

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Abteilung Pneumologie
der Universität Rostock.

Einfluss der segmentalen Allergenprovokation auf die
Lymphozytensubpopulationen und die Expression von
Oberflächenmolekülen in der bronchoalveolären Lavage und im
Blut beim allergischen Asthma bronchiale

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Universität
Rostock

Vorgelegt 2013

von Sabrina M. Irmscher
geboren in Esslingen/N.

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

1. Gutachter: Prof. Dr. med. J.C. Virchow jr. (Uniklinik Rostock)

2. Gutachter: PD Dr. med. habil. Jan P. Roesner (Uniklinik Rostock)

3. Gutachter: Prof. Dr. med. S. Sorichter (Uniklinik Freiburg)

Datum der Verteidigung: 03.12.2013

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Asthma bronchiale	1
1.1.1. Definition	1
1.1.2. Epidemiologie	1
1.1.3. Ätiologie	2
1.1.4. Extrinsisches Asthma bronchiale	2
1.1.5. Intrinsisches Asthma bronchiale	3
1.1.6. Pathogenese	3
1.2. Asthmatische Entzündung	4
1.2.1. Entzündungszellen	5
1.2.1.1. Mastzellen	5
1.2.1.2. Monozyten/Makrophagen	6
1.2.1.3. Lymphozyten	7
1.2.1.4. Granulozyten	8
1.2.2. Oberflächenmoleküle	9
1.2.2.1. CD49f	10
1.2.2.2. CD66acde und CD66b	10
1.2.2.3. CD69	11
1.2.2.4. CDw125	12
2. Zielsetzung	13
3. Material und Methoden	14
3.1. Materialien	14
3.1.1. Geräte	14
3.1.2. Gefäße und Zubehör	15
3.1.3. Chemikalien und Biochemikalien	15
3.1.4. Antikörper-Lösungen	16
3.2. Methoden	16
3.2.1. Auswahl der Probanden	16
3.2.2. Voruntersuchungen zur Auswahl des Allergens	17

3.2.3. Inhalative Provokation und Spirometrie	17
3.2.4. Bronchoskopie und segmentale Allergenprovokation	19
3.2.5. Aufarbeitung der BAL.....	20
3.2.6. Auszählung der Zellen	20
3.2.7. Herstellung des Präparates zur Differentialzytologie	20
3.2.8. Aufarbeitung des Blutes.....	21
3.2.9. Antikörpermarkierung der Zellen.....	22
3.2.10. Durchflusszytometrie	23
3.3. Statistische Auswertung	24
4. Resultate.....	25
4.1. Differentialzytologie der Leukozyten aus BAL und Blut	25
4.1.1. BAL-Flüssigkeit.....	25
4.1.2. Zellverteilung in der BAL	26
4.1.3. Differentialzytologie des Blutes	29
4.2. Expression von Oberflächenmolekülen auf Leukozyten	30
4.2.1. CD49f-Expression.....	30
4.2.2. CD66acde-Expression.....	32
4.2.3. CD66b-Expression.....	35
4.2.4. CD69-Expression	38
4.2.5. CDw125-Expression.....	40
4.3. Lymphozyten-Marker	42
4.3.1. CD3-Expression	42
4.3.1.1. CD3-Expression absolut in der BAL und im Blut.....	42
4.3.1.2. CD3-Expression prozentual in der BAL und im Blut.....	43
4.3.2.1. CD3/4-Expression absolut in der BAL und im Blut.....	44
4.3.2.2. CD3/4-Expression prozentual in der BAL und im Blut.....	45
4.3.3.1. CD3/8-Expression absolut in der BAL und im Blut.....	46
4.3.3.2. CD3/8-Expression prozentual in der BAL und im Blut.....	47
4.3.4.1. CD16/56- Expression absolut in der BAL und im Blut.....	47
4.3.4.2. CD16/56-Expression prozentual in der BAL und im Blut.....	48
4.3.5.1. CD19-Expression absolut in der BAL und im Blut.....	49
4.3.5.2. CD19-Expression prozentual in der BAL und im Blut.....	50
4.3.6.1. CD3/4/57-Expression prozentual in der BAL und im Blut.....	51
4.3.6.2. CD3/8/57-Expression prozentual in der BAL und im Blut.....	52

4.3.6.3	CD3/16/56/57-Expression prozentual in der BAL und im Blut.....	54
5.	Diskussion.....	55
5.1.	Zellzusammensetzung der BAL und des Blutes.....	55
5.2.	Differenzierung der Lymphozyten aus BAL und Blut	57
5.2.1.	Expression von CD3 auf BAL- und Blutlymphozyten.....	59
5.2.2.	Expression von CD3/4 auf BAL- und Blutlymphozyten.....	59
5.2.3.	Expression von CD3/8 auf BAL- und Blutlymphozyten.....	61
5.2.4.	Expression von CD16/56 auf BAL- und Blutlymphozyten	62
5.2.5.	Expression von CD19 auf BAL- und Blutlymphozyten.....	62
5.2.6.	Expression von CD57 auf T-Helfer-, T-Suppressor- und NK-Zellen in der BAL und im Blut.....	62
5.3.	Expression der Oberflächenmarker auf Leukozyten.....	63
5.3.1.	Expression von CD49f auf BAL- und Blutleukozyten	63
5.3.2.	Expression von CD66acde und CD66b auf BAL-und Blutleukozyten	64
5.3.3.	Expression von CD69 auf BAL- und Blutleukozyten.....	65
5.3.4.	Expression von CDw125 auf BAL- und Blutleukozyten	66
5.4	Besonderheiten des Mausmodells	67
6.	Zusammenfassung	68
7.	Literaturverzeichnis.....	69
8.	Danksagung	82
9.	Lebenslauf.....	83

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: Differentialzytologie der BAL nach Allergenprovokation.....	21
Abb. 3.2: Lage der Leukozytensubpopulationen im FSC-SSC-Dotplot.....	23
Abb. 4.1: Gesamtzellzahlen in der BAL	26
Abb. 4.2: Eosinophile Granulozyten in der BAL	27
Abb. 4.3: Neutrophile Granulozyten in der BAL	27
Abb. 4.4: Makrophagen in der BAL.....	28
Abb. 4.5: Lymphozyten in der BAL	28
Abb. 4.6: Differentialzytologie des Blutes	29
Abb. 4.7: CD49f-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus der BAL.....	30
Abb. 4.8: CD49f-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus dem Blut	31
Abb. 4.9: CD66acde-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus der BAL.....	32
Abb. 4.10: CD66acde-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus dem Blut	33
Abb. 4.11: CD66acde-Expression auf neutrophilen Granulozyten aus der BAL	33
Abb. 4.12: CD66acde-Expression auf neutrophilen Granulozyten aus dem Blut.....	34
Abb. 4.13: CD66acde-Expression auf Makrophagen aus der BAL	34
Abb. 4.14: CD66acde-Expression auf Monozyten aus dem Blut	35
Abb. 4.15: CD66b-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus der BAL	36
Abb. 4.16: CD66b-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus dem Blut	36
Abb. 4.17: CD66b-Expression auf neutrophilen Granulozyten aus der BAL.....	37
Abb. 4.18: CD66b-Expression auf neutrophilen Granulozyten aus dem Blut.....	37
Abb. 4.19: CD66b-Expression auf Makrophagen aus der BAL.....	38
Abb. 4.20: CD66b-Expression auf Monozyten aus dem Blut.....	38
Abb. 4.21: CD69-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus der BAL	39
Abb. 4.22: CD69-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus dem Blut	39
Abb. 4.23: CDw125-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus der BAL.....	40
Abb. 4.24: CDw125-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus dem Blut.....	41
Abb. 4.25: CD3 ⁺ Lymphozyten aus der BAL absolut.....	42
Abb. 4.26: CD3 ⁺ Lymphozyten aus dem Blut absolut	43
Abb. 4.27: Anteil CD3 ⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten aus der BAL	43
Abb. 4.28: Anteil CD3 ⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten aus dem Blut....	44
Abb. 4.29: CD3 ⁺ /4 ⁺ Lymphozyten aus der BAL absolut.....	45
Abb. 4.30: CD3 ⁺ /4 ⁺ Lymphozyten aus dem Blut absolut.....	45

