

Aus der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. VIRCHOW

Über die Regulation des Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) bei akuten Infektionen der unteren Atemwege

Eine klinisch-experimentelle Studie

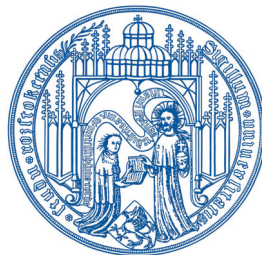
Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae
[Dr. med.]

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock



von

Anke Edner geb. Niewerth aus Gronau/Westf.
Potsdam 2009

Einreichungsdatum: 24.02.2009

Verteidigungsdatum: 17.11.2009

Dekan: Prof. Dr. med. habil. E. C. Reisinger

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. habil. J. Chr. Virchow
Direktor der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Podbielski
Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

3. PD Dr. rer. nat. A. Braun
Abteilungsleiter Immunologie, Allergologie und Immuntoxikologie des
Fraunhofer-Instituts für Toxikologie und Experimentelle Medizin Hannover

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	4
1.1. Postinfektiöse Hyperreagibilität der Atemwege.....	4
1.2. Neuronale Aktivität und Entzündung	4
1.2.1. Innervation der Atemwege	4
1.2.2. Veränderte neuronale Funktionen in der Atemwegsentszündung.....	9
1.2.3. Neurotrophine als Ursache veränderter neuronaler Funktionen	9
1.3. Das Neurotrophin BDNF als Mediator in Entzündungsprozessen	10
1.3.1. BDNF-Produktion durch Leukozyten.....	10
1.3.2. BDNF als Thrombozytenmediator	11
1.4. Thrombozyten als Entzündungszellen.....	12
1.4.1. Aufbau von Thrombozyten.....	12
1.4.2. Funktion von Thrombozyten.....	13
1.4.3. Thrombozyten in der Entzündung	14
1.4.4. Thrombozyten-BDNF und Entzündung	16
1.5. Fragestellungen	17
2. MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1. Studiendesign	18
2.1.1. Rekrutierung von Probanden und Patienten	18
2.1.2. Ablauf der Studie	19
2.1.3. Votum der Ethikkommission.....	20
2.2. Blutentnahme	20
2.3. Herstellung von Serum und Plasma.....	22

2.4. Aufreinigung der Leukozyten	22
2.4.1. Separation mononukleärer Zellen aus EDTA-Blut.....	22
2.4.2. Zellzählung.....	25
2.5. Zellkultur	26
2.6. Durchflusszytometrie (FACS)	28
2.7. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	32
2.8. Messungen im Zentrallabor	37
2.9. Statistik.....	37
3. ERGEBNISSE.....	38
3.1. Charakteristika der Studienteilnehmer	38
3.2. Klinische Chemie	40
3.2.1. Blutbild.....	40
3.2.2. Entzündungsparameter.....	42
3.3. BDNF und weitere Thrombozytenmediatoren	44
3.4. Korrelationen.....	48
3.4.1. Korrelation von BDNF mit anderen Thrombozytenmediatoren	48
3.4.2. Korrelation von Thrombozytenmediatoren mit Entzündungsparametern	48
3.4.3. Korrelation von Thrombozytenmediatoren mit Leukozyten.....	48
3.4.4. Korrelation mit klinischen Parametern.....	50
3.5. Zellkultur.....	50
3.5.1. Bestimmung der Monozytenzahl und des Anteiles toter Zellen	50
3.5.2. BDNF-Sekretion mononukleärer Zellen von Patienten/ Probanden.	51
3.5.3. Einfluss von Medikamenten auf die BDNF-Sekretion	52

4. DISKUSSION	55
4.1. Veränderungen der BDNF-Konzentration im Serum, Plasma und in Thrombozyten	56
4.1.1. BDNF-Regulation in Thrombozyten und im Serum	57
4.1.2. Regulation anderer Thrombozytenmediatoren	58
4.1.3. Thrombozytäres BDNF in der Lunge.....	61
4.1.4. BDNF-Freisetzung aus Leukozyten	63
4.2. BDNF-Freisetzung aus PBMC nach Stimulation mit Salmeterol, Fluticason und Prednisolon	64
4.3. Zusammenfassung und Hypothese	65
5. ZUSAMMENFASSUNG	67
6. LITERATURVERZEICHNIS	68
7. ANHANG	74
7.1. Abkürzungsverzeichnis	74
7.2. Abbildungsverzeichnis	76
7.3. Tabellenverzeichnis	77
7.4. Publikationsverzeichnis	78
7.5. Eidesstattliche Erklärung	79
8.THESEN	80

1. EINLEITUNG

1.1. Postinfektiöse Hyperreagibilität der Atemwege

Nach einer Infektion der unteren Atemwege kommt es bei einem erheblichen Prozentsatz der Patienten zu einem Husten und einer Atemwegshyperreagibilität, die weit über das akute Geschehen hinaus anhält. Postinfektiöser Husten, der länger als 3 Wochen persistierte, wurde von Kwon et al. bei 48% der von ihm untersuchten Patienten gefunden. Damit waren Atemwegsentzündungen die häufigste Ursache für „subakuten“ Husten ¹. Braman et al. zeigten in einer retrospektiven Studie, dass postinfektiöser Husten oft vergesellschaftet ist mit vermehrter bronchialer Drüsensekretion und Atemwegshyperreagibilität ². In einer epidemiologischen Studie an Patienten mit akuter Bronchitis zeigten Boldy et al., dass 37% dieser Patienten noch 6 Wochen nach Abklingen der Bronchitis unter einer bronchialen Hyperreagibilität litten ³.

Die Ursachen hierfür scheinen unter anderem in Veränderungen der Nervenaktivität durch die vorangegangene Entzündung zu liegen. Die Mechanismen dieser veränderten neuronalen Aktivität sind bislang jedoch kaum verstanden ^{4,5}. Kandidaten für die Vermittlung nachhaltiger neuronaler Veränderungen bzw. neuronaler Plastizität sind Nervenwachstumsfaktoren, die sogenannten Neurotrophine. Bevor wir diese jedoch betrachten, soll die Innervation der Lunge und der Begriff der neuronalen Plastizität rekapituliert werden.

1.2. Neuronale Aktivität und Entzündung

1.2.1. Innervation der Atemwege

Die Kontrolle der glatten Atemwegsmuskulatur erfolgt über sympathische und parasympathische Nerven ⁶. Der Einfluss der sympathischen Nerven auf die Atemwegsweite ist indirekt, nämlich durch die Kontrolle des Gefäßtonus und die Aktivierung parasympathischer Ganglien. Hingegen innervieren parasympathische Nerven die glatte Atemwegsmuskulatur direkt (**Abb. 1**). Parasympathische Nerven

können sowohl Bronchokonstriktion als auch Dilatation hervorrufen. Die dilatatorische Wirkung kommt durch non-cholinerge Mechanismen zustande, unter anderem durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO). Die dominante konstriktorische Wirkung des Parasympathikus wird jedoch cholinerg übermittelt.

Die Schlüsselstellung der parasympathischen Innervation nehmen parasympathische Ganglien ein, die in der Atemwegswand lokalisiert sind. Kurze postganglionäre Fasern dieser Ganglien versorgen glatte Muskelzellen der Atemwege, submuköse Drüsen und Blutgefäße. Postganglionäre cholinerge Fasern setzen den Mediator Acetylcholin frei, was sowohl zu Obstruktion der kleinen Bronchi und Bronchioli führt, als auch zu einem erhöhten Atemwegswiderstand, zu einer Stimulation der Zilienbeweglichkeit und zu einer Freisetzung von Sekret aus submukösen Drüsen. *In vitro* führt die Aktivierung dieser Nerven zu einer fast maximalen Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur. Dies lässt vermuten, dass die cholinergen postganglionären Fasern eine zentrale Rolle in der Regulation der glatten Atemwegsmuskulatur spielen. Parasympathische Ganglien werden von präganglionären parasympathischen Nerven beeinflusst. Diese erreichen die Atemwege über den Nervus recurrens und den Nervus laryngeus superior (tracheale Ganglien) sowie über den Nervus vagus (bronchiale Ganglien). Auch sensorische Nervenendigungen, deren Impulse größtenteils durch ganglionäre Neurokinin-3-Rezeptoren vermittelt werden⁷, wirken auf die parasympathischen Ganglien ein. Es wird deutlich, dass parasympathische Ganglien der Atemwegswände als neuronale Schnittstellen fungieren, welche sensorische, sympathische und parasympathische Reflexwege der Lunge integrieren.

Der Effekt von Acetylcholin in den Atemwegen wird über Muskarinrezeptoren vermittelt⁴. Bislang konnten fünf Subtypen gefunden werden, die als M1 - M5 bezeichnet werden. Die Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur wird hauptsächlich von M3-Rezeptoren übermittelt, welche außerdem die Vasodilatation und die Drüsensekretion vermitteln. M1-Rezeptoren werden in parasympathischen Ganglien exprimiert und beeinflussen wahrscheinlich die cholinerge Neurotransmission. Hingegen werden M2-Rezeptoren auf postganglionären cholinergen Nerven gefunden. Man nimmt an, dass sie als inhibitorische oder Autorezeptoren fungieren, da ihre Aktivierung die Ausschüttung von Acetylcholin aus

cholinergen Neuronen verhindert. Es wird daher postuliert, dass die Aktivierung der Rezeptoren M1 und M3 eine Atemwegobstruktion und vermehrte Drüsensekretion vermittelt. Die M2-Rezeptoren haben im Gegensatz dazu antiobstruktive Eigenschaften, indem sie die Freisetzung von Acetylcholin herabsetzen und dadurch die Kontraktion der glatten Atemwegmuskulatur und die Schleimproduktion vermindern.

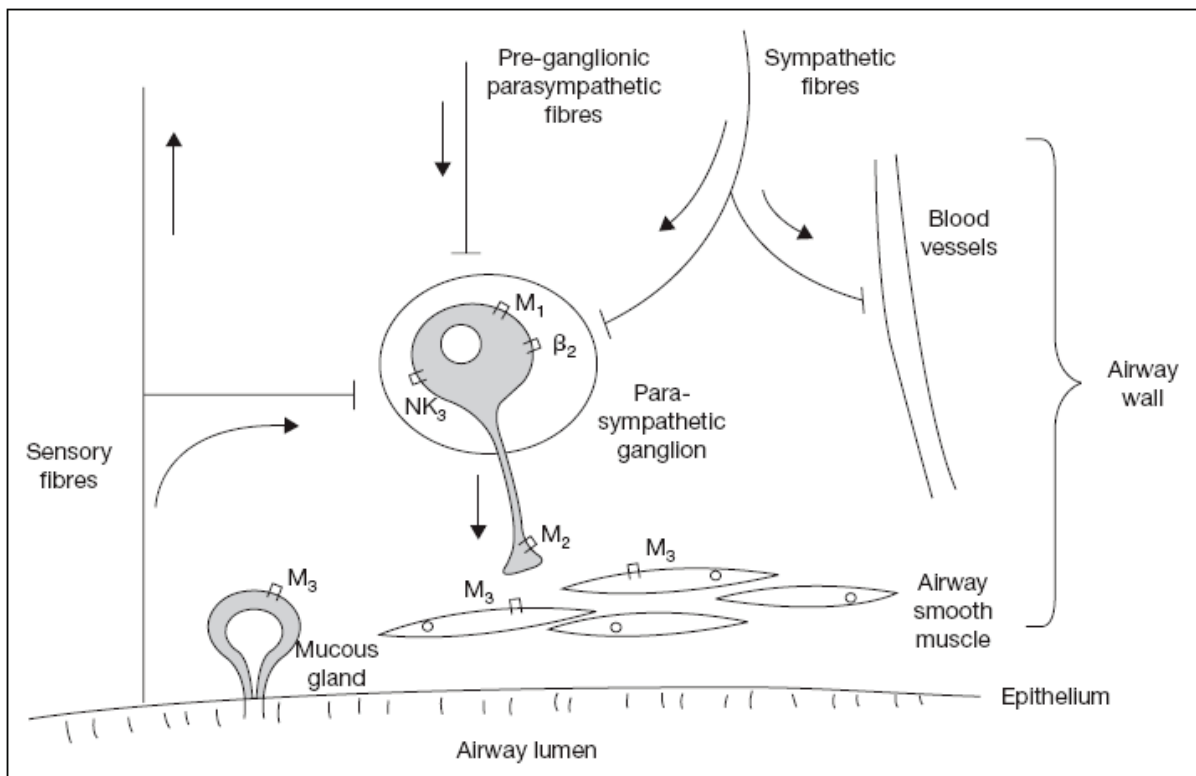


Abb. 1: Parasympathische Ganglien als neuronale Schaltstellen der Atemwege

Aus: Virchow JC, Lommatzsch M. Anticholinergic agents in asthma. Therapeutic Strategies in Asthma: Current Treatments (Hrsg: Polosa & Holgate). 2007. Seiten 79-90. Altas Medical Publishing Ltd., Oxford, UK.

In der Lunge kommen neben den klassischen motorischen Neuronen auch sogenannte „non-adrenerge, non-cholinerge (NANC)“ – Neurone vor, die sich vor allem der Neuropeptide als Transmitter bedienen. Eine strikte anatomische Trennung von den klassischen motorischen Neuronen ist jedoch oft nicht möglich, so dass diese Einteilung auch kritisiert wird. Es gibt nonadrenerg-inhibitorische („i-NANC“) Neurone, die mit Hilfe von vasoaktivem intestinalem Peptid (VIP)

bronchodilatatorische und vasokonstriktorische Eigenschaften entfalten. Desweiteren gibt es noncholinerg-exzitatorische („e-NANC“) Neurone. Letztere wirken mittels verschiedener Tachykinine wie Substanz P oder Neurokinin A (NK-A) und führen zu Bronchokonstriktion, Mucussekretion und zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Beim Menschen wird die Bronchokonstriktion vor allem durch NK-A vermittelt, die Entzündung stärker durch Substanz P. Interessanterweise können bis zu 94% der sensorischen Nervenfasern auf Substanz P reagieren⁸.

Neben den motorischen Nervenendigungen findet sich in der glatten Muskulatur und im Epithel eine dichte sensorische Innervation. So findet man zum Beispiel im apikalen Teil der Epithelzellen etwa 1900 Nervenendigungen sensorischer Fasern / mm², im Bereich der Basalmembran sind es ungefähr 700 Fasern / mm² (**Abb. 2**)⁸.

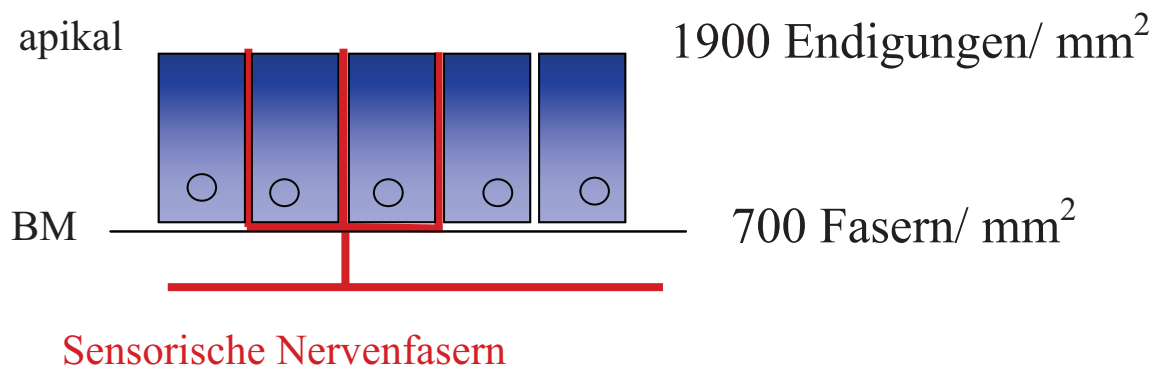


Abb. 2: Sensorische Nervenfasern

Dargestellt ist die Dichte der sensorischen Fasern (rot) an respiratorischen Epithelzellen (blau) und an deren Basalmembran (BM). Adaptiert nach⁸.

Diese sensorischen Fasern haben drei verschiedene Funktionen: (1) sie dienen als Signalgeber für zentrale Neurone, (2) sie können lokal direkt auf parasympathische Neurone umschalten (**Abb. 1**) und (3) sie können auch direkte lokale Effekte im Innervationsgebiet durch die Freisetzung von Neuropeptiden und anderen Mediatoren auslösen. Somit kann eine Überempfindlichkeit sensorischer Nerven weitreichende Konsequenzen für die Reagibilität und Funktion der Atemwege haben. Ein funktions-orientiertes Schema teilt sensorische Fasern in zwei Subtypen ein. Zum einen gibt es Neurone, die die normalen physiologischen Vorgänge steuern,

und zum anderen gibt es Neurone, die durch potentiell schädigende Stimuli aktiviert werden. Die Fasern für die physiologischen Vorgänge teilt man in langsam adaptierende Dehnungsrezeptoren (slow adapting receptors, SARs) und schnell adaptierende Rezeptoren (rapid adapting receptors, RARs) ein. Aktivierung der SARs führt zur Relaxation der glatten Muskulatur der Atemwege, zur Inhibition der Inspiration, zu einer peripheren Vasodilatation und Tachykardie. Bei Aktivierung der RARs hingegen kommt es zu verstärkter Atemanstrengung, zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur und zur Sekretion in submukösen Drüsen. Afferente Fasern, die durch schädliche Stimuli und Entzündungsmediatoren aktiviert werden, sind myelinisierte A δ -Fasern und unmyelinisierte C-Fasern. Reflexe, die von diesen Fasern vermittelt werden, führen zu Verminderung der In- und Expiration (was zu initialer Apnoe führt, die von flacher Atmung gefolgt wird), Bronchokonstriktion, einem verstärkten bronchialen Blutfluss und Bradykardie ⁹.

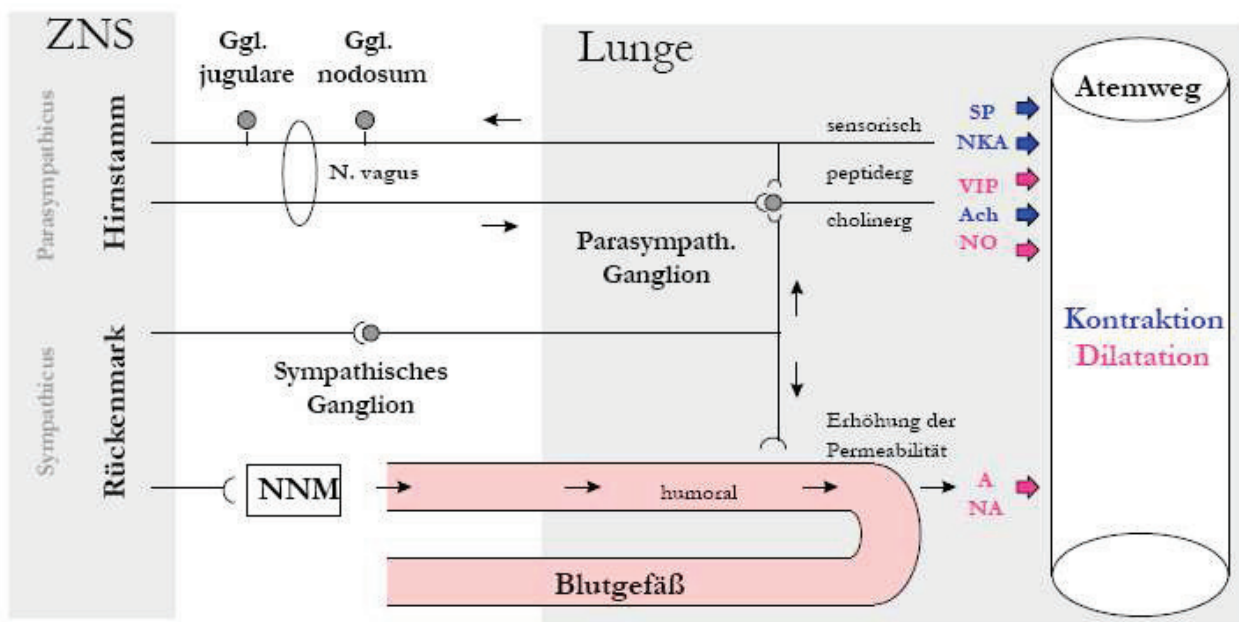


Abb. 3: Neuronale Kontrolle des Atemwegstonus

Der Tonus der Atemwege wird vor allem durch parasympathische und sensorische Neurone kontrolliert, sympathische Neurone haben einen indirekten Einfluss durch Modulation der cholinergen Signaltransmission und Veränderungen der Gefäßpermeabilität (Freisetzung zirkulierender Katecholamine). **NNM:** Nebennierenmark, **SP:** Substanz P, **NKA:** Neurokinin A, **NO:** Stickstoffmonoxid, **Ach:** Acetylcholin, **VIP:** Vasoaktives Intestinales Peptid, **A:** Adrenalin, **NA:** Noradrenalin. **Rot:** Bronchodilatoren, **Grün:** Bronchokonstriktoren. Adaptiert nach ¹⁰.

1.2.2. *Veränderte neuronale Funktion in der Atemwegsentzündung*

Durch entzündliche Erkrankungen der Atemwege kommt es zu funktionellen Veränderungen sensorischer und motorischer Neurone, die zu einer Hyperreagibilität der Atemwege wesentlich beitragen. So findet sich z.B. beim allergischen Asthma eine gesteigerte Freisetzung von Acetylcholin aus parasymphatischen Ganglien oder aus postganglionären Nervenendigungen^{11,12}. Auch die Sensitivität sensorischer Neurone ist nach Induktion einer allergischen Entzündung gesteigert¹². Es wird postuliert, dass unter anderem eine erhöhte Produktion und Freisetzung von Substanz P und Neurokinin A zu dieser erhöhten Sensitivität beiträgt¹³. Sogar phänotypische Veränderungen pulmonaler Nerven konnten nach allergischer Atemwegsentzündung festgestellt werden: so werden sensorische Neurone zur Produktion bestimmter Neurotransmitter befähigt, die sie im gesunden Zustand nicht produzieren könnten¹⁴. Bei Infektionen der Atemwege wurden ähnliche Mechanismen der neuronalen Dysfunktion beschrieben^{15,16}.

1.2.3. *Neurotrophine als Ursache veränderter neuronaler Funktionen*

Die Pathogenese der oben beschriebenen neuronalen Veränderungen ist bis heute nicht endgültig geklärt. In den letzten Jahren konnten jedoch wichtige Kandidaten für die Vermittlung neuronaler Veränderungen in entzündeten Atemwegen identifiziert werden: die Neurotrophine. Es handelt sich um Nervenwachstumsfaktoren, die sowohl für die Entwicklung als auch für die Funktionsfähigkeit und den Schutz von Neuronen vor schädigenden Einflüssen verantwortlich gemacht werden.

Im erwachsenen Organismus sind Neurotrophine für die Vermittlung neuronaler Anpassungsprozesse wie die Gedächtnisbildung, die Ausbildung erworbener Reflexe oder das Schmerzempfinden von essentieller Bedeutung¹⁷⁻¹⁹. Zur Familie der Neurotrophine werden die strukturverwandten Proteine Nerve Growth Factor (NGF), der Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4 (NT-4) gezählt. Neurotrophine und ihre Vorläuferproteine entfalten ihre Wirkungen durch Bindung an bestimmte Tyrosinkinase-Rezeptoren (TrkA, TrkB, TrkC) und an den Pan-Neurotrophin-Rezeptor p75^{NTR} auf Neuronen²⁰. Andererseits wirken diese Mediatoren aber auch auf non-neuronale Zellen wie Immunzellen,

Muskelzellen und Epithelien^{21,22}. In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass Neurotrophine eine besondere Bedeutung für die neuronale Plastizität in den Atemwegen haben²³⁻²⁵. Dies soll im folgenden Abschnitt in Bezug auf das Neurotrophin BDNF erläutert werden.

1.3. Das Neurotrophin BDNF als Mediator in Entzündungsprozessen

Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass BDNF eine besondere Bedeutung in Entzündungsprozessen zukommt. Einerseits wird BDNF von den meisten Entzündungszellen produziert (**Tab. 1**) und in großen Mengen in Thrombozyten gespeichert, die auch eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen spielen (**Abschnitt 1.4.**). Andererseits kann BDNF eine Reihe von neuronalen Veränderungen, die in Entzündungsprozessen auftreten, vermitteln. Dazu gehört die postinflammatorische Hyperalgesie¹⁸ und die Atemwegshyperreagibilität²⁴. BDNF hat aber auch neuroprotektive Funktionen und kann unter anderem durch Inflammation geschädigte Neurone vor Apoptose bewahren²⁶.

1.3.1. BDNF-Produktion durch Leukozyten

Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass BDNF in aktivierten Leukozyten produziert wird. Während entzündlicher Prozesse bilden T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Mastzellen BDNF^{26,27} (**Tab. 1**). Es kommt zu einer Hochregulation von BDNF in Entzündungsherden bei Erkrankungen wie der multiplen Sklerose²⁶, dem allergischen Asthma²⁸ und der Zystitis²⁹. Doch auch unstimulierte Immunzellen wie z.B. Monozyten können BDNF sezernieren³⁰. Es wird postuliert, dass Leukozyten durch eine Sekretion von BDNF bestimmte neuronale Funktionen (wie z.B. die Neuropeptidproduktion) beeinflussen und somit eine Hyperreaktivität in sensorischen Neuronen, eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur oder eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität bewirken²¹.

Leukozyten	BDNF-Expression
T-Zellen ^{26,31,32}	+
B-Zellen ^{26,33}	+
Makrophagen ^{26,34,35}	+
Monozyten ^{26,30, 36}	+
Mastzellen ³⁷	+
Eosinophile ³⁸	+
Neutrophile ³⁸	+

Tabelle 1: BDNF-Produktion durch Leukozyten

Für fast alle Leukozyten-Populationen ist eine Produktion von BDNF beschrieben worden. Diese ist oft aktivierungsabhängig kann aber auch konstitutiv erfolgen (wie bei Monozyten).

