten Tieren (OVA p1 + d1; MW: 72,8 %; SEM: 201,1) niedriger*. Einen Tag nach der dritten (OVA p3 + d1; MW: 70,5 %; SEM: 43,2) und sechsten Provokation (OVA p6 + d1; MW: 80,8 %; SEM: 7,5) blieb der Eosinophilen-Anteil insgesamt weitgehend konstant auf höherem Niveau als die Kontrollgruppe. Dies hielt auch noch drei (OVA p6 + d3; MW: 75,2 %; SEM: 29,8) und sieben Tage (OVA p6 + d7; MW: 85,4 %; SEM: 16,2) nach der letz-ten Provokation an.

Im Gegensatz zu den Eosinophilen gab es bei den anderen Leukozytenarten keine signifikanten Veränderungen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe blieben die Anteile von Lymphozyten (5 – 14 %), Makrophagen (9 – 26 %) und neutrophilen Granulozyten (0 – 9 %) im weiteren Versuchsablauf auf weitgehend konstant niedrigem Niveau. Der Anteil der basophilen Granulozyten betrug zu allen Untersuchungszeitpunkten unter 1 %.



Abbildung 3.4 – Zusammensetzung der BAL-Zellen. Anteile von Lymphozyten, Makrophagen sowie neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten an jeweils 100 differenzierten Zellen in der BAL. Alle Tiere außer der Kontrollgruppe (KTL) wurden vor den Provokationen mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich zudem in der Anzahl der täglich durchgeführten OVA-Provokationen (p) sowie in der Anzahl der Tage zwischen letzter Provokation und Entnahme (d). Der Standardfehler der Stichprobenverteilung (SEM) ist in dieser Abbildung nicht angegeben. Der Anteil der basophilen Granulozyten betrug in allen Gruppen unter 1 %. Signifikante Gruppenunterschiede bezogen auf die KTL sind mit * für p < 0,05 bzw. ** für p < 0,01 gekennzeichnet.

3.3. NEUROTROPHINE IN DER BRONCHOALVEOLÄREN LAVAGE

Die NGF-Konzentrationen in der BAL sind in *Abb. 3.5* dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (KTL p1 + d1; MW: 104,7; SEM: 27,5) wiesen die mit Allergen sensibilisierten Tiere (OVA p1 + d1; MW: 205,8; SEM: 54,8) nach einmaliger Provokation eine nahezu doppelt so hohe* NGF-Konzentration auf. Die NGF-Konzentration lag auch nach der dritten Provokation (OVA p3 + d1; MW: 317,1; SEM: 101,7) deutlich über** derjenigen der Kontrollgruppe. Zwischen 24 h (OVA p6 + d1; MW: 264,5; SEM: 111,7) und drei Tagen (OVA p6 + d3; MW: 95,3; SEM: 21,7) nach der sechsten Provokation war die NGF-Konzentration gesunken* und hatte wieder das Niveau der Kontrollgruppe erreicht. Dies blieb auch eine Woche nach der letzten Provokation (OVA p6 + d7; MW: 118,9; SEM: 30,4) unverändert.



Abbildung 3.5 – NGF-Konzentrationen in der BAL. NGF-Konzentrationen in der BAL mit Standardfehler (SEM). Alle Tiere außer der Kontrollgruppe (KTL) wurden vor den Provokationen mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich zudem in der Anzahl der täglich durchgeführten OVA-Provokationen (p) sowie in der Anzahl der Tage zwischen letzter Provokation und Entnahme (d). Signifikante Gruppenunterschiede sind mit * für p < 0,05 bzw. ** für p < 0,01 angegeben und, falls nicht anders gekennzeichnet, auf die KTL bezogen.

Im Gegensatz zu NGF lagen alle gemessenen Konzentrationen von BDNF und NT-4 unterhalb der Nachweisgrenze des jeweiligen ELISA und sind daher nicht aufgeführt.

3.4. IMMUNREAKTIVITÄT DER NEURONE IM GANGLION NODOSUM

3.4.1. RETROGRAD MARKIERTE ATEMWEGSNEURONE

Die Anzahlen einbezogener Schnitte und mit Fluoro-Gold retrograd markierter Neurone (FG) in den einzelnen Gruppen sind in *Tab. 3.1* aufgeführt. In den verschiedenen Gruppen wurden jeweils 64 – 95 Ganglienschnitte untersucht. Insgesamt wurden auf 521 Ganglienschnitten 1271 Atemwegsneurone identifiziert.

3.4.2. SUBSTANZ P- UND P75^{NTR}-IMMUNREAKTIVITÄT

Bei der Auswertung der retrograd markierten Neurone im Ganglion nodosum ergaben sich je nach Immunreaktivität (IR) folgende Subgruppen von Atemwegsneuronen:

- immunreaktiv für SP (FG/SP+) (siehe auch Abb. 3.7)
- immunreaktiv für p75^{NTR} (FG/p75^{NTR}+) (*siehe auch Abb. 3.8*)
- immunreaktiv für SP und p75^{NTR} (FG/SP+/p75^{NTR}+)
- nicht immunreaktiv für SP und p75^{NTR} (FG/SP-/p75^{NTR}-).

In Tab. 3.1 sind die Anzahlen der Neurone in diesen Subgruppen zusammengestellt.

Tabelle 3.1 – Anzahl untersuchter Ganglienschnitte und retrograd markierter Atemwegsneurone je nach Immunreaktivität für Substanz P- bzw. p75^{NTR}

	KTL	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA	Summe
	p1 + d1	p1 + d1	p3 + d1	p6 + d1	p6 + d3	p6 + d7	
Ganglienschnitte	91	88	92	64	95	91	521
FG	244	204	345	27	156	295	1271
FG/SP+	14	8	6	0	0	3	31
$FG/p75^{NTR}+$	40	26	18	0	1	11	96
$FG/SP+/p75^{NTR}+$	13	4	4	0	0	0	21
FG/SP-/p75 ^{NTR} -	203	174	325	27	155	281	1165

Alle Tiere außer der Kontrollgruppe (KTL) wurden vor den Provokationen mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich zudem in der Anzahl der täglich durchgeführten OVA-Provokationen (p) sowie in der Anzahl der Tage zwischen letzter Provokation und Entnahme (d). Folgende Subgruppen von Neuronen im Ganglion nodosum wurden erfasst: mit Fluoro-Gold retrograd markierte Atemwegsneurone (FG); Atemwegsneurone mit Immunreaktivität (IR) für SP (FG/SP+); Atemwegsneurone mit IR für p75^{NTR} (FG/p75^{NTR}+); Atemwegsneurone mit IR für beide (FG/SP+/p75^{NTR}+) sowie Atemwegsneurone ohne IR für beide (FG/SP-/p75^{NTR}-).

Die Anteile SP- bzw. p75^{NTR}-immunreaktiver Neurone bezogen auf die insgesamt markierten Atemwegsneuronen in den verschiedenen Gruppen sind in *Abb. 3.6* dargestellt.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (KTL p1 + d1; SP: 6,58 % (SEM: 18,83); p75^{NTR}: 16,31 % (SEM: 111,14)) unterschied sich der Anteil SP- als auch der p75^{NTR}-immunreaktiver Neurone bei den mit Allergen sensibilisierten Tieren (OVA p1 + d1; SP: 14,11 % (SEM: 287,63); p75^{NTR}: 7,32 % (SEM: 38,43)) nicht signifikant. Im Verlauf änderte sich dies auch 24 h nach der dritten Provokation (OVA p3 + d1; SP: 2,03 % (SEM: 1,56); p75^{NTR}: 5,79 % (SEM: 11,42)) nicht. Einen (OVA p6 + d1) bzw. drei Tage (OVA p6 + d3) nach der sechsten Provokation war die SP- bzw. p75^{NTR}-IR unter den Atemwegsneuronen (jeweils < 1 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe gesunken*. Bezogen auf das Ausgangsniveau hatte sich die SP-IR eine Woche nach der letzten Provokation (OVA p6 + d7; MW: 1,67 %, SEM: 2,43) wieder angeglichen, während immer noch weniger* Atemwegsneurone p75^{NTR}-IR (MW: 2,53 %, SEM: 1,94) aufwiesen.

Hinsichtlich der Co-Lokalisationen von SP und p75^{NTR} gab es nach einmaliger Provokation ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (KTL; SP + $p75^{NTR}$: 5,71 %, SEM: 22,69) und den mit Allergen sensibilisierten Tieren (OVA p1 + d1; 0,98 %, SEM: 1,92). Dies änderte sich nach der dritten Provokation (OVA p3 + d1; 1,45 %, SEM: 1,21) nicht. Nach der sechsten Provokation (OVA p6) wurden keine Co-IR für SP und p75^{NTR} detektiert.



Abbildung 3.6 – Anteil p75^{NTR}-, Substanz P(SP)- sowie SP- und gleichzeitig p75^{NTR}-immunreaktiver Neurone an den Atemwegsneuronen im Ganglion nodosum. Alle Tiere außer der Kontrollgruppe (KTL) wurden vor den Provokationen mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich zudem in der Anzahl der täglich durchgeführten OVA-Provokationen (p) sowie in der Anzahl der Tage zwischen letzter Provokation und Entnahme (d). Die Gruppenergebnisse wurden aus den Mittelwerten der einzelnen Tiere berechnet. Der Standardfehler der Stichprobenverteilung (SEM) ist in dieser Abbildung nicht angegeben. In den drei Gruppen OVA p6 lagen die IR teilweise < 1 %. Signifikante Gruppenunterschiede bezogen auf die KTL sind mit * für p < 0,05 angegeben.



Abbildung 3.7 – Fluoreszenzmikrosokopische Darstellung Tachykinin-immunreaktiver Neurone im Ganglion nodosum. Zur immunhistochemischen Anfärbung dieser Neurone wurden ein SP/NKA-spezifischer Primärantikörper sowie ein Fluoreszenzfarbstoff(Cy3)-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet.



Abbildung 3.8 – Fluoreszenzmikrosokopische Darstellung p75^{NTR}-immunreaktiver Neurone im Ganglion nodosum. Zur immunhistochemischen Anfärbung dieser Neurone wurden ein $p75^{NTR}$ -spezifischer Primärantikörper sowie ein Fluoreszenzfarbstoff(Cy2)-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet.

4. DISKUSSION

Die Untersuchungsergebnisse wurden in einem neu etablierten chronischen Asthma-Tiermodell erhoben. Dieses zeigte für das humane Asthma charakteristische Befunde wie konstant ausgeprägte Symptome einer akuten bronchialen Obstruktion, eine verstärkte Eosinophilie in den Atemwegen sowie histopathologisch eine über die Provokationen hinaus andauernde Atemwegsentzündung ohne wesentliche Hinweise für eine Allergentoleranzentwicklung. Zudem wurden erstmals in einem chronischen Asthma-Tiermodell ein trotz der anhaltenden Atemwegsentzündung vollständig reversibler Anstieg von Neurotrophinen in den Atemwegen sowie eine im Verlauf verminderte Immunreaktivität (IR) für Tachykinine und den Pan-Neurotrophinrezeptor p75^{NTR} in sensiblen Atemwegsneuronen festgestellt.

4.1. DAS NEUE CHRONISCHE ASTHMA-TIERMODELL

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde vor dem Hintergrund von Vorversuchen sowie den Erfahrungen der wenigen anderen Arbeitsgruppen, die mit chronischen Provokationsmodellen arbeiten, ein neues chronisches Asthma-Tiermodell mit sechs täglichen Allergenexpositionen entwickelt. Folgende methodische Aspekte wurden dabei berücksichtigt.

Im angewendeten Asthmamodell erfolgte die intraperitoneale Sensibilisierung der Meerschweinchen in Anlehnung an das etablierte Protokoll von Sanjar et al., dessen Sensibilisierungserfolg anhand lokaler Hautreaktion und Hautverdickung infolge intradermaler Allergeninjektion zuvor bereits mehrfach nachgewiesen wurde (156; 69). Es gibt viele ähnliche Sensibilisierungs-Protokolle mit meist ein- bis dreimaligen, intranasalen, intratrachealen, intraperitonealen oder subkutanen Injektionen bzw. inhalativer Allergenapplikation. Ein Nachteil aerodigestiver Sensibilisierungsformen im Vergleich zu parenteralen besteht in der dabei häufiger entstehenden mukosalen Allergentoleranz (157).

In nahezu allen vergleichbaren Studien werden nach erfolgreicher Sensibilisierung inhalative Allergenprovokationen angewendet, weil diese der Allergenexpositionssituation von Asthma-Patienten am nächsten kommen. Bisherige Untersuchungen wurden überwiegend in Tiermodellen mit ein- bis zweimaliger Provokation durchgeführt. Chronische Provokationsmodelle hingegen sind wahrscheinlich realistischer für die Situation von Asthma-Patienten (158), werden jedoch viel seltener angewendet. Ein wichtiger Grund hierfür ist ebenfalls die Entwicklung einer Allergentoleranz bei wiederholten Provokationen, welche bei Meerschweinchen sowohl von anderen Arbeitsgruppen (159) als auch in hier nicht dargestellten Vorversuchen mit gleichbleibender Allergenmenge beobachtet worden war. Eine gewisse Toleranzentwicklung infolge wiederholter Allergenexpositionen ist darüberhinaus ein auch von Mäusen (160) und Ratten (161) bekanntes methodisches Problem. Ein spezielles Ziel des in dieser Arbeit neu etablierten chronischen Provokationsschemas war daher die Induktion einer dem menschlichen Asthma ähnlichen, möglichst konstant ausgeprägten Expositionssymptomatik ohne relevante Toleranzentwicklung. Zu diesem Zweck wurden die Provokationen unter Berücksichtigung der zuvor beobachteten Symptome mit steigender Allergendosis bzw. Provokationsdauer durchgeführt. Aus dem gleichen Grund arbeitet auch die Arbeitsgruppe von Tiberio et al. bei mehrfachen Provokationen mit stufenweise erhöhten Allergendosen (162; 163; 164). In einer anderen Studie wurden sogar bei einer einmaligen Provokation steigende Allergendosen in drei 10-minütigen Abschnitten verwendet (165). Zu berücksichtigen ist allerdings, dass sehr hohe Allergeneinzeldosen eine Alveolitis hervorrufen können, welche möglicherweise Asthma-untypische Veränderungen im Tiermodell bewirken könnte (166).