Abb. 4.31: CD3 ⁺ /8 ⁺ Lymphozyten aus der BAL absolut.....	46
Abb. 4.32: CD3 ⁺ /8 ⁺ Lymphozyten aus dem Blut absolut.....	47
Abb. 4.33: CD16 ⁺ /56 ⁺ Lymphozyten aus der BAL absolut.....	48
Abb. 4.34: CD16 ⁺ /56 ⁺ Lymphozyten aus dem Blut absolut.....	48
Abb. 4.35: CD19 ⁺ Lymphozyten aus der BAL absolut	49
Abb. 4.36: CD19 ⁺ Lymphozyten aus dem Blut absolut	50
Abb. 4.37: Anteil CD19 ⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten aus der BAL ...	50
Abb. 4.38: Anteil CD19 ⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten aus dem Blut ..	51
Abb. 4.39: Anteil CD3 ⁺ /4 ⁺ /57 ⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten.....	
.....aus der BAL.....	52
Abb. 4.40: Anteil CD3 ⁺ /4 ⁺ /57 ⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten.....	
.....aus dem Blut.....	52
Abb. 4.41: Anteil CD3 ⁺ /8 ⁺ /57 ⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten.....	
.....aus der BAL.....	53
Abb. 4.42: Anteil CD3 ⁺ /8 ⁺ /57 ⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten.....	
.....aus dem Blut.....	53
Abb. 4.43: Anteil CD3 ⁺ /16 ⁺ /56 ⁺ /57 ⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten.....	
.....aus der BAL.....	54
Abb. 4.44: Anteil CD3 ⁺ /16 ⁺ /56 ⁺ /57 ⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten.....	
.....aus dem Blut	54

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Antikörper.....	16
Tab. 3.2: Probanden.....	17
Tab. 3.3: Antikörperkombinationen.....	22

Abkürzungsverzeichnis

A	Alter
Abt.	Abteilung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AU	Allergen Unit
B1	Blutentnahme vor SAP
B2/B72	Blutentnahme 72 h nach SAP
β_2	β_2 -Sympathomimetikum
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
b.B	bei Bedarf
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C3a	aktivierter Komplementfaktor 3
Ca ²⁺	Kalzium
CD	Cluster of Differentiation (Nomenklatur zellulärer Oberflächenantigene)
CR	Cromociline (Zellwandstabilisatoren)
Cy5	Cytochrom 5
ECF	Eosinophilen-chemotaktischer Faktor
ECP	eosinophil cationic protein
EDN	eosinophil derived neurotoxin
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
Eos	eosinophile Granulozyten
EPO	eosinophile Peroxidase
et al.	und andere
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter
FCS	Fetal Calf Serum
FEV ₁	Forciertes expiratorisches Volumen [l] in der 1. Sekunde; Maß für bronchiale Obstruktion
FEV ₁ 80%	80%-Wert der gemessenen FEV ₁
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter; Maß für die Größe einer Zelle
G	Geschlecht
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor

GZz	Gesamtzellzahl
h	Stunde(n)
H1	Histamin 1
H ₂ O	Wasser
HLA	Human Leucocyte Antigen
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
ICS	inhalative Kortikosteroide
i.d.R.	in der Regel
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IVC	Inspiratorische Vitalkapazität [l]
K1/K10min	Kontrollsegment 10 min nach NaCl-Instillation
K2/K72	Kontrollsegment 72 h nach NaCl-Instillation
LTB ₄	Leukotrien B ₄
µl	Mikroliter
m	männlich
Makros	Makrophagen
MBP	major basic protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
Monos	Monozyten
mRNA	Messenger Ribonucleid Acid
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Beobachtungen
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaN ₃	Natriumazid
NCF	Neutrophilen-chemotaktischer Faktor
Neu	neutrophile Granulozyten
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer
n.s.	nicht signifikant
OAH	orale Antihistaminika
OCS	orale Kortikosteroide
p	Irrtumswahrscheinlichkeit

P1	Provokationssegment 10 min nach SAP
P2/P72	Provokationssegment 72 h nach SAP
PAF	Platelet Activating Factor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD 20	Provokationsdosis, die nötig ist, um einen 20%igen Abfall der FEV1 zu erzeugen
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin-5
R	Rezeptor
SAP	Segmentale Allergenprovokation
SEM	Standard Error of Mean
SMF	Specific Mean Fluorescence
SSC	Side Scatter; Maß für die Granularität einer Zelle
Th ₀	T-Helferzelle vom Typ 0
Th ₁	T-Helferzelle vom Typ 1
Th ₂	T-Helferzelle vom Typ 2
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Umdrehung bzw. Unit; biochemische Einheit für durch optischen Test ermittelte Substanzmengen
VC	Vitalkapazität
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA	Very Late Antigen
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel
Zz	Zellzahl

1. Einleitung

1.1. Asthma bronchiale

1.1.1. Definition

Asthma bronchiale ist eine chronische Entzündung der Atemwege, charakterisiert durch eine bronchiale Hyperreagibilität sowie eine variable Atemwegsobstruktion (12). Die Obstruktion ist in der Regel spontan oder auf β 2-Mimetika vollständig reversibel, bei chronischem Verlauf kann jedoch auch nur eine partielle Reversibilität vorliegen.

Klinisch äußert sich dies typischerweise in anfallsweise auftretender Atemnot; weitere Symptome sind trockener Husten, ein verlängertes Expirium, Engegefühl im Thorax sowie ein giemendes oder pfeifendes Atemgeräusch; nachts häufig schlimmer als tagsüber.

Pathognomonisch ist der Wechsel von Krankheitsepisoden mit symptomfreien Intervallen. In den anfallsfreien Phasen kann durch chronische Obstruktion ein anhaltender trockener Husten verursacht werden (33, 69).

Die Dauer der Anfälle beträgt üblicherweise nur Minuten oder Stunden, die Episoden können sich allerdings auch bis zur über Tage anhaltenden schweren Obstruktion - dem Status asthmaticus- steigern. In schweren Fällen kann ein Asthmaanfall sogar zum Tode führen.

1.1.2. Epidemiologie

Die Prävalenz des Asthma bronchiale zeigt einen weltweiten Anstieg und ist am höchsten in westlichen Industrienationen. In Deutschland leiden 5 - 10% der Bevölkerung an Asthma bronchiale, wobei besonders Kinder betroffen sind (4, 33). Obzwar die Erkrankung prinzipiell in jedem Lebensalter auftreten kann, manifestiert sie sich vor allem in jungen Jahren.

1.1.3. Ätiologie

Die Ursachen des Asthma bronchiale sind vielfältig und zum Teil noch nicht geklärt. Klinisch bewährt hat sich eine auf den Entstehungsmechanismus bezogene Einteilung in

- extrinsisches oder allergisches Asthma bronchiale
- intrinsisches oder endogenes Asthma bronchiale

Diese beiden Formen weisen viele histopathologische Gemeinsamkeiten auf, jedoch unterscheiden sie sich durch den Entstehungsmechanismus und charakteristische Zytokinmuster (99).

Darüber hinaus existieren weitere Unterteilungen, die sich auf die auslösende Noxe beziehen, wie z.B. das analgetikainduzierte Asthma, das anstrengungsinduzierte Asthma, das chemisch-toxische Asthma, das physikalisch-irritative Asthma und das berufsbedingte Asthma. Dies sind jedoch keine eigenständigen Formen des Asthma bronchiale. In der Regel lassen sie sich dem extrinsischen oder dem intrinsischen Asthma zuordnen (87).

1.1.4. Extrinsisches Asthma bronchiale

Bedeutendster Risikofaktor für die Entstehung des extrinsischen Asthma bronchiale ist die Atopie oder das atopische Syndrom, also die Neigung zu allergischen Erkrankungen wie Neurodermitis, Heuschnupfen und Urtikaria. Milchschorf im Säuglingsalter oder eine doppelte Lidfalte sind phänotypischer Ausdruck einer solchen Atopieneigung. Ausgelöst wird es durch Inhalationsallergene wie Tierhaare, Hausstaubmilben, Gräser-, Baum- und Getreidepollen, Mehlstaub, Bettfedern und Schimmelpilzsporen. Allergene aus Fäkalpartikeln der Hausstaubmilbe zählen weltweit zu den bedeutendsten Ursachen des extrinsischen Asthmas (59). Das Auftreten ist häufig kombiniert mit Neurodermitis, Heuschnupfen oder Urtikaria bei Atopikern. Dieses so genannte allergische Asthma ist die häufigste Asthmaform in der Kindheit und ist häufig verknüpft mit einer positiven Familienanamnese bezüglich allergisch bedingter Erkrankungen.