1.3.2. BDNF als Thrombozytenmediator

Erste Hinweise darauf, dass BDNF im menschlichen Serum und Plasma vorkommt, fand man Anfang der 1990er Jahre ³⁹. Erstaunlicherweise lagen die Serumspiegel für BDNF über 100mal höher als die Plasmaspiegel ⁴⁰. Man konnte zeigen, dass dieser gravierende Unterschied dadurch verursacht wird, dass BDNF in großen Mengen in Thrombozyten gespeichert ist ⁴¹⁻⁴³. Während der Serum-Entstehung kommt es zu einer Degranulation der Thrombozyten und somit zur Freisetzung von BDNF. Fujimura et al. konnten nachweisen, dass die BDNF-Serumkonzentrationen der Menge an BDNF in Lysaten aufgereinigter Thrombozyten entspricht ⁴³. Der große Unterschied zwischen Serum- und Plasmaspiegeln scheint also die Menge an gespeichertem BDNF in Thrombozyten zu reflektieren, so dass aus der Serum-Plasma-BDNF-Differenz und der Thrombozytenzahl auf die individuelle BDNF-Freisetzung bzw. BDNF-Beladung pro Thrombozyt geschlossen werden kann („Thrombozyten-BDNF“) ⁴⁴. Es wurde postuliert, dass in Thrombozyten gespeichertes BDNF nicht von Megakaryozyten oder Thrombozyten synthetisiert wird ⁴³. Vielmehr scheint es aus externen Quellen (wie aus dem Blutplasma, dem Gehirn oder inneren Organen) aufgenommen zu werden und durch Stimulation mit

verschiedenen Agonisten wieder freigesetzt zu werden⁴³. Somit wären Thrombozyten Speicher und Transporteure von BDNF zugleich.

Da Thrombozyten-BDNF möglicherweise aus dem Blutplasma aufgenommen wird, ist die Frage nach den Quellen von Plasma-BDNF von wichtiger Bedeutung. Potentielle Quellen könnten Gefäßendothelzellen oder glatte Muskelzellen sein, bei denen Neurotrophinsynthese nachgewiesen wurde⁴⁵⁻⁴⁷. Auch die oben erwähnten Immunzellen könnten zusätzlich BDNF ins Plasma abgeben^{26,48,49}. Da BDNF auch in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke in beide Richtungen zu überschreiten, könnte ein signifikanter Anteil von Gliazellen und Neuronen des Zentralnervensystems stammen⁵⁰⁻⁵². Die Speicherung von BDNF in Thrombozyten bestätigt die Hypothese, dass BDNF in Entzündungsprozessen eine prominente Rolle spielen könnte, da nicht nur Leukozyten, sondern auch Thrombozyten wichtige inflammatorische Funktionen haben und daher auch zu den „Entzündungszellen“ gerechnet werden. Darauf soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

1.4. Thrombozyten als Entzündungszellen

1.4.1. Aufbau von Thrombozyten

Thrombozyten sind die kleinsten der menschlichen Blutzellen (ca. 2 µm) und bilden mit $1,3 - 4,0 \times 10^5$ Thrombozyten pro µl eine wichtige Fraktion der Blutzellen Gesunder. Ursprünglich dachte man, sie würden allein im Knochenmark durch Fragmentierung von Megakaryozyten entstehen, doch neuere Erkenntnisse weisen auch auf einen pulmonalen Ursprung hin. Hier scheinen die vom Knochenmark über das Blut transportierten Megakaryozyten durch das ausgedehnte kapilläre Netz fragmentiert zu werden. Hinweis darauf ist auch der Umstand, dass das pulmonalvenöse Blut deutlich höhere Thrombozytenzahlen aufweist als das arterielle Blut in der Lunge⁵³. Die Lebensdauer der Thrombozyten beträgt durchschnittlich 10 Tage. Abgebaut werden die Thrombozyten von Makrophagen des retikuloendothelialen Systems in der Milz, der Leber und im Knochenmark.

Membranständige Glykoproteine mit verschiedenen Rezeptorfunktionen ermöglichen ihnen verschiedenste Wechselwirkungen mit der Umgebung. Thrombozyten sind

kernlos und nur begrenzt zur Proteinsynthese fähig, enthalten jedoch kleine Mengen mRNA. Außerdem stehen sie mit dem Extrazellulärraum durch ein offenes kanalikuläres System in Verbindung, worüber sie Substanzen aufnehmen und wieder freisetzen können. Diese Substanzen werden in verschiedenen Granula gespeichert (**Tab. 3**). Dichte Granula enthalten verschiedene Nukleotidphosphate, wie ATP, ADP, GTP aber auch Calciumionen und Serotonin. ADP dient den Thrombozyten als Aktivator und lockt weitere Plättchen an, Serotonin dient als starker Vasokonstriktor. Die häufigeren α -Granula enthalten eine große Anzahl verschiedener Proteine, unter anderem Wachstumsfaktoren wie TGF- β . Es gibt Hinweise darauf, dass auch BDNF in den α -Granula gespeichert wird ⁴⁴.

Dichte Granula	α -Granula	Lysosome
ATP	Fibrinogen	β -Glucuronidase
ADP	von Willebrand Faktor (vWF)	Kollagenase
Serotonin	Transforming Growth Factor β (TGF- β)	Elastase

Tab. 2: Thrombozytengranula

Ausgewählte Inhaltsstoffe thrombozytärer Speichergranula. Adaptiert nach ⁵⁴.

1.4.2. Funktion von Thrombozyten

Lange kannte man Thrombozyten nur als Haupteffektoren der Blutgerinnung. Bei der Blutgerinnung erfolgt zunächst die Adhäsion an z.B. einen Gefäßdefekt und danach die Sekretion verschiedener Mediatoren, wodurch es zur Aggregation vieler Thrombozyten kommt, die ein Blutgerinnsel ausbilden. Zusätzlich spielen sie jedoch eine wichtige Rolle bei akuten und chronischen Entzündungen, bei der Immunabwehr, bei der Wundheilung und im Rahmen der Tumormetastasierung ^{55,56}. Werden ruhende, scheibenförmige Plättchen aktiviert, kommt es zu einer Veränderung ihrer Zytoskelettstruktur mit Ausbildung von Pseudopodien. Außerdem zentralisieren sich die Granula und fusionieren mit der Plasmamembran, so dass ihr Inhalt per Exozytose sezerniert werden kann (**Abb. 4**).

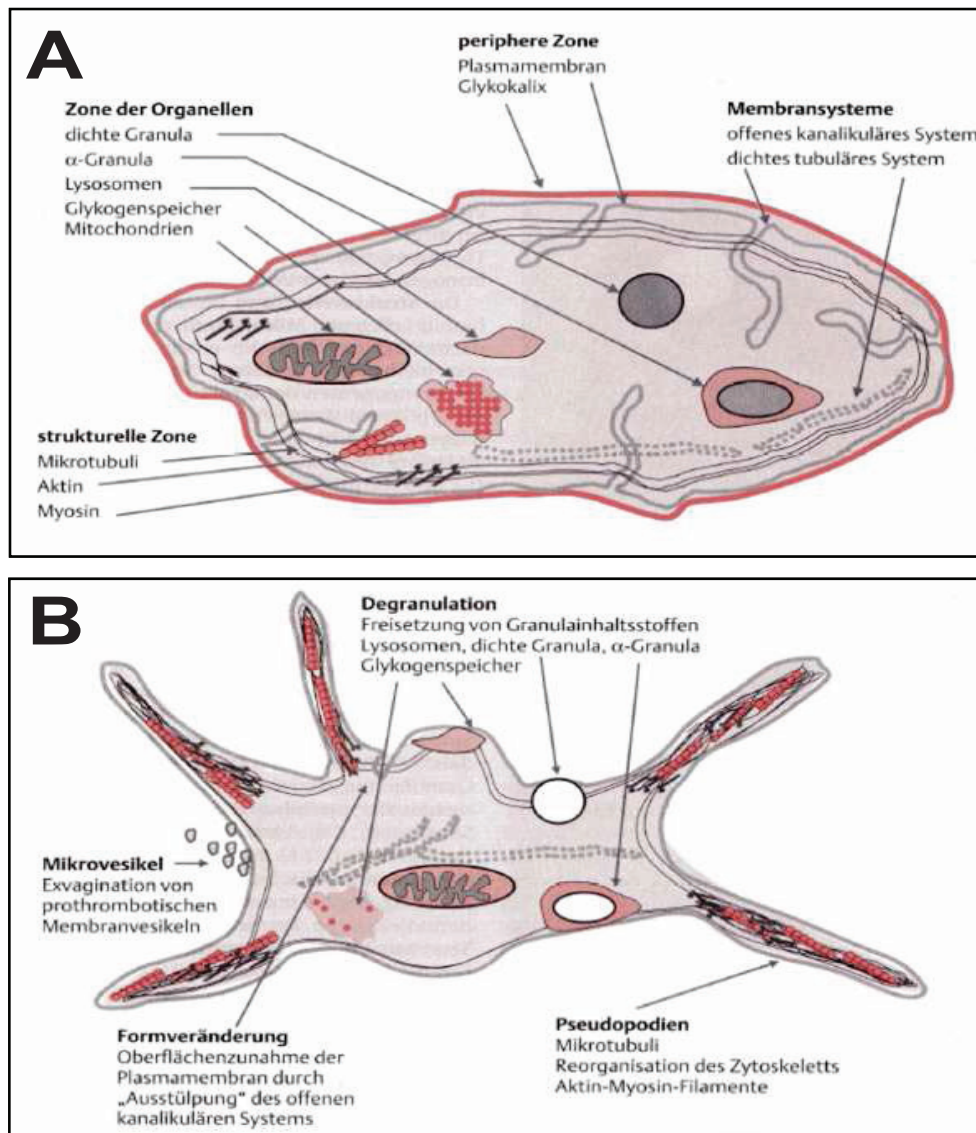


Abb. 4: Ruhender und aktivierter Thrombozyt

A: Ultrastruktur eines ruhenden Thrombozyten. Die Mediatoren der Thrombozyten werden vor allem in 3 Vesikeln gespeichert (dichte Granula, α -Granula und Lysosomen). Der ruhende Thrombozyt besitzt eine diskoide Form, die Vesikel sind nicht degranuliert. **B:** Durch Aktivierung werden Filamente aus Aktin und Myosin gebildet; sie besitzen eine Verbindung zu den Zellorganellen und reorganisieren diese während des Aktivierungsvorganges. Es kommt neben der typischen Formveränderung des Thrombozyten zu einer Ausschüttung der verschiedenen Granula. Abbildung entnommen aus: Meinrad Gawaz „Das Blutplättchen“⁵⁷.

1.4.3. Thrombozyten in der Entzündung

Thrombozyten sind eine wichtige, obgleich unterschätzte Komponente in Entzündungsprozessen. Durch ihre Eigenschaft schnell große Mengen an pro-

inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen freizusetzen, spielen sie eine zentrale Rolle in entzündetem Gewebe⁵⁸. Sie sind zur Chemotaxis fähig, aktivieren andere Entzündungszellen, setzen vasoaktive Substanzen frei und wirken entscheidend bei der Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe mit⁵⁹⁻⁶¹. Thrombozyten können auch direkt per Diapedese in entzündetes Lungengewebe einwandern⁶². Aktiviert werden Thrombozyten zum einen durch subendotheliale Matrix, Thrombin, ADP und ThromboxanA₂, aber auch durch Antigene, Antigen-Antikörper-Komplexe, Mikroorganismen und bakterielle Endotoxine, wie zum Beispiel Lipopolysaccharid (LPS)^{63,64}. Thrombozyten sind auch zur Phagozytose von Bakterien befähigt⁶⁵. Die Thrombozyten-Bakterien-Aggregate werden dann im Gewebe verschiedener Organe von Makrophagen eliminiert.

Eine entscheidende Fähigkeit der Thrombozyten ist die Rekrutierung von Leukozyten. Damit Leukozyten in entzündetes Gewebe eindringen können, müssen sie zuerst auf der Epitheloberfläche entlang rollen („rolling“), um eine festere Bindung eingehen zu können. Das Rolling ist entscheidend von Thrombozyten abhängig, denn durch thrombozytäres P-Selektin binden Leukozyten fester an das Endothel und können dann in das Gewebe eindringen (Diapedese) (**Abb. 5**). Leukozyten locken im Gegenzug auch Thrombozyten an. Sie sind in der Lage nach Endotoxinstimulation Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) auszuschütten, welcher Thrombozyten in entzündete Gebiete lockt. Eine weitere Form der Zusammenarbeit zwischen Leukozyten und Thrombozyten stellt die symbiotische Synthese von chemotaktischen Faktoren dar, welche weder Leukozyten noch Thrombozyten alleine synthetisieren könnten. In Anwesenheit von aktivierten Thrombozyten können Leukozyten z.B. vermehrt Leukotriene bilden⁶⁶. Auch Langzeiteffekte scheinen von Bedeutung zu sein. So setzen Plättchen die in Fibrinnetzwerken eingeschlossen sind, noch 18 Stunden nach der Gerinnungsbildung inflammatorische Cytokine frei⁶⁷. Auch Leukozyten-Thrombozyten-Bindungen sind für viele Stunden stabil⁶⁸. Die Wirkungen von Thrombozyten auf Leukozyten können zudem sehr nachhaltig sein und über 24 Stunden andauern^{68,69}.

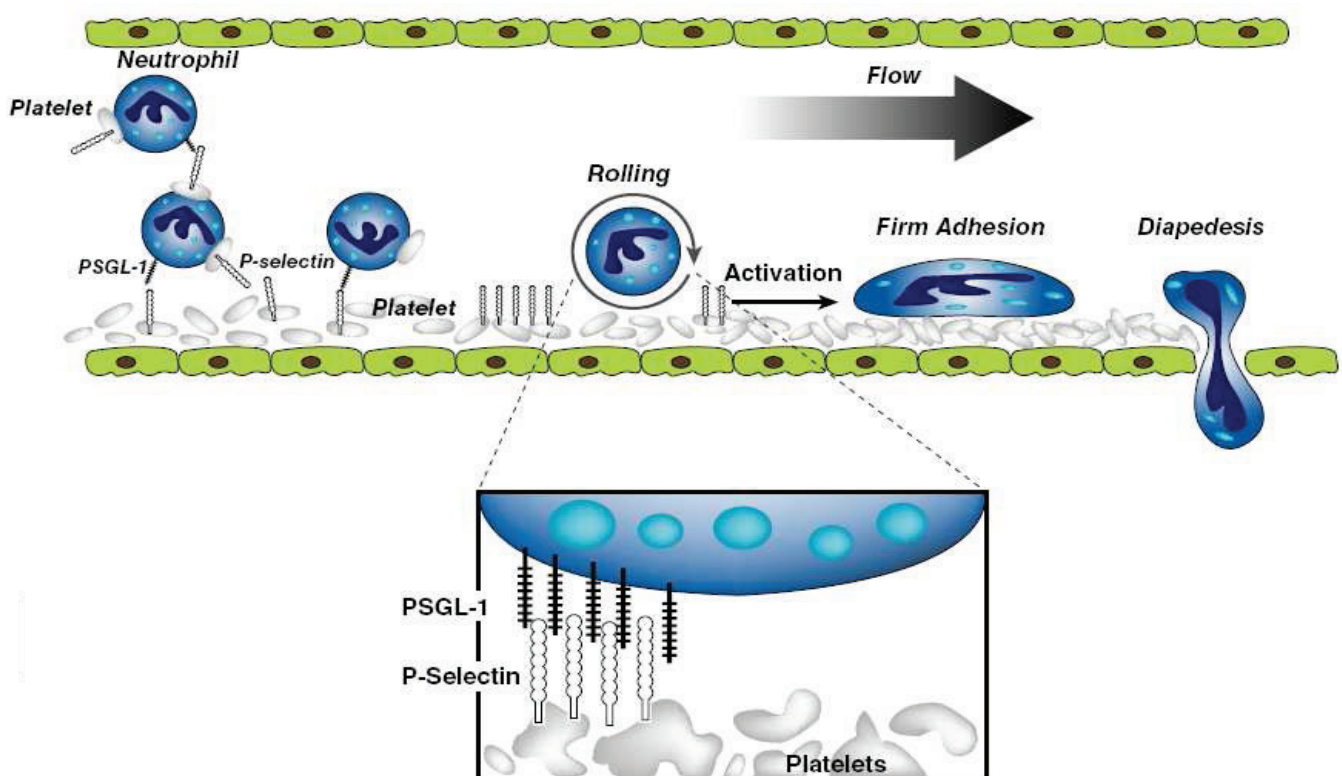


Abb. 5: Die Rolle der Thrombozyten bei der Leukozytendiapedese

Für das „Rolling“ der Leukozyten (Voraussetzung für die spätere Leukozytendiapedese) ist die Expression von P-Selectin notwendig, welches an den P-Selectin Glycoprotein-Ligand 1 (PSGL-1) der Leukozyten bindet. Adaptiert nach ⁵⁸.

1.4.4. Thrombozyten-BDNF und Entzündung

Über die Bedeutung von dem in Thrombozyten gespeicherten BDNF in entzündlichen Prozessen ist bisher nur wenig bekannt. Es wurde gezeigt, dass Patienten mit allergischem Asthma erhöhte BDNF-Konzentrationen in Thrombozyten aufweisen, die mit der Atemwegshyperreagibilität korrelieren ²⁴. Desweiteren finden sich auch bei Patienten mit atopischer Dermatitis erhöhte BDNF-Serumspiegel, die auf eine erhöhte BDNF-Thrombozytenbeladung hinweisen ⁷⁰. Somit scheint es bei chronisch entzündlichen Erkrankungen durch eine Überproduktion von BDNF in den Organen zu einer verstärkten BDNF-Beladung der Thrombozyten zu kommen. Es liegen jedoch bisher keine Daten zu der Bedeutung oder Regulation von Thrombozyten-BDNF in akuten Entzündungen vor. Des Weiteren gibt es bislang keine Studien zur Rolle von Thrombozyten-BDNF bei Infektionskrankheiten.

1.5. Fragestellungen

Die postinfektiöse Atemwegshyperreagibilität ist in ihrer Pathogenese bis heute kaum verstanden, beruht jedoch teilweise auf neuronalen Veränderungen der die Atemwege innervierenden Nerven. BDNF ist ein wichtiger Kandidat für die Vermittlung neuronaler Veränderungen in der Lunge. Die Regulation und Bedeutung von thrombozytär gespeichertem BDNF und leukozytär freigesetztem BDNF bei Infektionserkrankungen der Lunge ist jedoch bis heute unbekannt. Daher wurden folgende Fragestellungen im Rahmen dieser Promotionsarbeit formuliert:

1. Sind die BDNF-Konzentrationen im Plasma, Serum und in den Thrombozyten im Rahmen einer akuten Infektion der unteren Atemwege (Pneumonie oder infektexazerbierte COPD) im Vergleich zu gesunden Probanden verändert?
2. Werden die BDNF-Konzentrationen im Plasma, Serum und in den Thrombozyten durch eine erfolgreiche antibiotische Therapie beeinflusst?
3. Sind die Konzentrationen anderer Thrombozytenmarker (Serotonin, TGF- β) im Rahmen einer Infektion der unteren Atemwege auch verändert und gibt es einen Zusammenhang zu den Veränderungen der BDNF-Konzentrationen?
4. Gibt es Unterschiede in der Sekretion von BDNF durch mononukleäre Zellen *in vitro* zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Infektionen der unteren Atemwege vor und nach Therapie?
5. Haben bakterielle Toxine wie Lipopolysaccharid (LPS) einen Einfluss auf die Sekretion von BDNF durch mononukleäre Zellen *in vitro*?
6. Welchen Einfluß haben klinisch eingesetzte Medikamente wie Steroide oder β -Sympathomimetika auf die BDNF-Produktion durch mononukleäre Zellen *in vitro*?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Studiendesign

2.1.1. Rekrutierung von Probanden und Patienten

Zwischen April und September 2004 wurden in der internistischen Notaufnahme und auf den pneumologischen und infektiologischen Stationen der Uniklinik Rostock Patienten mit akuten Entzündungen der unteren Atemwege (Pneumonie oder infektexazerbierte COPD) rekrutiert. Bei Aufnahme wurden eine komplette Anamnese und ein Status praesens, inklusive Körpertemperatur bei Aufnahme, erhoben. Außerdem wurde Blut abgenommen und eine Röntgenthoraxaufnahme und Blutgasanalyse anfertigt. Die Patienten wurden schriftlich und mündlich über das Ziel und den Ablauf der Studie informiert und gebeten, einen Fragebogen auszufüllen. Dieser enthielt Fragen zu Alter, Geschlecht, Körpergröße, Gewicht, Medikation und aktuellen Beschwerden mit besonderem Schwerpunkt auf Schmerzen und Luftnot. Bei Erfüllung der Ein- und Ausschlusskriterien und der schriftlichen Einverständniserklärung wurden die Patienten in die Studie aufgenommen.

Einschluss-Kriterien für Patienten waren:

1. Auftreten von akuter Dyspnoe oder Husten in den letzten 7 Tagen vor stationärer Aufnahme
2. Radiologische und klinische Hinweise auf eine Pneumonie oder Auftreten von purulentem Sputum als Zeichen einer infektexazerbierten COPD
3. Leukozytenzahl im Blut $> 10.000 / \mu\text{l}$
4. CRP-Wert im Plasma $> 100 \text{ mg / l}$
5. Procalcitonin-Wert im Serum $> 0,12 \text{ ng / ml}$

Ausschluss-Kriterien für Patienten waren:

1. Instabiler klinischer Zustand (Intubationspflicht bzw. Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Betreuung)
2. Maligne Erkrankungen

3. Akute entzündliche Erkrankungen anderer Genese
4. Dialysepflichtigkeit
5. Immunsuppressive Therapie vor Klinikaufnahme

Im gleichen Zeitraum (April bis September 2004) wurden gesunde Kontrollprobanden ausgewählt nach Alter und Geschlecht (in Übereinstimmung mit dem Alters- und Geschlechtsspektrum der Patientengruppe) und schriftlich und mündlich über das Ziel und den Ablauf der Studie informiert. Bei Erfüllung der Ein- und Ausschlusskriterien und der schriftlichen Einverständniserklärung wurden die Probanden in die Studie aufgenommen.

Einschluss-Kriterien für gesunde Probanden waren:

1. Keine Zeichen einer akuten Infektion
2. Keine chronisch-entzündlichen Erkrankungen in der Anamnese
3. CRP-Wert im Plasma < 5 mg / l
4. Procalcitonin-Wert im Serum < 0,10 ng / ml

Ausschluss-Kriterien für gesunde Probanden waren:

1. Maligne Erkrankungen
2. Dialysepflichtigkeit
3. Immunsuppressive Therapie

2.1.2. Ablauf der Studie

Bei Erfüllung der Ein- und Ausschlusskriterien und Vorliegen der schriftlichen Einwilligung wurden die Patienten und Probanden in die Studie eingeschlossen. Die Patienten wurden einen Tag nach ihrer stationären Aufnahme erfasst, so dass im akuten Stadium der Erkrankung, am ersten Tag nach stationärer Aufnahme (Tag 1), die erste Blutentnahme erfolgen konnte. Eine zweite Blutentnahme fand am achten Tag nach Aufnahme statt (Tag 8). Auch zu diesem Zeitpunkt mussten die Patienten den oben beschriebenen Fragebogen ausfüllen, um die Entwicklung der Parameter

Schmerz und Luftnot im Verlauf auswerten zu können. Bei den gesunden Kontrollprobanden erfolgte nur zu einem Zeitpunkt eine Blutentnahme. Die Blutproben für Serum- und Plasmagewinnung wurden sofort nach Entnahme auf Eis gelegt. Die Weiterverarbeitung der Blutproben wird im **Abschnitt 2.2.** spezifiziert.

2.1.3. Votum der Ethikkommission

Bei der Ethikkommission der Ärztekammer Mecklenburg-Vorpommern wurde die vorliegende Studie beantragt. Die Ethikkommission äußerte keine berufsrechtlichen oder berufsethischen Bedenken gegen die Durchführung dieser klinisch-experimentellen Studie.

2.2. Blutentnahme

Material

- Stauschlauch
- Hautdesinfektionsmittel
- Sterile Wattetupfer
- Monovette-Kanüle 0,8 x 38 mm [SARSTEDT, Nümbrecht, D]
- Monovette EDTA 9 ml [SARSTEDT, Nümbrecht, D]
- Monovette EDTA 2,7 ml [SARSTEDT, Nümbrecht, D]
- Monovette Serum 2,7 ml [SARSTEDT, Nümbrecht, D]
- Monovette Lithium-Heparin 2,7 ml [SARSTEDT, Nümbrecht, D]

Durchführung

Alle Blutentnahmen fanden zwischen 9 und 12 Uhr statt, um den Einfluss eines möglichen zirkadianen Rhythmus von BDNF zu minimieren. Den untersuchten Patienten wurden zu beiden Zeitpunkten im Liegen nach Punktion einer Vena cubitalis ein Blutvolumen von ca. 50 ml entnommen, das wie folgt verwendet wurde:

Monovettentyp	Volumen	Anzahl	Gesamtvolumen	Verwendungszweck
EDTA	9 ml	4	36 ml	FACS, Zellkultur
EDTA	2,7 ml	1	2,7 ml	Blutbild
Serum	2,7 ml	1	2,7 ml	ELISA, PCT
Lithium-Heparin	2,7 ml	2	5,4 ml	ELISA, CRP
			46,8 ml	

Tab. 3: Entnommenes Blutvolumen bei Patienten

Sofort nach der Abnahme wurden die Blutröhrchen für die Serum- und Plasmagewinnung bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelegt. Die EDTA-Röhrchen wurden im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Bei den Kontrollprobanden wurden einmalig insgesamt ca. 80 ml venöses Blut entnommen. Dieses wurde wie folgt verwendet:

Monovettentyp	Volumen	Anzahl	Gesamtvolumen	Verwendungszweck
EDTA	9 ml	8	72 ml	FACS, Zellkultur
EDTA	2,7 ml	1	2,7 ml	Blutbild
Serum	2,7 ml	1	2,7 ml	ELISA, PCT
Lithium-Heparin	2,7 ml	1	2,7 ml	ELISA, CRP
			80,1 ml	

Tab. 4: Entnommenes Blutvolumen bei Gesunden

Auch hier wurden sofort nach der Abnahme die Blutröhrchen für die Serum- und Plasmagewinnung bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelegt und die EDTA-Röhrchen bei 4°C gelagert.