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt des angewendeten Tiermodells betrifft die Tatsache, dass Meerschweinchen während der Allergenexposition dem menschlichen Asthma-Anfall sehr ähnliche, potentiell ebenfalls lebensbedrohliche Symptome entwickeln. Deshalb verwenden einzelne Arbeitsgruppen ein Antihistaminikum zur Prävention eines anaphylaktischen Schocks (167; 11). Da hierdurch aber möglicherweise die erzeugte Asthma-Situation verzerrt wird, wurde in der vorliegenden Arbeit, wie auch in vielen anderen Arbeitsgruppen üblich (162; 168; 158; 169; 170), auf diese Intervention verzichtet. Unbehandelt ist die sehr realistische Allergenexpositionssymptomatik bei einzelnen Tieren jedoch so ausgeprägt, dass sie das vorzeitige Beenden eines Provokationsdurchganges erfordert. Die daraus resultierenden, unterschiedlich langen Expositionszeiten werden dabei zugunsten der hohen Realitätsnähe zu einem humanen Asthma-Anfall in Kauf genommen. Nur vereinzelt wird demgegenüber eine so geringe Allergendosis verwendet oder so kurz provoziert, dass Abbrüche offenbar überhaupt nicht nötig werden (11; 171). Hierdurch verliert das erzeugte Asthma-Modell allerdings möglicherweise an Aussagekraft für die humane Situation.

Das in dieser Arbeit neu etablierte chronische Provokations-Protokoll induzierte trotz wiederholter Allergenexpositionen eine weitgehend konstant ausgeprägte und dem humanen Asthmaanfall sehr ähnliche Symptomatik ohne Hinweise für eine relevante Allergentoleranzentwicklung.

4.2. CHARAKTERISIERUNG DER ATEMWEGSENTZÜNDUNG

Die im neuen chronischen Asthma-Tiermodell induzierte Atemwegsentzündung wurde anhand von peribronchialen Leukozyteninfiltraten und Zellen in der BAL untersucht. Die Atemwegsentzündung war bereits nach der ersten Provokation nachweisbar, verstärkte sich im Verlauf der wiederholten Allergenexpositionen und hielt auch noch sieben Tage nach der letzten Provokation an.

Peribronchiale Leukozyteninfiltrate (PLI)

Die vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich der PLI sind konsistent mit zahlreichen anderen Untersuchungen aus akuten und chronischen Provokationsmodellen mit Ovalbuminsensibilisierten Meerschweinchen. In den dabei identifizierten PLI wurden stets viele Eosinophile beobachtet (167; 163; 171).

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde übereinstimmend mit den dargestellten Resultaten bereits nach einmaliger Provokation ein ausgeprägtes Leukozyten-Infiltrat in den Atemwegen nachgewiesen (167), welches in einer Studie auch sieben Tage nach Provokation noch vorhanden war (172). In einer der wenigen Arbeiten, die ebenfalls Rückschlüsse auf den Verlauf der Atemwegsentzündung während mehrfacher Provokationen zulassen, erreichte die Zunahme von Bronchiengewebe infiltrierenden Eosinophilen, Neutrophilen und Mastzellen erst nach der neunten und letzten Provokationen statistische Signifikanz (171). Dieser Unterschied zu den vorliegenden Ergebnissen könnte einerseits Folge dessen sein, dass nicht mit steigenden Allergenmengen provoziert wurde, weshalb die Atemwegsentzündung von einer gewissen Toleranzentwicklung abgemildert worden sein könnte. Dass eine orale Allergentoleranz prinzipiell u.a. die induzierte Atemwegsentzündung abschwächen kann, wurde von Ruiz Schütz et al. gezeigt (173). Andererseits waren die Abstände zwischen den einzelnen Allergenexpositionen größer als im angewendeten Tiermodell und die Auswertungsmethode nach Leukozytensubpopulationen getrennt sowie quantitativ.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen übereinstimmend mit anderen chronischen Provokationsmodellen, dass auch 24 h (170; 168) bzw. drei Tage (163; 173) nach mehrfacher Allergenexpositionen relevante Entzündungszell-Infiltrate in den Atemwegen vorhanden sind. Neu dagegen ist deren Persistenz bis eine Woche nach mehrfachen Provokationen.

Der Nachweis von PLI wurde auch in anderen Tiermodellen wie Maus (174) oder Ratte (175) mehrfach als ein Beleg der erfolgreich induzierten Atemwegsentzündung herangezogen. Dass solche Befunde kein Tier-spezifisches Phänomen sind, zeigen Untersuchungen an Asthma-Patienten, in denen ebenfalls ausgeprägte Leukozyteninfiltrate mit vielen Eosinophilen in der Lunge identifiziert wurden (176; 177; 178; 179). Saetta et al. stellten in einer Untersuchung mit sechs Asthma-Patienten sogar noch sechs Monate nach der letzten Allergenexposition keine bedeutsame Rückbildung des Entzündungsinfiltrates in der Bronchialschleimhaut fest (180).

Anhaltspunkte für die klinische Relevanz von Leukozyteninfiltraten in der Lunge erbrachten u.a. zwei Studien mit Asthma-Patienten, in denen das Ausmaß des Leukozyteninfiltrates positiv mit dem thorakalen Gasvolumen (TGV) und der totalen Lungenkapazität (TLC) (181) bzw. mit einer Verschlechterung des FEV₁ korrelierte (182).

BAL-Zellen

Für die Charakterisierung der Atemwegsentzündung bei Asthma sind neben Leukozyteninfiltraten auch Veränderungen der zellulären Bestandteile in der BAL geeignet (183; 184).

In Kongruenz zu den vorliegenden Ergebnissen hatten auch andere Studien mit Ovalbumin-sensibilisierten Meerschweinchen sowohl infolge akuter (156; 11) als auch nach chronischer (168) Allergenexposition einen Anstieg der Gesamtzellzahl in der BAL gezeigt. Nach einmaliger Allergenprovokation erhöhte BAL-Gesamtzellzahlen lieferten auch andere Tiermodelle wie Maus (118) und Ratte (175). Die in einem chronischen Mausmodell gezeigte weitere Zunahme der BAL-Gesamtzellzahlen nach wiederholten Provokationen verglichen mit der Situation nach einmaliger Allergenexposition (139) erreichte in der vorliegenden Arbeit keine Signifikanz. Bei Asthma-Patienten hingegen wurden im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zumeist keine Unterschiede hinsichtlich der Gesamtzellzahl in der BAL, wohl aber bezogen auf deren zelluläre Zusammensetzung, festgestellt (179).

Die Differenzierung der BAL-Zellen nach Leukozyten-Subgruppen zeigte eine ausgeprägte Eosinophilie, welche auch noch eine Woche nach der letzten Allergenexposition vorhanden war. Erhöhte Eosinophilenanteile in der BAL waren zuvor übereinstimmend bei verschiedenen akuten Meerschweinchen-Modellen (167; 172; 156; 11) sowie einen (185; 168; 171) bzw. drei Tage (162) nach chronischer Provokation nachgewiesenen worden. Neu dagegen ist deren Persistenz auch noch eine Woche nach der letzten Provokation. Hinsichtlich der anderen Leukozyten-Subgruppen existieren dagegen eher inkonsistente Resultate. So wurden in manchen Studien vermehrt Lymphozyten (168; 162), neutrophile Granulozyten (171; 167; 156), Makrophagen (156) oder Mastzellen (171) in der BAL von asthmatischen Meerschweinchen festgestellt, jeweils andere Untersuchungen zeigten dagegen keinen Anstieg dieser Leukozyten-Subgruppen. Da in der vorliegenden Arbeit abgesehen von den Eosinophilen keine Veränderungen anderer Leukozyten-Subgruppen festgestellt wurden, kann angenommen werden, dass der Anstieg der BAL-Gesamtzellzahlen in erster Linie durch eine Zunahme von Eosinophilen in den Atemwegen zustande kam. Aufgrund einer anderen Untersuchung an Meerschweinchen, die eine enge Korrelation zwischen Eosinophilen in der BAL und im Lungengewebe zeigte (186), kann man überdies vermuten, dass auch die PLI in der vorliegenden Arbeit vorwiegend aus Eosinophilen bestanden. Die Eosinophilie in der BAL wurde davon abgesehen auch in Studien mit Mäusen (174; 139) oder Ratten (175; 187) nachgewiesen. Auch bei Asthma-Patienten ist die Eosinophilie neben einem Th₂-Zytokinmuster mit erhöhten Interleukinen (IL) 4, 5 und 13 ein typischer BAL-Befund (176; 179). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass erhöhte Eosinophilenzahlen sowohl im Blut als auch in den Atemwegen nicht Asthma-spezifisch sind (179). Die klinische Bedeutung der Atemwegs-Eosinophilie zeigt sich u.a. daran, dass sie bei Asthma-Patienten mit der Schwere der Erkrankung (176) sowie der bronchialen Hyperreagibiltät (188) korreliert.

Insgesamt deuten die dargestellten Untersuchungsergebnisse daraufhin, dass im angewendeten Tiermodell eine dem menschlichen Asthma sehr ähnliche über die Provokationen hinaus andauernde Atemwegsentzündung induziert werden konnte.

4.3. NEUROTROPHINE IN DER BRONCHOALVEOLÄREN LAVAGE

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal in einem chronischen Asthma-Meerschweinchenmodell NGF in der BAL untersucht. Dabei wurde eine NGF-Induktion während der mehrfachen Provokationen beobachtet, welche sich bereits drei Tage danach wieder vollständig zurückgebildet hatte. Andere Neurotrophine wie BDNF und NT-4 waren dagegen zu keinem Untersuchungszeitpunkt in der BAL messbar.

NGF

Für die Messung der Neurotrophin-Konzentrationen in der BAL wurden in Ermangelung verfügbarer an Meerschweinchenproben getesteter Alternativen ELISA verwendet, die eigentlich für humane Proben vorgesehen sind. Dies geschah vor dem Hintergrund der recht hohen Homologie von humanem und Meerschweinchen-NGF von fast 90 % (189). Zusätzlich waren bereits zuvor positive Vorerfahrungen mit der Verwendung eines anderen, aber ebenfalls für humane Proben ausgelegten NGF-ELISA gesammelt worden (11). Die aufgrund begrenzter Probenmengen vorgenommene Wertung aller oberhalb des sensitiven Bereiches gemessener OD-Werte ist methodisch nicht unproblematisch. Sie müsste allerdings in den davon betroffenen Gruppen mit hohen NGF-Konzentrationen (2, 3 und 4) insgesamt eher zu niedrigeren Ergebnissen geführt haben. Folglich dürfte die Differenz zu den Werten der Kontrollgruppe, welche trotzdem Signifikanz erreichte, eigentlich noch größer sein. Abgesehen davon sind Verzerrungen der Unterschiede zwischen den Gruppen 2, 3 und 4 nicht auszuschließen.

Bislang hatte nur eine einzige Studie überhaupt NGF in der BAL von OVAsensibilisierten Meerschweinchen nach Allergenprovokation untersucht und einen Anstieg der NGF-Konzentration nach einmaliger Provokation gezeigt (11). Dieser Effekt einer akuten Allergenexposition konnte in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden, was zudem im Einklang mit vergleichbaren Befunden aus anderen akuten Provokationsmodellen mit Mäusen (139; 120) und Ratten (187) steht. Auch in der BAL von Asthmapatienten wurde nach einmaliger Allergenexposition ein NGF-Anstieg beobachtet (128). Diese Ergebnisse deuten also übereinstimmend daraufhin, dass die NGF-Konzentration in den Atemwegen, welche bei Allergen-sensibilisierten Individuen im Vergleich zu gesunden Kontrollen schon grundsätzlich erhöht ist (12; 117), durch eine akute Allergenexposition noch weiter ansteigt. Unter Berücksichtigung des in Interventionsstudien (80) gezeigten Wirkungspotentials erscheint eine relevante Beteiligung von NGF an der Asthma-Pathogenese somit insgesamt sehr plausibel.

Der in dieser Arbeit erstmals gezeigte Verlauf der NGF-Konzentration in der BAL während wiederholter Provokationen lässt verschiedene Schlüsse zu. Die Entwicklung bis zu einer maximalen NGF-Induktion nach der dritten Allergenexposition könnte als Anhaltspunkt für eine zunächst mit zunehmender Provokationszahl steigende NGF-Konzentration in den Atemwegen interpretiert werden. Dies könnte eine Folge der im Provokationsverlauf gestei-Allergendosen sein. Eine derartige Dosisabhängigkeit gerten gewesen des Neurotrophinanstiegs wurde zuvor in einem Mausmodell gezeigt (190). Es gibt verschiedene Hinweise darauf, welche zellulären NGF-Quellen dabei im Rahmen der ebenfalls anwachsenden Atemwegsentzündung zu dem Anstieg beigetragen haben könnten. Besonders Eosinophile werden hierbei als relevante Kandidaten diskutiert (119). Eosinophile waren auch in der vorliegenden Arbeit vermehrt in der BAL nachweisbar und kämen somit als potentielle Quelle für den NGF-Anstieg in Frage. Die persistierende Eosinophilie nach Abschluss der Provokationen führte allerdings nicht zu ebenfalls konstant hohen NGF-Konzentrationen, was einerseits auf eine "Provokations-abhängige NGF-Induktion" in Eosinophilen hindeuten könnte. Nicht das bloße Vorhandensein von Entzündungszellen, sondern vielmehr deren Stimulierung durch die Allergenexposition wäre demzufolge für die NGF-Induktion entscheidend. Andererseits existieren Befunde, die eine wesentliche Beteiligung von Atemwegsepithelzellen an dem NGF-Anstieg in der BAL nahelegen (120; 117; 121). Bei diesen Strukturzellen wäre eine Provokations-induzierte NGF-Freisetzung eher auch unabhängig von der lokalen Atemwegsentzündung mit Eosinophilie vorstellbar. Atemwegsepithelzellen und andere Entzündungs-unabhängigere Faktoren könnten so für die vollständige Rückbildung des NGF-Anstiegs drei Tage nach Abschluss der wiederholten Provokationen trotz der fortbestehenden Entzündung in den Atemwegen mitverantwortlich gewesen sein. Ergänzend zu den erhobenen Daten nach Abschluss der Provokationen stehen Beobachtungen bei Asthmapatienten, bei denen NGF in der BAL bereits zwei Tage nach Abschluss mehrfacher Provokationen nicht mehr erhöht war (121). In einer Studie mit *Penicillium chrysogenum*-sensibilisierten Mäusen waren dagegen auch noch drei Tage nach wiederholten Provokationen erhöhte NGF-Konzentrationen in der BAL gemessen worden (191). Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen Spezies-bedingten Unterschied.