Zugrunde liegt eine IgE-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp (7), auf die nach zwei bis acht Stunden eine zweite Reaktion - die so genannte Spätreaktion - folgen kann (40, 16). Selten tritt diese isoliert auf. Die Sicherung der allergischen Genese erfolgt durch die Messung erhöhter Gesamt-IgE- und allergenspezifischer IgE-Spiegel im Serum. Außerdem finden sich eine Eosinophilie und ein positiver Pricktest. In der BAL liegen aktivierte CD4⁺ T-Lymphozyten und ein Th2-typisches Zytokinmuster vor (33, 97).

1.1.5. Intrinsisches Asthma bronchiale

An der Entstehung des intrinsischen Asthma bronchiale sind keine allergischen Mechanismen beteiligt. Wahrscheinlich spielen bronchopulmonale Infekte als Auslöser eine Rolle. Auch autoimmunologische Vorgänge werden diskutiert (59). Im Gegensatz zum extrinsischen Asthma tritt die intrinsische Form vor allem bei Erwachsenen auf und geht häufig mit einer chronisch-polypösen Rhinosinusitis einher (77).

Meist liegt eine Überempfindlichkeit gegenüber nichtsteroidalen Antiphlogistika vor, die bei Einnahme zu einer allergischen Reaktion führen können. Die IgE-Spiegel im Serum sind nicht erhöht, dagegen ist die Eosinophilie stärker ausgeprägt als beim allergischen Asthma. Trotzdem treten häufig positive Hauttests auf. Auch in symptomfreien Intervallen finden sich aktivierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in der BAL (33, 99).

Einige Patienten können allerdings keiner der beiden Gruppen eindeutig zugeordnet werden. Jedoch müssen extrinsische Ursachen immer berücksichtigt und, wenn möglich, vermieden werden.

1.1.6. Pathogenese

Bei allen Formen des Asthma bronchiale führen bestimmte Auslöser wie Allergene oder Infekte zu einer chronischen Entzündung der Atemwege. Diese ist die Grundlage für eine Hyperreagibilität der Bronchialschleimhaut, die nun auch auf Reize reagieren kann, welche nicht ursächlich zur Entstehung des Asthmas

beigetragen haben, wie Anstrengung, kalte und verschmutzte Luft, Infekte oder psychischer Stress.

Eine Reizung der Atemwege führt über die typische Trias

- Bronchialspasmus
- Schleimhautödem
- Hyper- bzw. Dyskrie

zur bronchialen Obstruktion.

Dieser Vorgang wird durch Entzündungsmediatoren vermittelt, die auf die glatte Bronchialmuskulatur, die Schleimhautkapillaren und die peribronchialen Drüsen einwirken. Der Bronchialspasmus kann außerdem reflektorisch durch direkte Reizung sensibler Nervenendigungen ausgelöst werden, welche zwischen den Zellen des respiratorischen Flimmerepithels liegen und durch die entzündlich bedingte Störung seiner Schrankenfunktion den unterschiedlichsten inhalativen Noxen ausgesetzt sind (70, 87).

Morphologische Befunde beim Asthma bronchiale sind Hypertrophie der Bronchialmuskulatur, Hyperplasie der Schleimdrüsen und der Becherzellen sowie glasig-zäher Schleim im Bronchuslumen. Darin befinden sich Curschmann-Spiralen, die sich aufgrund einer gestörten Zilienfunktion aus Schleim und abgeschilferten Epithelien bilden, und Charcot-Leyden-Kristalle, die aus den Zellmembranen zugrunde gegangener eosinophiler Granulozyten bestehen. Weiterhin zeigt sich eine ödematöse Schwellung der Submukosa mit Infiltration durch Entzündungszellen und eine Ödembildung der epithelialen Basalmembran, die in diesem Zustand als Glashaut bezeichnet wird (77).

Beim chronischen Verlauf findet ein fibrotischer Umbau des Bronchialgewebes statt, der als „airway remodeling“ bezeichnet wird (97).

1.2. Asthmatische Entzündung

Die allgemeine Definition der Entzündung ist eine Abwehrreaktion des Organismus auf verschiedene, gewöhnlich schädigende Reize. Zahlreiche humorale und zelluläre

Komponenten des Immunsystems, die über ein komplexes System von Signalstoffen miteinander kommunizieren, sind daran beteiligt. Für das allergische Asthma typisch ist eine übermäßige Reaktion auf Reize, die von einem gesunden Organismus als nicht schädigend erkannt werden und daher keine oder nur eine minimale Reaktion auslösen.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Entzündung beim extrinsischen Asthma bronchiale. Voraussetzung für eine allergische Reaktion ist eine Sensibilisierung des Organismus gegen ein Allergen. Hierbei interagieren Makrophagen, die dieses Allergen prozessieren und auf ihrer Oberfläche präsentieren, mit T-Helferzellen. Diese induzieren in Plasmazellen die Produktion von allergenspezifischem IgE.

Beim nächsten Allergenkontakt findet eine IgE-vermittelte Mastzelldegranulation statt, wodurch innerhalb weniger Minuten die asthmatische Frühreaktion mit bronchialer Obstruktion ausgelöst wird. Sie erreicht nach 15 bis 30 Minuten ihr Maximum und klingt nach etwa 2 Stunden wieder ab.

Mastzellen und Monozyten/Makrophagen sezernieren chemotaktische Zytokine, die eine Einwanderung weiterer Entzündungszellen aus dem Blut ins Bronchialgewebe bewirken. Diese lösen nach etwa 4 Stunden die asthmatische Spätreaktion aus, die nach 6 bis 24 Stunden ihr Maximum erreicht und bis zu 48 Stunden oder länger anhalten kann (9, 70, 87).

1.2.1. Entzündungszellen

Im Folgenden werden die Entzündungszellen, die beim allergischen Asthma eine Rolle spielen, genauer beschrieben.

1.2.1.1. Mastzellen

Mastzellen kommen in allen Körpergeweben vor, vor allem aber in solchen, die mit der Umwelt in Kontakt stehen, wie beispielsweise Haut, Lunge und Verdauungstrakt. Auf ihrer Oberfläche tragen sie einen hochaffinen Rezeptor für IgE. Durch die Kreuzvernetzung von zwei auf der Mastzelloberfläche gebundenen IgE-Antikörpern durch Antigene bzw. Allergene wird die Mastzelle aktiviert. Diese Aktivierung kann

auch durch Komplementfaktoren, Lektine, Opioide und Kaltluftreize hervorgerufen werden.

Bei Aktivierung kommt es zur Mastzelldegranulation und damit zur Freisetzung von Mediatoren wie Histamin, Heparin, proteolytischen Enzymen und plättchenaktivierendem Faktor (PAF) ins Gewebe. In der Lunge bewirkt dies die asthmatische Frühreaktion. Histamin führt über seine Bindung an H₁-Rezeptoren zu einer Vasodilatation, Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur. Durch die Aktivierung der Mastzelle wird außerdem eine Neusynthese von Prostaglandinen und Leukotrienen ausgelöst, die unter anderem zu einer erhöhten Schleimsekretion führt. Weiterhin setzen Mastzellen Chemotaxine wie Leukotrien-B₄ (LTB₄), neutrophilen-chemotaktischen Faktor (NCF) und eosinophilen-chemotaktischen Faktor (ECF) frei. Unter dem Einfluss von IL-4 können sie ein Th2-typisches Zytokinmuster aufweisen (8). So bewirken sie eine Einwanderung weiterer Entzündungszellen in die Bronchialschleimhaut, die ihrerseits für die asthmatische Spätreaktion verantwortlich sind (7, 64).

1.2.1.2. Monozyten/Makrophagen

Monozyten oder mononukleäre Zellen zirkulieren etwa zwei Tage im Blut und wandern dann ins Gewebe ein, wo sie sich zu spezifischen Makrophagen entwickeln. Durch ihre Fähigkeit zur Phagozytose sind sie an der Bekämpfung von Bakterien und Pilzen sowie an der Entsorgung zugrunde gegangener körpereigener Zellen beteiligt. Sie tragen aufgrund verschiedener Funktionen zur asthmatischen Entzündung bei. Zum einen phagozytieren und prozessieren sie vorhandene Allergene und präsentieren sie zusammen mit MHC II-Molekülen auf ihrer Oberfläche.