Blutbild- und CRP-Bestimmungen fanden im Zentrallabor der Uniklinik Rostock statt (Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, **Abschnitt 2.8**).

2.3. Herstellung von Serum und Plasma

Material

- Zentrifuge Megafuge 1,0 R [KENDRO-HERAEUS, Stuttgart, D]
- Pipette 100-1000 µl [EPPENDORF, Hamburg, D]
- Pipettenspitzen blau 1000 µl [EPPENDORF, Hamburg, D]
- PP-Röhrchen 1,5 ml [GREINER BIOONE, Frickenh., D]

Durchführung

Um bei der Serumentstehung die komplette Gerinnung und Plättchendegranulation zu gewährleisten, wurden die Serum-Röhrchen 60 Minuten auf Eis gestellt und erst danach zentrifugiert. Aus praktischen Gründen wurden auch die Plasmaröhrchen in dieser Zeit auf Eis belassen und dann zusammen mit den Serumröhrchen zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte für 15 min bei 2000 g (3500 U / min) und 10 °C mit aktivierter Bremse (9-10). Es wurden jeweils 2 x 350 µl der Überstände (Serum und Plasma) für die Neurotrophinbestimmung mittels ELISA aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung in PP-Röhrchen bei -80 °C tiefgefroren.

2.4. Aufreinigung der Leukozyten

2.4.1. Separation mononukleärer Zellen aus EDTA-Blut

Material

- Zentrifuge Megafuge 1,0 R [KENDRO-HERAEUS, Stuttgart, D]
- Sterilbank MICROFLOW [NUNC, Wiesbaden, D]
- Pipettierhilfe ACCU-JET [BRAND, Wertheim, D]
- Pipettenspitzen 25 ml [GREINER BIOONE, Frickenh., D]
- Pipettenspitzen 5 ml [GREINER BIOONE, Frickenh., D]
- Pipette 100-1000 µl [EPPENDORF, Hamburg, D]
- Pipette 2-20 µl [EPPENDORF, Hamburg, D]
- Pipettenspitzen blau 1000 µl [GREINER BIOONE, Frickenh., D]
- Pipettenspitzen gelb 200 µl [GREINER BIOONE, Frickenh., D]

- Falconröhrchen 50 ml [GREINER BIOONE, Frickenh., D]
- Falconröhrchen 15 ml [GREINER BIOONE, Frickenh., D]

Reagenzien

- OPTI-PREP-Lösung [AXIS SHIELD, Oslo, NW]
- RPMI 1640 [GIBCO, New York, USA]
- Fetales Kälberserum (FCS) [BIOCHROM AG, Berlin, D]
- Penicillin / Streptomycin [BIOCHROM AG, Berlin, D]
- Dulbecco's PBS [GIBCO, New York, USA]

Lösungen

- Lösung A: RPMI 1640 + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin
- Lösung B: 10 ml Lösung A + 20 ml OptiPrep
- Lösung C: 34 ml Lösung A + 14,54 ml Lösung B
- Blutlösung: 32,5 ml EDTA-Blut + 13,77 ml Lösung B

Methode

Zur Bestimmung des BDNF-Freisetzungspotentials zirkulierender mononukleärer Zellen trennten wir mit Hilfe der sogenannten „OptiPrep-Methode“, einer Dichtegradienten-Zentrifugation, die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) von den restlichen zellulären Bestandteilen des Blutes. Der Begriff „mononukleäre Zellen“ schließt sowohl Monozyten/Makrophagen als auch Lymphozyten ein. Mit der OptiPrep-Methode wird ein hoher Monozyten-Prozentsatz an den PBMC erreicht, der für die Bestimmung der BDNF-Sekretion wertvoll ist, da Monozyten die wichtigste Quelle von BDNF unter den PBMC darstellen³⁰.

Das Prinzip der OptiPrep-Dichtegradienten-Zentrifugation besteht darin, dass die Monozyten, die im Blut des Erwachsenen etwa 2-8 % aller Leukozyten ausmachen, mit 15-20 µm einen größeren Durchmesser haben als die Lymphozyten (6-20 µm). Dahingegen liegt ihre Dichte mit 1,063 g / ml unterhalb der von Lymphozyten (1,071 g / ml). Die spezifische Masse der Granulozyten und Erythrozyten liegt noch höher. Wird das Vollblut nun mit der OptiPrep-Dichtegradientenlösung, die eine Dichte von

1,072 g / ml aufweist, überschichtet und anschließend zentrifugiert, so bildet sich ein monozytenreicher Zellring oberhalb der Interphase, während die restlichen Zellen unterhalb zu finden sind.

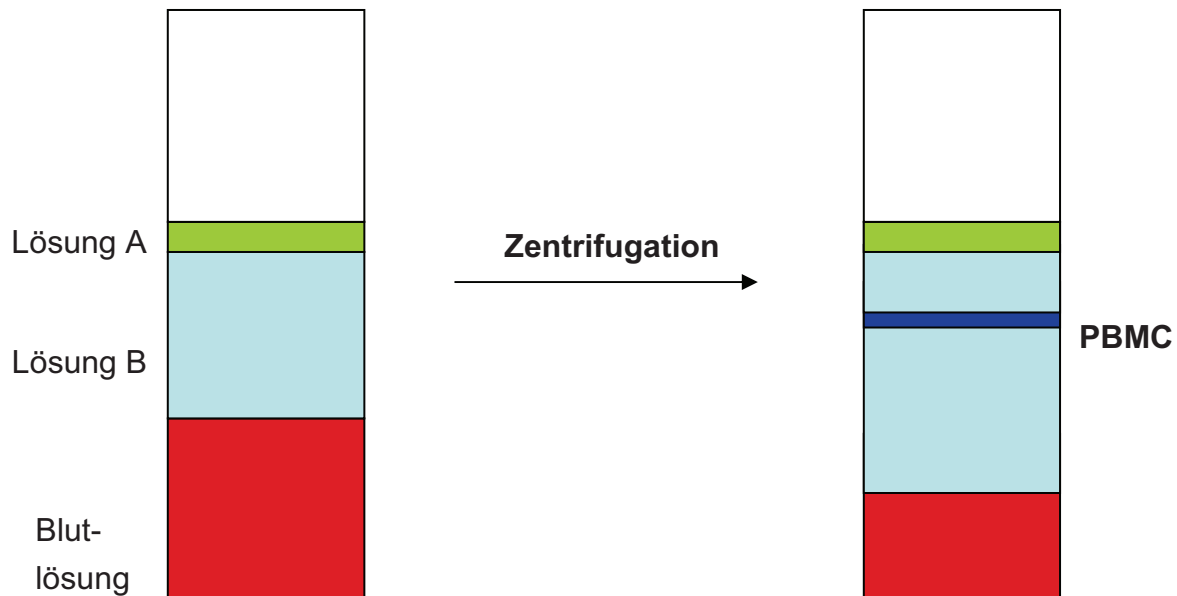


Abb. 6: Dichtegradientenzentrifugation mittels OptiPrep

Durchführung

Alle Lösungen wurden zu jeder Aufreinigung frisch angesetzt und wie oben beschrieben vorbereitet. Alle verwendeten Lösungen wurden bei 4°C aufbewahrt und verarbeitet. Die Aufreinigung erfolgte unter antiseptischen Bedingungen unter der Sterilbank. 2 x je 23 ml Blutlösung wurden mit je 23 ml Lösung C vorsichtig in einem 50 ml Falconröhrchen überschichtet, ohne dass eine Vermischung der beiden Phasen stattfinden konnte. 1 ml der Lösung A wurde zuletzt über die Schichten gelegt. Es erfolgte eine Zentrifugation über 30 Minuten bei 700 g (2000 U / min) und 4°C mit inaktivierter Bremse. Der so entstandene Zellring wurde mit einer 1000 µl Pipette vorsichtig in ein 50 ml Falcon-Röhrchen transferiert und mit PBS-Puffer bis 40 ml aufgefüllt. Die so gewonnenen Zellen wurden nun in der Neubauer-Kammer gezählt. Die mononukleären Zellen wurden gewonnen, um sie zum einen durchflusszytometrisch differenzieren zu können (**Abschnitt 2.6**) und zum anderen die PBMC in Zellkulturen anzuzüchten (**Abschnitt 2.5**).

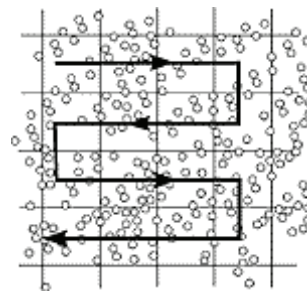
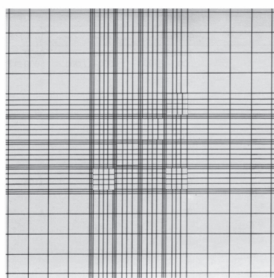
2.4.2. Zellzählung

Material

- Zellsuspension
- Zählkammer NEUBAUER [BRAND, Wertheim, D]
- Pipette 2-20 μl [EPPENDORF, Hamburg, D]
- Pipettenspitzen gelb 200 μl [GREINER BIOONE, Frickenh., D]
- Lichtmikroskop Wilovert S [HELMUT HUND, Wetzlar, D]

Durchführung

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 μl der Suspension mit einer Pipette in eine Neubauer Zählkammer überführt. Unter dem Lichtmikroskop wurden die vier großen Eckfelder (bestehend aus 16 Kleinquadraten) ausgezählt, wobei die durchschnittliche Zellzahl einer der großen Eckkammern die Zellzahl $\times 10000$ pro ml Zellsuspension widerspiegelte. So konnte errechnet werden in wieviel Millilitern 1,5 Millionen Zellen vorhanden waren. Die Zellsuspension wurde in Aliquots mit jeweils 1,5 Mio. Zellen pro ml aufgeteilt, zentrifugiert und für die Zellkultur aufbereitet. Weitere Verfahrensschritte werden in **Abschnitt 2.5** beschrieben.



Neubauer-Zählkammer

Abb 7: Zellzählung mittels Neubauer-Kammer

Links dargestellt ist eine Neubauer-Zählkammer. Die vier äußeren großen Eckfelder wurden, wie in der rechten Abbildung für eines dieser Felder dargestellt, mäanderförmig ausgezählt.

2.5. Zellkultur

Material

- Sterilbank MICROFLOW [NUNC, Wiesbaden, D]
- Brutschrank CELLSTAR [NUNC, Wiesbaden, D]
- Zentrifuge Megafuge 1,0 R [KENDRO-HERAEUS, Stuttgart, D]
- 24-Well-Zellkulturplatten [GREINER BIOONE, Frickenh., D]
- PP-Röhrchen 1,3 ml [GREINER BIOONE, Frickenh., D]
- Pipette 100-1000 µl [EPPENDORF, Hamburg, D]
- Pipette 2-20 µl [EPPENDORF, Hamburg, D]
- Pipettenspitzen blau 1000 µl [GREINER BIOONE, Frickenh., D]
- Pipettenspitzen gelb 200 µl [GREINER BIOONE, Frickenh., D]
- Falconröhrchen 15 ml [GREINER BIOONE, Frickenh., D]

Reagenzien

- RPMI 1640 + Glutamat [GIBCO, New York, USA]
- Fetales Kälberserum (FCS) [SIGMA, Deisenhofen, D]
- Penicillin / Streptomycin [BIOCHROM AG, Berlin, D]
- Dulbecco´s PBS [GIBCO, New York, USA]

Stimulantien

- TNF α : 1 ng / ml [SIGMA, Deisenhofen, D]
- LPS: 2 ng / ml [SIGMA, Deisenhofen, D]

Stammlösungen

- Prednisolon: 10^{-7} mol / l [JENAPHARM, Jena, D]
- Fluticason: 10^{-3} mol / l [GLAXOSMITHKLINE, Brentford, UK]
- Salmeterol: 10^{-3} mol / l [GLAXOSMITHKLINE, Brentford, UK]

Lösungen

- Zellkulturmedium: RPMI 1640 + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin
- Zellsuspension: 1,5 Millionen Zellen / ml PBS-Puffer

Methode

Die isolierten mononukleären Zellen sollten zum einen auf ihre Fähigkeit zur Ausschüttung von BDNF untersucht werden. Außerdem sollten die Zellen mit den Steroiden Prednisolon und Fluticason sowie dem β_2 -Sympathomimetikum Salmeterol inkubiert werden, um deren Wirkung auf die BDNF-Sekretion untersuchen zu können. Dazu wurden die Zellen in einem spezifischen Zellkulturmedium gehalten und zusätzlich mit den potenten Induktoren von Entzündungsprozessen Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Lipopolysaccharid (LPS) versetzt, um deren stimulatorisches Potential beurteilen zu können. Die Zellkulturen wurden über 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C unter einer 5%-igen CO_2 - Atmosphäre inkubiert. Die Zellkulturüberstände und die Zellen wurden danach analysiert.

Durchführung

Die Zellsuspension wurde, wie in **Abschnitt 2.4.2** beschrieben, in Aliquots à 1,5 Mio. Zellen / ml aufgeteilt und bei 1200 U / min 10 Minuten lang bei 20 °C mit aktivierter Bremse abzentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgeschüttet und anschließend die Pellets aus jeweils 1,5 Mio. Zellen mit verschiedenen Ansätzen von Zellkulturmedium gelöst (**Tab. 5**). Dann wurden je 950 μl der verschiedenen Ansätze pro Well auf die Kulturplatten gegeben. Alle Zellkulturmedien wurden für jeden Ansatz frisch hergestellt.

Da die Stammlösungen für Salmeterol und Fluticason auf Grund der schweren Wasserlöslichkeit jeweils 0,1%-ig Ethanol enthielten, wurden auch den Zellkulturen mit Prednisolon, LPS und der Kontrolle 10 μl Ethanol hinzugefügt, so dass nun alle Ansätze 0,01%-ig Ethanol enthielten. Die Ansätze 1-7 wurden zweimal angesetzt und einmal mit je 50 μl TNF α versetzt, so dass sich 15 Ansätze ergaben, die dann für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C unter einer 5%-igen CO_2 - Atmosphäre inkubiert wurden.

Ansatz	Verdünnung in Zellkulturmedium
1. Kontrolle	reine Zellsuspension
2. Fluticason -7	10^{-7} mol / l
3. Salmeterol -7	10^{-7} mol / l
4. Salmeterol -9	10^{-9} mol / l
5. Fluticason -7 + Salmeterol -7	10^{-7} mol / l + 10^{-7} mol / l
6. Fluticason -7 + Salmeterol -9	10^{-7} mol / l + 10^{-9} mol / l
7. Prednisolon	10^{-7} mol / l
8. LPS	100 ng / ml

Tabelle 5: Ansatzschema für Zellkultur

Nach diesem Zeitraum wurden aus jedem Well 2 x 350 µl Überstand entnommen und in beschrifteten PP-Röhrchen bis zu ihrer weiteren Verarbeitung mittels ELISA-Test bei -80 °C tiefgefroren (**Abschnitt 2.7**). Die Zellen am Boden der Wells wurden dann mit der FACS-Methode analysiert (**Abschnitt 2.6**). Auf Grund der geringen Zellzahlen bei einigen Probanden und Patienten konnten jedoch nicht immer alle 15 Ansätze realisiert werden.

2.6. Durchflusszytometrie (FACS)

Material

- Zentrifuge MiniSpin [EPPENDORF, Hamburg, D]
- Durchflusszytometer FACScan [BECTON&DICKINSON, Heidelberg, D]
- FACS-Software Cellquest [BECTON&DICKINSON, Heidelberg, D]
- Pipette 100-1000µl [EPPENDORF, Hamburg, D]
- Pipette 20-200µl [EPPENDORF, Hamburg, D]
- Pipettenspitzen blau 1000µl [GREINER BIOONE, Frickenh.,D]
- Pipettenspitzen gelb 200µl [GREINER BIOONE, Frickenh.,D]
- Falconröhrchen FACS 5ml [SARSTEDT, Nümbrecht, D]
- Reaktionsgefäße 1,5 ml [SARSTEDT, Nümbrecht, D]

Reagenzien

- Dulbecco's PBS [GIBCO, New York, USA]
- Fetales Kälberserum (FCS) [SIGMA, Deisenhofen, D]
- Monoklonale Maus-Anti-Human-Antikörper [DAKO, Glostrup, DK]
 - IgG_{2a}-Kontrollantikörper
 - CD14-Antikörper
- 2-amino-4,6-dimethylphenoxazone-3 chromophore (7-AAD) [BECKMANN COULTER, USA]

Lösungen

- FACS-Puffer: PBS + 2% FCS
- NaN₃-Stammlösung (10%): 1g NaN₃-Pulver aufgelöst in 10 ml PBS
- Antikörper-Verdünnungslösung:
49,5 ml FACS-Puffer + 0,5 ml NaN₃-Stammlösung
- Antikörper-Gebrauchslösung:
980 µl Antikörper-Verdünnungslösung + 20µl Antikörper-Stammlösung

Methode

Mit Hilfe der FACS-Methode (Fluorescence Activated Cell Sorting) ist es möglich, Einzelzellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und definierter Oberflächenantigene zu charakterisieren. Die zu untersuchenden Zellen werden separiert und als Suspension über eine dünne Glaskapillare in das Durchflusszytometer gesaugt, so dass ein Flüssigkeitsstrom aus einzelnen Zellen entsteht. Diese passieren einen Laserstrahl und werden mit Licht der Wellenlänge 488 nm bestrahlt. Über Photodetektoren kann die Ablenkung des Strahles senkrecht zur Bewegungsachse (Seitwärtsstreuung, sideward scatter = SSC) gemessen werden, wodurch sich die Granularität der Zellen ermitteln lässt. Die gemessene Absorption des Lichtes entlang des Strahlenganges (Vorwärtsstreuung, forward scatter = FSC) gilt als ein Maß für die Größe der Zellen. Werden die Zellen durch spezifische Antikörper mit gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, können die durch die Bestrahlung aus den Farbstoffen emittierten Photoquanten detektiert werden. Drei der am häufigsten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind Phytoerythrin (PE), Cytochrom-5 (Cy5) und

Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Auf Anregungen durch Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert Cy5 tiefrotes Licht der Wellenlänge 650 nm, PE oranges Licht (585 nm) und FITC grünes Licht einer Wellenlänge von 530 nm. Die Intensitäten der Wellenlängen werden detektiert und dadurch die Menge an zelladhärenten Antikörpern gemessen, welche wiederum proportional der Menge an Oberflächenantigenen der Zelle ist (**Abb. 8**).

Die gespeicherten Daten können durch Darstellung in Koordinatensystemen (Dotplots) ausgewertet werden. Die Achsen des Diagramms werden durch zwei der gemessenen Parameter gebildet, und jede Zelle wird gemäß den bei ihr gemessenen Größen als Punkt eingetragen. Die sich daraus ergebenden Punktwolken repräsentieren die unterschiedlichen Populationen in der analysierten Zellgesamtheit.

Die Software ermöglicht die Auswahl bestimmter Zellpopulationen durch so genannte Gates. Dies gestattet beispielsweise, nachdem im FSC-SSC-Dotplot die Monozyten von den Lymphozyten unterschieden worden sind, die Definition eines Lymphozytengates. Dieses dient zur Charakterisierung der eingeschlossenen Zellen anhand der vorhandenen Oberflächenantigene. Die Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern gestattet eine Analyse der unterschiedlichen Lymphozytensubgruppen. Eine Negativkontrolle führt zum Ausschluss derjenigen (toten) Zellen und Zelltrümmer, die die angebotenen Antikörper unspezifisch gebunden haben. Die absoluten Mengen und die prozentualen Anteile der antikörpertragenden Zellen lassen sich mit Hilfe von Quadrantenstatistiken darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur die CD14-positiven Monozyten identifiziert und die toten Zellen quantifiziert.

Durchführung

Am Tag der Zellaufreinigung wurden die nativen Zellen gemessen. Einen Tag später, also nach der Inkubation der Zellen in Kulturmedium, erfolgte jeweils die Messung der Zellen nach Stimulation mit TNF- α , LPS, Fluticason, Prednisolon und Salmeterol in der Zellkultur.

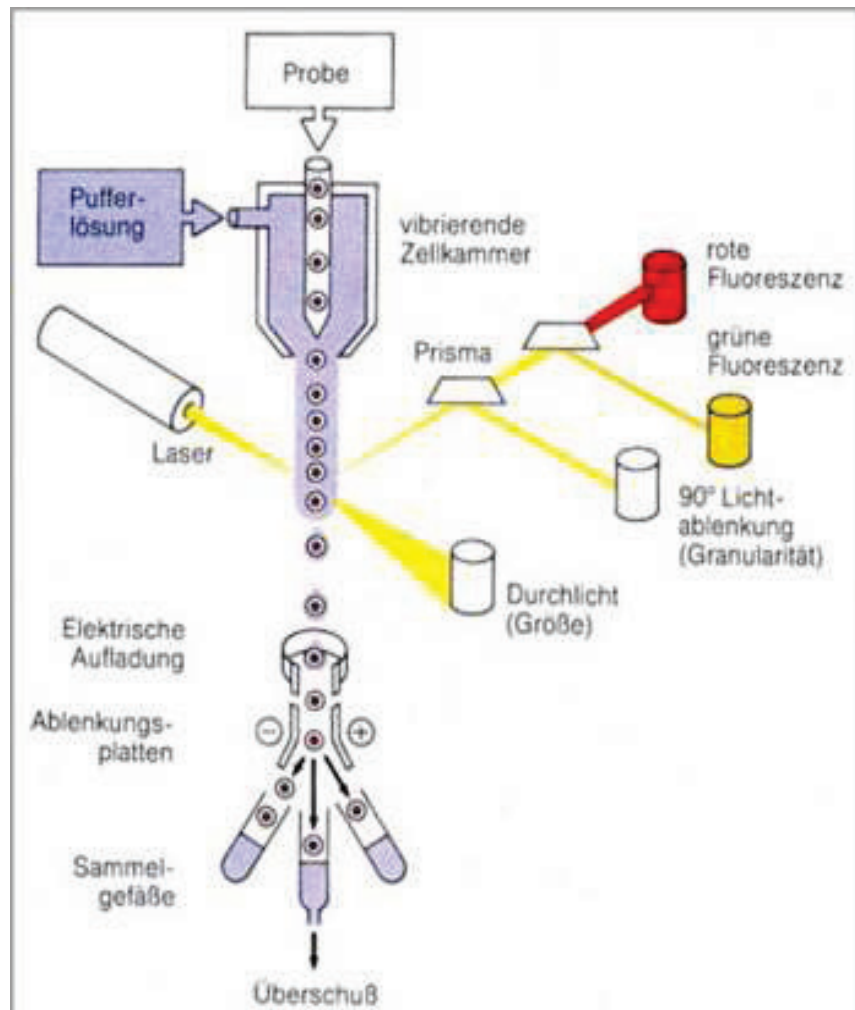


Abb. 8: Grundprinzip der FACS-Messung

Die Zellen werden einzeln durch den Laserstrahl geleitet, wodurch ihre Größe und Granularität bestimmt werden kann. Fluoreszenzmarkierte Antikörper ermöglichen die zusätzliche Detektion spezifischer Oberflächenantigene.

Dazu wurden je 10.000 Zellen in FACS-Falkonröhrchen pipettiert und entweder mit 10 µl IgG2a, oder mit 10 µl CD14 + 10 µl 7-AAD vermischt, nachdem die Antikörper-Gebrauchslösungen zuvor kurz gemischt worden waren (**Tab. 6**). Die Röhrchen wurden dann 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert und anschließend mit 400 µl FACS-Puffer vermischt. Danach erfolgt die Messung am FACS-Gerät. Es wurden 10000 Zellen aus jedem Ansatz mit dem Durchflussszytometer gemessen.

Kontrolle	Kontrolle	TNF α - oder LPS-stimulierte Zellen	TNF α - oder LPS-stimulierte Zellen
+ 10 μ l IgG2a	+ 10 μ l CD 14 + 10 μ l 7-AAD	+ 10 μ l IgG2a	+ 10 μ l CD 14 + 10 μ l 7-AAD

Tabelle 6: Ansätze für die FACS-Messung der PBMC

Messung der Zellen nach Inkubation in normalem Medium (Kontrolle) oder nach Stimulation mit TNF- α bzw. LPS. So wurde mit allen Zellen aus den verschiedenen Kulturmedien verfahren (Fluticason, Prednisolon, Salmeterol).

2.7. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Material

- Multichannel-Pipette [EPPENDORF, Hamburg, D]
- Pipette Research 100-1000 μ l [EPPENDORF, Hamburg, D]
- Pipette Research 20-200 μ l [EPPENDORF, Hamburg, D]
- Pipettenspitzen blau 1000 μ l [GREINER BIOONE, Frickenh.,D]
- Pipettenspitzen gelb 200 μ l [GREINER BIOONE, Frickenh.,D]
- Photometer ANTHOS HT III [ANTHOS MIKROSYSTEME, Krefeld, D]
- Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R [KENDRO, Hanau, D]
- Schüttler Belly Dancer [STOVALL, Greenboro, USA]
- Rundbodenplatten, 96 Wells [GREINER MICROLON, Frickenh., D]
- PP – Röhrchen 1,3 ml [GREINER BIOONE, Frickenh.,D]
- Reagent Reservoir Costar 50 ml [CORNING , Wiesbaden, D]
- Parafilm

Reagenzien

- ELISA-Kit DuoSet [R&D SYSTEMS, Wiesbaden, D]
- Bovines Serumalbumin (BSA) [SIGMA, Deisenhofen, D]
- Tween 20 [MERCK-SCHUCHARDT, Hohenbr., D]
- Entwickler [R&D SYSTEMS, Wiesbaden, D]
 - Color Reagent A: H₂O₂ und Color Reagent B: Tetramethylbenzidin (TMB)

Lösungen

PBS-Puffer:	80 g NaCl + 2,051 g KCl + 14,4 g Na ₂ HPO ₄ + 2,04 g KH ₂ PO ₄ aufgelöst in 1000 ml Aqua dest., pH-Wert eingestellt auf 7,3, zum Gebrauch 1:10 verdünnt
Blockpuffer:	PBS + 1 % BSA + 5 % Saccharose + 0,05 % NaN ₃ PBS + 5 % Tween 20 + 0,05 % NaN ₃ [<i>nur für TGF-β</i>]
Reagent Diluent:	PBS + 1 % BSA PBS + 1,4 % BSA + 0,05 % Tween 20 [<i>nur für TGF-β</i>]
Waschpuffer:	PBS + 0,05 % Tween 20
Stopp-Lösung:	2N H ₂ SO ₄
Aktivierungslösung:	100 ml Aqua dest. + 150,2 g Harnstoff + 35,9 ml Eisessigsäure, aufgefüllt auf 250 ml mit Aqua dest. = 2,5 N Eisessigsäure/10 M Harnstoff [<i>nur für TGF-β</i>]
Neutralisationslösung:	140 ml Aqua dest. + 67,5 ml 10 N NaOH + 59,5 g HEPES, aufgefüllt auf 250 ml mit Aqua dest. = 2,7 N NaOH / 1 M HEPES [<i>nur für TGF-β</i>]

Methode

Der so genannte „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) dient der quantitativen Bestimmung von Protein-Stoffmengenkonzentrationen. Die Bildung eines Komplexes aus gesuchtem Eiweiß, Antikörpern und einem Enzym führt zur enzymatischen Umsetzung eines Substratgemisches. Hiermit ist ein Farbumschlag verbunden, der sich photometrisch bestimmen und in die Konzentration des interessierenden Proteins umrechnen lässt (**Abb. 9**). Der auf die Mikrotiterplatte aufgetragene monoklonale Primärantikörper (Capture Antibody) wird an diese fest gebunden. Wird nun die Probe mit dem interessierenden Protein (Antigen) dazu gegeben, bindet der Primärantikörper dieses ebenfalls.