Zusammenfassend kann man somit schlussfolgern, dass der NGF-Anstieg in den Atemwegen bei Mensch und Meerschweinchen offenbar Allergenexpositions-abhängig ist und das bloße Vorhandensein von Entzündungszellen hierfür eine untergeordnete Rolle spielt. Abgesehen davon ergibt sich aus den vorliegenden Resultaten kein Anhaltspunkt für eine Rolle von NGF im Expositionsintervall - sowohl bei der Aufrechterhaltung der lokalen Entzündung als auch hinsichtlich der Tachykinin-IR sensibler Atemwegsneurone.

BDNF und NT-4

Es gelang kein Nachweis von BDNF bzw. NT-4 in der BAL, wobei es auch in der Literatur bisher keine positiven Ergebnisse aus Meerschweinchenmodellen gibt. Dies könnte einerseits als tatsächliche Situation im Rahmen der induzierten Atemwegsentzündung gedeutet werden und damit eher gegen eine relevante Beteiligung dieser beiden Neurotrophine bei der Asthma-Pathogenese im Meerschweinchenmodell sprechen. Im Gegensatz dazu stünden dann Befunden von Asthma-Patienten, bei denen zumindest BDNF vermehrt in der BAL festgestellt wurde (128). Andererseits ist zumindest vorstellbar, dass die jeweiligen Neurotrophin-Antikörper in den für menschliche Proben ausgelegten ELISA zwar an Meerschweinchen-NGF, nicht aber an -BDNF oder -NT-4 binden. Bezüglich der NT-4-Konzentration in der BAL nach Allergenexposition ist bisher weder aus anderen Tiermodellen noch von Asthma-Patienten etwas bekannt.

4.4. TACHYKININ- UND P75^{NTR}-IMMUNREAKTIVITÄT IM GANGLION NODOSUM

In der vorliegenden Arbeit blieb die Tachykinin-IR der sensiblen Atemwegsneurone im Ganglion nodosum im Verlauf mehrfacher Provokationen entgegen der Erwartungen zunächst unverändert und nahm im weiteren Verlauf vorübergehend ab. Die bisher noch nie am Meerschweinchen untersuchte p75^{NTR}-IR sowie Co-IR für Tachykinine und p75^{NTR} zeigte einen ähnlichen Verlauf.

Tachykinin-IR

Aus vorhergehenden Studien ist bekannt, dass die Atemwegsneurone im Ganglion nodosum von Meerschweinchen überwiegend dünn myelinisierte, mechano-sensible Aδ-Fasern sind, welche im Ganglion nodosum unter physiologischen Bedingungen nahezu keine IR für Tachykinine wie SP aufweisen (36; 192; 15; 155). Folglich zeigten mehrere Studien mit Meerschweinchen in Übereinstimmung mit den dargestellten Ergebnissen, dass der Anteil Tachykinin-immunreaktiver Atemwegsneurone im Ganglion nodosum bei nicht sensibilisierten Tieren maximal im einstelligen Prozentbereich liegt (36; 15; 155; 193).

Eine im Meerschweinchenmodell erzeugte allergische Atemwegsentzündung induziert jedoch einen relevanten Anstieg der Tachykinin-IR in den Atemwegsneuronen (69; 15; 155; 11). Dies wurde auch bei Mäusen (194) und Ratten (195) nachgewiesen. Es gibt hierzu keine vergleichbaren Daten von Asthma-Patienten, deren Erhebung aus ethisch-methodischen Gründen unmöglich ist. In einer Autopsie-Studie wurden in den Atemwegen von Asthma-Patienten vermehrt vorhandene SP-haltige Nervenfasern festgestellt (41). Nachfolgende Untersuchungen erbrachten diesbezüglich allerdings gegenteilige Befunde (74; 75; 73). Die naheliegende Vermutung, dass die bei Meerschweinchen unter pathologischen Bedingungen erhöhte Tachykinin-IR unter den Atemwegsneuronen in erster Linie durch den im Ganglion nodosum dominierenden Aô-Neuronen-Typ verursacht wird, konnte mehrfach bestätigt werden (155; 165). Es handelt sich hierbei also auch um eine qualitative Veränderung im Sinne eines sogenannten "Phänotyp-Switchs" und damit um ein Phänomen neuronaler Plastizität (17). Die Zunahme der Tachykinin-IR geht erwartungsgemäß mit einem quantitativen Anstieg der Tachykininvorläufer-mRNA im Ganglion nodosum sowie der Tachykininkonzentration in der Lunge einher (69; 11). Auch in Sputum (77), bronchialer und nasaler Lavage von Asthma-Patienten (70) wurden erhöhte Tachykinin-Konzentrationen gemessen, die korrespondierend zu den Resultaten aus Tiermodellen nach Allergenexposition noch weiter anstiegen. Bisher sind die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Tachykinin-Induktion allerdings nicht vollständig geklärt.

Bei der Interpretation der dargestellten Ergebnisse vor dem Hintergrund der oben erwähnten Vorbefunde sollten folgende methodische Aspekte berücksichtigt werden. Es ist vorstellbar, dass kurz nach der Fluoreszenzfarbstoff-Applikation stattfindende Provokationen den retrograden Transport des Fluoreszenzfarbstoffs in den Axonen beeinträchtigen. Dies könnte möglicherweise erklären, weshalb in der vorliegenden Arbeit die durchschnittliche Anzahl retrograd markierter Neurone pro Ganglienschnitt insgesamt nur ca. 10-15 % der Vorgängerstudien von Kummer et al. (36) und Fischer et al. (69) betrug. Es gibt es keinen Anhalt dafür, die Ursache für diese Abweichung im Markierungs-Prozedere zu suchen, da es nach dem gleichen, seit langem etablierten Protokoll (69; 192; 193; 165) und von einem darin sehr erfahrenen Operateur sowie mit dem etablierten (196) und mehrfach verwendeten Fluoreszenzfarbstoff Fluoro-Gold (36; 197) durchgeführt wurde. Dieser Unterschied könnte vielmehr damit zusammenhängen, dass in der vorliegenden Untersuchung aufgrund des chronischen Provokationsschemas nicht alle Tiere nach der Fluoro-Gold-Applikation eine mehrtägige provokationsfreie Erholungszeit hatten. So lag der zeitliche Abstand zwischen retrograder Markierung und der nächsten der noch ausstehenden fünf bzw. sechs täglichen Provokationen beispielsweise in den Gruppen 4 und 5 bei maximal 24 h (siehe Abb. 2.1). Die beiden Vorgängerstudien konnten dagegen aufgrund anderer Versuchsanordnungen allen Meerschweinchen nach der retrograden Markierung 6 - 15 provokationsfreie Tage einräumen (69; 36). Für diesen vermuteten Zusammenhang spricht, dass in den Gruppen 4 und 5 nur ein Drittel so viele retrograd markierte Neurone pro Schnitt identifiziert wurden wie in den übrigen vier Gruppen, die nach der Fluoro-Gold-Applikation entweder mindestens vier provokationsfreie Tage oder nur noch eine folgende Provokation hatten.

Ein für diese Hypothese ursächlicher Mechanismus könnte der bei Meerschweinchen ausgeprägte Axon-Reflex darstellen (8). Demzufolge werden auf Irritation sensibler Atemwegsneurone hin in deren Axonen Neuropeptide (wie CGRP oder das Tachykinin SP) anterograd zur peripheren Nervenendigung transportiert und dort freigesetzt. Der aktive axonale Transport in Vesikeln in diese Richtung wird durch N-Kinesine, retrograd durch zytoplasmatisches Dynein sowie C-Kinesine bewerkstelligt (198). Beide Transportvorgänge laufen unter ATP-Verbrauch ab (199). Möglicherweise wird z.B. aufgrund limitierter ATP-Ressourcen der aktive vesikuläre retrograde Transport des Fluoreszenzfarbstoffs ins Perikaryon durch den gleichzeitig vermehrt ablaufenden anterograden Tachykinin-Transport beeinträchtigt. Konsekutiv würde sich der retrograd transportierte Fluoreszenzfarbstoff (*zu*- mindest nach der gleichen Zeit) in weniger Neuronen im Ganglion nodosum nachweisen lassen.

In diesem Kontext erscheint eine Beeinträchtigung der retrograden Transportvorgänge v.a. in Tachykinin-haltigen Neuronen plausibel, was allerdings bisher noch nicht näher untersucht wurde. Gerade in den Tachykinin-immunreaktiven Neurone wäre demzufolge ein erschwerter Transport des Fluoreszenzfarbstoffs in Richtung Soma und damit eine verminderte Markierung solcher Neurone zu erwarten. Die kurz nach dem retrograden Markieren durchgeführten Provokationen könnten somit v.a. in den Gruppen 4 und 5 neben einer geringeren Anzahl von überhaupt retrograd markierten Neuronen zusätzlich eine Unterrepräsentation Tachykinin-immunreaktiver Neurone bewirkt haben. Ein derartiger Effekt mehrfacher Provokationen auf die Tachykinin-IR von Atemwegsneuronen wurde in der Literatur bislang nicht beschrieben. Er erscheint darüberhinaus in geringerem Maß auch bei Gruppe 3 bzw. 6 möglich. Die Tiere von Gruppe 3 hatten vor den drei noch ausstehenden Allergenexpositionen lediglich vier Tage Erholungszeit, während Gruppe 6 nach dem retrograden Markieren noch am selben Tag ein letztes Mal provoziert wurde. Durch diesen möglichen Effekt kurz nach dem retrograden Markieren durchgeführter Provokationen auf die Tachykinin-IR könnte folglich in den Gruppen 3 - 6 trotz einer möglicherweise selektiv in Aδ-Atemwegsneuronen stattfindenden Tachykinin-Neuinduktion insgesamt ein anderer Eindruck entstanden sein.

Einzig die Resultate von Gruppe 1 und 2 müssten hiervon weitgehend unberührt geblieben sein, da diese Tiere nach dem retrograden Markieren sechs provokationsfreie Tage vor nur einer ausstehenden Allergenexposition hatten. Warum sich die erstmals von Fischer et al. (69) nachgewiesene Tachykinin-Induktion nach einmaliger Provokation in der vorliegenden Arbeit nur tendenziell reproduzieren ließ, erscheint somit zunächst weiter unklar. Möglicherweise könnte die im Vergleich zu dieser Vorgänger-Studie (0,2 % Tachykininimmunreaktive Atemwegsneurone im Ganglion nodosum) etwas höhere Tachykinin-IR bei Tieren der Kontrollgruppe (5,7 %) hierzu beigetragen haben. Eine ebenfalls leicht erhöhte Tachykinin-IR unter physiologischen Bedingungen wurde abgesehen von den dargestellten Ergebnissen auch in einigen anderen Studien registriert (15; 193). In zwei weiteren Arbeiten wiesen nicht sensibilisierte Meerschweinchen sogar noch mehr Tachykinin-immunreaktive Atemwegsneurone im Ganglion nodosum (18,7 % bzw. 8,7 %) als in der vorliegenden Arbeit auf (165; 197). Von anderen Arbeitsgruppen vermutete Ursachen für diese Abweichung zu den Ergebnissen von Fischer et al. (69) könnten das operative Prozedere im Rahmen der intratrachealen Fluoreszenzfarbstoff-Applikation oder eine gewisse Entzündungsreaktion auf den applizierten Fluoreszenzfarbstoff darstellen (15; 165). Gerade diese bei Fischer et al. (69) nur sporadisch vorhandenen Tachykinin-immunreaktiven Atemwegsneuronen unter physiologischen Bedingungen könnten jedoch die Entwicklung der Tachykinin-IR während mehrfacher Provokationen beeinflusst haben. In der vorliegenden Arbeit wurde deren Faser-Typ zwar nicht näher untersucht, aber vorhergehende Studien legen übereinstimmend nahe, dass die unter physiologischen Bedingungen Tachykinin-immunreaktiven Neurone im Ganglion nodosum von Meerschweinchen fast ausschließlich vom unmyelinisierten C-Faser-Typ sind (15; 193; 155; 197). Diese vergleichsweise langsam leitenden, nozizeptiven Neurone sind sensibel für diverse Entzündungsmediatoren wie u.a. Capsaicin, Bradykinin, Histamin oder Prostaglandine (17). Vor diesem Hintergrund ist anzunehmen, dass diese C-Faser-Atemwegsneurone gemäß dem Axon-Reflex bereits nach der ersten Allergenexposition verstärkt Tachykinine freisetzten. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Ausschüttung sogar zur Erschöpfung der Tachykinin-Ressourcen in den Perikaryen der C-Faser-Atemwegsneurone führen kann. Folglich würden mit zunehmender Provokationszahl zunächst immer weniger C-Faser-Atemwegsneurone im Ganglion nodosum IR für Tachykinine zeigen. Krishna et al. (200) und Lilly et al. (73) interpretierten eine verminderte Tachykinin-IR in Neuronen ebenfalls als Zeichen einer verstärkt abgelaufenen Tachykinin-Freisetzung. Bei den in der vorliegenden Arbeit unter physiologischen Bedingungen festgestellten Tachykinin-immunreaktiven C-Faser-Atemwegsneuronen könnte es demzufolge nach Provokation zuvor sensibilisierter Tiere zu einer Abnahme der Tachykinin-IR im Ganglion nodosum gekommen sein, obwohl gleichzeitig, wie von Fischer et al. (69) beobachtet, eine Tachykinin-Induktion selektiv in Aδ-Faser-Neuronen beginnt. Dies ließe die im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant erhöhte Tachykinin-IR in Gruppe 2 nachvollziehbar erscheinen, obwohl durch die bekannte Tachykinin-Induktion in Aô-Faser-Neuronen ein Anstieg der Gesamt-Tachykinin-IR im Ganglion nodosum zu erwarten gewesen wäre.