Dies ist die Voraussetzung dafür, dass sensibilisierte T-Helferzellen nach Erkennung des Antigens über Zytokine auf verschiedene Zellen einwirken und die Entzündung vorantreiben können. Zum anderen sezernieren auch Monozyten/Makrophagen eine Vielzahl entzündungsfördernder Zytokine, vor allem IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ und GM-CSF, und lösen damit unter anderem ebenfalls eine Migration weiterer Entzündungszellen in die Bronchialschleimhaut aus. Sie sind also sowohl an Vorgängen der spezifischen, als auch der unspezifischen Abwehr beteiligt (30, 31).

Eine Subgruppe der Makrophagen machen die dendritischen Zellen aus, welche in letzter Zeit in den Fokus bei der Erforschung entzündlicher Lungenerkrankungen

gerückt sind. Auch dendritische Zellen präsentieren nach Phagozytose Antigene zusammen mit MHC II-Molekülen und spielen somit eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Aktivierung. Sie lassen sich weiter in plasmazytoide (PDC) und myeloide dendritische Zellen (MDC) unterteilen, wobei die myeloiden dendritischen Zellen das Oberflächenmerkmal CD11c und die plasmazytoiden Zellen CD123 aufweisen (94). Wie bereits erwähnt sind die dendritischen Zellen in letzter Zeit verstärkt zum Gegenstand der Erforschung immunologischer Krankheiten geworden. Diese Zellen wandern aus dem peripheren Blut in den Respirationstrakt ein und transportieren das phagozytierte Antigenmaterial in die pulmonalen Lymphknoten (3, 95), wodurch sie die Immunantwort regulieren (37). Ihr Vorhandensein korreliert mit erhöhten Leveln an IgE und Eosinophilen im Blut und sie spielen eine zentrale Rolle bei der primären Immunantwort, indem sie die Differenzierung zu Th2-Zellen induzieren (67, 94). Nachgewiesenermaßen finden sie sich vermehrt im peripheren Blut von Patienten mit atopischen Erkrankungen (67) und korrelieren zahlenmäßig mit der Schwere der Erkrankung (37).

In einer Studie, in der ebenfalls eine asthmatische Reaktion provoziert wurde, zeigte sich nach 24 Stunden ein deutlicher Anstieg beider dendritischer Zelltypen, wobei die plasmazytoiden Zellen überwogen, wohingegen es nach zehn Minuten zu keiner messbaren Reaktion kam. (11). Somit können dendritische Zellen auch für die Aufrechterhaltung der asthmatischen Reaktion verantwortlich gemacht werden. Durch die in mehreren Studien (11, 67) nachgewiesene prozentuale Überzahl der plasmazytoiden Zellen bei Asthmatikern könnte sich die beim Asthma vorhandene verstärkte Produktion der Th2-Zellen erklären.

Ein ähnlicher Effekt dendritischer Zellen wurde auch bei der Pathogenese der atopischen Dermatitis untersucht (37).

1.2.1.3. Lymphozyten

Die Lymphozyten machen etwa 20% der im Blut zirkulierenden Leukozyten aus. Diese Zellen entwickeln sich aus lymphoiden Stammzellen des Knochenmarks zu den späteren Zielzellen, den B- und T-Lymphozyten.

Charakteristisch für die **B-Lymphozyten** ist die Expression von CD19 auf ihrer Oberfläche. Dort tragen sie gebundenes IgM und IgD und können so spezifische

Antigene erkennen. Unter Mitwirkung von T-Helferzellen finden bei Kontakt mit einem Antigen eine Proliferation der B-Lymphozyten und ihre Differenzierung in antikörperproduzierende Plasmazellen und Gedächtniszellen statt (18). Typisch für allergische Reaktionen ist eine starke Produktion von IgE. Auch B-Lymphozyten sezernieren immunmodulierende Zytokine (75).

Die Reifung der **T-Lymphozyten** zu immunkompetenten Zellen findet im Thymus statt. $CD4^+$ T-Helferzellen sind maßgeblich an der Regulation von Immunreaktionen beteiligt, indem sie durch eine Vielzahl an Zytokinen mit anderen Entzündungszellen kommunizieren und deren Aktivität steuern (66).

Sie lassen sich aufgrund unterschiedlicher Zytokinmuster in zwei weitere Gruppen gliedern: Th1-Zellen produzieren vorwiegend IL-2 und IFN- γ und regulieren damit die zellvermittelte Immunantwort. Th2-Zellen hingegen beeinflussen durch die Bildung von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 die humorale Immunantwort. Durch verschiedene Effekte fördern sie die allergische Entzündung (99). Beispielsweise bewirken sie eine Differenzierung von Stammzellen zu eosinophilen Granulozyten und deren Aktivierung sowie den Isotyp-Switch der B-Lymphozyten (17). $CD8^+$ T-Lymphozyten, die sogenannten T-Suppressorzellen dienen der Unterdrückung überschießender Immunreaktionen und als zytotoxische T-Zellen der Elimination körperfremder oder entarteter körpereigener Zellen.

Natürliche Killerzellen, die durch die Expression von CD16 und CD56 auf ihrer Oberfläche gekennzeichnet sind, haben ähnliche Aufgaben wie die zytotoxischen T-Lymphozyten und dienen vor allem der Elimination von Fremdstoffen.

1.2.1.4. Granulozyten

Granulozyten lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Anfärbbarkeit ihrer Granula in basophile, neutrophile und eosinophile Granulozyten unterteilen.

Den **basophilen Granulozyten** kommen ähnliche Aufgaben zuteil wie den Mastzellen. Auch sie können durch IgE-vermittelte Aktivierung Mediatoren wie Histamin und Heparin freisetzen und somit zur asthmatischen Frühreaktion beitragen (72).

Ausserdem sezernieren sie die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 (79). Im Gegensatz zu Mastzellen zirkulieren Basophile jedoch im Blutkreislauf, die Einwanderung ins

Gewebe erfolgt nur auf spezielle Reize. Die Intensität der asthmatischen Spätreaktion korreliert mit der Histaminfreisetzung durch periphere Blutbasophile (43).

Neutrophile Granulozyten sind zur Phagozytose fähig und setzen Interferone, gewebsschädigende Enzyme, reaktive Sauerstoffverbindungen und entzündungsfördernde Mediatoren wie IL-1, TNF- α und GM-CSF frei. Einige dieser Substanzen lassen sich beim Asthma bronchiale vermehrt nachweisen.

Weiterhin steuern die Neutrophilen Durchblutung und Permeabilität im Entzündungsgebiet. Ebenso gehört zu ihren Aufgaben die Aktivierung des Komplementsystems. Viele ihrer Funktionen überschneiden sich mit denen der eosinophilen Granulozyten (83, 96).

Eosinophile Granulozyten kommen vor allem in den Epithelien des Respirationstraktes, des Verdauungstraktes und des unteren Urogenitaltraktes vor, wo ihre Lebensdauer auf etwa 6 Tage begrenzt ist. In der Bronchialschleimhaut sind sie entscheidend an der Entwicklung der asthmatischen Spätreaktion beteiligt. Gewebsschädigende Enzyme wie Elastasen und Kollagenasen, reaktive Sauerstoffverbindungen und die basischen Proteine MBP (major basic protein), ECP (eosinophil cationic protein), EDN (eosinophil derived neurotoxin) und EPO (eosinophil peroxidase) zerstören das respiratorische Flimmerepithel und induzieren die bronchiale Hyperreagibilität (28). Außerdem produzieren die eosinophilen Granulozyten Lipidmediatoren wie PAF (platelet activating factor), Thromboxan A₂ und verschiedene Prostaglandine und Leukotriene sowie eine Reihe an Zytokinen wie Interleukin (IL)-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-16, Granulozyten-Monozyten Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) und Tumornekrosefaktor (TNF)- α mit denen sie auf andere Entzündungszellen einwirken. Eine Stimulation der eosinophilen Granulozyten kann durch die Komplementfaktoren C3a und C5a, die Zytokine IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 und GM-CSF und die Lipidmediatoren PAF und Leukotrien 4 (LTB₄) erfolgen (29, 54, 56, 82, 88). Eosinophile finden sich in erhöhter Konzentration sowohl im Blut als auch in der BAL von Asthmatikern (10, 25).