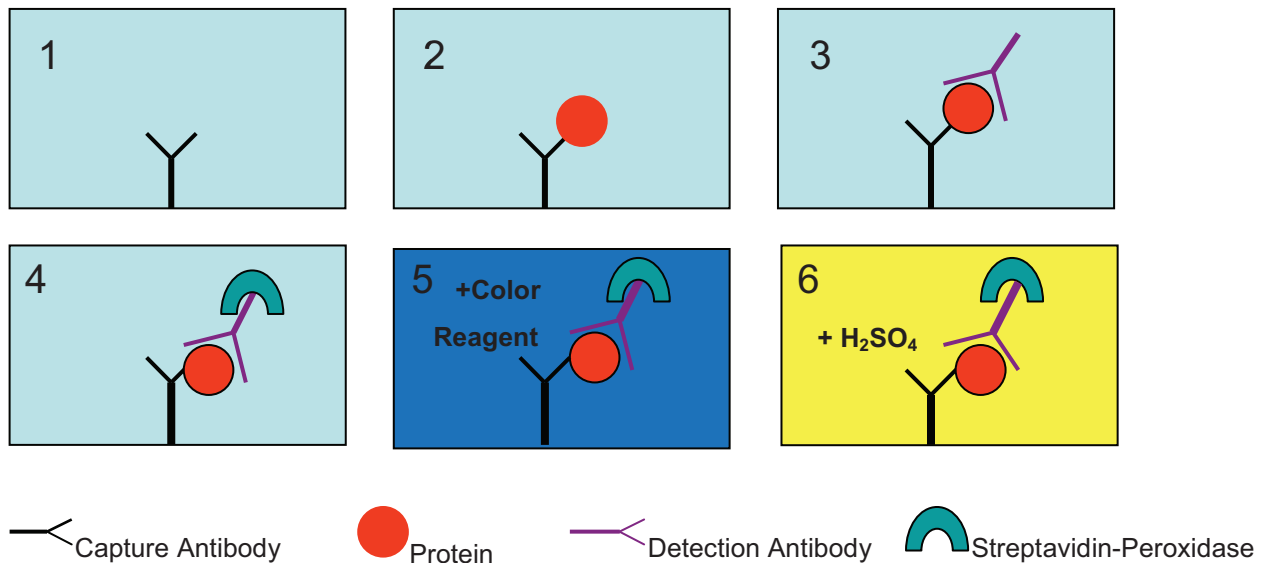


Abb. 9: Grundprinzip des ELISA

Der erste, spezifische Antikörper („Capture Antibody“) wird auf die ELISA-Platte geschichtet (1). An ihn wird das lösliche Antigen gebunden (2). Der Zweitantikörper („Detection Antibody“) erkennt ein anderes Epitop des Antigens (3). Durch das zugegebene Enzym Streptavidin-Peroxidase (4) wird eine Farbreaktion nach Zugabe von Color Reagent katalysiert (5), die photometrisch quantifiziert werden kann, nachdem Schwefelsäure einen Umschlag ins gelbliche bewirkt hat (6).

Der im Folgenden hinzugefügte polyklonale Sekundärantikörper (Detection Antibody) bindet mit einer seiner zwei Bindungsstellen ebenfalls an diesen Antigen-Antikörper-Komplex. Die andere Bindungsregion fixiert die nun dazu kommende Streptavidin-Peroxidase, welche in der Lage ist, Tetramethylbenzidin durch eine Redoxreaktion mit Wasserstoffperoxid in die oxidierte Form zu überführen, und bewirkt so einen bläulich sichtbaren Farbumschlag. Die Zugabe von Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag in den gelblichen Bereich, welcher in seiner Intensität quantitativ bestimmt werden kann und mit Hilfe der mitgeführten Standardreihen definierter Konzentrationen in die Stoffmengenkonzentration des gesuchten Proteins umgerechnet werden kann.

Durchführung

Die Primärantikörper (Capture Antibody) wurden in PBS auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt und mit jeweils 50 µl pro Well auf die ELISA-Rundbodenplatte aufgetragen. Die mit Parafilm abgedeckten Platten wurden in Dunkelheit bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Platten manuell achtmal mit Waschpuffer gewaschen, der vor jeder Benutzung frisch angesetzt wurde. Im Anschluss daran erfolgte das Auftragen von 100 µl Blockpuffer pro Well. Die Platten wurden daraufhin bei Dunkelheit und Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert und wiederum achtmal gewaschen. Nach dem im Folgenden beschriebenen Schema wurde nun das Pipettieren der Probenlösungen vorgenommen: In die beiden oberen Reihen der Platte wurden in die ersten zehn Wells 50 µl der Standardverdünnungsreihen pipettiert; die beiden letzten Vertiefungen enthielten lediglich 50 µl Verdünnungslösung und dienten als Negativkontrolle und Blankwert. Die übrigen 72 Wells in den unteren sechs Reihen der Platte wurden durch jeweils 50 µl der Probenlösungen belegt. Die Proteinkonzentrationen aller Proben wurden in Doppelbestimmung erfasst. Die Platten wurden mit Parafilm abgedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Belly Dancer inkubiert. Nach erneutem achtmaligen Waschen wurden pro Well 50 µl des Sekundärantikörpers (Detection Antibody) aufgetragen und mit Parafilm abgedeckt, um dann für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Belly Dancer zu inkubieren, wonach die Platten dann wiederum achtmal gewaschen wurden. Im Folgenden wurde dann die Streptavidin-Peroxidase-Stammlösung 1:200 mit Reagent Diluent verdünnt und mit einem Volumen von 50 µl pro Well appliziert. Daran schloss sich eine Inkubation bei Dunkelheit und Raumtemperatur von 20 Minuten Dauer an. Die im Verhältnis 1:1 gemischten Color Reagents A und B wurden nun mit einem Volumen von 50 µl pro Well auf die Platten aufgetragen und bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Nach ca. 20 Minuten wurden 50 µl der 1 M Schwefelsäure zum Abstoppen der Reaktion hinzu gegeben. Es erfolgte die sofortige Messung der optischen Dichten mit Hilfe des ANTHOS HT3 Readers bei 450 nm Wellenlänge und einem Referenzfilter bei 595 nm. Unter Verwendung der mitgeführten Standardreihen erfolgte die computergestützte Umrechnung der optischen Dichten in die entsprechenden Konzentrationen.

Bei der Bearbeitung des Assay-Protokolls zur Messung der TGF- β -Konzentration wurde vor dem Auftragen der Proben ein zusätzlicher Schritt vorgenommen, der der Aktivierung des Serums und Plasmas diente. Diese war notwendig, um das Protein in eine immunoreaktive Form zu transferieren und wurde nach folgendem Ablauf durchgeführt: Nach dem Auftauen der Serum- und Plasmaproben wurde ein Volumen von 100 μ l Probe mit 100 μ l einer Lösung aus 2,5 N Eisessigsäure und 10 M Harnstoff gegeben, gut durchmischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Säure durch die Zugabe weiterer 100 μ l Lösung aus 2,7 N Natronlauge und 1 M HEPES neutralisiert. Zusätzlich zu dieser Verdünnung der Proben im Verhältnis 1:3 wurden vor dem Auftragen das Plasma 1:4 und das Serum 1:10 in Reagent Diluent verdünnt.

Protein	Probe	Proben Verdünnung	Konz. CAB (ng/ml)	Konz. DAB (ng/ml)	Standard -Max. (pg/ml)	Standard -Min. (pg/ml)	Aktivierung der Proben
BDNF	Serum	1:50	2000	25	2000	8	-
	Plasma	-	2000	25	2000	8	-
	Zellkultur	-	2000	25	2000	8	-
TGF-β1	Serum	1:30	2000	300	2000	8	+
	Plasma	1:12	2000	300	2000	8	+

Tabelle 7: Konzentrationen und Verdünnungen der ELISA-Ansätze

Dargestellt ist die Verdünnung der Proben (in PBS), die Konzentration der Primärantikörper (capture antibody, CAB) und der Sekundärantikörper (detection antibody, DAB), das Minimum und das Maximum des Standards auf dem ELISA, und eine eventuelle Aktivierung der Proben.

Die ELISA-Messungen für BDNF erfolgten aus Serum, Plasma und den Zellkulturüberständen. TGF- β wurde im Serum und im Plasma bestimmt. Die Messungen von Serotonin aus dem Serum wurden vom Zentrallabor durchgeführt. Die entsprechenden Verdünnungen sind **Tabelle 7** zu entnehmen.

2.8. Messungen im Zentrallabor

Die weiteren Laborbestimmungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Christiana Zingler im Institut für Klinische Chemie und Labormedizin der Universität Rostock durchgeführt. Das Blutbild wurde mit einem hämatologischen Analysegerät (XE, 2100, Sysmex, Norderstedt, Deutschland) bestimmt. Die Serotonin-Bestimmung im Serum und Plasma erfolgte mittels HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) unter Nutzung eines kommerziell erhältlichen Reagenz-Systems (Chromosystems, München, D). C-reaktives Protein (CRP, Detektionslimit: 1 µg / ml Plasma) wurde mittels Synchron LX 20 (Beckmann Coulter, Krefeld, D), Procalcitonin (PCT, Detektionslimit: 0.06 ng / ml Serum) wurde mittels Kryptor PCT automated assay (Brahms, Hennigsdorf, D) gemessen.

2.9. Statistik

Die Auswertung der in dieser Studie erhobenen Daten erfolgte mit dem Datenanalyseprogramm Statistical package for social sciences (SPSS) (Chicago, IL, USA). Die meisten Parameter waren nicht normalverteilt. Daher wurde der Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der Gruppen gewählt (Patienten versus Kontrollen). Für die Vergleiche der Patientendaten zu verschiedenen Zeitpunkten wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Gruppen benutzt. Die Korrelationen wurden mit Hilfe des Spearman Korrelationskoeffizienten berechnet. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant gewertet. Die Boxplot-Darstellungen zeigen den Median (schwarze Linie innerhalb der Box), den Interquartilsabstand (Höhe der Box) und alle Fälle, die weniger als 1,5 Interquartilsabstände vom oberen Quartil nach oben oder vom unteren Quartil nach unten entfernt liegen (vertikale Linien).

3. ERGEBNISSE

3.1. Charakteristika der Studienteilnehmer

Von den anfänglich eingeschlossenen und untersuchten 26 Patienten wiesen 4 im Laufe der stationären Behandlung Hinweise auf maligne Erkrankungen auf, so dass sie ausgeschlossen werden mussten. Ein Patient verstarb, bei einem anderen wurde eine Cholezystitis als Ursache der Entzündung diagnostiziert und ein Patient wurde wegen Multimorbidität ausgeschlossen. Drei weitere Patienten mussten wegen Dialysepflichtigkeit, chronischer Mittellappenpneumonie mit bereits mehrfacher antibiotischer Therapie und Zustand nach Empyem-Operation ausgeschlossen werden. Letztendlich konnten 16 Patienten (4 weibliche und 12 männliche Patienten) eingeschlossen und ausgewertet werden (**Tab. 8**).

Patient	Geschlecht	Alter	BMI	Diagnose	Pack Years	Antibiotische Behandlung
1	männlich	64	26	Pneumonie	40	Cefuroxim
2	weiblich	35	22	Pneumonie	0	Sultamicillin
3	männlich	75	25	Pneumonie	30	Cefuroxim
4	weiblich	80	16	IECOPD	40	Sultamicillin
5	männlich	39	32	Pneumonie	20	Moxifloxacin
6	männlich	52	29	Pneumonie	40	Levofloxacin
7	weiblich	43	33	Pneumonie	20	Moxifloxacin
8	weiblich	80	29	Pneumonie	0	Cefuroxim
9	männlich	55	38	IECOPD	30	Cefuroxim/Vancomycin
10	männlich	68	19	IECOPD	30	Ceftazidim
11	männlich	75	23	IECOPD	45	Sultamicillin
12	männlich	80	26	Pneumonie	100	Sultamicillin
13	männlich	64	27	Pneumonie	40	Levofloxacin
14	männlich	65	28	Pneumonie	0	Moxifloxacin
15	männlich	65	35	Pneumonie	10	Levofloxacin
16	männlich	78	24	Pneumonie	0	Cefuroxim
Median		65	27		30	

Tabelle 8: Patientencharakteristika

Beschrieben werden das Geschlecht, Alter, BMI = Body Mass Index, die klinische Diagnose (IECOPD = infektexazerbierte chronisch obstruktive Lungenerkrankung), Raucheranamnese in Pack Years und das Antibiotikum, mit dem therapiert wurde.

Es wurden 4 Patienten mit infektexazerbierter COPD (chronisch obstruktiver Lungenerkrankung) und 12 Patienten mit einer Pneumonie in die Studie eingeschlossen. Die Mehrheit der Patienten (12 von 16) waren Raucher mit einer Anamnese von 30 Pack Years als Medianwert. Die klinischen Parameter am Tag der Aufnahme sind in **Tab. 9** dargestellt. Die verwendeten Antibiotika wurden vom jeweiligen behandelnden Arzt ausgewählt und alle Patienten wurden mindestens 7 Tage antibiotisch behandelt. Ein Patient erhielt initial Cefuroxim und wurde nach 3 Tagen aufgrund einer Infektion mit Methicillin-resistentem Staphylococcus aureus (MRSA) auf Vancomycin umgestellt. Sputumkulturen wurden bei 4 Patienten durchgeführt und waren in 2 Fällen positiv. Blutkulturen konnten bei 2 von 5 Patienten als positiv beurteilt werden. Alle untersuchten Patienten zeigten nach einer Woche eine deutliche Verbesserung des klinischen Zustandes und der Laborparameter und konnten nach einem medianen Aufenthalt von 9,5 Tagen aus der Klinik entlassen werden.

Parameter	Einheit	Patienten Tag 1
Körpertemperatur	°C	38,0
		(36,7 - 40,2)
Herzfrequenz	bpm	106
		(64 - 127)
Blutdruck systolisch	mmHg	130
		(96 - 174)
Blutdruck diastolisch	mmHg	74
		(49 - 84)
pH	-	7,47
		(7,41 - 7,6)
PaO ₂	mmHg	52,6
		(42,9 - 64,7)
PaCO ₂	mmHg	34,6
		(27,8 - 57,9)

Tabelle 9: Klinische Parameter am Tag der Aufnahme der Patienten

Dargestellt sind die jeweiligen Medianwerte (Minimum - Maximum). bpm = beats per minute, Schläge pro Minute, PaO₂ = Sauerstoffpartialdruck, PaCO₂ = Kohlendioxidpartialdruck.

Zur gleichen Zeit wurden sechzehn Kontrollprobanden rekrutiert. Keiner der Kontrollprobanden litt unter einer akuten oder chronischen Erkrankung und keiner berichtete über eine regelmäßige Medikamenteneinnahme. Die beiden untersuchten Gruppen (Patienten und Kontrollen) wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihres Geschlechtes (4 weibliche, 12 männliche Probanden) auf. Auch waren die Mehrheit der Kontrollprobanden Raucher (11 von 16) mit Median (Minimum-Maximum) - Werten von 20 (10 – 50) Pack Years. Das Alter der Patienten (Median: 65 Jahre, Minimum - Maximum: 35 – 80) unterschied sich nicht signifikant von dem der Kontrollprobanden (Median: 52 Jahre, Minimum - Maximum: 37 – 63).

3.2. Klinische Chemie

3.2.1. Blutbild

Im Blutbild von Patienten und Kontrollprobanden zeigten sich bei Hämoglobin, Hämatokrit und Erythrozyten signifikante Unterschiede. So war das Hämoglobin bei den Patienten an Tag 1 erniedrigt und sank zum Tag 8 hin sogar noch weiter ab. Ebenso verhielten sich der Hämatokritwert und die Erythrozyten. Alle Vergleiche zu den Kontrollprobanden waren signifikant (**Tab. 10**).

Parameter	Einheit	Kontrollen	Patienten Tag 1	Patienten Tag 8	Sign. Tag 1/K	Sign. Tag 8/K
Hämoglobin	mmol / l	9,20	8,25	7,65	0,01	< 0,001
		(7,4 - 10,2)	(6,3 - 9,7)	(6,0 - 8,9)		
Hämatokrit	%	0,43	0,40	0,38	0,049	< 0,001
		(0,35-0,48)	(0,29-0,47)	(0,29-0,42)		
Erythrozyten	10 ¹² /l	4,83	4,51	4,05	0,015	< 0,001
		(4,27-5,38)	(3,03-5,17)	(3,38-4,73)		
Thrombozyten	10 ⁹ /l	230,5	230,5	295	0,792	< 0,01
		(143 - 310)	(111 - 491)	(209 - 594)		
Leukozyten	10 ⁹ /l	5,92	13,65	8,63	< 0,001	< 0,001
		(3,3 - 7,89)	(6,89 - 30)	(3,3-14,6)		

Tab. 10: Blutbild der Studienteilnehmer

Die dargestellten Parameter wurden im Zentrallabor der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock bestimmt. Dargestellt sind die jeweiligen Medianwerte (Minimum - Maximum).

Die Thrombozytenzahlen hingegen wiesen an Tag 1 im Vergleich zu den Kontrollen keinen signifikanten Unterschied auf, stiegen aber an Tag 8 signifikant an. Die Leukozytenzahlen der Patienten am Tag 1 lagen hochsignifikant über den Leukozytenzahlen der Kontrollprobanden. Am Tag 8 waren die Leukozytenzahlen signifikant abgesunken, kehrten jedoch noch nicht zu Kontrollwerten zurück (**Tab. 10**). Zur Verdeutlichung sind die Hämoglobinwerte, die Hämatokritwerte, sowie die Thrombozytenzahlen und die Leukozytenzahlen als Boxplots in den Abb. 10 und 11 dargestellt (**Abb. 10 und 11**).

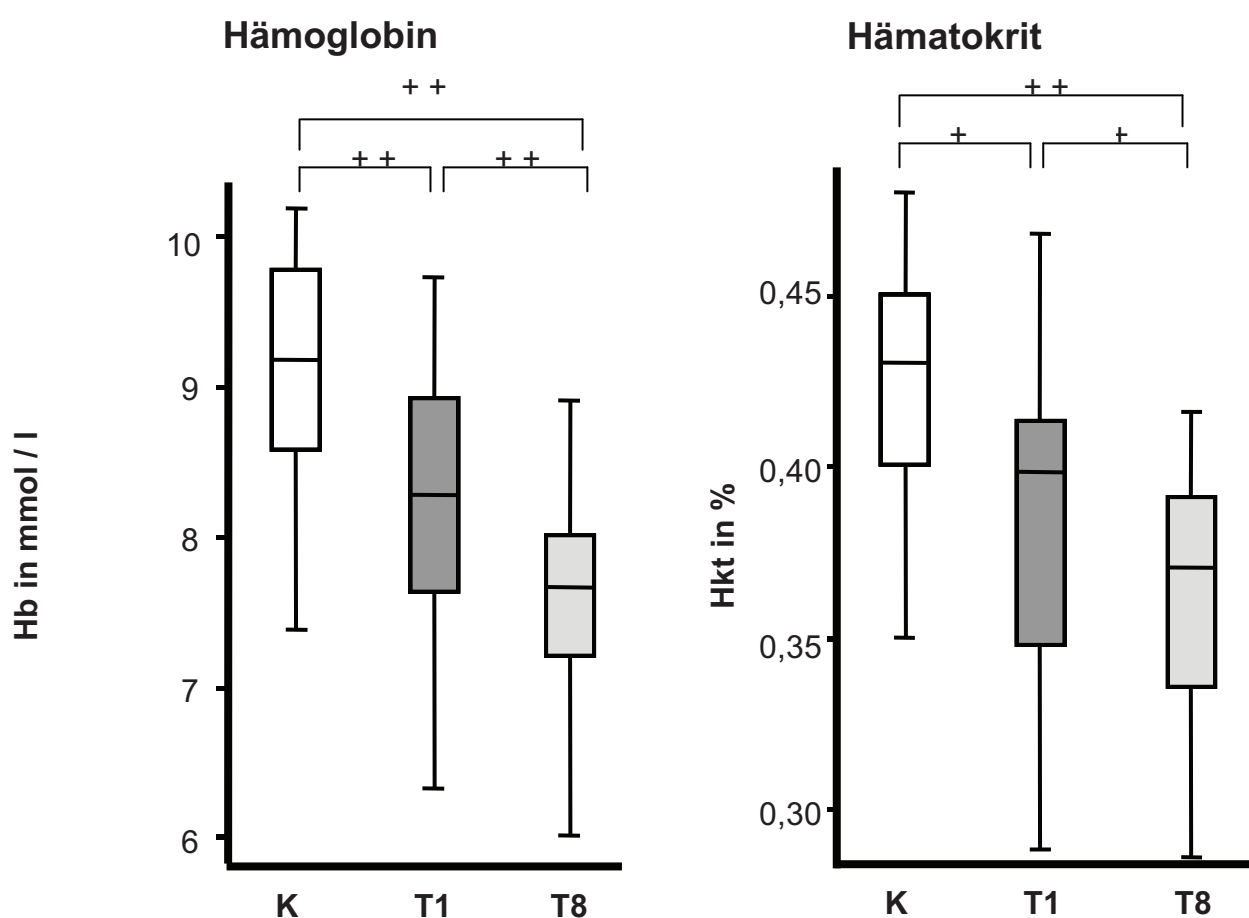


Abb. 10: Boxplot-Darstellung von Hämoglobin und Hämatokrit im Blut

Gezeigt sind die Hämoglobin- (Hb) und Hämatokritwerte (Hkt) der Kontrollprobanden (K, weiße Box) und der Patienten an Tag 1 (T1, dunkelgraue Box) und Tag 8 (T8, hellgraue Box). Das Signifikanzniveau ist über der jeweiligen Grafik angegeben (++ = hoch signifikant ($p < 0,01$), + = signifikant ($p < 0,05$), ns = nicht signifikant).

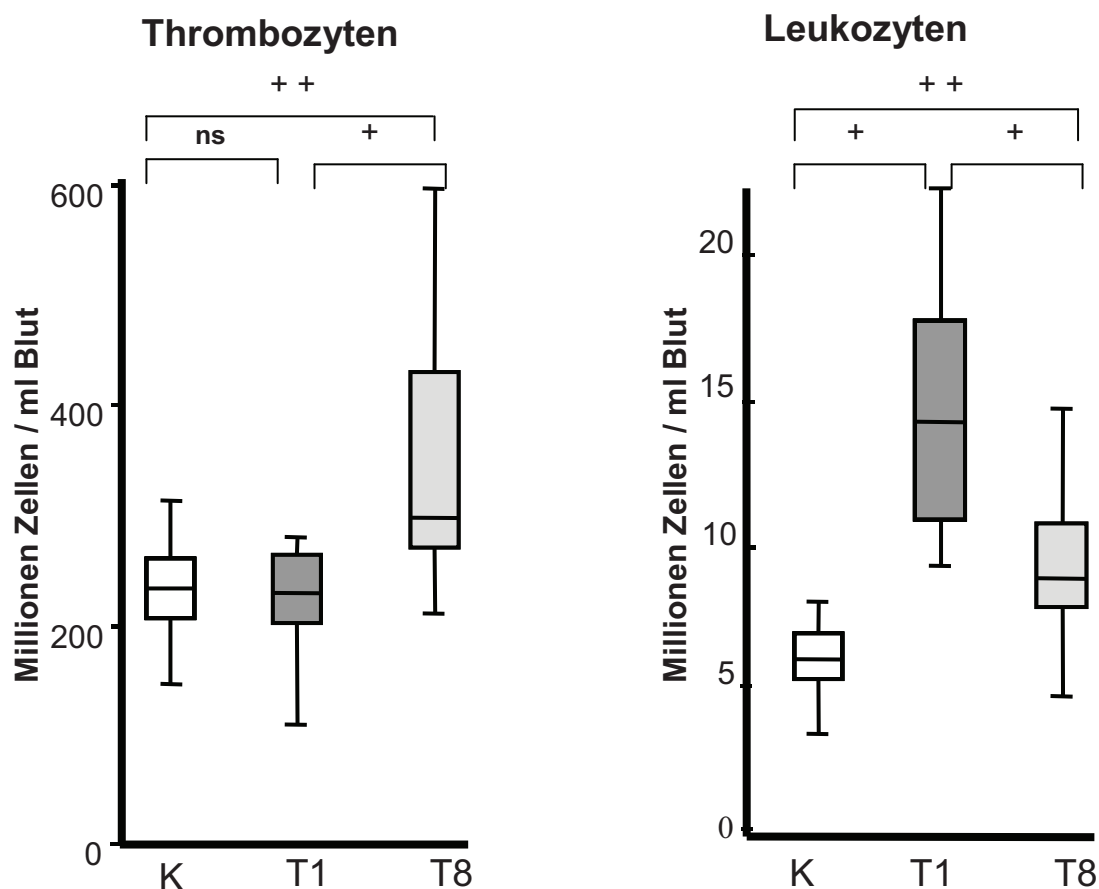


Abb. 11: Boxplot-Darstellung der Thrombozyten und Leukozyten im Blut

Gezeigt sind die Thrombozyten- und Leukozytenwerte der Kontrollprobanden (K, weiße Box) und der Patienten an Tag 1 (T1, dunkelgraue Box) und Tag 8 (T8, hellgraue Box). Das Signifikanzniveau ist über der jeweiligen Grafik angegeben (++ = hoch signifikant ($p < 0,01$), + = signifikant ($p < 0,05$), ns = nicht signifikant).