Die Betrachtung der weiteren Entwicklung der Tachykinin-IR während der mehrfachen Provokationen unter der Hypothese einer gleichzeitigen Abnahme der Tachykinin-IR in C-Faser-Neuronen und -Induktion in Aδ-Faser-Neuronen lässt folgende Schlussfolgerung zu. Die in Akutmodellen gezeigte Tachykinin-Induktion in Aδ-Faser-Neuronen sistiert nach einmaliger Provokation oder fällt zumindest im Vergleich zur abnehmenden Tachykinin-IR in C-Fasern immer weniger ins Gewicht. Dies führte in der vorliegenden Arbeit möglicherweise zu dem vollständigen Verlust der Gesamt-Tachykinin-IR im Ganglion nodosum kurz nach sechsmaliger Provokation. Erst eine Woche nach der letzten Provokation erreichte die Tachykinin-IR wieder das Ausgangsniveau unter physiologischen Bedingungen, was für eine beginnende Kompensierung der forcierten Tachykinin-Ausschüttung in den C-Faser-Neuronen sprechen könnte.

Zusammengefasst gibt es in der vorliegenden Arbeit einerseits Hinweise dafür, dass Wechselwirkungen zwischen dem retrograden Markieren und der kurz darauf durchgeführten mehrfachen Provokationen zu weniger markierten Neuronen und einer Unterrepräsentation Tachykinin-immunreaktiver Neurone beigetragen haben könnten. Andererseits könnte es neben einer kurzfristigen Tachykinin-Induktion in Aδ-Faser-Neuronen gleichzeitig zu einer abnehmenden Tachykinin-IR in C-Faser-Neuronen durch forcierte Tachykinin-Freisetzung in die Atemwege gemäß dem *Axon-Reflex* gekommen sein.

Diese Überlegungen könnten erklären, wieso die Tachykinin-IR unter den Atemwegsneuronen im Ganglion nodosum entgegen der Erwartungen aus Akutmodellen im angewendeten chronischen Asthmamodell zunächst nicht signifikant zunahm und im weiteren Verlauf mehrfacher Provokationen sogar vorübergehend sank.

p75^{NTR}-IR sowie Co-IR für Tachykinine und p75^{NTR}

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal überhaupt die p75^{NTR}-IR von Atemwegsneuronen im Ganglion nodosum unter asthmatischen Bedingungen untersucht. Die mehrfachen Provokationen führten im dargestellten Meerschweinchenmodell zu einem teilweise reversiblen Abfall der p75-IR sowie der gleichzeitigen IR für Tachykinine und p75^{NTR} unter den sensiblen Atemwegsneuronen im Ganglion nodosum.

Bis zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit existierten weder aus physiologischen noch aus asthmatischen Bedingungen publizierte Daten zur p75^{NTR}-IR im Ganglion nodosum von Meerschweinchen. Die p75^{NTR}-IR in anderen sensiblen Ganglien von Meerschweinchen war zuvor nur einmal unter physiologischen Bedingungen semiquantitativ an Spinalganglien untersucht worden (201). Weiterhin wurde p75^{NTR}-IR in peripheren Nervenfasern im Lungengewebe von Mäusen nachgewiesen (140). In humanem Gewebe wurde p75^{NTR}-IR in Spinalganglien (202), sympathischen Ganglien (203) sowie nicht-neuronalem Gewebe (204) festgestellt, bisher aber nicht im vagalen Ganglion nodosum untersucht. Studien zur Rolle von p75^{NTR} in der Asthma-Pathogenese wurden bislang überwiegend am Mausmodell durchgeführt und zeigten, dass die durch Allergenexposition induzierte Atemwegsentzündung und bronchiale Hyperreagibilität bei p75^{NTR}-Knockout-Tieren bzw. nach Vorbehandlung mit p75^{NTR}-Antikörpern nicht eintraten (139; 140). Einen indirekten Hinweis auf eine Beteiligung von p75^{NTR} an der Asthma-Pathogenese im Meerschweinchenmodell lieferte eine Arbeit von de Vries et al., bei die Allergenexpositions-bedingte und NGF-abhängige akute Bronchokonstriktion nicht durch trkA-Inhibition beeinflussbar war (138).

Im Vergleich zu vorhergehenden Studien an sensiblen Ganglien anderer Spezies liegen die vorliegenden Ergebnissen mit ca. 16 % in der Kontrollgruppe deutlich niedriger. Die bislang einzigen Nachweise von p75^{NTR} im Ganglion nodosum stammen aus Studien mit Ratten unter physiologischen Bedingungen. Eine Untersuchung zeigte mittels *in situ* Hybridisierung, dass unter physiologischen Bedingungen mehr als 50 % aller Nodosum-Neurone (*ohne vorhe-rige Markierung der Atemwegsneurone*) von Ratten p75^{NTR}-mRNA aufweisen (205). Auch in anderen sensiblen Ganglien von Ratten wie Spinalganglien (206; 207) oder dem Ganglion Trigeminale (208) wurde p75^{NTR}-mRNA ebenfalls in ähnlichen Größenordnungen detektiert. Dieser Unterschied könnte Spezies-bedingt sein und zudem daran liegen, dass in diesen Studien ausnahmslos die gesamte Neuronenpopulation eines Ganglions untersucht wurde. Beides würde implizieren, dass die Subpopulation der Atemwegsneurone im Ganglion nodosum von Meerschweinchen vergleichsweise wenig p75^{NTR} enthält.

Davon abgesehen ähnelt der Verlauf der p75^{NTR}-IR während und nach mehrfacher Provokationen dem der Tachykinin-IR. Es ist nicht auszuschließen, dass die p75^{NTR}-IR ebenfalls auf gleiche Weise von den kurz nach dem retrograden Markieren durchgeführten Provokationen beeinflusst wurde. Andererseits könnten die vorliegenden Ergebnisse auch als erstes Indiz dafür angesehen werden, dass wiederholte Allergenexpositionen zu einer verminderten p75^{NTR}-IR in sensiblen Atemwegsneuronen führen.

Da p75^{NTR} offenbar eine wichtige Rolle bei der NGF-induzierten und SP-vermittelten bronchialen Hyperreagibilität spielt (140), könnte der nachgewiesene Abfall der Co-IR für Tachykinine und p75^{NTR} außerdem dazu beigetragen haben, dass es im Verlauf der Provokationen trotz erhöhter NGF-Konzentrationen in den Atemwegen zu keinem Anstieg der Tachykinin-IR unter den Atemwegsneuronen im Ganglion nodosum kam.

4.5. KLINISCHE RELEVANZ UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit liefert neue Erkenntnisse, aber auch neue Fragen zur komplexen neuroimmunologischen Pathogenese von allergischem Asthma bronchiale.

Weitere Studien in diesem Bereich sind zukünftig v.a. mit chronischen Tiermodellen nötig, da sie für die Situation der meisten Asthma-Patienten wahrscheinlich geeigneter sind, jedoch aufgrund methodischer Nachteile seltener angewendet werden. Idealerweise sollten derartige Studien zu Asthma mit Meerschweinchen durchgeführt werden, weil dies in vielerlei Hinsicht das geeignetste Tiermodell für Atemwegserkrankungen des Menschen darstellt. Aufbauend auf den Resultaten dieser Arbeit könnte dabei beispielsweise der vermutete Effekt kurz nach dem retrograden Markieren durchgeführter Provokationen auf die sensiblen Atemwegsneurone weiter untersucht und ggf. bei Versuchsplanung zukünftiger chronischer Provokationsmodelle berücksichtigt werden. Auch die Hypothese einer gleichzeitig stattfindenden kurzfristigen Tachykinin-Induktion in A δ -Faser-Neuronen und abnehmenden Tachykinin-IR in C-Faser-Neuronen während mehrfacher Provokationen sollte genauer untersucht werden.

Die Beobachtung aus dem angewendeten Tiermodell, dass NGF während chronischer Allergenexpositionen in den Atemwegen erhöht bleibt, untermauert eine potentielle NGF-Beteiligung an der Symptomatik bei Allergenexposition. Diese erscheint auch wegen der ebenfalls an Meerschweinchen gezeigten Effekte von gegen NGF gerichteten Antikörpern auf die provokationsbedingte Bronchokonstriktion wahrscheinlich (138). Zusätzlich könnte die Entwicklung von p75^{NTR}-Antagonisten und deren Einsatz in entsprechenden Tiermodellen eventuell zur weiteren Präzisierung der Bedeutung von p75^{NTR} für die Asthma-Pathogenese beitragen. Ergänzend zu den vorhandenen Daten wäre auch die Untersuchung der TrkA-IR sensibler Atemwegsneurone in chronischen Provokationsmodellen von Interesse. Ergebnisse der Studien mit akuter Allergenexposition von De Vries et al. (11) und Dinh et al. (134) deuten auf eine Rolle auch dieses Neurotrophin-Rezeptors bei der SP-Induktion in sensiblen Atemwegsneurone hin. Darüber hinaus wurden die tierexperimentell gezeigten positiven Effekte von TrkA-Antagonisten (11) bislang noch nicht auf die Behandlung von Asthma-Patienten übertragen.

Die bisher weit besser erforschten Tachykinin-Rezeptoren, v.a. der von SP bevorzugte NK₁-Rezeptor, wurden schon länger als aussichtsreiche therapeutische Angriffspunkte angesehen. In einigen Untersuchungen konnte mithilfe von Tachykinin-Rezeptor-Antagonisten die Bronchokonstriktion von Asthma-Patienten reduziert werden (209; 210; 211; 212). Bezogen auf andere Asthma-Parameter (z.B. Lungenfunktion, bronchiale Hyperreagibilität oder Atemwegsentzündung) gab es allerdings auch weitgehend wirkungslose Anwendungsversuche von Tachykinin-Rezeptor-Antagonisten (213; 214; 215; 216). Zu dieser widersprüchlichen Datenlage könnte einerseits die Verwendung von verschiedenen NKA-Antagonisten mit teilweise unterschiedlichen Rezeptor-Affinitätsprofilen beigetragen haben. Andererseits ist denkbar, dass die Mechanismen der NE nicht bei allen Asthma-Typen gleichermaßen von pathogenetischer Bedeutung sind, sondern möglicherweise besonders für schwerere Formen wie z.B. das Brittle-Asthma relevant sind (10). Weitere Studien hierzu sind in jedem Fall nötig, um das aus Tiermodellen erlangte Wissen über die neuroimmunologischen Mechanismen in der Asthma-Pathogenese zu erweitern und v.a. zukünftig auch für die Behandlung von Asthma-Patienten nutzbar zu machen.

Neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der NE könnten darüberhinaus auch für andere Erkrankungen, bei denen ebenfalls eine neuroimmunologische Genese vermutet wird, von Bedeutung sein. So sind Tachykinine wie SP Gegenstand der Forschung auch zu anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen u.a. der Gelenke (217), der Haut (218), des Gastrointestinaltrakts (219) und der Blase (220) sowie zu Veränderungen im kardiovaskulären System (221). Für Neurotrophine wie NGF wird hingegen eine Beteiligung z.B. an rheumatischen Erkrankungen (222), Multipler Sklerose (223) oder Psoriasis (224) diskutiert.

Bislang ist in Deutschland nur ein Medikament mit Substanz P-vermitteltem Wirkmechanismus zugelassen worden - der selektive NK-1-Antagonist Aprepitant® zur Prophylaxe von Übelkeit und Erbrechen nach Chemotherapie oder Operation (225). Neuroimmunologische Aspekte sollten daher zukünftig bei der Entwicklung neuer Therapiekonzepte - *nicht nur für Asthma* - als mögliche Angriffspunkte stärker berücksichtigt werden.

Ein weiterer Fokus im Rahmen der Forschung zur NE sind zentralnervöse Effekte von Neuropeptiden. Neben Übelkeit und Erbrechen wird SP auch mit Hyperalgesie bei peripherer Entzündung (65) oder einer beobachteten Assoziation zwischen chronischen Entzündungen und affektiven Erkrankungen (226) in Zusammenhang gebracht. Eine wichtige Rolle in der Migräne-Pathogenese wird dagegen für CGRP angenommen, die klinische Erprobung von CGRP-Antagonisten in der Migräne-Behandlung ist bereits angelaufen (227).

Zweifellos müssen für solche erfolgversprechenden klinischen Studien zuvor genügend Erfahrungen aus geeigneten Tiermodellen gewonnen werden. Das Beispiel von CGRP-Antagonisten verdeutlicht nichtsdestotrotz das zukünftig noch stärker therapeutisch nutzbare Potential von Neurotrophinen und Neuropeptiden im Wechselspiel zwischen neuronalen und immunologischen Faktoren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der Pathogenese von allergischem Asthma bronchiale (Asthma) spielen Wechselwirkungen zwischen immunologischen und neuronalen Faktoren im Sinne einer neurogenen Entzündung (NE) eine wichtige Rolle. Bisherige Untersuchungen hierzu wurden überwiegend in Tiermodellen mit akuter Allergenexposition durchgeführt. Chronische Provokationsmodelle sind im Hinblick auf humanes Asthma wahrscheinlich aussagekräftiger, können jedoch zur Entwicklung einer Allergentoleranz bei wiederholten Provokationen führen. Frühere Studienergebnisse zur NE implizieren, dass insbesondere Nerve Growth Factor (NGF) über eine Tachykinin-Induktion in Atemwegsneuronen an der Entstehung von Asthma-typischen Symptomen beteiligt ist. Dabei scheint der Pan-Neurotrophin-Rezeptor (p75^{NTR}) von Bedeutung zu sein. Für Studien zu Asthma gilt das Meerschweinchen wegen seiner großen Ähnlichkeit zum humanen Atemwegssystem in vielerlei Hinsicht als das geeignetste Tiermodell.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher erstmals die NGF-Konzentration in den Atemwegen sowie die Tachykinin- und p75^{NTR}-Immunreaktivität (IR) in sensiblen Atemwegsneuronen in einem neuen chronischen Asthma-Tiermodell an Meerschweinchen untersucht.

Hierfür wurden 30 Meerschweinchen in sechs Gruppen randomisiert, von denen fünf durch intraperitoneale Injektionen mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert wurden. Die Kontrollgruppe (KTL) erhielt lediglich das Vehikel. Anschließend erfolgten bis zu sechs inhalative Allergenexpositionen mit steigender OVA-Dosis.