1.2.2. Oberflächenmoleküle

Als wichtiger Vorgang beim allergischen Asthma gilt die Migration von Entzündungszellen in die Bronchialschleimhaut. Voraussetzung hierfür ist das

Vorhandensein von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothel- und Entzündungszellen. Diese lassen sich in die Integrin-, Selektin- und Immunglobulin-Familie unterteilen. Zu den Oberflächenmolekülen gehören außerdem MHC (major histocompatibility complex)-Proteine, oberflächengebundene Enzyme und Rezeptoren für verschiedene Substanzen wie Zytokine, Lipidmediatoren oder Immunglobuline.

Eine andere Möglichkeit der Einteilung von Oberflächenmolekülen ist das CD (cluster of differentiation)-System, bei dem jedes Molekül mittels monoklonaler Antikörper identifiziert werden kann. Zwei Bezeichnungen für dasselbe Molekül können also durchaus vorkommen, z. B. entspricht CD-25 dem IL-2 Rezeptor.

Oberflächenmoleküle können als Marker für Zellidentität, Zellreifung oder den Aktivierungsgrad einer Zelle dienen (64, 66).

1.2.2.1. CD49f

Wie bereits oben erwähnt ist die Migration von Leukozyten durch die intakte Kapillarwand eine wichtige Voraussetzung für den Entzündungsvorgang. Dies geschieht durch Interaktion von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten und Endothelzellen.

CD49f ist ein Adhäsionsmolekül auf Leukozyten und vermittelt im Rahmen des Asthma bronchiale Adhäsion und Migration vor allem von Eosinophilen und Lymphozyten. Dieser Oberflächenmarker gehört zur Gruppe der $\alpha 6$ -Integrine und ist assoziiert mit CD29, Laminin und dem Invasin-Rezeptor VLA-5.

Für T-Zellen spielt CD49f eine wichtige Rolle als Ko-Stimulator bezüglich Aktivierung und Proliferation.

1.2.2.2. CD66acde und CD66b

CD66acde und CD66b, welche zur Gruppe der karzinoembryonalen Antigene gehören, sind ebenfalls Adhäsionsmoleküle auf Leukozyten; weiterhin wird diesen Oberflächenmarkern die Fähigkeit zur Aktivierung von Granulozyten zugeschrieben. Ein vermehrtes Vorkommen CD66b-tragender Neutrophiler wurde beispielsweise

auch im Zusammenhang mit Colitis ulcerosa und Heuschnupfen beschrieben (51, 53). Eine weitere Aufgabe ist eine Rezeptorfunktion für *Neisseria gonorrhoeae*.

Diese Moleküle werden sowohl in geringer Zahl auf ruhenden Blutgranulozyten exprimiert, die Expression steigt jedoch gravierend nach Stimulation an. Das Submolekül CD66a ist ein transmembranöses Protein mit einer zytoplasmatischen Domäne, während die Submoleküle CD66b und CD66c mittels einer Glykosilphosphatidylinositolverbindung an der Zellmembran verankert sind.

In neutrophilen Granulozyten kommt CD66a in phosphorylierter Form vor, was nach Stimulation mit verschiedenen Faktoren, unter anderem PAF, deutlich zunimmt.

Bei Neutrophilen mit Expression von CD66a, CD66b und CD66c wurde eine Kreuzverlinkung von Antigenen mit folgender Zellaggregation und Proteinkinaseaktivität beobachtet, vor allem die Aktivität der Tyrosinkinase. Dies spielt eine große Rolle in der Signaltransduktion, was wiederum die Regulation anderer Zellfunktionen zur Folge hat (85).

Weiterhin wird eine starke Erhöhung der Kinaseaktivität durch Bindung der CD66-Antigene an Fibronectin beschrieben. Diese Bindung wird erreicht durch $\alpha(4)\beta(1)$ - und $\alpha(5)\beta(1)$ -Integrine, was durch das Vorhandensein des monoklonalen Antikörpers Kat4c unterstützt wird (73).

Bezüglich der CD66-Antikörper-vermittelten Adhäsionsvorgänge wurde eine gesteigerte Adhäsion nur unter Kalziumkonzentrationen im extrazellulären Normbereich beschrieben. Die antikörpervermittelte Adhäsion kann durch das Vorhandensein von CD18-Antikörpern blockiert werden und geht einher mit einer vermehrten Expression von CD11 und CD18 auf der Oberfläche von Neutrophilen (86).

Nach Kreuzverlinkung von CD66b wird eine Sekretion von in unstimulierten Neutrophilen gespeichertem IL-8 beschrieben. Dies wiederum dient anderen Zellen als chemotaktischer Reiz zur Migration ins Entzündungsgebiet (81).

1.2.2.3. CD69

CD69 gehört strukturell zu den C-Typ-Lektinen, einer Gruppe von Oberflächenmolekülen mit Rezeptorfunktion. Auch für CD69 wurden Rezeptoreigenschaften postuliert (34). CD69 wird von fast allen Zellen der hämatopoetischen Reihe konstitutiv oder in induzierbarer Form exprimiert. So

befindet es sich konstitutiv auf Thrombozyten und Monozyten, während es als Aktivierungsmarker von T-Lymphozyten und Eosinophilen gilt (69, 92). Auf eosinophilen Granulozyten von Patienten mit allergischem Asthma findet sich im Gegensatz zu Gesunden eine Expression von CD69 (36), die nach Allergenkontakt weiter ansteigt (39, 44). Auf Eosinophilen des peripheren Blutes wird CD69 durch Stimulation mit IL-3, IL-5, IL-13 und GM-CSF induziert (36, 63). Hinweise auf eine mögliche Rezeptorfunktion von CD69 geben Studien mit kreuzvernetzenden Antikörpern.

So führt die Kreuzvernetzung bei T-Lymphozyten zu einer Proliferationssteigerung (15), während bei Monozyten und Eosinophilen Apoptose induziert wurde (76, 100). Weitere Effekte sind der Einstrom von Ca^{2+} in Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten und Neutrophile und die Aggregation, Mediatorproduktion und Degranulation von Thrombozyten (19, 27, 91, 93).

1.2.2.4. CDw125

Das Oberflächenmolekül CDw125 ist ein Bestandteil der α -Kette des Interleukin-5 Rezeptors welcher von eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie B-Lymphozyten exprimiert wird (106). Der Rezeptor besteht aus der bereits erwähnten α -Kette, die eine spezifische Bindungsstelle für IL-5 darstellt, und einer β -Kette, die er mit den Rezeptoren für IL-3 und GM-CSF gemeinsam hat. Die β -Kette besitzt keine Bindungseigenschaften, verstärkt jedoch die Affinität für IL-5 und ist wie die α -Kette für die Signaltransduktion verantwortlich (14, 35). Nur 10% der α -Kette befinden sich in membrangebundener Form (mIL-5 α R) auf den jeweiligen Entzündungszellen. Die restlichen 90% liegen in löslicher Form (sIL-5R α ; s = soluble) vor und können die Wirkung von IL-5 antagonisieren (23). IL-5 induziert und reguliert die Expression von IL-5R α , die bei der asthmatischen Früh- und Spätreaktion erhöht ist (20, 89, 65).

2. Zielsetzung

Die korrekt durchgeführte segmentale Allergenprovokation löst eine auf zwei Lungensegmente begrenzte asthmatische Entzündung aus und ermöglicht so die Betrachtung der asthmatischen Entzündung *in vivo*, ohne eine übermäßige Belastung für den Probanden darzustellen.

Ziel dieser Arbeit war die Erfassung der Verteilung von Entzündungszellen in der BAL 10 Minuten und 72 Stunden nach NaCl-Provokation und Allergenprovokation im Verhältnis zu ihrer Verteilung im Blut, sowie die zeitliche Einordnung der erhaltenen Ergebnisse in frühere Studien, um eine genauere Vorstellung über die ablaufende Zellkinetik zu erhalten.