3.2.2. Entzündungsparameter

Das C-reaktive Protein gilt als klassisches „akute-Phase-Protein“, das als generelle, unspezifische Antwort auf entzündliche Prozesse gebildet wird. Es war bei den Patienten am Tag 1 signifikant erhöht und sank bis zum Tag 8 signifikant ab, blieb jedoch im Vergleich zu der Kontrollgruppe noch signifikant erhöht (**Abb. 12**). Bezüglich Procalcitonin zeigte sich ein vergleichbarer Verlauf (**Abb. 12**).

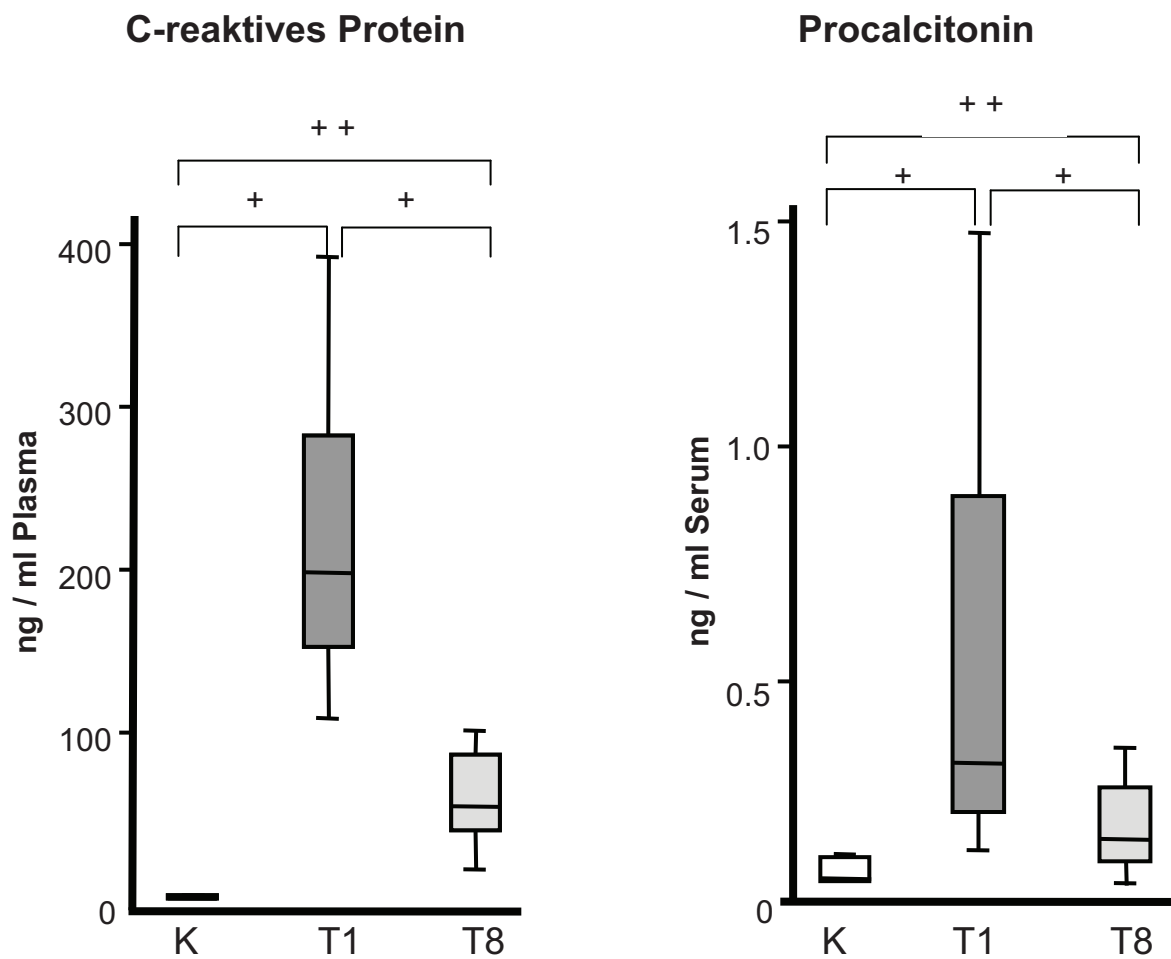


Abb. 12: Boxplot-Darstellung der Entzündungsparameter

Gezeigt sind CRP im Plasma und PCT im Serum der Kontrollprobanden (K, weiße Box) und der Patienten an Tag 1 (T1, dunkelgraue Box) und Tag 8 (T8, hellgraue Box). Das Signifikanzniveau ist über der jeweiligen Grafik angegeben (++ = hoch signifikant ($p < 0,01$), + = signifikant ($p < 0,05$), ns = nicht signifikant).

3.3. BDNF und weitere Thrombozytenmediatoren

Im Serum und Plasma wurden die Konzentrationen des Neurotrophins BDNF bestimmt. Wie bereits in der Literatur beschrieben⁴⁴, fand sich ein deutlicher Unterschied zwischen den BDNF-Konzentrationen im Serum (im ng-Bereich) und Plasma (im pg-Bereich) bei allen Studienteilnehmern. Aus den BDNF-Konzentrationen im Serum und Plasma und den Thrombozytenzahlen wurde die Menge an BDNF pro Thrombozyt (pg / 10⁶) ermittelt. Zusätzlich wurden die Thrombozytenmarker TGF- β und Serotonin in Serum und Plasma mittels ELISA bestimmt (**Tab. 11**).

Es zeigte sich, dass die BDNF-Serumwerte der Patienten an Tag 1 im Vergleich zu den Kontrollen hochsignifikant vermindert waren (auf einen Median von 24% der Kontrollen). Am Tag 8 fand sich hingegen kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (**Tab. 11 und Abb. 13**). Ein ähnlicher Verlauf war für Thrombozyten-BDNF zu beobachten. Die Abnahme des Thrombozyten-BDNF war sogar noch deutlicher: das mediane Thrombozyten-BDNF lag bei 23% des Medians der Kontrollen. Im Plasma hingegen fanden sich keine signifikanten Veränderungen der BDNF-Konzentrationen (**Tab. 11 und Abb. 13**).

Als weitere Thrombozytenmediatoren wurden Serotonin und TGF- β untersucht. Serotonin im Serum war ebenso wie BDNF am Tag 1 gegenüber den Kontrollen hochsignifikant erniedrigt, normalisierte sich jedoch noch nicht am Tag 8 (**Tab. 11 und Abb. 14**). Bezüglich TGF- β im Serum fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Patienten am Tag 1. Es wurde aber ein tendentieller Anstieg der Werte an Tag 8 beobachtet, der jedoch kein Signifikanzniveau erreichte (**Tab. 11 und Abb. 14**).

Bezüglich der Serotonin-Plasma-Konzentrationen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Patienten am Tag 1. Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Abfall der Serotonin-Plasma-Konzentrationen am Tag 8 im Vergleich zu den Kontrollprobanden. Die TGF- β -Plasmakonzentrationen waren sowohl am Tag 1 als auch am Tag 8 signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (**Tab. 11 und Abb. 14**).

Parameter	Gesunde Probanden	Patienten (Tag 1)	Patienten (Tag 8)	Sign. Tag 1/K	Sign. Tag 8/K
BDNF im Serum ng / ml	11,8	2,8	14,1	p<0,001	0,821
	(1,6-37,8)	(0,7-14,1)	(0,3-41,3)		
BDNF im Plasma pg / ml	25,2	22,1	32,8	0,561	0,486
	(5,8-130,3)	(5,4-132,5)	(12,1-177,1)		
BDNF/Thrombozyten pg / 10 ⁶	51,8	12,1	34,5	p<0,001	0,187
	(9,6-184,4)	(5,6-52,8)	(1,3-176,3)		
Serotonin im Serum ng / ml	97,7	20,6	44,5	p<0,001	p<0,01
	(8,0-219,0)	(1,0-77,9)	(9,7-106,0)		
Serotonin im Plasma ng / ml	10,6	13,8	3,4	0,651	p<0,01
	(2,4-62,2)	(0,1-84,9)	(0,1-16,7)		
TGFβ im Serum ng / ml	17,3	17,3	33,0	0,366	0,088
	(10,4-40,2)	(2,8-117,8)	(2,0-233,7)		
TGFβ im Plasma ng / ml	5,5	12,5	11,9	p<0,05	p<0,01
	(3,2-7,9)	(2,0-23,6)	(2,3-25,4)		

Tab. 11: Konzentrationen von BDNF und anderen Thrombozytenmediatoren

Dargestellt sind die jeweiligen Medianwerte (Minimum - Maximum). Zur Ermittlung der Signifikanzen beim Vergleich der Patientengruppen mit der Kontrollgruppe wurde der Mann-Whitney-U-Test (unverbundene Stichproben) angewendet.

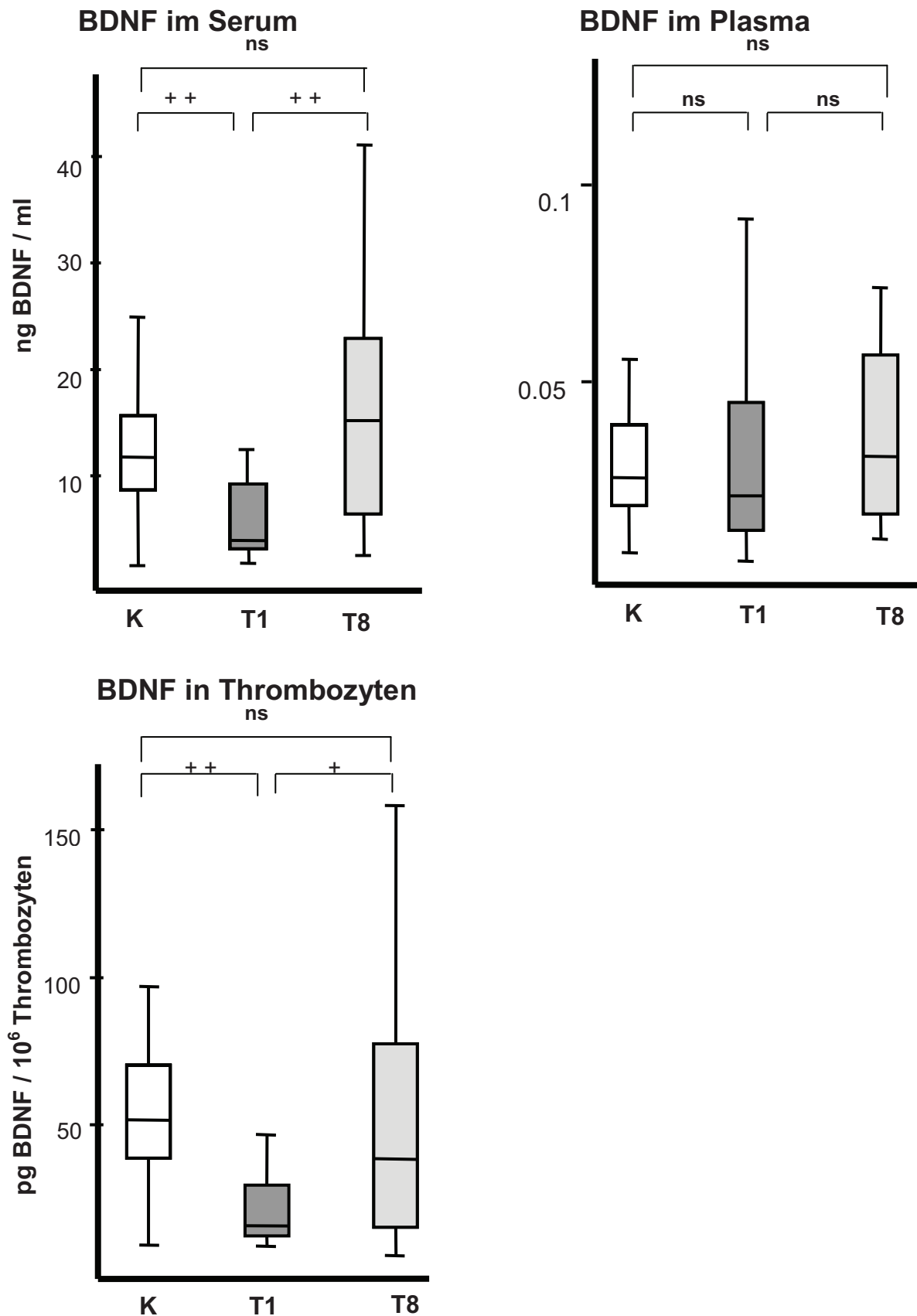


Abb 13: Boxplot-Darstellung von BDNF in Serum, Plasma und in Thrombozyten

Gezeigt sind die BDNF-Werte im Serum und Plasma in ng / ml und in pg pro 10^6 Thrombozyten.

(++ = hoch signifikant ($p < 0,01$), + = signifikant ($p < 0,05$), ns = nicht signifikant).

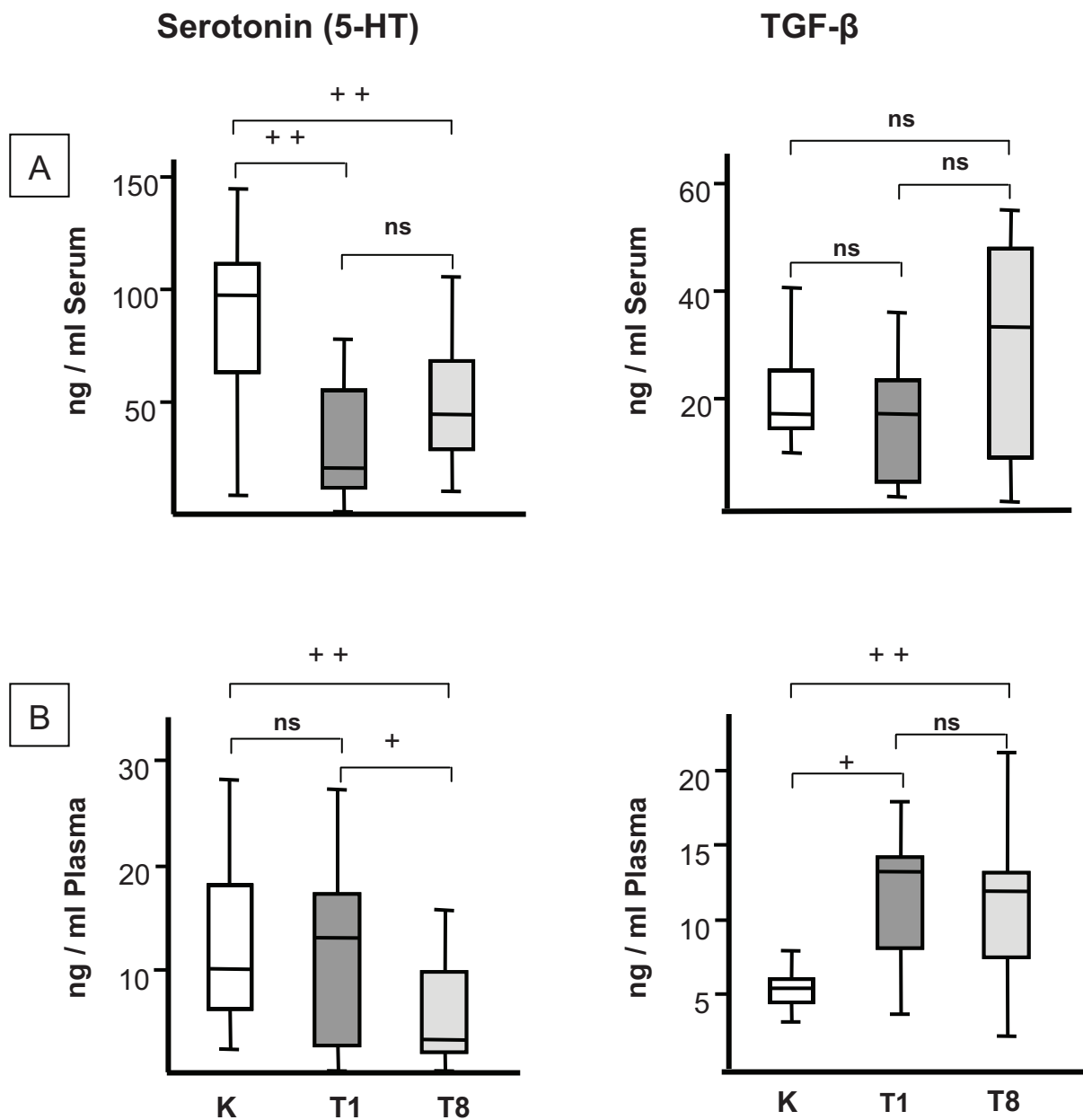


Abb 14: Boxplot-Darstellungen von Serotonin und TGF-β in Serum und Plasma

Gezeigt sind die Serotonin- und TGF-β -Werte in **A**: Serum und **B**: Plasma für die Kontrollprobanden (K, weiße Box) und für die Patienten an Tag 1 (T1, dunkelgraue Box) und Tag 8 (T8, hellgraue Box). Das Signifikanzniveau ist über der jeweiligen Grafik angegeben (++ = hoch signifikant ($p < 0,01$), + = signifikant ($p < 0,05$), ns = nicht signifikant).

3.4. Korrelationen

3.4.1. Korrelationen von BDNF mit anderen Thrombozytenmediatoren

Bei den Kontrollprobanden fand sich eine starke Korrelation zwischen den BDNF- und TGF- β -Konzentrationen im Serum. Im Vergleich zu den Kontrollen war diese Korrelation bei den Patienten am Tag 1 schwächer (jedoch noch signifikant), am Tag 8 fand sich keine signifikante Korrelation (**Abb. 15**). Die Korrelation von BDNF mit Serotonin im Serum war weder bei den Kontrollen noch bei den Patienten am Tag 1 signifikant. Es fand sich jedoch eine Korrelation zwischen Serum-BDNF und Serum-Serotonin am Tag 8 (**Abb. 15**). Bis auf eine Korrelation zwischen Plasma-BDNF und Plasma-TGF- β am Tag 8 ($r = 0,66$, $p = 0,02$, vor allem jedoch auf Ausreißern beruhend) fanden sich keine Korrelationen zwischen den Plasma-Spiegeln der verschiedenen Thrombozytenmediatoren (Daten nicht gezeigt).

3.4.2. Korrelation von Thrombozytenmediatoren mit Entzündungsparametern

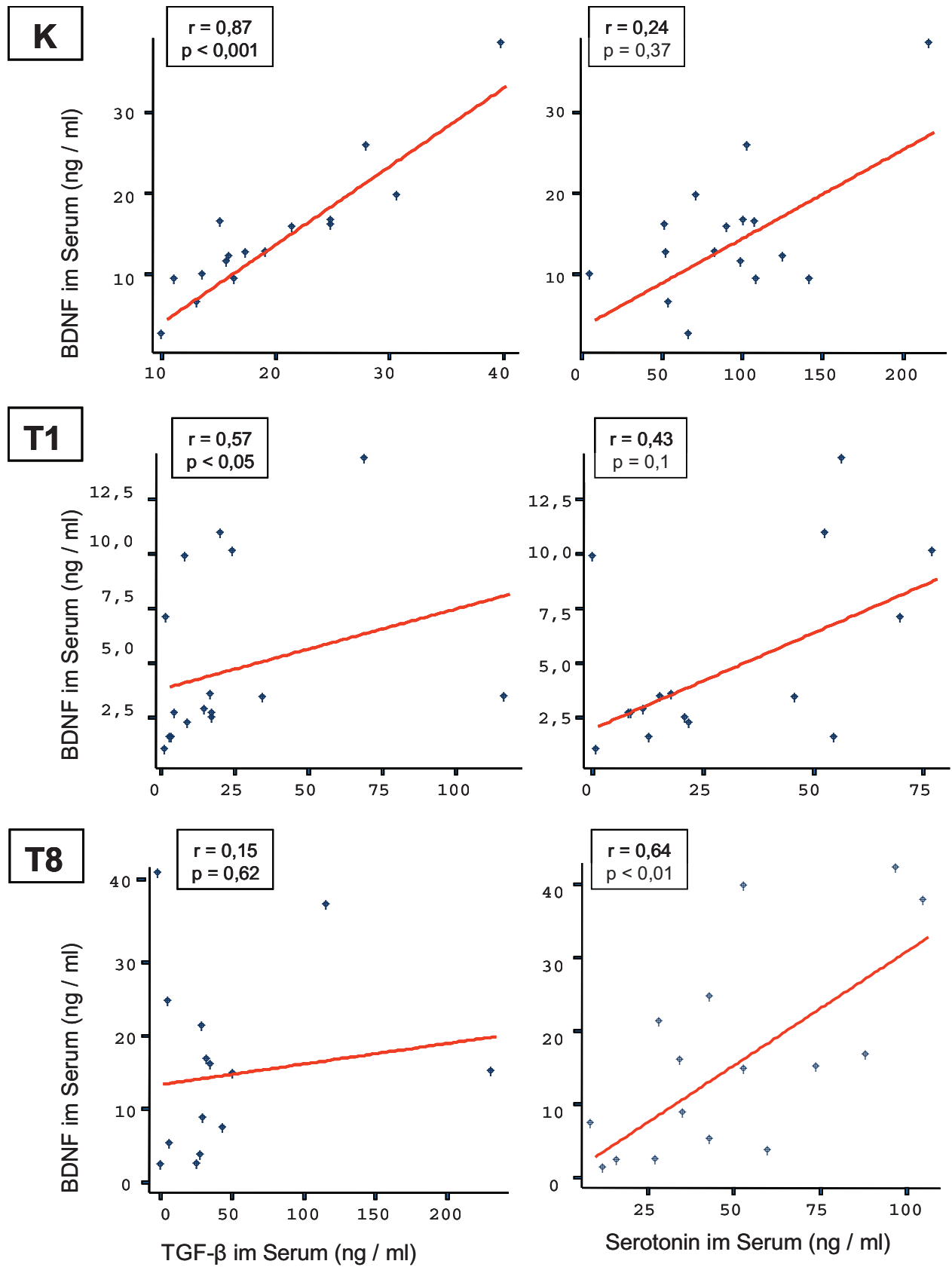
Es fand sich eine negative Korrelation zwischen Procalcitonin und Serotonin im Serum ($r = - 0,59$, $p = 0,02$) und Serotonin im Plasma ($r = - 0,53$, $p = 0,04$). Ansonsten fanden sich keine signifikanten Korrelationen zwischen den Entzündungsparametern (CRP, PCT) und den jeweiligen Thrombozytenmediatoren (BDNF, TGF- β , Serotonin) im Plasma und Serum (Daten nicht gezeigt).

3.4.3. Korrelation von Thrombozytenmediatoren mit Leukozyten

Es fand sich eine signifikante Korrelation zwischen Leukozytenzahlen und TGF- β im Plasma ($r = 0,57$, $p = 0,02$) bei den Patienten am Tag 8. Ansonsten fanden sich keine signifikanten Korrelationen zwischen den Leukozytenzahlen und den Konzentrationen von BDNF, TGF- β und 5-HT (Daten nicht gezeigt).

Abb. 15: Korrelationen von BDNF und Thrombozytenmarkern im Serum

Gezeigt werden die Korrelationen von BDNF im Serum (ng / ml) mit den Thrombozytenmarkern TGF- β im Serum (ng / ml) und Serotonin im Serum (ng / ml) bei den Kontrollen sowie den Patienten an Tag 1 und an Tag 8. Die Korrelationen wurden mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r) berechnet. Die Gerade (rot) stellt die Regressionsgerade dar. Siehe nächste Seite.



3.4.4. Korrelation mit klinischen Parametern

Am Tag 1 waren die Vitalzeichen (Temperatur, Puls, Blutdruck) und Blutgase (PaCO₂ und PaO₂) nicht signifikant mit den BDNF-Konzentrationen im Serum, Plasma oder in den Thrombozyten korreliert (Daten nicht gezeigt). Es fand sich jedoch eine negative Korrelation zwischen dem Blut-pH-Wert und den BDNF-Konzentrationen im Serum ($r = -0,60$, $p < 0,05$), den BDNF-Konzentrationen im Plasma ($r = -0,74$, $p < 0,01$) und den BDNF-Konzentrationen in Thrombozyten ($r = -0,53$, $p < 0,05$). Hierbei muss erwähnt werden, dass alle pH-Werte im alkalischen Bereich lagen ($> \text{pH } 7,40$).

3.5. Zellkultur

Die Zellkultur-Experimente wurden einmalig bei den Kontrollprobanden und bei den Patienten zu den beiden Zeitpunkten Tag 1 und Tag 8 durchgeführt. Die Kulturen aus isolierten Monozyten-angereicherten PBMC wurden nativ, mit LPS, TNF- α und verschiedenen Konzentrationen von Prednisolon, Fluticason und Salmeterol stimuliert. Die Überstände wurden nach 24 Stunden Inkubation abgenommen, in diesen wurde das Neurotrophin BDNF mittels ELISA bestimmt. Die Zellen wurden nativ und nach 24 h Inkubation mittels FACS durchflußzytometrisch analysiert.