Folgende Aspekte konnten in dieser Arbeit festgestellt werden:

- Nur die sensibilisierten Tiere entwickelten während der Provokationen weitgehend konstant ausgeprägte Symptome einer akuten bronchialen Obstruktion wie Steigerung der Atemfrequenz, zunehmende Tiefe der Atemexkursionen und Husten. Diese Expositionssymptomatik war der von Asthma-Patienten sehr ähnlich und zeigte keinen Anhalt für eine Allergentoleranzentwicklung.
- 2. Im Gegensatz zur KTL zeigten die sensibilisierten Tiere während und auch noch eine Woche nach den Provokationen ausgedehnte peribronchiale Infiltrate in Periodic acid-Schiff(PAS)-gefärbten Lungenschnitten und eine stärkere Eosinophilie in der Bronchoalveolären Lavage (BAL). Beides spricht für eine im Tiermodell erfolgreich induzierte Asthma-ähnliche Atemwegsentzündung ohne Allergentoleranzentwicklung.

- 3. Erstmals in einem chronischen Tiermodell wurden während mehrfacher Allergenexpositionen mittels Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) erhöhte NGF-Konzentrationen in der BAL nachgewiesen. Dieser NGF-Anstieg hatte sich trotz der anhaltenden Atemwegsentzündung bereits 72 h nach Abschluss der Provokationen vollständig zurückgebildet. Für die NGF-Induktion in den Atemwegen scheint demzufolge v.a. die direkte Allergenexposition und weniger das alleinige Vorhandensein von Entzündungszellen entscheidend zu sein.
- 4. Entgegen der Erwartungen aus Akutmodellen blieb die Tachykinin-IR in den sensiblen Atemwegsneuronen im Ganglion nodosum zunächst unverändert und nahm im weiteren Verlauf der wiederholten Allergenexpositionen vorübergehend ab. Möglicherweise ist dies Folge einer ausgeprägten Freisetzung von Tachykininen in die Atemwege während mehrfacher Provokationen. Die erstmals an Meerschweinchen untersuchte p75^{NTR}-IR sowie Co-IR für Tachykinine und p75^{NTR} zeigten eine ähnliche Entwicklung wie die Tachykinin-IR. Dies könnte dazu beigetragen haben, dass es trotz erhöhter NGF-Konzentrationen in den Atemwegen insgesamt zu keiner nachweisbaren Tachykinin-Induktion in den Atemwegsneuronen kam.

Die vorliegende Arbeit liefert neue Erkenntnisse über die komplexe neuroimmunologische Pathogenese von allergischem Asthma bronchiale, in der Neurotrophine und Tachykinine potentielle Angriffspunkte bei der Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten darstellen. Hierfür kann auf das in dieser Arbeit neu etablierte chronische Asthma-Tiermodell zurückgegriffen werden. Darüber hinaus könnten diese Ergebnisse auch für andere chronischentzündliche Erkrankungen, bei denen ebenfalls eine neuroimmunologische Pathogenese vermutet wird, von Bedeutung sein.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung	Titel	Seite	
Abb. 1.1	Konzept der neurogenen Entzündung	9	
Abb. 1.2	Neurotrophine und ihre Rezeptoren	14	
Abb. 2.1	Versuchsanordnung	25	
Abb. 2.2	Prinzip des Sandwich-ELISA	32	
Abb. 3.1	Peribronchiale Leukozyteninfiltrate	37	
Abb. 3.2	Beispielfotos von peribronchialen Leukozyteninfiltraten	38	
Abb. 3.3	Gesamtzellkonzentration in der BAL	39	
Abb. 3.4	Zusammensetzung der BAL-Zellen	40	
Abb. 3.5	NGF-Konzentrationen in der BAL	41	
Abb. 3.6	Anteil p75 ^{NTR} -, Substanz P(SP)- sowie SP- und gleichzeitig p75 ^{NTR} -		
	immunreaktiver Neurone an den Atemwegsneuronen im Ganglion	43	
	nodosum		
Abb. 3.7	Fluoreszenzmikrosokopische Darstellung Tachykinin-immunreaktiver	44	
	Neurone im Ganglion nodosum		
Abb. 3.8	Fluoreszenzmikrosokopische Darstellung p75 ^{NTR} -immunreaktiver Neu-		
	rone im Ganglion nodosum		

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle	Titel	Seite	
Tab. 2.1	Antikörper für Immunhistochemie	21	
Tab. 2.2	Chemikalien und Reagenzien	21	
Tab. 2.3	Geräte und Apparaturen	22	
Tab. 2.4	Verbrauchsmaterialien	23	
Tab. 2.5	Lösungen	23	
Tab. 2.6	Gruppeneinteilung der Versuchstiere	24	
Tab. 2.7	Ovalbumin-Konzentration, Provokationsdauer und -symptomatik	26	
Tab. 2.8	Antikörper und Verdünnungen für die Immunhistochemie	35	
Tab. 2.9	Fluorochrome und Filtermodule mit Anregungs- und Sperrfilter	36	
Tab. 3.1	Anzahl untersuchter Ganglienschnitte und retrograd markierter		
	Atemwegsneurone je nach Immunreaktivität für Substanz P- bzw. p75 ^{NTR}	12	

LITERATURVERZEICHNIS

1. Nationale Versorgungs-Leitlinie Asthma Kurzfassung 2. Auflage. [Online] 1.1, März 2010.[Zitatvom:15.Jun2010.]http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/asthma/pdf/nvl_asthma_kurz.pdf.

2. World Health Organization. [Online] [Zitat vom: 31. Mai 2010.] http://www.who.int/respiratory/asthma/en/index.html.

3. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*. Apr 25, 1998, Vol. 351, 9111, pp. 1225-32.

4. **Pisi G, Olivieri D, Chetta A.** The airway neurogenic inflammation: clinical and pharmacological implications. *Inflamm Allergy Drug Targets*. Jul 2009, Vol. 8, 3, pp. 176-81.

5. WHO - Asthma. [Online] [Zitat vom: 11. Juni 2010.] http://www.who.int/topics/asthma/en/.

6. Willis, Thomas. The Anatomy of the Brain and Nerves. 1681.

7. Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother*. Sep 1967, Vol. 31, 1, pp. 138-51.

8. Barnes, PJ. Asthma as an axon reflex. Lancet. Feb 01, 1986, Vol. 1, 8475, pp. 242-5.

9. —. Airway inflammation and autonomic control. *Eur J Respir Dis Suppl.* 1986, Vol. 147, pp. 80-7.

10. —. Neuroeffector mechanisms: the interface between inflammation and neuronal responses. *J Allergy Clin Immunol*. Nov 1996, Vol. 98, 5 Pt 2, pp. 73-83.

11. De Vries A, Engels F, Henricks PA, Leusink-Muis T, McGregor GP, Braun A, Groneberg DA, Dessing MC, Nijkamp FP, Fischer A. Airway hyper-responsiveness in allergic asthma in guinea-pigs is mediated by nerve growth factor via the induction of substance P: a potential role for trkA. *Clin Exp Allergy*. Sep 2006, Vol. 36, 9, pp. 1192-200.

12. Undem BJ, Hunter DD, Liu M, Haak-Frendscho M, Oakragly A, Fischer A. Allergen-induced sensory neuroplasticity in airways. *Int Arch Allergy Immunol.* Feb-Apr 1999, Vol. 118, 2-4, pp. 150-3.

Nassenstein C, Schulte-Herbruggen O, Renz H, Braun A. Nerve growth factor: the central hub in the development of allergic asthma? *Eur J Pharmacol.* Mar 8, 2006, Vol. 533, 1-3, pp. 195-206.

14. **Freund V, Frossard N.** Expression of nerve growth factor in the airways and its possible role in asthma. *Prog Brain Res.* 2004, Vol. 146, pp. 335-46.

15. Hunter DD, Myers AC, Undem BJ. Nerve growth factor-induced phenotypic switch in guinea pig airway sensory neurons. *Am J Respir Crit Care Med.* Jun 2000, Vol. 161, 6, pp. 1985-90.

16. De Vries A, Dessing MC, Engels F, Henricks PA, Nijkamp FP. Nerve growth factor induces a neurokinin-1 receptor- mediated airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med.* May 1999, 159 (5 Pt 1), pp. 1541-4.

17. Lundberg, JM. Tachykinins, sensory nerves, and asthma-an overview. *Can J Physiol Pharmacol.* Jul 1995, Vol. 73, 7, pp. 908-14.

18. Butler CA, Heaney LG. Neurogenic inflammation and asthma. *Inflamm Allergy Drug Targets*. Jun 2007, Vol. 6, 2, pp. 127-32.

19. von Euler US, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol.* Jun 6, 1931, Vol. 72, 1, pp. 74-87.

20. Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol.* Jul 1971, Vol. 232, 29, pp. 86-7.

21. Lundberg JM, et al. Substance P-, VIP-, and enkephalin-like immunoreactivity in the human vagus nerve. *Gastroenterology*. Sep 1979, Vol. 77, 3, pp. 468-71.

22. Lundberg JM, Hökfelt T, Nilsson G, Terenius L, Rehfeld J, Elde R, Said S. Peptide neurons in the vagus, splanchnic and sciatic nerves. *Acta Physiol Scand*. Dec 1987, Vol. 104, 4, pp. 499-501.

23. Fischer A, Hoffmann B. Nitric oxide synthase in neurons and nerve fibers of lower airways and in vagal sensory ganglia of man. Correlation with neuropeptides. *Am J Respir Crit Care Med.* Jul 1996, Vol. 154, 1, pp. 209-16.

24. Franco-Cereceda A, Henke H, Lundberg JM, Petermann JB, Hokfelt T, Fischer JA. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in capsaicin-sensitive substance P-immunoreactive sensory neurons in animals and man: distribution and release by capsaicin. *Peptides*. Mar-Apr 1987, Vol. 8, 2, pp. 399-410.

25. Hua XY, Theodorsson-Norheim E, Brodin E, Lundberg JM, Hokfelt T. Multiple tachykinins (neurokinin A, neuropeptide K and substance P) in capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea-pig. *Regul Pept*. Dec 1985, Vol. 13, 1, pp. 1-19.

26. Gamse R, Lembeck F, Cuello AC. Substance P in the vagus nerve. Immunochemical and immunohistochemical evidence for axoplasmic transport. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Jan 1979, Vol. 306, 1, pp. 37-44.

27. MacLean DB, Lewis SF. Axoplasmic transport of somatostatin and substance P in the vagus nerve of the rat, guinea pig and cat. *Brain Res.* Jul 30, 1984, Vol. 307, 1-2, pp. 135-45.

28. **Kimura S, Okada M, Sugita Y, Kanazawa I, Munekata E.** Novel neuropeptides, neurokinin a and b, isolated from porcine spinal cord. *Proc Jpn Acad.* 1983, Vol. 59, pp. 101–104.

29. Kangawa K, Minamino N, Fukuda A, Matsuo H. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 1983, Vol. 114, 2, pp. 533-40.

30. **Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V.** Neuropeptide Y-a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*. Apr 1982, Vol. 296, 5858, pp. 659-60.

31. **Karlsson, JA.** In vivo and in vitro studies of the non-adrenergic non-cholinergic nervous system of the guinea-pig airways. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* Apr 1986, Vol. 280, 2 Suppl, pp. 191-207.

32. Joos GF, Germonpre PR, Pauwels RA. Neural mechanisms in asthma. *Clin Exp Allergy*. Jun 2000, Vol. 30, Suppl 1, pp. 60-5.

33. —. Role of tachykinins in asthma. Allergy. Apr 2000, Vol. 55, 4, pp. 321-37.

34. Nawa H, Hirose T, Takashima H et al. Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor. *Nature*. 1983, Vol. 306, 5938, pp. 32-6.

35. **MacLean, DB.** Substance P synthesis and transport in explants of nodose ganglion/vagus nerve: effects of double ligation, 2-deoxyglucose, veratridine, and ouabain. *J Neurochem*. Jun 1987, Vol. 48, 6, pp. 1794-803.

36. **Kummer W, Fischer A, Kurkowski R, Heym C.** The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience*. Aug 1992, Vol. 49, 3, pp. 715-37.

37. Springall DR, Cadieux A, Oliveira H, Su H, Royston D, Polak JM. Retrograde tracing shows that CGRP-immunoreactive nerves of rat trachea and lung originate from vagal and dorsal root ganglia. *J Auton Nerv Syst.* Aug 1987, Vol. 20, 2, pp. 155-66.

38. Lundberg JM, Hokfelt T, Martling CR, Saria A, Cuello C. Substance Pimmunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell Tissue Res.* 1984, Vol. 235, 2, pp. 251-61.

39. **Dinh QT, Klapp BF, Fischer A.** Die sensible Atemwegsinnervation und die Tachykinine bei Asthma und COPD. *Pneumologie*. 2006, Bd. 60, S. 80-85.

40. Ollerenshaw S, Jarvis D, Woolcock A, Sullivan C, Scheibner T. Absence of immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide in tissue from the lungs of patients with asthma. *N Engl J Med.* May 1989, Vol. 320, 19, pp. 1244-8.

41. **Ollerenshaw SL, Jarvis D, Sullivan CE, Woolcock AJ.** Substance P immunoreactive nerves in airways from asthmatics and nonasthmatics. *Eur Respir J.* Jun 1991, Vol. 4, 6, pp. 673-82.

42. Luts A, Uddman R, Alm P, Basterra J, Sundler F. Peptide-containing nerve fibers in human airways: distribution and coexistence pattern. *Int Arch Allergy Immunol.* 1993, Vol. 101, 1, pp. 52-60.

43. Hislop AA, Wharton J, Allen KM, Polak JM, Haworth SG. Immunohistochemical localization of peptide-containing nerves in human airways: age-related changes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Sep 1990, Vol. 3, 3, pp. 191-8.

44. Pinto FM, Almeida TA, Hernandez M, Devillier P, Advenier C, Candenas ML. Candenas, M. L. *Eur J Pharmacol.* Jun 2004, Vol. 494, 2-3, pp. 233-9.

45. **Satake H, Kawada T.** Overview of the primary structure, tissue-distribution, and functions of tachykinins and their receptors. *Curr Drug Targets*. Aug 2006, Vol. 7, 8, pp. 963-74.

46. Groneberg DA, Harrison S, Dinh QT, Geppetti P, Fischer A. Tachykinins in the Respiratory Tract. *Current Drug Targets*. Aug 2006, Vol. 7, 8, pp. 1005-10.