Die durchflusszytometrische Messung der Expression von spezifischen Aktivierungsmarkern, Adhäsionsmolekülen und Interleukinrezeptoren sollte genaueren Einblick in die entzündlichen Vorgänge beim Asthma bronchiale geben.

Des Weiteren wurde eine Aufschlüsselung der Lymphozyten-Subpopulationen vorgenommen, um tiefere Einblicke in die Kinetik dieser für das Asthma bronchiale wichtigen Zellgruppe zu erhalten.

Folgende Punkte sollten im Einzelnen untersucht werden:

- die Verteilung von Leukozyten (eosinophile und neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten) 10 Minuten nach segmentaler Allergenprovokation sowie nach 72 Stunden in der BAL und im Blut
- die Expression des Adhäsionsmoleküls CD49f auf Leukozyten
- der Aktivierungsgrad von Leukozyten durch Bestimmung der Aktivierungsmarker CD69, CD66b sowie CD66acde
- die Expression des einen Bestandteil des IL-5-Rezeptor bildenden Oberflächenmarkers CDw125
- die Kinetik der Lymphozyten und ihrer Subpopulationen (T-Zellen, T-Helferzellen, T-Suppressorzellen, NK-Zellen, B-Zellen, CD57-positive T-Helfer-, T-Suppressor- und NK-Zellen)

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte

Hersteller

FACSCalibur Durchflusszytometer in Verbindung mit Personalcomputer PowerMAC G4 Und Software Cell Quest Pro	Becton-Dickinson, New York, USA Apple, USA
Mikroskop mit Planachromat- Objektiven	Carl-Zeiss, Jena, BRD
Zählkammer Neubauer Improved	Fa. Brand, Wertheim, BRD
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus, Kendro Products, Langenselbold, BRD
Laborwaage MC1 Laboratory LC220S	Sartorius, Göttingen, BRD
Vortex-Mixer VM-300	Neolab Migge, Heidelberg, BRD
Pipette Eppendorf Research variable 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg, BRD
Pipette Eppendorf Research variable 2-20 µl	Eppendorf, Hamburg, BRD
Pipette Eppendorf Research variable 20-200 µl	Eppendorf, Hamburg, BRD
Pipette Eppendorf Research variable 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, BRD
Pipettenspitze blau	Eppendorf, Hamburg, BRD
Pipettenspitze gelb	Eppendorf, Hamburg, BRD
Spirometer	Eppendorf, Hamburg, BRD
Bronchoskop	Olympus, Hamburg, BRD
Venöser Zugang	Sarstedt AG, Nümbrecht, BRD
EDTA-Monovette S-Monovette 10 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, BRD
EDTA-Monovette S-Monovette 7,5 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, BRD
Objektträger	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, BRD

3.1.2. Gefäße und Zubehör**Hersteller**

50 ml Tubes PP-Röhrchen steril
 45 ml Tubes PP-Röhrchen steril
 FACS-Röhrchen

Greiner Bio-One, Frickenhausen, BRD

Greiner Bio-One, Frickenhausen, BRD

Filter

Becton-Dickinson, New York, USA
 BD Falcon, Biosciences, Bedford, USA

3.1.3. Chemikalien und Biochemikalien**Hersteller**

D-PBS-Puffer

Gibco Invitrogen Corp., USA

Waschpuffer bestehend aus D-PBS + 10 ml FCS
 (entspricht 2%) + 500 ml NaN₃ (entspricht 0,1%)

NaN₃

Merck KGaA, Darmstadt

FACS Lysing Solution (mit Aqua dest. zu 1:10
 verdünnt)

Becton-Dickinson, USA

FACS-Flow

Becton-Dickinson, USA

FACS-Clean

Becton-Dickinson, USA

FACS-Rinse

Becton-Dickinson, USA

Rinder-Albumin 30%

Biotest AG, Dreieich, BRD

Immersionsöl

Toluol

Methanol zur Fixierung der Präparate

Merck KGaA, Darmstadt,
 BRD

Eosin-Lösung zur Färbung

Merck KGaA, Darmstadt,
 BRD

Giemsa-Lösung zur Färbung

Merck KGaA, Darmstadt,
 BRD

3.1.4. Antikörper-Lösungen

Tabelle 3.1: Antikörper; Auflistung der zur Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörper, Aufführung des konjugierten Farbstoffes und der gewählten Verdünnung.

Antikörper	Konjugierter Farbstoff	Gebrauchslösung	Hersteller
IgM	FITC	1:20	Immunotools
IgG1	FITC	1:20	Immunotools
IgG2a	FITC	1:20	Immunotools
CD14	FITC	1:10	Immunotools
CD49f	FITC	1:2	Immunotools
CD57	FITC	1:10	Immunotools
CD66b	FITC	1:2	Immunotools
Anti-Maus IgG	FITC	1:20	Dako, Hamburg, BRD
IgG1	PE	1:20	Immunotools
IgG2a	PE	1:20	Immunotools
CD4	PE	1:50	Dako, Hamburg, BRD
CD8	PE	1:50	Dako, Hamburg, BRD
CD16	PE	1:20	Dako, Hamburg, BRD
CD19	PE	1:50	Dako, Hamburg, BRD
CD16/56	PE	1:50	Dako/Diaclone
CD66acde	PE	1:2	Immunotools
CD69	PE	1:2	Immunotools
CDw125	PE	1:5	BD Pharmingen
IgG1	PE-CY5	1:50	Dako, Hamburg, BRD
CD3	PE-CY5	1:50	Dako, Hamburg, BRD
CD16	TC	1:10	Caltag
Maus IgG	Unmarkiert	1:70	Dako, Hamburg, BRD
IL-13R Klon 1E7	Unmarkiert	1:70	selbst hergestellt

Immunotools, Frisethe, BRD

3.2. Methoden

3.2.1. Auswahl der Probanden

Gesucht wurden freiwillige Probanden sowohl männlichen als auch weiblichen Geschlechts, welche

- an allergischem Asthma bronchiale seit mindestens 1 Jahr litten
- zur Zeit der Untersuchung an keinem akuten Infekt litten

- zum Zeitpunkt der Untersuchung keine andere Medikation neben Asthmamedikamenten einnahmen

Ausgewählt wurden acht Probanden zwischen 22 und 37 Jahren (mittleres Alter 27). Alle Probanden waren Nichtraucher. Sie wurden schriftlich und mündlich über den Ablauf der Studie informiert. Ebenso wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt.

Die Studie wurde mit Genehmigung der lokalen Ethikkommission durchgeführt.

Tabelle 3.2: Probanden; Auflistung der untersuchten Probanden mit Angabe von Alter, Geschlecht, Asthmadauer sowie zur Provokation verwendetem Allergen und Dosierung. Weiterhin Darstellung der relevanten spirometrischen Werte, der IgE-Konzentration und der Eigenmedikation der Probanden. Hierbei bedeutet A = Alter, G = Geschlecht, b. B. = bei Bedarf, $\beta 2$ = $\beta 2$ -Sympathomimetika, OCS = orale Kortikosteroide, ICS= inhalative Kortikosteroide, CR = Cromoclycin, OAH = orale Antihistaminika
Dauer: Asthmadauer in Jahren

Nr.	A	G	Dauer	Allergen	FEV1 Basis	FEV1 % pred	IVC % pred	IgE [kU/l]	Spez. IgE	All.- Dos. [μ l]	All.- Dos. [AU]	Medikation
1	24	W	11	Milbe	3,32	95,1	91	226	56,6	98	9,8	$\beta 2$ b. B.
2	22	W	8	Roggen	4,08	105	89,6	545	12,6	76	76	$\beta 2$, OCS b.B.
3	34	M	24	Birke	5,68	124	108	127	35,2	230	230	$\beta 2$ b.B., ICS
4	24	W	1	Milbe	4,00	105	89,6	64,2	16,9	18	1,8	CR, $\beta 2$ b.B., OAH
5	26	W	16	Birke	3,64	101	88	121	34,5	28	28	$\beta 2$ b.B., OAH
6	25	W	2	Birke	3,92	123	99,2	20,4	5,28	14	14	ICS, $\beta 2$ b. B.
7	37	M	> 10	Birke	4,86	104	61	490	>100	135	135	OAH b. B.
8	22	M	1	Roggen	4,6			695	>100	60	60	keine

3.2.2. Voruntersuchungen zur Auswahl des Allergens

Zur Bestimmung der gesamten und spezifischen IgE-Spiegel wurde jedem Probanden Serum entnommen und analysiert. Des Weiteren erfolgte am Unterarm jedes Teilnehmers ein Pricktest. Voraussetzung zur Teilnahme an der Studie war eine eindeutige positive Reaktion sowie ein spezifischer IgE-Spiegel von mindestens Klasse 2 (0,70 – 3,5 kU/l).