3.5.1. Bestimmung der Monozytenzahl und des Anteiles toter Zellen

Die FACS-Messungen dienten zum einen der Bestimmung des prozentualen Anteils an Monozyten an der Gesamtmenge der isolierten Zellen und zum zweiten der Ermittlung des prozentualen Anteils toter Zellen an der Gesamtzellzahl in den Ansätzen vor und nach Inkubation. Der Anteil an Monozyten war in den Zellkulturen der Patienten (Tag 1 und 8) tendentiell höher als in den Zellkulturen der Kontrollen, dies war jedoch nicht statistisch signifikant (**Tab. 12**). Bezüglich des Anteiles toter Zellen (sowohl Monozyten als auch Gesamt-Zellen) fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (**Tab. 12**). Die Stimulation der Zellen mit Prednisolon, Fluticason oder Salmeterol hatte keinen signifikanten Effekt auf das Überleben in der Zellkultur (Daten nicht gezeigt).

Zellkultur	Kontrollen	Patienten Tag 1	Patienten Tag 8
Monozyten 0h (%)	37,5	54,4	46,2
	(10,3 - 56,9)	(19,6 - 82,1)	(10,3 - 82,1)
Monozyten 24h (%)	16,6	27,1	22,2
	(4,3 - 41,4)	(13,7 - 60,3)	(4,3 - 68,0)
Tote Monozyten 0h (%)	0,3	0,5	0,4
	(0,1 - 1,3)	(0,3 - 8,1)	(0,1 - 8,1)
Alle toten Zellen 0h (%)	0,5	0,9	0,7
	(0,3 - 2,1)	(0,4 - 0,3)	(0,3 - 10,3)
Tote Monozyten 24h (%)	1,6	3,5	1,9
	(0,7 - 5,1)	(1,2 - 7,5)	(0,1 - 7,5)
Alle toten Zellen 24h (%)	7,2	12,9	8,1
	(3,7 - 20,4)	(3,1 - 34,9)	(0,01 - 34,9)

Tabelle 12: Monozytenanteil und Überleben in der Zellkultur

Gezeigt sind die prozentualen Anteile der Monozyten an der Gesamtzahl der aufgereinigten PBMC (vor und nach Kultur) und der Anteil toter Zellen vor und nach Kultur als Median (Minimum – Maximum).

3.5.2. BDNF-Sekretion mononukleärer Zellen von Patienten und Probanden

Die BDNF-Freisetzung aus mononukleären Zellen wurde zunächst ohne jegliche Stimulation gemessen. Es fand sich kein signifikanter Unterschied der BDNF-Konzentrationen in den PBMC-Zellkulturüberständen unstimulierter Zellen der Kontrollprobanden (Median: 13,1 pg/ml), der Patienten am Tag 1 (Median: 14,6 pg/ml) und der Patienten am Tag 8 (Median: 20,6 pg/ml). Zum Vergleich der BDNF-Konzentrationen in Überständen von stimulierten und unstimulierten Zellen wurden, aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität der BDNF-Konzentrationen, die BDNF-Konzentrationen der Medium-Kontrolle jedes einzelnen Probanden als 100% festgelegt. In **Abb. 16** zeigt sich eine signifikant verstärkte Sekretion von BDNF nach Stimulation der PBMC mit TNF- α und dem Bakterientoxin LPS sowohl bei den Kontrollprobanden als auch bei den Patienten an Tag 1 und 8. Bezüglich der Steigerung der BDNF-Sekretion nach Stimulation fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Probanden und den Patienten weder an Tag 1 noch an Tag 8.

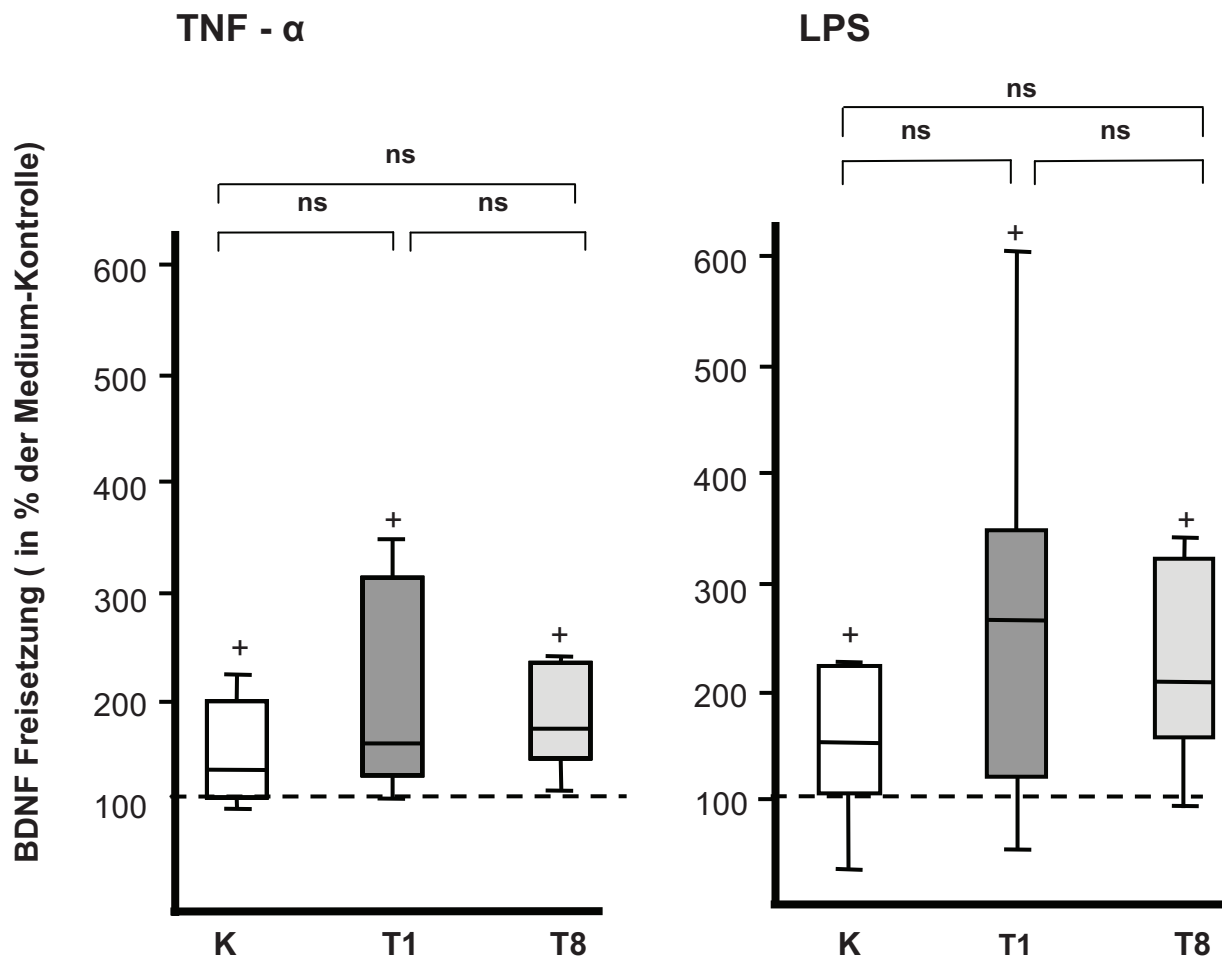


Abb 16: BDNF- Freisetzung aus PBMC von Patienten und Probanden

Gezeigt wird die BDNF-Freisetzung aus mononukleären Zellen (PBMC) in % von der Mediumkontrolle (Mediumkontrolle = 100%) nach Stimulation mit TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α) und LPS (Lipopolysaccharid) über 24 Stunden. Kontrollprobanden (K, weiss), Patienten an Tag 1 (T1, dunkelgrau) und Tag 8 (T8, hellgrau). + bedeutet $p < 0,05$ im Vergleich zur entsprechenden Mediumkontrolle, ns bedeutet nicht signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten am Tag 1 oder Tag 8.

3.5.3. Einfluss von Medikamenten auf die BDNF-Sekretion

Die PBMC wurden außerdem mit den Steroiden Fluticason und Prednisolon sowie dem β_2 -Sympathomimetikum Salmeterol inkubiert, um deren Wirkung auf die BDNF-Sekretion untersuchen zu können. Auch für **Abb. 17a/b** wurde die Mediumkontrolle

jedes einzelnen Probanden (jeweils mit und ohne Stimulation durch TNF- α) als 100% festgelegt. In den Zellkulturen ohne TNF- α -Stimulation zeigte sich eine signifikant verminderte BDNF-Produktion nach Stimulation mit Fluticason und eine signifikant erhöhte Sekretion von BDNF aus PBMC nach der Stimulation mit Salmeterol. Interessanterweise unterdrückte die Stimulation mit der Kombination aus Fluticason und Salmeterol die BDNF-Sekretion im vergleichbaren Maße wie die Stimulation mit Fluticason alleine (**Abb. 17a**). Nach Stimulation mit TNF- α zeigte sich ein ähnlicher Effekt von Salmeterol auf die BDNF-Sekretion wie ohne Stimulation mit TNF- α (**Abb. 17b**). Der Einfluß von Fluticason (sowohl alleine als auch in Kombination mit Salmeterol) auf die BDNF-Sekretion war nach Stimulation mit TNF- α geringer ausgeprägt, und nur bei den Kontrollen signifikant. Bei der Stimulation mit Prednisolon traten keine signifikanten BDNF-Konzentrationsunterschiede auf, unabhängig davon, ob eine Stimulation mit TNF- α durchgeführt wurde oder nicht (**Abb. 17a/b**).

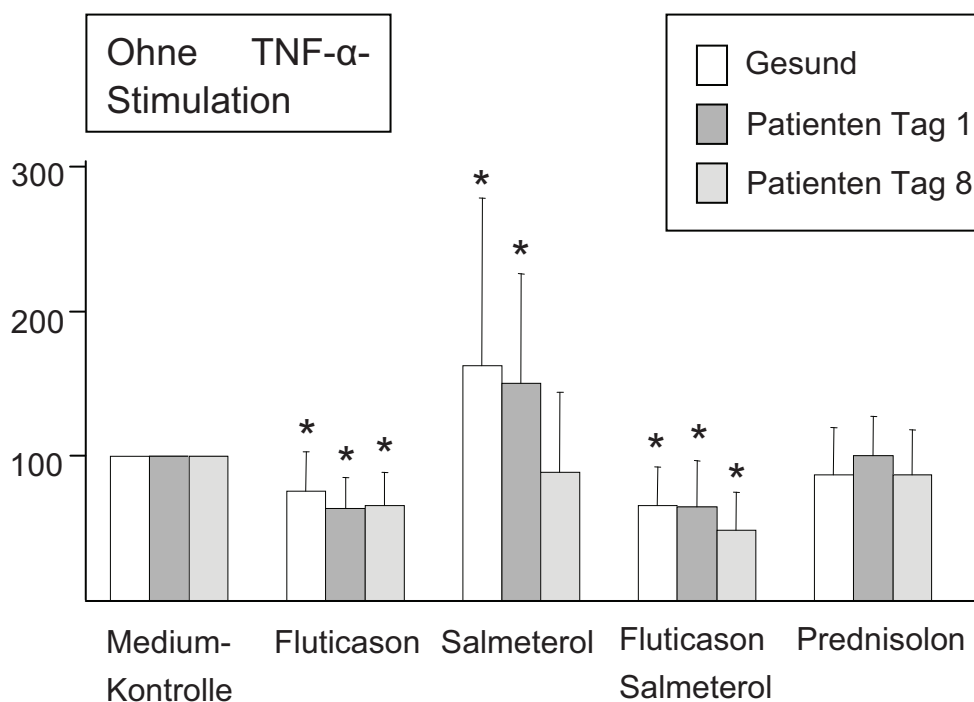


Abb. 17a: BDNF in PBMC nach Stimulation mit Salmeterol, Fluticason und Prednisolon (ohne Stimulation durch TNF- α)

Gezeigt werden die BDNF-Werte aus PBMC gemessen in Prozent im Vergleich zur Mediumkontrolle (=100%) ohne Stimulation durch TNF- α . Die PBMC wurden zusätzlich mit Salmeterol, Fluticason, Prednisolon und der Kombination Salmeterol+Fluticason stimuliert.

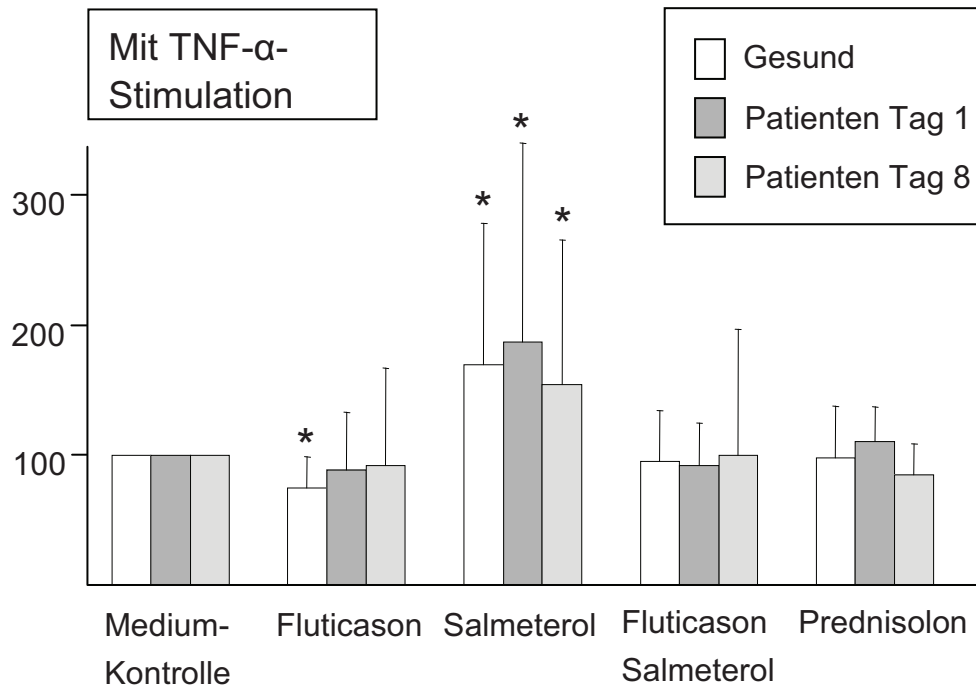


Abb. 17b: BDNF in PBMC nach Stimulation mit Salmeterol, Fluticason und Prednisolon (mit Stimulation durch TNF- α)

Gezeigt werden die BDNF-Werte aus PBMC gemessen in Prozent im Vergleich zur Mediumkontrolle (=100%) mit Stimulation durch TNF- α . Die PBMC wurden zusätzlich mit Salmeterol, Fluticason, Prednisolon und der Kombination Salmeterol+Fluticason stimuliert.

4. DISKUSSION

Eine erhöhte bronchiale Reagibilität im Laufe und nach einer akuten Entzündung der unteren Atemwege ist ein sehr häufiges Phänomen, welches zu klinischen Symptomen wie Husten oder Luftnot führt. Die Pathogenese der postinfektiösen bronchialen Hyperreagibilität ist jedoch kaum verstanden. Aus diesem Grunde ist auch die Therapie der Symptome bislang sehr limitiert und rein empirisch. Eine zeitlich begrenzte Therapie mit inhalativen Steroiden stellt heute das Mittel der Wahl dar. Der zugrunde liegende Wirkmechanismus ist jedoch nicht bekannt. Eine der möglichen Erklärungen für die postinfektiös erhöhte bronchiale Reagibilität ist eine veränderte Aktivität der die Atemwege innervierenden Nerven. Sowohl im gesunden Zustand als auch während einer Entzündung findet eine umfangreiche Kommunikation zwischen Immunzellen und Nerven in der Lunge statt^{71,72}. Während einer Entzündung ist diese Kommunikation verstärkt. Man geht davon aus, dass Immunzellen durch bestimmte Mediatoren die Aktivität von Neuronen in der entzündeten Lunge beeinflussen können und somit eine neuronale Hyperreagibilität hervorrufen können. Andererseits können die hyperreagiblen Nerven durch eine verstärkte Ausschüttung von Neurotransmittern und Neuropeptiden die Aktivität von Immunzellen beeinflussen. Somit können sich durch sogenannte „neuroimmune Interaktionen“ immunologische und neuronale Veränderungen gegenseitig verstärken und perpetuieren (**Abb. 18**).

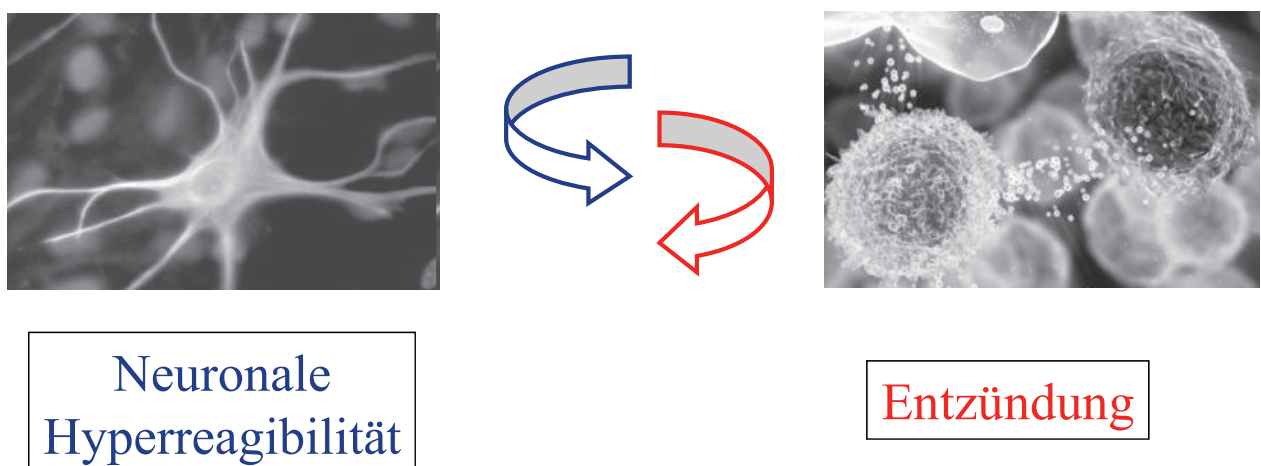


Abb. 18 Neuroimmune Interaktionen

Der Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), welcher von Leukozyten und Thrombozyten ausgeschüttet wird und welcher neuronale Funktionen nachhaltig beeinflussen kann, wurde kürzlich als Mediator der bronchialen Hyperreagibilität beim allergischen Asthma entdeckt^{24,25,73}. Es ist jedoch bislang unbekannt, ob BDNF auch bei anderen entzündlichen Erkrankungen der Atemwege eine Rolle spielt. Erste Studien weisen darauf hin, dass die lokale BDNF-Produktion bei akuten Infektionserkrankungen wie der Meningitis oder Bronchiolitis erhöht ist^{23,74,75}.

Es ist jedoch bislang unbekannt, wie die Menge des in Thrombozyten gespeicherten BDNF bei akuten Atemwegsinfektionen reguliert wird und ob sich eine veränderte BDNF-Sekretion bei zirkulierenden Leukozyten findet. Desweiteren ist unbekannt, welchen Einfluss bakterielle Toxine (wie LPS) und Inhalativa wie β_2 -Mimetika (wie Salmeterol) oder Steroide (wie Fluticason) auf die BDNF-Sekretion zirkulierender Leukozyten bei akuten Atemwegsinfektionen haben. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, anhand von Patienten, die mit akuten Infektionen der unteren Atemwege in der Uniklinik Rostock behandelt wurden, diesen Fragen nachzugehen und die Ergebnisse mit einer Kontrollgruppe gesunder Erwachsener zu vergleichen.

4.1. Veränderungen der BDNF-Konzentrationen im Serum, Plasma und in Thrombozyten

Die vorliegende Studie demonstriert zum ersten Male, dass sowohl die BDNF-Serumspiegel als auch das Thrombozyten-BDNF von Patienten mit einer akuten Entzündung der unteren Atemwege (am Tag 1 nach stationärer Aufnahme) im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erniedrigt sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die BDNF-Konzentrationen in Thrombozyten sich nach einer Woche erfolgreicher antibiotischer Therapie (Tag 8 der stationären Therapie) wieder normalisieren ebenso wie die Serumspiegel des Neurotrophins. Bei den BDNF-Plasmaspiegeln ließen sich keine signifikanten Veränderungen darstellen.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Medikation der Patienten einen Einfluss auf die BDNF-Spiegel und die BDNF-Messungen hatte. Da die medikamentöse Therapie an Tag 1 und Tag 8 jedoch so gut wie identisch war,

andererseits sich aber erhebliche Veränderungen in den BDNF-Spiegeln zeigten, scheint es unwahrscheinlich, dass die beobachteten Veränderungen durch die Medikation der Patienten bedingt sind. Die Veränderungen der BDNF-Konzentrationen scheinen daher spezifisch für die Entzündung der unteren Atemwege zu sein.

4.1.1. BDNF-Regulation in Thrombozyten und im Serum

Ein zentrales Ergebnis der vorliegenden Studie ist die Entdeckung, dass sowohl die BDNF-Serumspiegel (die die Speicherung von BDNF in Thrombozyten reflektieren) als auch das Thrombozyten-BDNF von Patienten bei einer akuten Entzündung der unteren Atemwege deutlich erniedrigt sind (auf <25% der Werte der Kontrollgruppe). Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen der Lunge. Sie setzen wirksame Mediatoren nach intravaskulärer Aktivierung in die Umgebung frei, aber auch nach Migration in das entzündete Lungengewebe ^{54,55,59,62}.

Die Verminderung des Thrombozyten-BDNF bei Entzündungen der unteren Atemwege könnte entweder durch eine verminderte Aufnahme von BDNF entstehen, oder ihre Ursache in einer verstärkten Ausschüttung von BDNF aus den Thrombozyten haben. Vorangegangene Studien vermuten eine verstärkte Ausschüttung von Thrombozytenmediatoren während akuter Entzündungsprozesse ^{76,77}. Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine BDNF - Überexpression in entzündeten Organen ^{23,74,75}. Daher stellen wir hier die Hypothese auf, dass die erniedrigten BDNF-Konzentrationen in Thrombozyten in einer verstärkten Ausschüttung aus diesen Zellen begründet sind.

Über die Auslöser für eine derartige Freisetzung kann derzeit nur spekuliert werden. Es erscheint wahrscheinlich, dass immunologische Mechanismen zu einer Aktivierung und Degranulation der Thrombozyten führen. Tatsächlich wurden bereits mehrere Agonisten beschrieben, die eine Ausschüttung von BDNF aus Thrombozyten stimulieren können ⁴³. Auch ein veränderter Säure-Basen-Haushalt könnte die BDNF-Freisetzung der Thrombozyten beeinflussen, da wir einen Zusammenhang zwischen pH-Werten und Thrombozyten-BDNF gefunden haben. Der genaue Zusammenhang zwischen pH-Wert und Thrombozyten-BDNF kann jedoch in unserer Studie nicht genau evaluiert werden, da alle Patienten alkalische

pH-Werte aufwiesen, und somit keine Aussage über den Einfluss eines sauren pH-Wertes möglich ist. Möglicherweise ist die Korrelation lediglich Ausdruck einer etwaigen negativen Assoziation zwischen Hyperventilation und BDNF-Spiegeln.

4.1.2. Regulation anderer Thrombozytenmediatoren

Um der Hypothese einer verstärkten BDNF-Freisetzung aus Thrombozyten bei Infektionen der unteren Atemwege weiter nachzugehen, haben wir die Thrombozytenmarker Serotonin und TGF- β (im Serum und im Plasma) untersucht, von denen bekannt ist, dass sie auch während bakterieller Infektionen von Thrombozyten ausgeschüttet werden^{61,76,77}.

Die Serotonin-Konzentrationen im Serum fielen während der akuten Atemwegsentzündung ähnlich stark ab wie die BDNF-Serum-Konzentrationen (auch < 25%), erreichten jedoch nach einer Woche erfolgreicher Therapie noch nicht das Niveau der Kontrollgruppe (weiterhin < 50%). Dies könnte einerseits Ausdruck dafür sein, dass auch Serotonin aus Thrombozyten ausgeschüttet wird und darauf hinweisen, dass es bei der Entzündung der unteren Atemwege zu einer eher unspezifischen Ausschüttung verschiedener Thrombozytenmediatoren kommt. Andererseits könnten die Unterschiede (am Tag 8) darin begründet liegen, dass BDNF und Serotonin in verschiedenen Granula im Thrombozyten gespeichert werden. Während Serotonin in den dichten Granula zu finden ist, wird BDNF wahrscheinlich in α -Granula gespeichert^{24,44,78,79}. Es ist zwar zu vermuten, dass sowohl die BDNF- als auch die Serotoninspeicher in Thrombozyten nach einer klinischen Besserung wieder aufgefüllt werden. Die Tatsache der unterschiedlichen Speicherung innerhalb des Thrombozyten könnte jedoch eine unterschiedliche Aufnahme-Geschwindigkeit erklären, da die Granula verschiedenen Funktionen nachkommen und unterschiedliche physiologische Eigenschaften aufweisen^{80,81}. Es ist auffällig, dass sowohl die Plasmaspiegel von BDNF als auch von Serotonin während der akuten Entzündung der unteren Atemwege nicht verändert waren. In der Literatur wurde eine sehr kurze Plasma-Halbwertszeit von BDNF (> 1 Minute)⁸² und Serotonin (> 2 Minuten)⁸³ beschrieben. Unsere Ergebnisse könnten daher mit einer schnellen Clearance des aus Thrombozyten freigesetzten BDNF und Serotonin in der Zirkulation erklärt werden. Ungeklärt bleibt jedoch, warum es am Tag 8 (nach

erfolgreicher Therapie) zu einem signifikanten Abfall der Serotonin-Plasmaspiegel (nicht jedoch der BDNF-Plasmaspiegel) kam.

Im Gegensatz zu Serotonin wird TGF- β ebenso wie BDNF in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert⁴⁴. Daher findet sich eine starke Korrelation der Serumwerte beider Parameter bei gesunden Erwachsenen⁴⁴. Diese Korrelation wurde in der Kontrollgruppe unserer Studie bestätigt ($r = 0,87$). Trotz dieser Tatsachen zeigte sich aber im Gegensatz zu BDNF keinerlei Abfall der TGF- β -Serumspiegel während der akuten Atemwegsentszündung. Zur Beurteilung der TGF- β -Serumspiegel muss jedoch auch der TGF- β -Plasmaspiegel betrachtet werden. Im Gegensatz zu den sehr niedrigen BDNF-Plasmaspiegeln ist der TGF- β -Plasmaspiegel nämlich nicht vernachlässigbar. In der Literatur werden ca. 5 ng / ml beschrieben⁸⁴. Dies stimmt mit den Werten in unserer Kontrollgruppe sehr gut überein (Median: 5,5 ng / ml). Zu diesen TGF- β -Plasmaspiegeln tragen in erheblichem Maße Leukozyten bei, die große Mengen an TGF- β freisetzen können. In einem Leukozyt ist etwa dreimal mehr TGF- β gespeichert als in einem Thrombozyt. Da jedoch die Thrombozytenzahl die Leukozytenzahl weit übersteigt, ist das TGF- β im Serum vor allem thrombozytären Ursprungs⁸⁴.