47. **Di Maria GU, Bellofiore S, Geppetti P.** Regulation of airway neurogenic inflammation by neutral endopeptidase. *Eur Respir J.* Dec 1998, Vol. 12, 6, pp. 1454-62.

48. Wang LH, Ahmad S, Benter IF, Chow A, Mizutani S, Ward PE. Differential processing of substance P and neurokinin A by plasma dipeptidyl(amino)peptidase IV, aminopeptidase M and angiotensin converting enzyme. *Peptides*. Nov-Dec 1991, Vol. 12, 6, pp. 1357-64.

49. **Krause, J.E., et al.** Structure, expression and second messenger-mediated regulation of the human and rat substance P receptors and their genes. *Regul Pept.* Jul 1993, Vol. 46, 1-2, pp. 59-66.

50. Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci*. Feb 6, 2004, Vol. 74, 12, pp. 1445-63.

51. Almeida TA, Rojo J, Nieto PM, Pinto FM, Hernandez M, Martín JD, Candenas ML. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem.* Aug 2004, Vol. 11, 15, pp. 2045-81.

52. Fischer A, Kummer W, Couraud JY, Adler D, Branscheid D, Heym C. Immunohistochemical localization of receptors for vasoactive intestinal peptide and substance P in human trachea. *Lab Invest.* Sep 1992, Vol. 67, 3, pp. 387-93.

53. Advenier C, Lagente V, Boichot E. The role of tachykinin receptor antagonists in the prevention of bronchial hyperresponsiveness, airway inflammation and cough. *Eur Respir J*. Aug 1997, Vol. 10, 8, pp. 1892-906.

54. Joos GF, Pauwels RA. Tachykinin receptor antagonists: potential in airways diseases. *Curr Opin Pharmacol.* Jun 2001, Vol. 1, 3, pp. 235-41.

55. Groneberg DA, Peiser C, Dinh QT, Matthias J, Eynott PR, Heppt W, Carlstedt I, Witt C, Fischer A, Chung KF. Distribution of respiratory mucin proteins in human nasal mucosa. *Laryngoscope*. Mar 2003, Vol. 113, 3, pp. 520-4.

56. Groneberg DA, Eynott PR, Lim S, Oates T, Wu R, Carlstedt I, Roberts P, McCann B, Nicholson AG, Harrison BD, Chung KF. Expression of respiratory mucins in fatal status asthmaticus and mild asthma. *Histopathology*. Apr 2002, Vol. 40, 4, pp. 367-73.

57. Hilaire G, Burnet H, Ptak K, Sieweke M, Blanchi B, De Felipe C, Hunt S, Monteau R. Deletion of tachykinin NK1 receptor gene in mice does not alter respiratory network maturation but alters respiratory responses to hypoxia. *Adv Exp Med Biol.* 2003, 536, pp. 497-504.

58. Tournoy KG, De Swert KO, Leclere PG, Lefebvre RA, Pauwels RA, Joos GF. Modulatory role of tachykinin NK1 receptor in cholinergic contraction of mouse trachea. *Eur Respir J.* Jan 2003, Vol. 21, 1, pp. 3-10.

59. Lilly CM, Hall AE, Rodger IW, Kobzik L, Haley KJ, Drazen JM. Substance Pinduced histamine release in tracheally perfused guinea pig lungs. *J Appl Physiol*. Apr 1995, Vol. 78, 4, pp. 1234-41.

60. Adcock IM, Peters M, Gelder C, Shirasaki H, Brown CR, Barnes PJ. Increased tachykinin receptor gene expression in asthmatic lung and its modulation by steroids. *J Mol Endocrinol.* Aug 1993, Vol. 11, 1, pp. 1-7.

61. Naline E, Devillier P, Drapeau G, Toty L, Bakdach H, Regoli D, Advenier C. Characterization of neurokinin effects and receptor selectivity in human isolated bronchi. *Am Rev Respir Dis.* Sep 1989, Vol. 140, 3, pp. 679-86.

62. Crimi N, Oliveri R, Polosa R, Pulvirenti G, Prosperini G, Palemo F, Mistretta A. Effect of oral terfenadine on bronchoconstrictor response to inhaled neurokinin A and histamine in asthmatic subjects. *Eur Respir J*. Nov 1993, Vol. 6, 10, pp. 1462-7.

63. **Frossard N, Rhoden KJ, Barnes PJ.** Influence of epithelium on guinea pig airway responses to tachykinins: role of endopeptidase and cyclooxygenase. *J Pharmacol Exp Ther.* Jan 1989, Vol. 248, 1, pp. 292-8.

64. **Watson N, Maclagan J, Barnes PJ.** Endogenous tachykinins facilitate transmission through parasympathetic ganglia in guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol.* Jul 1993, Vol. 109, 3, pp. 751-9.

65. Neumann S, Doubell TP, Leslie T, Woolf CJ. Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature*. Nov 1996, Vol. 384, 6607, pp. 360-4.

66. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. Jun 2000, Vol. 288, 5472, pp. 1765-9.

67. **Mazzone, SB.** Sensory regulation of the cough reflex. *Pulm Pharmacol Ther.* 2004, Vol. 17, 6, pp. 361-8.

68. Bonham AC, Sekizawa SI, Joad JP. Plasticity of central mechanisms for cough. *Pulm Pharmacol Ther.* 2004, Vol. 17, 6, pp. 453-7.

69. Fischer A, McGregor G, Saria A, Philippin B, Kummer W. Induction of Tachykinin Gene and Peptide Expression in Guinea Pig Nodose Primary Afferent Neurons by Allergic Airway Inflammation. *J. Clin. Invest.* November 1996, Vol. 98, 10, pp. 2284–2291.

70. Nieber K, Baumgarten CR, Rathsack R, Furkert J, Oehme P, Kunkel G. Substance P and beta-endorphin-like immunoreactivity in lavage fluids of subjects with and without allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. Oct 1992, Vol. 90, 4 Pt 1, pp. 646-52.

71. Heaney LG, Cross LJ, McGarvey LP, Buchanan KD, Ennis M, Shaw C. Neurokinin A is the predominant tachykinin in human bronchoalveolar lavage fluid in normal and asthmatic subjects. *Thorax*. May 1998, Vol. 53, 5, pp. 357-62.

72. **Cardell LO, Uddman R, Edvinsson L.** Low plasma concentrations of VIP and elevated levels of other neuropeptides during exacerbations of asthma. *Eur Respir J*. Dec 1994, Vol. 7, 12, pp. 2169-73.

73. Lilly CM, Bai TR, Shore SA, Hall AE, Drazen JM. Neuropeptide content of lungs from asthmatic and nonasthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med.* Feb 1995, Vol. 151, 2 Pt 1, pp. 548-53.

74. Howarth PH, Springall DR, Redington AE, Djukanovic R, Holgate ST, Polak JM. Neuropeptide-containing nerves in endobronchial biopsies from asthmatic and nonasthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Sep 1995, Vol. 13, 3, pp. 288-96.

75. Chanez P, Springall D, Vignola AM, Moradoghi-Hattvani A, Polak JM, Godard P, Bousquet J. Bronchial mucosal immunoreactivity of sensory neuropeptides in severe airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* Sep 1998, Vol. 158, 3, pp. 985-90.

76. Hazbun ME, Hamilton R, Holian A, Eschenbacher WL. Ozone-induced increases in substance P and 8-epi-prostaglandin F2 alpha in the airways of human subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Nov 1993, Vol. 9, 5, pp. 568-72.

77. Tomaki M, Ichinose M, Miura M, Hirayama Y, Yamauchi H, Nakajima N, Shirato K. Elevated substance P content in induced sputum from patients with asthma and patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* Mar 1995, Vol. 151, 3 Pt 1, pp. 613-7.

78. Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool*. Mar 1951, Vol. 116, 2, pp. 321-61.

79. Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V. A NERVE GROWTH-STIMULATING FACTOR ISOLATED FROM SARCOM AS 37 AND 180. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 1954, Vol. 40, 10, pp. 1014-8.

80. Freund-Michel V, Frossard N. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacol Ther.* Jan 2008, Vol. 117, 1, pp. 52-76.

81. Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Essential role of the nerve growth factor in the survival and maintenance of dissociated sensory and sympathetic embryonic nerve cells in vitro. *Dev Biol.* Mar 1963, 7, pp. 653-9.

82. Levi-Montalcini R, Dal Toso R, della Valle F, Skaper SD, Leon A. Update of the NGF saga. *J Neurol Sci.* Jun 1995, Vol. 130, 2, pp. 119-27.

83. Thoenen H, Barde YA, Davies AM, Johnson JE. Neurotrophic factors and neuronal death. *Ciba Found Symp.* 1987, 126, pp. 82-95.

84. Hoyle GW, Graham RM, Finkelstein JB, Nguyen KP, Gozal D, Friedman M. Hyperinnervation of the airways in transgenic mice overexpressing nerve growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Feb 1998, Vol. 18, 2, pp. 149-57.

85. Nockher WA, Renz H. Neurotrophins in allergic diseases: from neuronal growth factors to intercellular signaling molecules. *J Allergy Clin Immunol.* Mar 2006, Vol. 117, 3, pp. 583-9.

86. Allen SJ, Dawbarn D. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin Sci* (*Lond*). Feb 2006, Vol. 110, 2, pp. 175-91.

87. Edwards RH, Selby MJ, Garcia PD, Rutter WJ. Processing of the native nerve growth factor precursor to form biologically active nerve growth factor. *J Biol Chem.* May 1988, Vol. 263, 14, pp. 6810-5.

88. Fahnestock, M. Structure and biosynthesis of nerve growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1991, 165, pp. 1-26.

89. Angeletti RH, Mercanti D, Bradshaw RA. Amino acid sequences of mouse 2.5S nerve growth factor. I. Isolation and characterization of the soluble tryptic and chymotryptic peptides. *Biochemistry*. Jan 1973, Vol. 12, 1, pp. 90-100.

90. Zabel BU, Eddy RL, Lalley PA, Scott J, Bell GI, Shows TB. Chromosomal locations of the human and mouse genes for precursors of epidermal growth factor and the beta subunit of nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 1985, Vol. 82, 2, pp. 469-73.

91. Francke U, de Martinville B, Coussens L, Ullrich A. The human gene for the beta subunit of nerve growth factor is located on the proximal short arm of chromosome 1. *Science*. Dec 1983, Vol. 222, 4629, pp. 1248-51.

92. Selby MJ, Edwards R, Sharp F, Rutter WJ. Mouse nerve growth factor gene: structure and expression. *Mol Cell Biol.* Sep 1987, Vol. 7, 9, pp. 3057-64.

93. Ehrhard PB, Erb P, Graumann U, Otten U. Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1993, Vol. 90, 23, pp. 10984-8.

94. Leon A, Buriani A, Dal Toso R, Fabris M, Romanello S, Aloe L, Levi-Montalcini R. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 1994, Vol. 91, 9, pp. 3739-43.

95. Solomon A, Aloe L, Pe'er J, Frucht-Pery J, Bonini S, Bonini S, Levi-Schaffer F. Nerve growth factor is preformed in and activates human peripheral blood eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* Sep 1998, Vol. 102, 3, pp. 454-60.

96. Ricci A, Greco S, Mariotta S, Felici L, Amenta F, Bronzetti E. Neurotrophin and neurotrophin receptor expression in alveolar macrophages: an immunocytochemical study. *Growth Factors*. 2000, Vol. 18, 3, pp. 193-202.

97. Murase K, Murakami Y, Takayanagi K, Furukawa Y, Hayashi K. Human fibroblast cells synthesize and secrete nerve growth factor in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 1992, Vol. 184, 1, pp. 373-9.

98. Varilek GW, Neil GA, Bishop WP, Lin J, Pantazis NJ. Nerve growth factor synthesis by intestinal epithelial cells. *Am J Physiol*. Sep 1995, Vol. 269, 3 Pt 1, pp. G445-52.

99. Ueyama T, Hamada M, Hano T, Nishio I, Masuyama Y, Furukawa S. Production of nerve growth factor by cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *J Hypertens*. Oct 1993, Vol. 11, 10, pp. 1061-5.

100. **Bandtlow CE, Heumann R, Schwab ME, Thoenen H.** Cellular localization of nerve growth factor synthesis by in situ hybridization. *EMBO J.* Apr 1987, Vol. 6, 4, pp. 891-9.

101. **Bruno MA, Cuello AC.** Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 2006, Vol. 103, 17, pp. 6735-40.

102. Muragaki Y, Timothy N, Leight S, Hempstead BL, Chao MV, Trojanowski JQ, Lee VM. Expression of trk receptors in the developing and adult human central and peripheral nervous system. *J Comp Neurol*. Jun 1995, Bd. 356, 3, S. 387-97.

103. Aloe L, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Manni L. The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy*. Sep 1997, Vol. 52, 9, pp. 883-94.

104. Tam SY, Tsai M, Yamaguchi M, Yano K, Butterfield JH, Galli SJ. Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells. *Blood.* Sep 1997, Vol. 90, 5, pp. 1807-20.

105. Ricci A, Felici L, Mariotta S, Mannino F, Schmid G, Terzano C, Cardillo G, Amenta F, Bronzetti E. Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Jan 2004, Vol. 30, 1, pp. 12-9.

106. Huebner K, Isobe M, Chao M, Bothwell M, Ross AH, Finan J, Hoxie JA, Sehgal A, Buck CR, Lanahan A, et al. The nerve growth factor receptor gene is at human chromosome region 17q12-17q22, distal to the chromosome 17 breakpoint in acute leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 1986, Vol. 83, 5, pp. 1403-7.

107. **Chapman, BS.** A region of the 75 kDa neurotrophin receptor homologous to the death domains of TNFR-I and Fas. *FEBS Lett.* Oct 1995, Vol. 374, 2, pp. 216-20.

108. Barker, PA. p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron*. May 2004, Vol. 42, 4, pp. 529-33.

109. Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*. Aug 2005, Vol. 6, 8, pp. 603-14.

110. **Chao, MV.** Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* Apr 2003, Vol. 4, 4, pp. 299-309.

111. Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*. Apr 1991, Vol. 350, 6320, pp. 678-83.

112. Yoon SO, Casaccia-Bonnefil P, Carter B, Chao MV. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci*. May 1998, Vol. 18, 9, pp. 3273-81.