3.2.3. Inhalative Provokation und Spirometrie

Anhand der Ergebnisse des Pricktests und der Bestimmung des spezifischen IgE wurde ein Allergen zur inhalativen Provokation ausgewählt. Für die Probanden 3,5,6

und 7 wurde Birken-Allergen, für die Probanden 2 und 8 Roggen-Antigen und für die Probanden 1 und 4 Milben-Antigen verwendet.

Voraussetzung für die inhalative Allergenprovokation war Infektfreiheit der Probanden. Inhalative oder systemische Steroide wurden 10 Tage, Antihistaminika 3 Tage, Cromoclycin 7 Tage, lang wirksame β 2-Mimetika 3 Tage vor Provokation abgesetzt und kurz wirksame β 2-Mimetika am Tag der Untersuchung abgesetzt.

Für eventuell auftretende Notfälle lag jeweils ein β 2-Mimetikum bereit.

Nach Festlegung eines Ausgangswertes durch Spirometrie (Fluss-Volumen-Kurve) inhalierte jeder Proband 1 ml 0,9% NaCl-Lösung. Anhand der dazu benötigten Atemzüge konnte die pro Atemzug aufgenommene Menge an Flüssigkeit errechnet werden.

Anschließend erfolgte die inhalative Provokation: nacheinander wurde vom Probanden in aufsteigender Verdünnung (1:10000, 1:1000, 1:100, 1:10, 1:1) das Allergen inhaliert, und zwar zuerst 1 Atemzug, danach ein weiterer Atemzug, dann 3 Atemzüge und daraufhin 5 Atemzüge. Ab der Verdünnung 1:1000 wurde nach dem Schema 1 Atemzug \rightarrow 3 Atemzüge \rightarrow 5 Atemzüge \rightarrow nächste Konzentration verfahren.

Nach jeder Inhalation erfolgte nach 10 Minuten Wartezeit (ggf. auch länger) eine Lungenfunktionsmessung.

Die Provokation wurde abgebrochen, wenn in der Lungenfunktionsmessung ein Abfall der FEV1 um 20% des Ausgangswertes erreicht war (Provokationsdosis für den 20%igen Abfall der FEV1 – PD20).

Nach Erreichen des gewünschten Abfalls der FEV1 wurden Lungenfunktionsmessungen im Abstand von 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h angeschlossen, um die Spätreaktion (erneuter Abfall der FEV1 um mindestens 15% nach anfänglicher Normalisierung der Werte) zu erfassen.

Die PD20 wurde mit Hilfe der Kenntnis über die notwendige Verdünnung und Anzahl der benötigten Atemzüge graphisch ermittelt. Diese Dosis wurde, in Kenntnis des Zusammenhangs zwischen Dosierung des verabreichten Allergens und Zellzahlerhöhung im provozierten Segment, den Probanden verzehnfacht in der bronchoalveolären Provokation verabreicht, um eine Reaktion im provozierten Bereich sicherzustellen.

Probanden, die bei der inhalativen Allergenprovokation keine Spätreaktion zeigten, wären von der Studie ausgeschlossen worden (0 von 8).

3.2.4. Bronchoskopie und segmentale Allergenprovokation

Die segmentale Allergenprovokation mit folgender bronchoalveolärer Lavage hat sich als sichere und effektive Methode erwiesen, um die Folgen einer Allergenexposition und die Mechanismen beim chronisch entzündlichen Asthma zu untersuchen (71, 45).

Vor der ersten Bronchoskopie erfolgte eine venöse Blutentnahme von EDTA-Blut zur Differentialblutbildbestimmung im Labor und zur Messung von Oberflächenmolekülen.

Alle Probanden erhielten für die Dauer der Bronchoskopie zur Ermöglichung einer raschen medikamentösen Intervention beim Auftreten eines Notfalles eine Venenverweilkanüle. Nach erfolgter Prämedikation– Inhalation eines Lokalanästhetikums und lokaler Anästhesie der Schleimhaut- wurde unter ständiger Sauerstoffgabe sowie pulsoxymetrischer Kontrolle die Bronchoskopie mittels eines flexiblen Bronchoskops durchgeführt. In die linke Lunge wurden in das 8er Segment des linken Unterlappens und das 4er oder 5er Segment des linken Oberlappens jeweils 2,5 ml 0,9% NaCl-Lösung instilliert. Anschließend erfolgte die bronchoalveoläre Lavage mit fünfmal 20 ml 0,9% NaCl-Lösung im 8er Segment links. In das 4er oder 5er Segment des rechten Mittellappens und das 8er Segment des rechten Unterlappens wurde über das Bronchoskop das Allergen in der zuvor festgelegten Dosierung (gelöst in 2,5 ml 0,9% NaCl) appliziert. Nach einer Wartezeit von 10 Minuten erfolgte die zweite bronchoalveoläre Lavage (BAL) mit ebenfalls 100 ml im 8er Segment des rechten Unterlappens. Der Proband blieb danach noch etwa zwei Stunden zur Überwachung in der Klinik.

Drei Tage später, nach 72 Stunden, erfolgten die zweite Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage sowie eine erneute venöse Blutentnahme. Hierbei wurden wiederum die mit NaCl und Allergen provozierten Segmente der Lingula links(S4 oder S5) und des Mittellappens rechts (S4 oder S5) mit jeweils fünfmal 20 ml 0,9% NaCl-Lösung gespült.

Die Lavage-Flüssigkeit wurde jeweils sofort auf Eis gelagert und sogleich weiter verarbeitet.

Die Probanden wurden nach erneuter Erholungs- und Beobachtungszeit von etwa 2 Stunden aus der Rostocker Universitätsklinik entlassen.

3.2.5. Aufarbeitung der BAL

Die BAL wurde unter der Sterilbank zunächst mittels Filtrierung von Schleim und größeren Partikeln gereinigt und dabei in 50 ml Tubes überführt. 5 ml der Lavage-Flüssigkeit wurden zur Vorbereitung für die Erstellung eines Präparates zur Differentialzellzytologie in ein 15 ml Tube überführt und mit 1 Tropfen Albumin versetzt.

Darauf folgte eine erste Zentrifugation der Tubes bei 380 g für 10 Minuten bei 20°C. Die Überstände wurden jeweils in 2 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

Das Zellpellet wurde in 35 ml Waschpuffer resuspendiert und erneut 10 Minuten bei 380 g bei 20°C zentrifugiert. Der dabei erhaltene Überstand wurde verworfen und dieser Waschschrift wiederholt.

Das hierbei erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml Waschpuffer resuspendiert und zur Zellzählung vorbereitet.

3.2.6. Auszählung der Zellen

Nach der Aufnahme des Pellet in Waschpuffer wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Türk-Lösung für etwa 10 Minuten inkubiert und angefärbt.

Die Auszählung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Dabei entspricht ein großes Feld einer Zellzahl von $10E4$ Zellen. Ausgezählt wurden 4 große Felder. Berechnung der Zellzahl: gezählte Zellen: $4 \times 10E4 \times 10$ (=Verdünnung Türk-Lösung) [ml].

3.2.7. Herstellung des Präparates zur Differentialzytologie

Der mit Albumin versetzten BAL-Flüssigkeit wurde 1 ml PBS zugefügt. Die Zellen wurden auf einen Objektträger sedimentiert (i.d.R. 1-3 ml, abhängig vom Trübungsgrad der BAL), der zum Trocknen beiseite gelegt wurde. Nachdem das Präparat vollständig getrocknet war, wurden die Zellen mit Methanol fixiert und danach zunächst mit Eosin-Lösung etwa 3 Sekunden; danach mit Giemsa-Lösung

etwa 6 Sekunden gefärbt. Rückstände der Färbemittel wurden mittels einer Pufferlösung entfernt.

Unter dem Mikroskop wurde das Präparat unter Nutzung des 100er-Objektivs unter Verwendung von Immersionsöl betrachtet; dabei wurden 500 Zellen, differenziert nach Makrophagen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten, ausgezählt.