Auffällig war in unserer Studie der erhebliche Anstieg der TGF- β -Plasmaspiegel (von 5,5 ng auf > 12 ng / ml) in der akuten Entzündung, der sich deutlich dem TGF- β -Serumspiegel (17,3 ng / ml) annäherte. Wohlgedenkt fand sich auch ein ähnlicher Anstieg der Leukozytenzahlen in der akuten Entzündung (von 5,9 auf 13,7 x 10⁹ / l). Es ist daher naheliegend, dass der Anstieg der TGF- β -Plasmaspiegel auf eine verstärkte Sekretion von TGF- β aus Leukozyten zurückzuführen ist. Diese TGF- β -Produktion durch Leukozyten scheint so erheblich zu sein, dass sie trotz der beschriebenen geringen Halbwertszeit von TGF- β im Plasma (ca. 2 min.)⁸⁴ zu einem deutlichen Anstieg des Plasmaspiegels führt. Gesehen den Fall, dass die erhöhten TGF- β -Plasmaspiegel in der akuten Entzündung der Atemwege allein auf die Leukozyten zurückzuführen wären, würde der Anteil an thrombozytären TGF- β am gesamten Serum-TGF- β (welches am Tag 1 unverändert war) deutlich geringer sein. Somit weist die Gesamtschau aller Befunde (Plasma- und Serumspiegel von TGF- β) darauf hin, dass die scheinbar unveränderten TGF- β -Serumspiegel durchaus mit einer deutlichen Abnahme des thrombozytär gespeicherten TGF- β vereinbar sind. Zu

dieser Hypothese passen mehrere Beobachtungen. Einerseits war die Korrelation der Serum-Konzentrationen von BDNF (welches fast ausschließlich aus Thrombozyten stammt) und TGF- β bei den Patienten deutlich schwächer, so dass davon auszugehen ist, dass auch leukozytäres TGF- β im Serum eine erhebliche Rolle spielte. Andererseits zeigte sich am Tag 8 ein deutlicher Anstieg der TGF- β -Serumspiegel, jedoch kein Anstieg der TGF- β -Plasmaspiegel, so dass davon auszugehen ist, dass auch im Falle von TGF- β eine Auffüllung der Thrombozytenspeicher am Tag 8 stattfindet (**Abb. 19**).

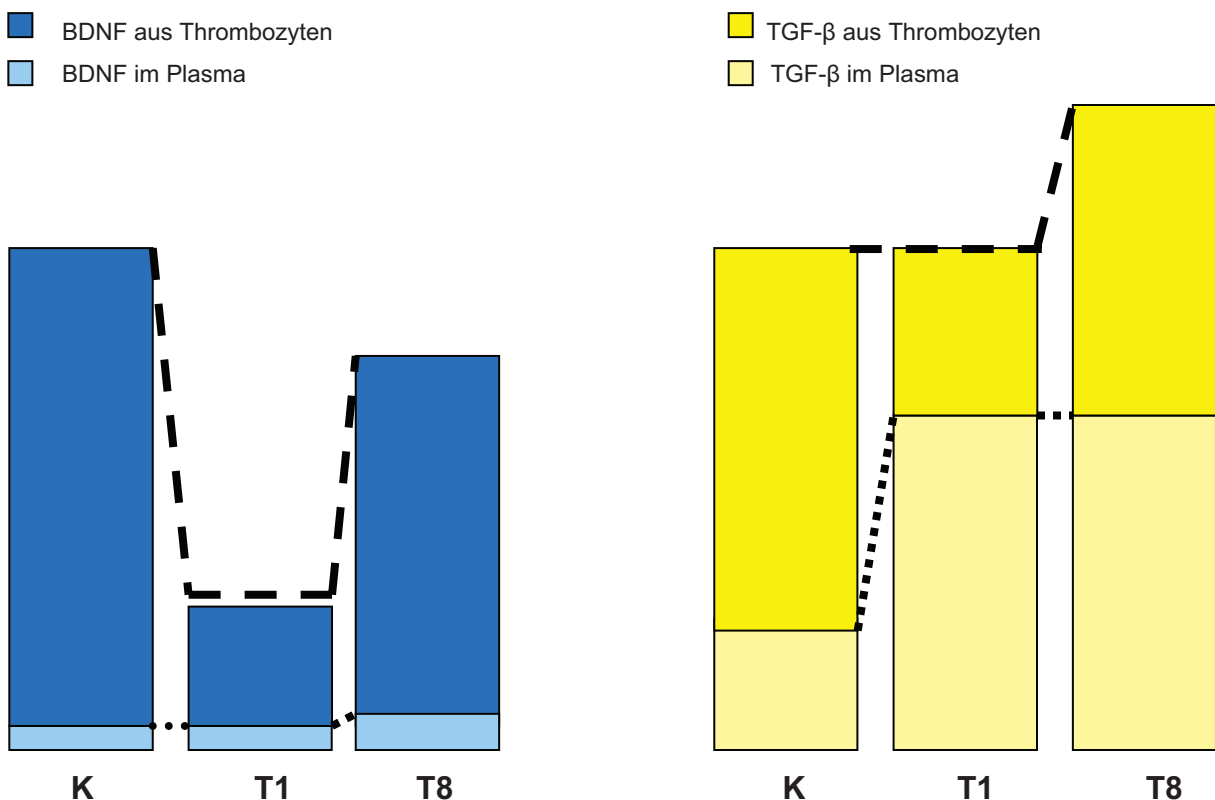


Abb. 19 Hypothesen-Graphik 1: Ursprung von BDNF- und TGF- β im Serum

Die Serumspiegel von BDNF und TGF- β (Höhe des gesamten Balkens) setzen sich aus den Plasmakonzentrationen der Mediatoren (hell) und den thrombozytär freigesetzten Mediatoren (dunkel) zusammen. Sowohl bei Kontrollen (K) als auch bei Patienten (Tag 1 und Tag 8) sind die BDNF-Plasmaspiegel vernachlässigbar, so dass Änderungen der BDNF-Thrombozytenkonzentrationen für die BDNF-Serumspiegel ausschlaggebend sind. Die TGF- β -Plasmaspiegel sind jedoch bei Patienten am Tag 1 so stark erhöht, dass sie den Abfall der TGF- β -Thrombozytenkonzentrationen verschleiern: es werden scheinbar normale TGF- β -Serumkonzentrationen am Tag 1 gemessen. Am Tag 8 regenerieren sich die TGF- β -Thrombozytenkonzentrationen. Durch die weiterhin hohen Plasmaspiegel kommt es jedoch an diesem Zeitpunkt zu einem Anstieg der TGF- β -Serumkonzentrationen.

In der Zusammenschau der erhobenen Daten aller 3 Thrombozytenmediatoren (BDNF, 5-HT, TGF- β) haben wir die Hypothese aufgestellt, dass es während der akuten Infektion der unteren Atemwege zu einer unspezifischen Ausschüttung von Thrombozytenmediatoren (inklusive BDNF) kommt. Der Thrombozytenmediator TGF- β weist hierbei die Besonderheit auf, dass TGF- β während des Entzündungsprozesses auch in erheblichem Maße aus Leukozyten freigesetzt wird.

4.1.3. Thrombozytäres BDNF in der Lunge

Die Art und der Ort der BDNF-Freisetzung aus Thrombozyten sind bisher ungeklärt. Es sind 2 mögliche Szenarios denkbar, die zu den gemessenen niedrigen BDNF-Thrombozytenkonzentrationen während einer akuten Infektion der unteren Atemwege führen könnten:

Hypothese A: Intravaskuläre Degranulation

Thrombozyten könnten aufgrund der Aktivierung durch Entzündungsmediatoren BDNF direkt in den pulmonalen Blutkreislauf ausschütten. Das würde zu niedrigen BDNF-Spiegeln in zirkulierenden Thrombozyten führen, so wie es unsere Studie gezeigt hat. Die schnelle BDNF-Clearance aus dem Plasma könnte entweder durch enzymatischen Abbau oder durch bisher unbekannte Transportmechanismen in das umliegende durchblutete Gewebe erklärt werden.

Hypothese B: Sequestration und Regeneration

Es wurde in früheren Studien gezeigt, dass Thrombozyten in entzündliches Lungengewebe übertreten können. Einerseits wurde beschrieben, dass Thrombozyten selbst aktiv in die Lunge übertreten können⁶². Andererseits können Thrombozyten in Verbindung mit Leukozyten (als Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate) in die Lunge eintreten^{54,55,59}. Wahrscheinlich treten jedoch beide Vorgänge gleichzeitig auf (aktive Diapedese von Thrombozyten und Infiltration von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten). Unter Berücksichtigung dieser Möglichkeit würde BDNF in Thrombozyten in das entzündete Lungengewebe gebracht werden können. Die niedrigen BDNF-Thrombozytenkonzentrationen während einer akuten Infektion der unteren Atemwege würden in diesem Falle sowohl auf einer

Sequestration BDNF-reicher Thrombozyten in die Lunge als auch auf der Zunahme BDNF-arter jüngerer Thrombozyten aus dem Knochenmark bzw. zirkulierenden Megakaryozyten beruhen.

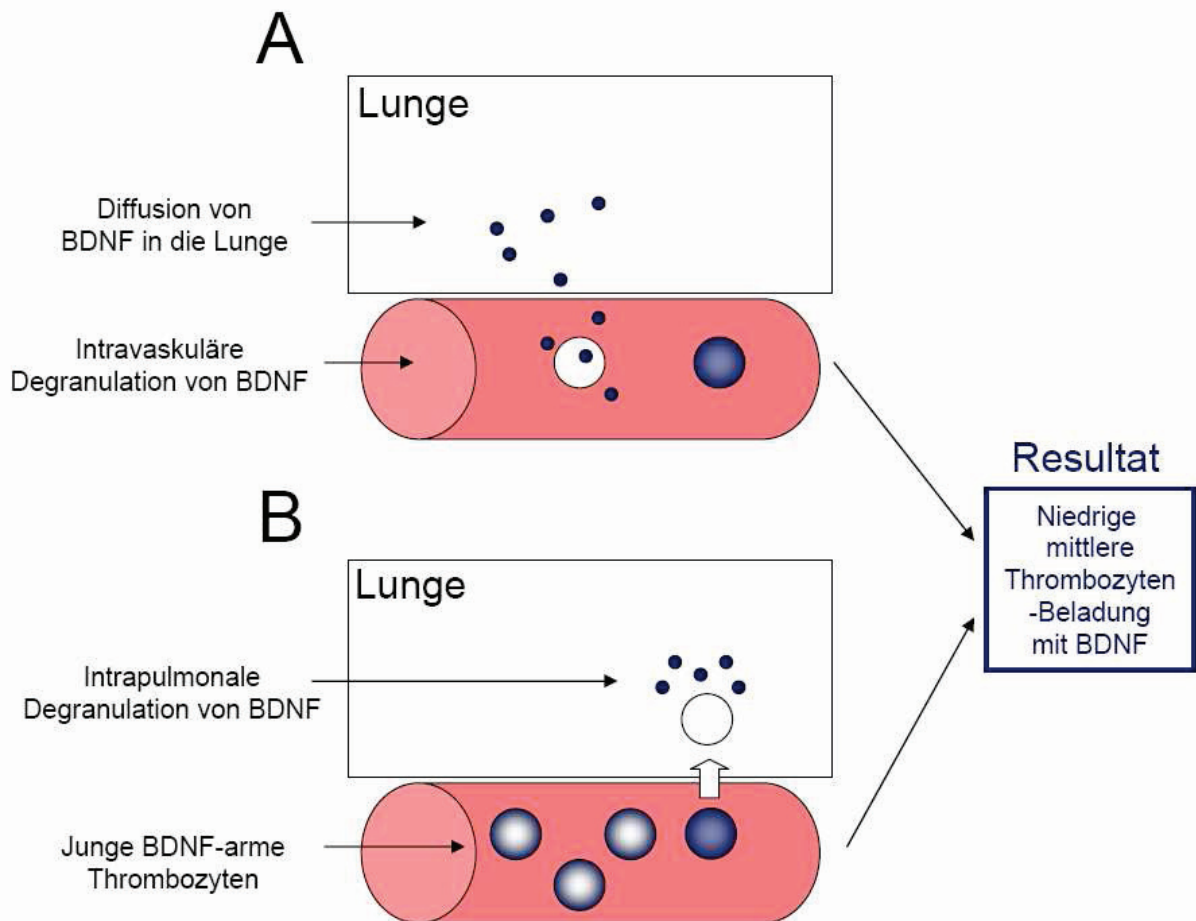


Abb. 20 Hypothesen-Graphik 2: Freisetzung von thrombozytärem BDNF

Thrombozyten könnten aufgrund der Aktivierung durch Entzündungsmediatoren BDNF direkt in den pulmonalen Blutkreislauf (intravaskulär) ausschütten und dieses BDNF könnte in die Lunge diffundieren (Hypothese A). Andererseits könnten Thrombozyten direkt in die Lunge übertreten und lokal BDNF ausschütten. Gleichzeitig würden junge, noch BDNF-arme Thrombozyten aus Megakaryozyten nachgeliefert werden (Hypothese B). In beiden Fällen würde man niedrige mittlere BDNF-Spiegel in zirkulierenden Thrombozyten finden.

4.1.4. BDNF-Freisetzung aus Leukozyten

Die Menge an freigesetztem BDNF aus Monozyten, welche die größte BDNF-Quelle unter den Leukozyten darstellen, ist wesentlich niedriger als die BDNF-Menge aus Thrombozyten³⁰. Thrombozyten in 1 ml humanem Blut können bis zu 50 ng BDNF freisetzen. Im Vergleich dazu schütten Monozyten aus der gleichen Menge Blut ca. 1 ng BDNF aus³⁰. Trotzdem könnten Monozyten zur lokalen Freisetzung von BDNF erheblich beitragen, vor allem dadurch, dass sie im Gegensatz zu Thrombozyten BDNF selber produzieren und somit eine nachhaltige BDNF-Freisetzung bedingen könnten.

Daher wurde im Rahmen dieser Studie die BDNF-Freisetzung aus PBMC (peripheral blood mononuclear cells) mit einem hohen Anteil an Monozyten (monozytenangereicherte PBMC) *in vitro* getestet. Es konnten keine Unterschiede in der Freisetzung von BDNF aus Monozyten von gesunden Kontrollprobanden im Vergleich mit den Patienten mit akuten Infektionen der unteren Atemwege gezeigt werden. Somit scheint keine generell erhöhte BDNF-Freisetzungs-Neigung der zirkulierenden Monozyten während akuter Atemwegsinfektionen zu bestehen.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die BDNF-Ausschüttung signifikant erhöht werden kann, wenn LPS der Zellkultur zugesetzt wird. Die Steigerung der BDNF-Sekretion durch LPS unterschied sich nicht zwischen Gesunden und Patienten mit akuter Infektion der unteren Atemwege. Somit gehen wir davon aus, dass es sich um eine generelle Eigenschaft humaner Monozyten handelt. Die Steigerung der BDNF-Freisetzung durch LPS deckt sich mit Ergebnissen aus Tiermodellen⁸⁵.

Auch nach Stimulation mit dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) kam es zu einem signifikanten Anstieg der BDNF-Konzentrationen sowohl bei den Kontrollprobanden als auch bei den Patienten. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten überein, die bereits in einer früheren Studie von Schulte-Herbrüggen und Kollegen publiziert wurden³⁰. Wir postulieren daher, dass es in den entzündlichen Leukozyten-Infiltraten in den Atemwegen zu einer verstärkten lokalen Produktion von BDNF kommen könnte, sowohl durch eine Stimulation mit bakteriellen Mediatoren (wie LPS) als auch durch eine Stimulation mit endogenen Entzündungsmediatoren (wie TNF- α).

4.2. BDNF-Freisetzung aus PBMC nach Stimulation mit Salmeterol, Fluticason und Prednisolon

Corticosteroide, alleine oder in Kombination mit β_2 -Mimetika, werden oft zur Behandlung der postinfektiösen Atemwegshyperreagibilität eingesetzt. Es sollte daher untersucht werden, ob Corticosteroide (wie Prednisolon und Fluticason) oder β_2 -Mimetika (wie das langwirksame β_2 -Mimetikum Salmeterol) einen Einfluß auf die BDNF-Sekretion humaner PBMC haben. Es zeigte sich, dass das inhalative Steroid Fluticason die BDNF-Sekretion senkt, hingegen das langwirksame β_2 -Mimetikum Salmeterol die BDNF-Sekretion steigert. Diese Effekte waren sowohl bei Gesunden als auch bei den Patienten mit einer akuten Atemwegsinfektion nachweisbar.

Es konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass inhalierte Steroide wie Fluticason die BDNF-Sekretion in Leukozyten unterdrücken können ²⁴. Auch vermindern sie die BDNF-Serumspiegel bei Asthmapatienten ⁸⁶. Auch andere Steroide, wie zum Beispiel Dexamethason, können die BDNF-Sekretion unterdrücken ^{24,87}. Es gibt bereits Hinweise darauf, dass Steroide ihre Effekte auf die Atemwegsreagibilität durch Unterdrückung der BDNF-Sekretion vermitteln. Diese Vermutung wird durch unsere Ergebnisse untermauert.

Inhalative β_2 -Mimetika wie Salmeterol sind potente Bronchodilatoren, die insbesondere in Kombination mit inhalativen Corticosteroiden von großer Bedeutung in der Therapie obstruktiver Lungenerkrankungen sind ^{88,89}. Es gibt jedoch überzeugende und konsistente Hinweise aus der Asthma-Forschung, die darauf hinweisen, dass eine Monotherapie mit inhalativen β_2 -Mimetika zu einem paradoxen Anstieg der Mortalität führt ⁹⁰⁻⁹³. Des Weiteren wurde gezeigt, dass β_2 -Mimetika die Asthma-Kontrolle verschlechtern und zu einer erhöhten Anzahl von Exazerbationen und Hospitalisationen führen, am ehesten im Sinne eines Klassen-Effekts von β_2 -Mimetika ⁹⁴⁻⁹⁸. Eine eindeutige Erklärung für dieses Paradoxon gibt es bislang nicht. Es gibt jedoch eine Reihe von Studien, die gezeigt haben, dass eine regelmäßige Monotherapie mit β_2 -Mimetika die Atemwegshyperreagibilität steigert ^{97,99,100}. Es wurde aufgrund von tierexperimentellen Daten vermutet, dass diese Steigerung der Atemwegshyperreagibilität durch β_2 -Mimetika in einer veränderten Aktivität der die Atemwege innervierenden Nerven begründet liegt ¹⁰¹. Die in der vorliegenden

Disseration erstmalig beobachtete Induktion von BDNF durch Salmeterol *in vitro* könnte eine Erklärung für dieses bisherige Rätsel liefern: Salmeterol wirkt zwar als Bronchodilatator, führt aber auch zu einer verstärkten Sekretion von BDNF welches wiederum die bronchiale Reaktivität steigert. In der Tat konnte in einer Studie mit Asthma-Patienten kürzlich gezeigt werden, dass Salmeterol auch *in vivo* die BDNF-Spiegel steigert, und dass dieser Anstieg mit einer gesteigerten Atemwegsreagibilität korreliert (Lommatzsch et al., *Thorax* 2009 *In press*).

4.3. Hypothese

Die postinfektiöse Atemwegshyperreagibilität beruht teilweise auf neuronalen Veränderungen der die Atemwege innervierenden Nerven. BDNF, ein wichtiger Kandidat für die Vermittlung neuronaler Veränderungen in der Lunge, wird in Thrombozyten gespeichert und aus diesen freigesetzt und von Leukozyten produziert und ausgeschüttet. In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden erstmals Hinweise dafür gefunden, dass es bei einer Infektion der unteren Atemwege zu einer verstärkten Freisetzung von BDNF aus Thrombozyten und Leukozyten kommt. Wir haben die Hypothese aufgestellt, dass dieses verstärkt freigesetzte BDNF zur Pathogenese der postinfektiösen Atemwegshyperreagibilität beitragen könnte. Desweiteren wurde gezeigt, dass inhalative Steroide und β_2 -Mimetika die BDNF-Sekretion von Leukozyten beeinflussen und somit die Atemwegshyperreagibilität spezifisch modulieren könnten.