113. Makkerh JP, Ceni C, Auld DS, Vaillancourt F, Dorval G, Barker PA. p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. *EMBO Rep.* Oct 2005, Vol. 6, 10, pp. 936-41.

114. **Mayer N, Lembeck F, Goedert M, Otten U.** Effects of antibodies against nerve growth factor on the postnatal development of substance P-containing sensory neurons. *Neurosci Lett.* Mar 1982, Vol. 29, 1, pp. 47-52.

115. Lindsay RM, Harmar AJ. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature*. Jan 1989, Vol. 337, 6205, pp. 362-4.

116. **Donnerer J, Schuligoi R, Stein C.** Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience*. Aug 1992, Vol. 49, 3, pp. 693-8.

117. Olgart Höglund C, de Blay F, Oster JP, Duvernelle C, Kassel O, Pauli G, Frossard N. Nerve growth factor levels and localisation in human asthmatic bronchi. *Eur Respir J*. Nov 2002, 20 (5), pp. 1110-6.

118. **Braun A, Appel E, Baruch R, Herz U, Botchkarev V, Paus R, Brodie C, Renz H.** Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur J Immunol.* Oct 1998, 28 (10), pp. 3240-51.

119. Noga O, Englmann C, Hanf G, Grützkau A, Seybold J, Kunkel G. The production, storage and release of the neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. *Clin Exp Allergy*. May 2003, 33(5, pp. 649-54.

120. Hahn C, Islamian AP, Renz H, Nockher WA. Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* Apr 2006, Vol. 117, 4, pp. 787-94.

121. Kassel O, de Blay F, Duvernelle C, Olgart C, Israel-Biet D, Krieger P, Moreau L, Muller C, Pauli G, Frossard N. Local increase in the number of mast cells and expression of nerve growth factor in the bronchus of asthmatic patients after repeated inhalation of allergen at low-dose. *Clin Exp Allergy*. Sep 2001, 31 (9), pp. 1432-40.

122. **Olgart C, Frossard N.** Human lung fibroblasts secrete nerve growth factor: effect of inflammatory cytokines and glucocorticoids. *Eur Respir J.* Jul 2001, Vol. 18, 1, pp. 115-21.

123. Fox AJ, Patel HJ, Barnes PJ, Belvisi MG. Release of nerve growth factor by human pulmonary epithelial cells: role in airway inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol*. Jul 2001, Vol. 424, 2, pp. 159-62.
124. **Pons F, Freund V, Kuissu H, Mathieu E, Olgart C, Frossard N.** Nerve growth factor secretion by human lung epithelial A549 cells in pro- and anti-inflammatory conditions. *Eur J Pharmacol.* Oct 2001, Vol. 428, 3, pp. 365-9.

125. Freund V, Pons F, Joly V, Mathieu E, Martinet N, Frossard N. Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions. *Eur Respir J.* Aug 2002, 20 (2), pp. 458-63.

126. Brodie C, Goldreich N, Haiman T, Kazimirsky G. Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion. *J Neuroimmunol.* Jan 1998, Vol. 81, 1-2, pp. 20-30.

127. Hattori A, Iwasaki S, Murase K, Tsujimoto M, Sato M, Hayashi K, Kohno M. Tumor necrosis factor is markedly synergistic with interleukin 1 and interferon-gamma in stimulating the production of nerve growth factor in fibroblasts. *FEBS Lett.* Mar 1994, Vol. 340, 3, pp. 177-80.

128. Virchow JC, Julius P, Lommatzsch M, Luttmann W, Renz H, Braun A. Neurotrophins Are Increased in Bronchoalveolar Lavage Fluid after Segmental Allergen Provocation. *Am J Respir Crit Care Med.* Dec 1998, 158 (6), pp. 2002-5.

129. Rost B, Hanf G, Ohnemus U, Otto-Knapp R, Groneberg DA, Kunkel G, Noga O. Monocytes of allergics and non-allergics produce, store and release the neurotrophins NGF, BDNF and NT-3. *Regul Pept*. Jan 2005, Vol. 124, 1-3, pp. 19-25.

130. Bonini S, Lambiase A, Bonini S, Angelucci F, Magrini L, Manni L, Aloe L. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc Natl Acad Sci.* Oct 1996, 93 (20), pp. 10955-60.

131. Mazurek, N., Weskamp, G., Erne, P. and Otten, U. Nerve growth factor induces mast cell degranulation without changing intracellular calcium levels. *FEBS Lett.* 1986, 198, pp. 315–320.

132. Freund-Michel V, Bertrand C, Frossard N. TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle cell proliferation. *Cell Signal.* May 2006, 18 (5), pp. 621-7.

133. Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Tosco R, Petrelli L, Leon A. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci.* 1996, 19, pp. 514–20.

134. Dinh QT, Groneberg DA, Peiser C, Springer J, Joachim RA, Arck PC, Klapp BF, Fischer A. Nerve growth factor-induced substance P in capsaicin-insensitive vagal neurons innervating the lower mouse airway. *Clin Exp Allergy*. Sep 2004, Vol. 34, 9, pp. 1474-9.

135. **Wu ZX, Dey RD.** Nerve growth factor-enhanced airway responsiveness involves substance P in ferret intrinsic airway neurons. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Jul 2006, Vol. 291, 1, pp. L111-8.

136. De Vries A, van Rijnsoever C, Engels F, Henricks PA, Nijkamp FP. The role of sensory nerve endings in nerve growth factor-induced airway hyperresponsiveness to histamine in guinea-pigs. *Br J Pharmacol*. Oct 2001, Vol. 134, 4, pp. 771-6.

137. **Hazari MS, Pan JH, Myers AC.** Nerve growth factor acutely potentiates synaptic transmission in vitro and induces dendritic growth in vivo on adult neurons in airway parasympathetic ganglia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Apr 2007, Vol. 292, 4, pp. L992-1001.

138. **De Vries A, Engels F, Henricks PA, Leusink-Muis T, Fischer A, Nijkamp FP.** Antibodies directed against nerve growth factor inhibit the acute bronchoconstriction due to allergen challenge in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy*. Feb 2002, 32 (2), pp. 325-8.

139. Tokuoka S, Takahashi Y, Masuda T, Tanaka H, Furukawa S, Nagai H. Disruption of antigen-induced airway inflammation and airway hyper-responsiveness in low affinity neurotrophin receptor p75 gene deficient mice. *Br J Pharmacol.* Dec 2001, Vol. 134, 7, pp. 1580-6.

140. Kerzel S, Päth G, Nockher WA, Quarcoo D, Raap U, Groneberg DA, Dinh QT, Fischer A, Braun A, Renz H. Pan-neurotrophin receptor p75 contributes to neuronal hyperreactivity and airway inflammation in a murine model of experimental asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Feb 2003, 28 (2), pp. 170-8.

141. Noga O, Hanf G, Schäper C, O'Connor A, Kunkel G. The influence of inhalative corticosteroids on circulating Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 in allergic asthmatics. *Clin Exp Allergy*. Dec 2001, Vol. 31, 12, pp. 1906-12.

142. Noga O, Hanf G, Görges D, Dinh QT, Groneberg DA, Suttorp N, Kunkel G. Regulation of NGF and BDNF by dexamethasone and theophylline in human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. *Regul Pept*. Dec 2005, Vol. 132, 1-3, pp. 74-9.

143. **Szelenyi, I.** Animal models of bronchial asthma. *Inflamm Res.* Dec 2000, Vol. 49, 12, pp. 639-54.

144. **Karol, MH.** Animal models of occupational asthma. *Eur Respir J.* Mar 1994, Vol. 7, 3, pp. 555–568.

145. **Canning BJ, Chou Y.** Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. *Pulm Pharmacol Ther.* Oct 2008, Vol. 21, 5, pp. 702-20.

146. Ricciardolo FL, Nijkamp F, De Rose V, Folkerts G. The guinea pig as an animal model for asthma. *Curr Drug Targets*. Jun 2008, Vol. 9, 6, pp. 452-65.

147. Tschernig T, Neumann D, Pich A, Dorsch M, Pabst R. Experimental bronchial asthma - the strength of the species rat. *Curr Drug Targets*. Jun 2008, Vol. 9, 6, pp. 466-9.

148. Kucharewicz I, Bodzenta-Łukaszyk A, Buczko W. Experimental asthma in rats. *Pharmacol Rep.* Nov-Dec 2008, Vol. 60, 6, pp. 783-8.

149. Lommatzsch M, Braun A, Renz H. Neurotrophins in allergic airway dysfunction: what the mouse model is teaching us. *Ann N Y Acad Sci.* May 2003, Vol. 992, pp. 241-9.

150. Bates JH, Rincon M, Irvin CG. Animal models of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Sep 2009, Vol. 297, 3, pp. L401-10.

151. **Bice DE, Seagrave J, Green FH.** Animal models of asthma: potential usefulness for studying health effects of inhaled particles. *Inhal Toxicol.* Sep 2000, Vol. 12, 9, pp. 829-62.

152. **Kurucz I, Szelenyi I.** Current animal models of bronchial asthma. *Curr Pharm Des.* 2006, Vol. 12, 25, pp. 3175-94.

153. **Canning, BJ.** Modeling asthma and COPD in animals: a pointless exercise? *Curr Opin Pharmacol.* Jun 2003, Vol. 3, 3, pp. 244-50.

154. Köbbert C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S. Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol*. Nov 2000, Vol. 62, 4, pp. 327-51.

155. Myers AC, Kajekar R, Undem BJ. Allergic inflammation-induced neuropeptide production in rapidly adapting afferent nerves in guinea pig airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Apr 2002, Vol. 282, 4, pp. L775-81.

156. Sanjar S, Aoki S, Kristersson A, Smith D, Morley J. Antigen challenge induces pulmonary airway eosinophil accumulation and airway hyperreactivity in sensitized guineapigs: the effect of anti-asthma drugs. *Br J Pharmacol.* Apr 1990, Vol. 99, 4, pp. 679-86.

157. Conrad ML, Yildirim AO, Sonar SS, Kiliç A, Sudowe S, Lunow M, Teich R, Renz H, Garn H. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy*. Aug 2009, Vol. 39, 8, pp. 1246-54.

158. Kasahara DI, Perini A, Lopes FD, Arantes-Costa FM, Martins MA, Nunes MP. Effect of salbutamol on pulmonary responsiveness in chronic pulmonary allergic inflammation in guinea pigs. *Braz J Med Biol Res.* May 2005, Vol. 38, 5, pp. 723-30.

159. Van Hove CL, Maes T, Joos GF, Tournoy KG. Prolonged inhaled allergen exposure can induce persistent tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol.* May 2007, Vol. 36, 5, pp. 573-84.

160. **Kumar RK, Foster PS.** Modeling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Sep 2002, Vol. 27, 3, pp. 267-72.

161. **Zosky GR, Sly PD.** Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. Jul 2007, Vol. 37, 7, pp. 973-88.

162. Tibério IF, Turco GM, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva SO, do Patrocínio M, Warth TN, Lapa e Silva JR, Saldiva PH, Martins MA. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med.* May 1997, Vol. 155, 5, pp. 1739-47.

163. Leick-Maldonado EA, Kay FU, Leonhardt MC, Kasahara DI, Prado CM, Fernandes FT, Martins MA, Tibério IF. Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatments in an experimental model of chronic airway inflammation in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy*. Jan 2004, Vol. 34, 1, pp. 145-52.

164. Starling CM, Prado CM, Leick-Maldonado EA, Lanças T, Reis FG, Aristóteles LR, Dolhnikoff M, Martins MA, Tibério IF. Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates lung tissue responsiveness and remodeling in a model of chronic pulmonary inflammation in guinea pigs. *Respir Physiol Neurobiol.* Feb 2009, Vol. 165, 2-3, pp. 185-94.

165. Chuaychoo B, Hunter DD, Myers AC, Kollarik M, Undem BJ. Allergen-induced substance P synthesis in large-diameter sensory neurons innervating the lungs. *J Allergy Clin Immunol*. Aug 2005, Vol. 116, 2, pp. 325-31.

166. **Kumar RK, Foster PS.** Murine model of chronic human asthma. *Immunol Cell Biol.* Apr 2001, Vol. 79, 2, pp. 141-4.

167. Hutson PA, Church MK, Clay TP, Miller P, Holgate ST. Early and late-phase bronchoconstriction after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. I. The association of disordered airway physiology to leukocyte infiltration. *Am Rev Respir Dis.* Mar 1988, Vol. 137, 3, pp. 548-57.

168. Li L, Kong L, Fang X, Jiang C, Wang Y, Zhong Z, Sun Q, Gu G, Zheng D, Meng R, Kang J. SH2-B beta expression in alveolar macrophages in BAL fluid of asthmatic guinea pigs and its role in NGF-TrkA-mediated asthma. *Respirology*. Jan 2009, Vol. 14, 1, pp. 60-8.

169. Gosens R, Bos IS, Zaagsma J, Meurs H. Protective effects of tiotropium bromide in the progression of airway smooth muscle remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* May 2005, Vol. 171, 10, pp. 1096-102.

170. Bos IS, Gosens R, Zuidhof AB, Schaafsma D, Halayko AJ, Meurs H, Zaagsma J. Inhibition of allergen-induced airway remodelling by tiotropium and budesonide: a comparison. *Eur Respir J*. Oct 2007, Vol. 30, 4, pp. 653-61.

171. Bazán-Perkins B, Sánchez-Guerrero E, Vargas MH, Martínez-Cordero E, Ramos-Ramírez P, Alvarez-Santos M, Hiriart G, Gaxiola M, Hernández-Pando R. Beta1integrins shedding in a guinea-pig model of chronic asthma with remodelled airways. *Clin Exp Allergy*. May 2009, Vol. 39, 5, pp. 740-51.

172. **Dunn CJ, Elliott GA, Oostveen JA, Richards IM.** Development of a prolonged eosinophil-rich inflammatory leukocyte infiltration in the guinea-pig asthmatic response to ovalbumin inhalation. *Am Rev Respir Dis.* Mar 1988, Vol. 137, 3, pp. 541-7.

173. Ruiz Schütz VC, Drewiacki T, Nakashima AS, Arantes-Costa FM, Prado CM, Kasahara DI, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Tibério IF. Oral tolerance attenuates airway inflammation and remodeling in a model of chronic pulmonary allergic inflammation. *Respir Physiol Neurobiol.* Jan 2009, Vol. 165, 1, pp. 13-21.

174. Braun A, Lommatzsch M, Mannsfeldt A, Neuhaus-Steinmetz U, Fischer A, Schnoy N, Lewin GR, Renz H. Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Oct 1999, Vol. 21, 4, pp. 537-46.

175. **Ouyang RY, Hu CP, Zhu JQ, Huang XG.** Changes of nerve growth factor and its receptors in the lung tissues in asthmatic rats and their effects on the airway inflammation. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* Dec 2005, Vol. 30, 6, pp. 660-5.

176. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barnéon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med.* Oct 1990, Vol. 323, 15, pp. 1033-9.

177. Howarth PH, Wilson J, Djukanovic R, Wilson S, Britten K, Walls A, Roche WR, Holgate ST. Airway inflammation and atopic asthma: a comparative bronchoscopic investigation. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991, Vol. 94, 1-4, pp. 266-9.

178. Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* Nov 1996, Vol. 154, 5, pp. 1505-10.

179. **Smith, H.** Asthma, inflammation, eosinophils and bronchial hyperresponsiveness. *Clin Exp Allergy*. Feb 1992, Vol. 22, 2, pp. 187-97.

180. Saetta M, Maestrelli P, Di Stefano A, De Marzo N, Milani GF, Pivirotto F, Mapp CE, Fabbri LM. Effect of cessation of exposure to toluene diisocyanate (TDI) on bronchial mucosa of subjects with TDI-induced asthma. *Am Rev Respir Dis.* Jan 1992, Vol. 145, 1, pp. 169-74.

181. Sutherland ER, Martin RJ, Bowler RP, Zhang Y, Rex MD, Kraft M. Physiologic correlates of distal lung inflammation in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* Jun 2004, Vol. 113, 6, pp. 1046-50.

182. **Kraft, M.** The distal airways: are they important in asthma? *Eur Respir J.* Dec 1999, Vol. 14, 6, pp. 1403-17.

183. Crump JW, Pueringer RJ, Hunninghake GW. Bronchoalveolar lavage and lymphocytes in asthma. *Eur Respir J Suppl.*. Apr 1991, 13, pp. 39s-46s.

184. Mengelers HJ, Maikoe T, Brinkman L, Hooibrink B, Lammers JW, Koenderman L. Immunophenotyping of eosinophils recovered from blood and BAL of allergic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med.* Feb 1994, Vol. 149, (2 Pt 1), pp. 345-51.

185. Xiang L, Guo DY, Jiang ZF, Liu SY, Xiong ZY. Effects of budesonide on chronic airway inflammation in guinea pigs sensitized with repeated exposure to allergen. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. Jun 2005, Vol. 43, 6, pp. 414-7.

186. **Snella MC, Venaille T, Holt P, Rylander R.** Interstitial and free lung cells in acute inflammation in the guinea-pig. *Agents Actions*. Dec 1987, Vol. 22, 3-4, pp. 261-9.

187. Amann R, Peskar BA, Schuligoi R. Effects of terbutaline on NGF formation in allergic inflammation of the rat. *Br J Pharmacol.* May 2001, Vol. 133, 1, pp. 186-92.

188. Macedo P, Hew M, Torrego A, Jouneau S, Oates T, Durham A, Chung KF. Inflammatory biomarkers in airways of patients with severe asthma compared with non-severe asthma. *Clin Exp Allergy*. Nov 2009, Vol. 39, 11, pp. 1668-76.

189. Schwarz MA, Fisher D, Bradshaw RA, Isackson PJ. Isolation and sequence of a cDNA clone of beta-nerve growth factor from the guinea pig prostate gland. *J Neurochem*. Apr 1989, Vol. 52, 4, pp. 1203-9.

190. Chung YJ, Farraj A, Coates NH, Gavett SH, Ward MD. Increased neurotrophin production in a Penicillium chrysogenum-induced allergic asthma model in mice. *J Toxicol Environ Health A*. Jun 2007, Vol. 70, 12, pp. 1020-6.

191. —. Increased neurotrophin production in a Penicillium chrysogenum-induced allergic asthma model in mice. *J Toxicol Environ Health A*. Jun 2007, Vol. 70, 12, pp. 1020-6.

192. Riccio MM, Kummer W, Biglari B, Myers AC, Undem BJ. Interganglionic segregation of distinct vagal afferent fibre phenotypes in guinea-pig airways. *J Physiol*. Oct 1996, Vol. 496, 2, pp. 521-30.

193. Carr MJ, Hunter DD, Jacoby DB, Undem BJ. Expression of tachykinins in nonnociceptive vagal afferent neurons during respiratory viral infection in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med.* Apr 2002, Vol. 165, 8, pp. 1071-5.

194. Dinh QT, Mingomataj E, Quarcoo D, Groneberg DA, Witt C, Klapp BF, Braun A, Fischer A. Allergic airway inflammation induces tachykinin peptides expression in vagal

sensory neurons innervating mouse airways. *Clin Exp Allergy*. Jun 2005, Vol. 35, 6, pp. 820-5.

195. Hunter DD, Satterfield BE, Huang J, Fedan JS, Dey RD. Toluene diisocyanate enhances substance P in sensory neurons innervating the nasal mucosa. *Am J Respir Crit Care Med.* Feb 2000, Vol. 161, 2 Pt 1, pp. 543-9.

196. Köbbert C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S. Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol*. Nov 2000, Vol. 62, 4, pp. 327-51.

197. **Mazzone SB, McGovern AE.** Immunohistochemical characterization of nodose cough receptor neurons projecting to the trachea of guinea pigs. *Cough.* Oct 2008, Vol. 4, 9.

198. Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Oct 2009, Vol. 10, 10, pp. 682-96.

199. Vale, RD. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*. Feb 2003, Vol. 112, 4, pp. 467-80.

200. Krishna MT, Springall D, Meng QH, Withers N, Macleod D, Biscione G, Frew A, Polak J, Holgate S. Effects of ozone on epithelium and sensory nerves in the bronchial mucosa of healthy humans. *Am J Respir Crit Care Med.* Sep 1997, Vol. 156, 3 Pt 1, pp. 943-50.

201. Hu P, McLachlan EM. Distinct sprouting responses of sympathetic and peptidergic sensory axons proximal to a sciatic nerve transection in guinea pigs and rats. *Neurosci Lett.* Dec 2000, Vol. 295, 1-2, pp. 59-63.

202. Khorooshi MH, Hansen BF, Keeling JW, Nolting DS, Kjaer IM. p75NGFR immunoreactivity in normal prenatal human dorsal root ganglia. *Pediatr Neurol*. Nov 2001, Vol. 25, 5, pp. 401-4.

203. Garcia-Suarez O, Naves FJ, Del Valle ME, Esteban I, Bronzetti E, Vazquez E, Vega JA. Distribution of p75 and trk-neurotrophin receptor proteins in adult human sympathetic ganglia. *Anat Embryol (Berl)*. Jun 1996, Vol. 193, 6, pp. 577-83.

204. Yamamoto M, Sobue G, Li M, Arakawa Y, Mitsuma T, Kimata K. Nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and low-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR) mRNA levels in cultured rat Schwann cells; differential time- and dose-dependent regulation by cAMP. *Neurosci Lett.* Apr 1993, Vol. 152, 1-2, pp. 37-40.

205. Verge VM, Merlio JP, Grondin J, Ernfors P, Persson H, Riopelle RJ, Hökfelt T, Richardson PM. Colocalization of NGF binding sites, trk mRNA, and low-affinity NGF receptor mRNA in primary sensory neurons: responses to injury and infusion of NGF. *J Neurosci.* Oct 1992, Vol. 12, 10, pp. 4011-22.

206. Bergman E, Johnson H, Zhang X, Hökfelt T, Ulfhake B. Neuropeptides and neurotrophin receptor mRNAs in primary sensory neurons of aged rats. *J Comp Neurol*. Nov 1996, Vol. 375, 2, pp. 303-19.

207. Sugiura A, Ohtori S, Yamashita M, Inoue G, Yamauchi K, Koshi T, Suzuki M, Norimoto M, Orita S, Eguchi Y, Takahashi Y, Watanabe TS, Ochiai N, Takaso M, Takahashi K. Existence of nerve growth factor receptors, tyrosine kinase a and p75 neurotrophin receptors in intervertebral discs and on dorsal root ganglion neurons innervating intervertebral discs in rats. *Spine (Phila Pa 1976)*. Sep 2008, Vol. 33, 19, pp. 2047-51.

208. Jacobs JS, Miller MW. Expression of nerve growth factor, p75, and the high affinity neurotrophin receptors in the adult rat trigeminal system: evidence for multiple trophic support systems. *J Neurocytol.* Jul 1999, Vol. 28, 7, pp. 571-95.

209. Ichinose M, Nakajima N, Takahashi T, Yamauchi H, Inoue H, Takishima T. Protection against bradykinin-induced bronchoconstriction in asthmatic patients by neurokinin receptor antagonist. *Lancet*. Nov 1992, Vol. 340, 8830, pp. 1248-51.

210. Schelfhout V, Van De Velde V, Maggi C, Pauwels R, Joos G. The effect of the tachykinin NK(2) receptor antagonist MEN11420 (nepadutant) on neurokinin A-induced bronchoconstriction in asthmatics. *Ther Adv Respir Dis.* Oct 2009, Vol. 3, 5, pp. 219-26.

211. Joos GF, Vincken W, Louis R, Schelfhout VJ, Wang JH, Shaw MJ, Cioppa GD, Pauwels RA. Dual tachykinin NK1/NK2 antagonist DNK333 inhibits neurokinin A-induced bronchoconstriction in asthma patients. *Eur Respir J.* Jan 2004, Vol. 23, 1, pp. 76-81.

212. Van Schoor J, Joos GF, Chasson BL, Brouard RJ, Pauwels RA. The effect of the NK2 tachykinin receptor antagonist SR 48968 (saredutant) on neurokinin A-induced bronchoconstriction in asthmatics. *Eur Respir J*. Jul 1998, Vol. 12, 1, pp. 17-23.

213. Boot JD, de Haas S, Tarasevych S, Roy C, Wang L, Amin D, Cohen J, Sterk PJ, Miller B, Paccaly A, Burggraaf J, Cohen AF, Diamant Z. Effect of an NK1/NK2 receptor antagonist on airway responses and inflammation to allergen in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* Mar 2007, Vol. 175, 5, pp. 450-7.

214. Fahy JV, Wong HH, Geppetti P, Reis JM, Harris SC, Maclean DB, Nadel JA, Boushey HA. Effect of an NK1 receptor antagonist (CP-99,994) on hypertonic saline-induced bronchoconstriction and cough in male asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* Sep 1995, Vol. 152, 3, pp. 879-84.

215. Ichinose M, Miura M, Yamauchi H, Kageyama N, Tomaki M, Oyake T, Ohuchi Y, Hida W, Miki H, Tamura G, Shirato K. A neurokinin 1-receptor antagonist improves

exercise-induced airway narrowing in asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med.* Mar 1996, Vol. 153, 3, pp. 936-41.

216. Joos GF, Van Schoor J, Kips JC, Pauwels RA. The effect of inhaled FK224, a tachykinin NK-1 and NK-2 receptor antagonist, on neurokinin A-induced bronchoconstriction in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med.* Jun 1996, Vol. 153, 6 Pt 1, pp. 1781-4.

217. Sutton S, Clutterbuck A, Harris P, Gent T, Freeman S, Foster N, Barrett-Jolley R, Mobasheri A. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J*. Jan 2009, Vol. 179, 1, pp. 10-24.

218. **Hendrix S, Peters EM.** Neuronal plasticity and neuroregeneration in the skin -- the role of inflammation. *J Neuroimmunol*. Mar 2007, Vol. 184, 1-2, pp. 113-26.

219. Margolis KG, Gershon MD. Neuropeptides and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol.* Nov 2009, Vol. 25, 6, pp. 503-11.

220. **Callsen-Cencic P, Mense S.** Expression of neuropeptides and nitric oxide synthase in neurones innervating the inflamed rat urinary bladder. *J Auton Nerv Syst.* Jul 1997, Vol. 65, 1, pp. 33-44.

221. Walsh DA, F McWilliams D. Tachykinins and the cardiovascular system. *Curr Drug Targets*. Aug 2006, Vol. 7, 8, pp. 1031-42.

222. Seidel MF, Herguijuela M, Forkert R, Otten U. Nerve growth factor in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* Oct 2010, Vol. 40, 2, pp. 109-26.

223. **Mirowska-Guzel, D.** The role of neurotrophic factors in the pathology and treatment of multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2009, Vol. 31, 1, pp. 32-8.

224. **Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK.** Role of NGF and neurogenic inflammation in the pathogenesis of psoriasis. *Prog Brain Res.* 2004, Vol. 146, pp. 433-7.

225. Quartara L, Altamura M, Evangelista S, Maggi CA. Tachykinin receptor antagonists in clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs*. Dec 2009, Vol. 18, 12, pp. 1843-64.

226. Rotzinger S, Lovejoy DA, Tan LA. Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety. *Peptides*. Apr 2010, Vol. 31, 4, pp. 736-56.

227. Fischer, MJ. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonists for migraine. *Expert Opin Investig Drugs*. Jul 2010, Vol. 19, 7, pp. 815-23.

228. Groneberg DA, Quarcoo D, Frossard N, Fischer A. Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases. *Allergy*. Nov 2004, Bd. 59, 11, S. 1139-52.

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A. Fischer für die enge persönliche Betreuung bei der Planung und Durchführung der Tierversuche sowie der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Sebastian Regus danke ich für seine außergewöhnliche Hilfe bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Tierversuche sowie für die sehr hilfreiche Korrektur dieser Arbeit.

Für die sehr lehrreiche und geduldige Unterstützung im Labor möchte ich insbesondere Frau L. Kirchhof und Frau L. Cifuentes herzlich danken.

Ganz spezieller Dank gebührt Frau Nadine Dannemann für die intensive Korrektur dieser Arbeit mit vielen wertvollen Hinweisen.

LEBENSLAUF

Aus Gründen des Datenschutzes wird der Lebenslauf an dieser Stelle nicht veröffentlicht.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

"Ich, Tilman Hottenrott, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "*Neurogene Entzündung in einem neuen chronischen Tiermodell für allergisches Asthma bronchiale*" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

Berlin, den

Unterschrift