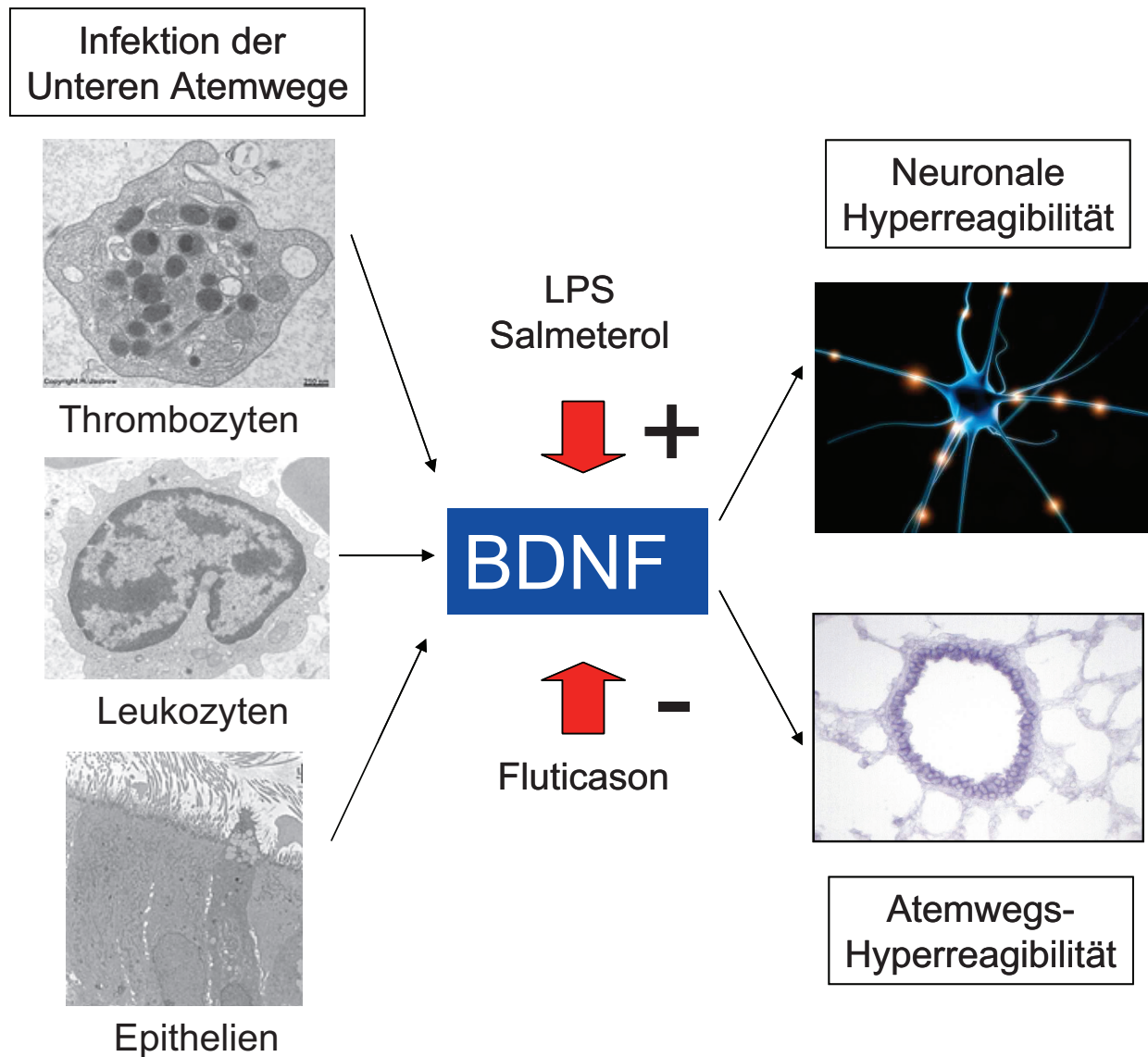


Abb. 21 Hypothesen-Graphik 3: Rolle von BDNF bei Atemwegsinfektionen

BDNF wird bei Infektionen der unteren Atemwege verstärkt aus Thrombozyten, Leukozyten und Epithelien freigesetzt. Dieses BDNF kann eine nachhaltige Überempfindlichkeit der die Atemwege innervierenden Neurone, und in dessen Folge eine Atemwegshyperreagibilität auslösen. Bakterielle Toxine wie LPS oder inhalative β_2 -Mimetika wie Salmeterol können die BDNF-Sekretion steigern und somit die Atemwegshyperreagibilität noch weiter verstärken. Inhalative Steroide wie Fluticason haben hingegen durch eine BDNF-Hemmung einen dämpfenden Effekt auf die Atemwegshyperreagibilität.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei Infektionen der unteren Atemwege kommt es zu einer Überempfindlichkeit der Atemwege, die zu klinischen Symptomen wie Husten oder Atemwegsobstruktion führen kann. Die Pathogenese dieser Veränderungen ist unklar. In den letzten Jahren wurde der Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) als Mediator neuronaler Hyperreagibilität in entzündeten Atemwegen identifiziert. BDNF wird von Thrombozyten und Leukozyten freigesetzt, die Regulation von thrombozytärem und leukozytärem BDNF während einer akuten Infektion der Atemwege ist jedoch unbekannt. In der vorliegenden klinisch-experimentellen Studie wurden 16 Patienten mit akuter Infektion der unteren Atemwege am Tag nach der Aufnahme und eine Woche nach antibiotischer Therapie untersucht. Parallel wurden 16 gesunde Kontrollprobanden vergleichbaren Alters und Geschlechts untersucht. Es zeigte sich, dass die BDNF-Konzentrationen in Thrombozyten, nicht jedoch im Plasma bei den Patienten am Tag nach der Aufnahme deutlich reduziert waren (< 25% der Werte der Kontrollprobanden). Die Analyse weiterer Thrombozytenmarker (TGF- β , Serotonin) erbrachte Hinweise darauf, dass es zu einer unspezifischen Freisetzung von Thrombozytenmediatoren (inklusive BDNF) während einer Infektion der unteren Atemwege kommt. Bereits eine Woche nach erfolgreicher antibiotischer Therapie kam es zu einer Normalisierung der BDNF-Konzentrationen in Thrombozyten. Eine generell verstärkte BDNF-Sekretion durch zirkulierende Leukozyten wurde bei den Patienten nicht gefunden, es konnte jedoch gezeigt werden, dass das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) die Sekretion von BDNF steigert. Zudem wurde erstmals gezeigt, dass zwar das inhalative Steroid Fluticason die BDNF-Sekretion von Leukozyten hemmen kann, dass aber das β_2 -Mimetikum Salmeterol die BDNF-Sekretion steigert. Anhand der erhobenen Daten haben wir die Hypothese aufgestellt, dass es während einer akuten Entzündung der unteren Atemwege zu einer gesteigerten Sekretion von BDNF durch Thrombozyten und Leukozyten kommt, die zu einer Hyperreagibilität der Atemwege beitragen könnte. Inhalative Steroide könnten durch eine Senkung der BDNF-Produktion einen positiven Effekt auf die Reagibilität der Atemwege haben. Eine Monotherapie mit Bronchodilatoren wie Salmeterol scheint hingegen aufgrund der verstärkten BDNF-Sekretion mit dem Risiko einer gesteigerten Reagibilität verbunden zu sein.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Kwon NH, Oh MJ, Min TH, Lee BJ, Choi DC. Causes and clinical features of subacute cough. *Chest*. 2006;129:1142-7.
2. Braman SS. Postinfectious cough: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2006;129:138S-146S.
3. Boldy DA, Skidmore SJ, Ayres JG. Acute bronchitis in the community: clinical features, infective factors, changes in pulmonary function and bronchial reactivity to histamine. *Respir Med*. 1990;84:377-85.
4. Barnes PJ. Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol Rev*. 1992;72:699-729.
5. Colasurdo GN, Hemming VG, Prince GA, Gelfand AS, Loader JE, Larsen GL. Human respiratory syncytial virus produces prolonged alterations of neural control in airways of developing ferrets. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1506-11.
6. Canning BJ, Fischer A. Neural regulation of airway smooth muscle tone. *Respir Physiol*. 2001;125:113-27.
7. Myers AC, Goldie RG, Hay DW. A novel role for tachykinin neurokinin-3 receptors in regulation of human bronchial Ganglia neurons. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:212-6.
8. Lamb JP, Sparrow MP. Three-dimensional mapping of sensory innervation with substance p in porcine bronchial mucosa: comparison with human airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1269-81.
9. Carr MJ, Hunter DD, Udem BJ. Neurotrophins and asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2001;7:1-7.
10. Lommatzsch M. Zur Bedeutung des brain-derived neurotrophic factor in den inneren Organen unter besonderer Berücksichtigung der allergischen Entzündung in der Lunge. In: *Medizinische Fakultät - Charité* -. Berlin: Humboldt - Universität; 1999.
11. Barnes PJ. Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol Rev*. 1992;72:699-729.
12. Udem BJ, Hunter DD, Liu M, Haak-Frendscho M, Oakragly A, Fischer A. Allergen-induced sensory neuroplasticity in airways. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;118:150-3.
13. Barnes PJ. Neurogenic inflammation in the airways. *Respir Physiol*. 2001;125:145-54.
14. Hunter DD, Myers AC, Udem BJ. Nerve growth factor-induced phenotypic switch in guinea pig airway sensory neurons. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1985-90.
15. Piedimonte G. Contribution of neuroimmune mechanisms to airway inflammation and remodeling during and after respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22:S66-74; discussion S74-5.
16. Goldie RG, Henry PJ, Rigby PJ, Knott PG. Influence of respiratory tract viral infection on endothelin-1-induced modulation of cholinergic nerve-mediated contractions in murine airway smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;31 Suppl 1:S219-21.
17. Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci*. 2002;70:735-44.
18. Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. 2005;438:1017-21.

19. Heppenstall PA, Lewin GR. BDNF but not NT-4 is required for normal flexion reflex plasticity and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:8107-12.
20. Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6:603-14.
21. Braun A, Lommatzsch M, Renz H. The role of neurotrophins in allergic bronchial asthma. *Clin Exp Allergy*. 2000;30:178-86.
22. Vega JA, Garcia-Suarez O, Hannestad J, Perez-Perez M, Germana A. Neurotrophins and the immune system. *J Anat*. 2003;203:1-19.
23. Tortorolo L, Langer A, Polidori G, Vento G, Stampachiacchere B, Aloe L, Piedimonte G. Neurotrophin overexpression in lower airways of infants with respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:233-7.
24. Lommatzsch M, Schloetcke K, Klotz J, Schuhbaeck K, Zingler D, Zingler C, Schulte-Herbruggen O, Gill H, Schuff-Werner P, Virchow JC. Brain-derived Neurotrophic Factor in Platelets and Airflow Limitation in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:115-20.
25. Lommatzsch M, Braun A, Renz H. Neurotrophins in allergic airway dysfunction: what the mouse model is teaching us. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;992:241-9.
26. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med*. 1999;189:865-70.
27. 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;18:193-202.
28. 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*. 1998;158:2002-5.
29. Oddiah D, Anand P, McMahon SB, Rattray M. Rapid increase of NGF, BDNF and NT-3 mRNAs in inflamed bladder. *Neuroreport*. 1998;9:1455-8.
30. Schulte-Herbruggen O, Nassenstein C, Lommatzsch M, Quarcoo D, Renz H, Braun A. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes. *J Neuroimmunol*. 2005;160:204-9.
31. Besser M, Wank R. Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. *J Immunol*. 1999;162:6303-6.
32. Maroder M, Bellavia D, Meco D, Napolitano M, Stigliano A, Alesse E, Vacca A, Giannini G, Frati L, Gulino A, Screpanti I. Expression of trkB neurotrophin receptor during T cell development. Role of brain derived neurotrophic factor in immature thymocyte survival. *J Immunol*. 1996;157:2864-72.
33. Schuhmann B, Dietrich A, Sel S, Hahn C, Klingenspor M, Lommatzsch M, Gudermann T, Braun A, Renz H, Nockher WA. A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J Neuroimmunol*. 2005;163:15-23.
34. Shibayama E, Koizumi H. Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol*. 1996;148:1807-18.
35. Garcia-Suarez O, Hannestad J, Esteban I, Sainz R, Naves FJ, Vega JA.

- Expression of the TrkB neurotrophin receptor by thymic macrophages. *Immunology*. 1998;94:235-41.
36. 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*. 1993;90:10984-8.
 37. 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*. 1997;90:1807-20.
 38. Nassenstein C, Braun A, Erpenbeck VJ, Lommatzsch M, Schmidt S, Krug N, Luttmann W, Renz H, Virchow JC, Jr. The neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma. *J Exp Med*. 2003;198:455-67.
 39. Rosenthal A, Goeddel DV, Nguyen T, Martin E, Burton LE, Shih A, Laramée GR, Wurm F, Mason A, Nikolics K, et al. Primary structure and biological activity of human brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology*. 1991;129:1289-94.
 40. Radka SF, Holst PA, Fritsche M, Altar CA. Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain Res*. 1996;709:122-301.
 41. Yamamoto H, Gurney ME. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 1990;10:3469-78.
 42. Pliego-Rivero FB, Bayatti N, Giannakoulououlos X, Glover V, Bradford HF, Stern G, Sandler M. Brain-derived neurotrophic factor in human platelets. *Biochem Pharmacol*. 1997;54:207-9.
 43. Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, Sun B, Tandon NN. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost*. 2002;87:728-34.
 44. Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P, Virchow JC. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging*. 2005;26:115-23.
 45. Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN, Sun B. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett*. 2000;470:113-7.
 46. Lommatzsch M, Braun A, Mannsfeldt A, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Paus R, Fischer A, Lewin GR, Renz H. Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. Implications for paracrine and target-derived Neurotrophic functions. *Am J Pathol*. 1999;155:1183-93.
 47. Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R, McCaffrey TA, Tessarollo L, Mahadeo D, Sharif S, Kaplan DR, Tsoulfas P, Parada L, et al. Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol*. 1995;147:309-24.
 48. 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*. 1999;21:537-46.
 49. Gielen A, Khademi M, Muhallab S, Olsson T, Piehl F. Increased brain-derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Scand J Immunol*. 2003;57:493-7.
 50. Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed

- patients. *Psychiatry Res.* 2002;109:143-8.
51. Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology.* 1998;37:1553-61.
 52. Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramée GR, Johnson SA, Winslow JW. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron.* 1991;7:695-702.
 53. Italiano JE HJ. *Megakaryocyte development and platelet formation*; 2002.
 54. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115:3378-84.
 55. Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1897-905.
 56. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31:381-92.
 57. Gawaz M. *Das Blutplättchen-Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1999.
 58. O'Sullivan BP, Michelson AD. The inflammatory role of platelets in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:483-90.
 59. Herd CM, Page CP. Pulmonary immune cells in health and disease: platelets. *Eur Respir J.* 1994;7:1145-60.
 60. Gear AR, Camerini D. Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation.* 2003;10:335-50.
 61. Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res.* 2002;22:913-22.
 62. Pitchford SC, Momi S, Baglioni S, Casali L, Giannini S, Rossi R, Page CP, Gresele P. Allergen induces the migration of platelets to lung tissue in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:604-12.
 63. König B, Jaeger KE, Sage AE, Vasil ML, König W. Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes). *Infect Immun.* 1996;64:3252-8.
 64. Yeaman MB, A. Antimicrobial Host Defence. *Michelson, AD; ed. Platelets. San Diego. Academic Press; 2002:469-490.* 2002.
 65. Copley AL. Roles of platelets in physiological defense mechanisms and pathological conditions. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch.* 1979;106:732-64.
 66. Serhan CN, Sheppard KA. Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro. *J Clin Invest.* 1990;85:772-80.
 67. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol.* 2001;154:485-90.
 68. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, Prescott SM, Zimmerman GA. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest.* 1996;97:1525-34.
 69. Galt SW, Lindemann S, Medd D, Allen LL, Kraiss LW, Harris ES, Prescott SM, McIntyre TM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets. *Circ Res.* 2001;89:509-16.

70. Raap U, Goltz C, Deneka N, Bruder M, Renz H, Kapp A, Wedi B. Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:1268-75.
71. Veres TZ, Rochlitzer S, Shevchenko M, Fuchs B, Prenzler F, Nassenstein C, Fischer A, Welker L, Holz O, Muller M, Krug N, Braun A. Spatial interactions between dendritic cells and sensory nerves in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;37:553-61.
72. Veres TZ, Shevchenko M, Krasteva G, Spies E, Prenzler F, Rochlitzer S, Tschernig T, Krug N, Kummer W, Braun A. Dendritic Cell-Nerve Clusters Are Sites of T Cell Proliferation in Allergic Airway Inflammation. *Am J Pathol.* 2009; (*In press*).
73. Zaidi SI, Jafri A, Doggett T, Haxhiu MA. Airway-related vagal preganglionic neurons express brain-derived neurotrophic factor and TrkB receptors: implications for neuronal plasticity. *Brain Res.* 2005;1044:133-43.
74. Tauber SC, Stadelmann C, Spreer A, Bruck W, Nau R, Gerber J. Increased expression of BDNF and proliferation of dentate granule cells after bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64:806-15.
75. Chiaretti A, Antonelli A, Piastra M, Genovese O, Polidori G, Aloe L. Expression of neurotrophic factors in cerebrospinal fluid and plasma of children with viral and bacterial meningoencephalitis. *Acta Paediatr.* 2004;93:1178-84.
76. Yaguchi A, Lobo FL, Vincent JL, Pradier O. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost.* 2004;2:2096-102.
77. Zimmerman TS, Spiegelberg HL. Pneumococcus-induced serotonin release from human platelets. Identification of the participating plasma/serum factor as immunoglobulin. *J Clin Invest.* 1975;56:828-34.
78. Lommatzsch M, Hornyk K, Zingler C, Schuff-Werner P, Hoppner J, Virchow JC. Maternal serum concentrations of BDNF and depression in the perinatal period. *Psychoneuroendocrinology.* 2006;31:388-94.
79. Staats R, Stoll P, Zingler D, Virchow JC, Lommatzsch M. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) during sleep apnoea treatment. *Thorax.* 2005;60:688-92.
80. McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res.* 1999;95:1-18.
81. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993;7:52-62.
82. Poduslo JF, Curran GL. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996;36:280-6.
83. Siepler JK, Ahlman BH, Bhargava HN, Donahue PE, Nyhus LM. A pharmacokinetic analysis of the vagal release of 5-hydroxytryptamine in the cat. *J Neural Transm.* 1980;47:99-105.
84. Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC. TGF-beta in blood: a complex problem. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11:133-45.
85. Barouch R, Appel E, Kazimirsky G, Brodie C. Macrophages express neurotrophins and neurotrophin receptors. Regulation of nitric oxide production by NT-3. *J Neuroimmunol.* 2001;112:72-7.
86. Noga O, Hanf G, Schaper 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.* 2001;31:1906-12.

87. Lommatzsch M, Klotz J, Virchow JC, Jr. Postnatal dexamethasone for lung disease of prematurity. *N Engl J Med*. 2004;350:2715-8; author reply 2715-8.
88. Pauwels RA, Lofdahl CG, Postma DS, Tattersfield AE, O'Byrne P, Barnes PJ, Ullman A. Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. Formoterol and Corticosteroids Establishing Therapy (FACET) International Study Group. *N Engl J Med*. 1997;337:1405-11.
89. Bateman ED, Boushey HA, Bousquet J, Busse WW, Clark TJ, Pauwels RA, Pedersen SE. Can guideline-defined asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:836-44.
90. Castle W, Fuller R, Hall J, Palmer J. Serevent nationwide surveillance study: comparison of salmeterol with salbutamol in asthmatic patients who require regular bronchodilator treatment. *Bmj*. 1993;306:1034-7.
91. Hasford J, Virchow JC. Excess mortality in patients with asthma on long-acting beta2-agonists. *Eur Respir J*. 2006;28:900-2.
92. Nelson HS, Weiss ST, Bleecker ER, Yancey SW, Dorinsky PM. The Salmeterol Multicenter Asthma Research Trial: a comparison of usual pharmacotherapy for asthma or usual pharmacotherapy plus salmeterol. *Chest*. 2006;129:15-26.
93. Sears MR, Ottosson A, Radner F, Suissa S. Long-acting beta-agonists: a review of formoterol safety data from asthma clinical trials. *Eur Respir J*. 2009;33:21-32.
94. Inman WH, Adelstein AM. Asthma mortality and pressurised aerosols. *Lancet*. 1969;2:693.
95. Crane J, Pearce N, Burgess C, Beasley R. Fenoterol and asthma death. *N Z Med J*. 1989;102:356-7.
96. Spitzer WO, Suissa S, Ernst P, Horwitz RI, Habbick B, Cockcroft D, Boivin JF, McNutt M, Buist AS, Rebeck AS. The use of beta-agonists and the risk of death and near death from asthma. *N Engl J Med*. 1992;326:501-6.
97. Sears MR, Taylor DR. Bronchodilator treatment in asthma. Increase in deaths during salmeterol treatment unexplained. *Bmj*. 1993;306:1610-1.
98. Mann M, Chowdhury B, Sullivan E, Nicklas R, Anthracite R, Meyer RJ. Serious asthma exacerbations in asthmatics treated with high-dose formoterol. *Chest*. 2003;124:70-4.
99. Kraan J, Koeter GH, vd Mark TW, Sluiter HJ, de Vries K. Changes in bronchial hyperreactivity induced by 4 weeks of treatment with antiasthmatic drugs in patients with allergic asthma: a comparison between budesonide and terbutaline. *J Allergy Clin Immunol*. 1985;76:628-36.
100. Drazen JM, Israel E, Boushey HA, Chinchilli VM, Fahy JV, Fish JE, Lazarus SC, Lemanske RF, Martin RJ, Peters SP, Sorkness C, Szeffler SJ. Comparison of regularly scheduled with as-needed use of albuterol in mild asthma. Asthma Clinical Research Network. *N Engl J Med*. 1996;335:841-7.
101. Keir S, Page C, Spina D. Bronchial hyperresponsiveness induced by chronic treatment with albuterol: Role of sensory nerves. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110:388-94.

7. ANHANG

7.1. Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptophan (Serotonin)
7-AAD	2-amino-4,6-dimethylphenoxanone-3-chromophore
A	Adrenalin
Ach	Acetylcholin
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BM	Basalmembran
BMI	Body Mass Index
bpm	beats per minute, Herzfrequenz
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CAB	Capture Antibody
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
Cy-5	Cytochrom-5
DAB	Detection Antibody
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
Hb	Hämoglobin
Hkt	Hämatokrit
HPLC	High pressure liquid chromatography
IECOPD	infektexazerbierte chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Ig	Immunglobulin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LPS	Lipopolysaccharid
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
NA	Noradrenalin

NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NANC	Nonadrenerg Noncholinerg
NaOH	Natriumhydroxid
NGF	Nerve growth factor
NK-A	Neurokinin A
NNM	Nebennierenmark
NO	Stickstoffmonoxid
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4/5	Neurotrophin-4/5
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCT	Procalcitonin
PaCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PaO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein-Ligand-1
RAR	rapid adapting receptors
SAR	slow adapting receptors
SP	Substanz P
SPSS	statistical package for social sciences
SSC	Sideward Scatter
TGF-β	Transforming growth factor-β
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
Trk	Tyrosinkinasezeptoren
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
vWF	von Willebrand Faktor

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Parasympathische Ganglien als neuronale Schaltstellen der Atemwege.....	6
Abb. 2	Sensorische Nervenfasern	7
Abb. 3	Neuronale Kontrolle des Atemwegstonus	8
Abb. 4	Ruhender und aktivierter Thrombozyt	14
Abb. 5	Die Rolle der Thrombozyten bei der Leukozytendiapedese	16
Abb. 6	Dichtegradientenzentrifugation mittels OptiPrep	24
Abb. 7	Zellzählung mittels Neubauer-Kammer.....	25
Abb. 8	Grundprinzip der FACS-Messung	31
Abb. 9	Grundprinzip des ELISA	34
Abb. 10	Boxplot-Darstellung von Hämoglobin und Hämatokrit im Blut.....	41
Abb. 11	Boxplot-Darstellung der Thrombozyten und Leukozyten im Blut	42
Abb. 12	Boxplot-Darstellung der Entzündungsparameter	43
Abb. 13	Boxplot-Darstellung von BDNF in Serum, Plasma und Thrombozyten	46
Abb. 14	Boxplot-Darstellung von Serotonin und TGF- β in Serum und Plasma	47
Abb. 15	Korrelationen von BDNF und Thrombozytenmarkern im Serum.....	49
Abb. 16	BDNF-Freisetzung aus PBMC von Patienten und Probanden	52
Abb. 17a	BDNF in PBMC nach Stimulation mit Salmeterol, Fluticason und Prednisolon (ohne Stimulation durch TNF- α)	53
Abb. 17b	BDNF in PBMC nach Stimulation mit Salmeterol, Fluticason und Prednisolon (mit Stimulation durch TNF- α).....	54
Abb. 18	Neuroimmune Interaktionen	55
Abb. 19	Hypothesen-Graphik 1: Ursprung von BDNF- und TGF- β im Serum	60
Abb. 20	Hypothesen-Graphik 2: Freisetzung von thrombozytärem BDNF....	62
Abb. 21	Hypothesen-Graphik 3: Rolle von BDNF bei Atemwegsinfektionen.	66

7.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	BDNF-Produktion durch Leukozyten	11
Tab. 2	Thrombozytengranula	13
Tab. 3	Entnommenes Blutvolumen bei Patienten	21
Tab. 4	Entnommenes Blutvolumen bei Gesunden	21
Tab. 5	Ansatzschema für Zellkultur	28
Tab. 6	Ansätze für die FACS-Messung der PBMC	32
Tab. 7	Konzentrationen und Verdünnungen der ELISA-Ansätze.....	36
Tab. 8	Patientencharakteristika	38
Tab. 9	Klinische Parameter am Tag der Aufnahme der Patienten.....	39
Tab. 10	Blutbild der Studienteilnehmer	40
Tab. 11	Konzentrationen von BDNF und anderen Thrombozytenmediatoren	45
Tab. 12	Monozytenanteil und Überleben in der Zellkultur	51

7.4. Publikationsverzeichnis

ORIGINALARBEITEN von Anke Edner (geb. Niewerth)

1. Lommatzsch M, **Niewerth A**, Klotz J, Schulte-Herbrüggen O, Zingler C, Schuff-Werner P, Virchow JC:
Platelet and plasma BDNF in lower respiratory tract infections of the adult.
Respir Med 2007 Jul;101(7):1493-1499.
2. Lommatzsch M, Lindner Y, **Edner A**, Bratke K, Kuepper M, Virchow JC:
Adverse effects of salmeterol in asthma: a neuronal perspective.
Thorax 2009; 64:763-769.

7.5. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Anke Edner

Potsdam, im Februar 2009

Aus der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. VIRCHOW

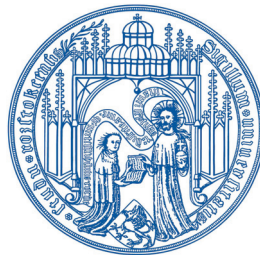
Über die Regulation des Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) bei akuten Infektionen der unteren Atemwege

Eine klinisch-experimentelle Studie

THESEN ZUR DISSERTATION

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock



von

Anke Edner geb. Niewerth aus Gronau/Westf.
Potsdam 2009

8. THESEN

1. Nach einer Infektion der unteren Atemwege kommt es bei einem erheblichen Prozentsatz der Patienten zu einer Atemwegshyperreagibilität, die sich in Symptomen wie Husten oder Atemwegsobstruktion äußern kann. Die Pathogenese dieses Phänomens ist bis heute nicht geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass eine veränderte Aktivität der die Atemwege innervierenden Nerven wesentlich zu dieser Atemwegshyperreagibilität beiträgt.

2. Der Nervenwachstumsfaktor Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ist ein wichtiger Modulator der neuronalen Plastizität des adulten Organismus. Studien am Tiermodell weisen darauf hin, dass BDNF eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der bronchialen Hyperreagibilität zukommt. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte lokale BDNF-Produktion insbesondere für die neuronale Hyperreagibilität der entzündeten Atemwege mitverantwortlich zeichnet.

3. Eine Besonderheit der BDNF-Physiologie ist die Speicherung von BDNF in Thrombozyten, die BDNF aktiv aus externen Quellen aufnehmen. Die Speicherung von BDNF in Thrombozyten führt zu hohen BDNF-Serumspiegeln beim Menschen. BDNF wird außerdem von Leukozyten produziert und kann in Entzündungsherden aus ihnen freigesetzt werden.

4. In den letzten Jahren wurden Zusammenhänge zwischen BDNF-Spiegeln im Serum, Plasma und in Thrombozyten mit funktionellen Veränderungen der Lunge und des Nervensystems gezeigt. Die BDNF-Konzentrationen im Serum, Plasma und in Thrombozyten von Patienten mit akuten Infektionen der unteren Atemwege wurden jedoch bislang nicht systematisch untersucht.

5. In der vorliegenden Studie wurden 16 Patienten mit akuten Infektionen der unteren Atemwege und 16 gesunde Kontrollpatienten untersucht. Es wurden bei allen Probanden (neben einer Reihe von Routine-Laborparametern) die BDNF-Konzentrationen im Serum, in Thrombozyten und im Plasma bestimmt. Bei den Patienten wurden die Werte zu zwei Zeitpunkten bestimmt (ein Tag nach Aufnahme

und eine Woche nach antibiotischer Therapie). Des Weiteren wurde in Zellkulturexperimenten die BDNF-Freisetzung aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Patienten und Kontrollprobanden verglichen. Zusätzlich wurden die Zellen mit verschiedenen Mediatoren und Medikamenten inkubiert.

6. Die BDNF-Konzentrationen im Serum und in Thrombozyten, jedoch nicht im Plasma, waren bei den Patienten in der akuten Entzündungsphase deutlich reduziert (< 25% der Werte der Kontrollprobanden). Die Verbesserung des klinischen Zustandes der Patienten nach 8 Tagen ging einher mit einer Normalisierung der BDNF-Spiegel im Serum und in Thrombozyten.

7. Die Analyse weiterer Thrombozytenmarker (TGF- β , Serotonin) erbrachte Hinweise darauf, dass es zu einer unspezifischen Freisetzung von Thrombozytenmediatoren (inklusive BDNF) während einer Infektion der unteren Atemwege kommt.

8. Eine generell verstärkte BDNF-Sekretion durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurde bei den Patienten nicht gefunden. Die BDNF-Ausschüttung konnte jedoch signifikant erhöht werden, wenn bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) zugesetzt wurde.

9. In den Zellkulturexperimenten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sowohl bei Kontrollprobanden als auch bei Patienten das inhalative Steroid Fluticason die BDNF-Sekretion hemmen kann. Im Gegensatz dazu führte das β_2 -Mimetikum Salmeterol zu einer signifikanten Steigerung der BDNF-Sekretion.

10. Anhand der erhobenen Daten haben wir die Hypothese aufgestellt, dass es während einer akuten Entzündung der unteren Atemwege zu einer gesteigerten Sekretion von BDNF durch Thrombozyten und Leukozyten kommt, die zu einer Hyperreagibilität der Atemwege beitragen könnte. Inhalative Steroide könnten durch eine Senkung der BDNF-Produktion einen positiven Effekt auf die Reagibilität der Atemwege haben. Eine Monotherapie mit Bronchodilatoren wie Salmeterol scheint hingegen aufgrund der verstärkten BDNF-Sekretion mit dem Risiko einer gesteigerten Atemwegsreagibilität verbunden zu sein.