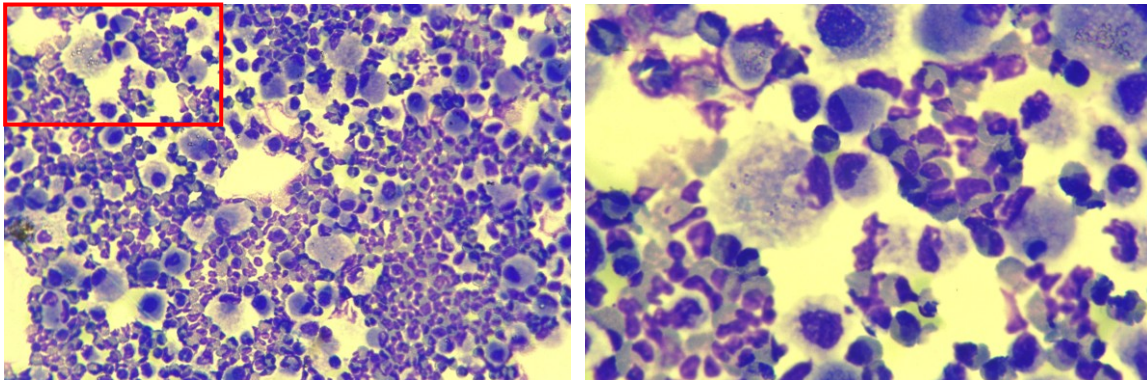


Abbildung 3.1: Differentialzytologie der BAL nach Allergenprovokation
Links 10-fache Vergrößerung, rechts Bildausschnitt mit 40-facher Vergrößerung.
Dargestellt sind neutrophile und eosinophile Granulozyten, Lymphozyten sowie Makrophagen.

3.2.8. Aufarbeitung des Blutes

Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das EDTA-Vollblut im Kühlschrank gelagert.

Um die für die Messungen nicht benötigten Erythrozyten zu lysieren, wurden 2 ml des Blutes mit 6 ml FACS Lysing Solution (diese war zuvor mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt worden) versetzt, aufgeschüttelt und für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Blut bei 380 g für 5 Minuten bei 20°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Diesem Schritt folgte ein Waschschriff, um die lysierten Erythrozyten zu entfernen. Zu diesem Zweck wurden dem Blut 6 ml Waschpuffer beigefügt, das Gemisch gut aufsuspendiert und erneut bei 380 g für 5 Minuten bei 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls verworfen.

3.2.9. Antikörpermarkierung der Zellen

Zunächst wurden die vorbereiteten Blutzellen in 1,0 ml Waschpuffer und die vorbereiteten Zellen aus der BAL-Flüssigkeit (i.d.R. 1×10^5 bis 2×10^6) in 0,4 ml Waschpuffer aufgenommen und gut resuspendiert. Daraufhin wurden jeweils 20 μ l der Zellsuspension in kleine FACS-Röhrchen pipettiert. Im nächsten Arbeitsschritt wurden jeweils 10 μ l der direkt markierten bzw. bei Ansatz 15 und 16 10 μ l der indirekt markierten Antikörper beigefügt, bei etwa 300 g kurz abzentrifugiert und anschließend gut gewirrt. Danach erfolgte eine 30minütige Inkubation bei Raumtemperatur an lichtgeschützter Stelle.

Nach der Inkubation wurden durch Zugabe von jeweils 200 μ l Waschpuffer und darauf folgende Zentrifugation bei 380 g für 5 Minuten bei 20°C überschüssige Antikörperreste entfernt und der Überstand abgesaugt. Dieser Schritt wurde wiederholt. Auf das verbleibende Zellpellet wurden 150 μ l PBS gegeben, die Zellen gründlich aufsuspendiert und danach sofort im Durchflusszytometer analysiert.

Da die Ansätze 15 und 16 nur indirekt markierte Antikörper enthielten, mussten diese in einem zweiten Schritt mit direkt markierten Antikörpern konjugiert werden. Dies erfolgte nach demselben Schema wie die weiter oben beschriebene Vorgehensweise der Konjugation mit Antikörpern. Anschließend wurde mit den Ansätzen in der gleichen Weise verfahren wie oben bereits beschrieben.

Tabelle 3.3: Antikörperkombinationen

Zusammenstellung der Antikörperkombinationen und der Verdünnungen mit Waschpuffer für die Markierung von Oberflächenmolekülen auf Leukozyten

Nr.	1.Antikörper FITC	Ver- dünnung	2.Antikörper PE	Ver- dünnung	3.Antikörper PE-Cy5/TC	Ver- dünnung	4.Antikörper unmarkiert	Verdü- nung
1	IgM	1:20	IgG1	1:20	IgG1	1:50		
2	CD57	1:10	CD4	1:50	CD3	1:50		
3	CD57	1:10	CD8	1:50	CD3	1:50		
4	CD57	1:10	CD16/56	1:50	CD3	1:50		
5	CD57	1:10	CD19	1:50	CD3	1:50		
6	CD14	1:10	IgG2a	1:20	CD16	1:10		
7	CD14	1:10	CD69	1:2	CD16	1:10		
8	CD14	1:10	IgG1	1:20	CD16	1:10		
9	CD14	1:10	CD66acde	1:2	CD16	1:10		
10	CD14	1:10	CDw125	1:5	CD16	1:10		
11	IgG2a	1:20	CD16	1:20				
12	CD49f	1:2	CD16	1:20				
13	IgG1	1:20	CD16	1:20				
14	CD66b	1:2	CD16	1:20				
15	Anti-Maus IgG	1:20					Maus-IgG	1:70
16	Anti-Maus IgG	1:20					IL-13R Klon 1E7	1:70

3.2.10. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, die es ermöglicht, Zellen auf der Grundlage von Größe, Granularität, Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften zu analysieren. Zur Messung werden die Zellen einzeln durch eine Glaskapillare an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Für diese Arbeit wurde das FACSCalibur-Durchflusszytometer von Becton-Dickinson verwendet, welches mit einem Argonlaser der Wellenlänge 488nm ausgestattet ist.

Die Absorption des Lichtes in Richtung des Laserstrahles (FSC: forward scatter) gibt Auskunft über die Zellgröße. Als Seitwärtsstreuung (SSC: side scatter) wird die Streuung des Lichtes im rechten Winkel zum Laserstrahl bezeichnet. Diese ist ein Maß für die Granularität der Zelle. Des Weiteren können bis zu drei verschiedene Fluoreszenzen gleichzeitig gemessen und mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper Zelloberflächenantigene nachgewiesen werden. Die Antikörper sind markiert mit folgenden Fluoreszenzfarbstoffen:

- Fluoresceinisothiocyanat (FITC; grün; Wellenlänge 503 nm)
- Phycoerythrin (PE; orange-rot; 585 nm)
- Phycoerythrin-Cyanin-5 (Cy5/RPE; 670 nm)

Die Daten werden mittels der angeschlossenen Software verarbeitet und gespeichert, so dass sie zur späteren Auswertung zur Verfügung stehen.

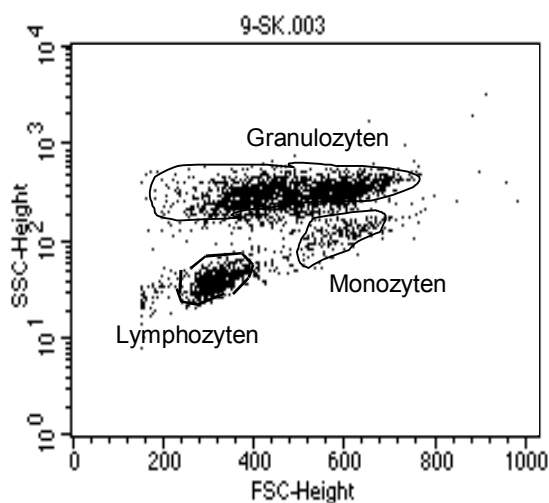


Abbildung 3.2: Lage der Leukozytenpopulationen im FSC-SSC-Dotplot
Dargestellt ist die Position der einzelnen Leukozytenpopulationen aus dem peripheren Blut im FSC-SSC-Diagramm.

3.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS für Windows. Werte sind als Median und Spannweite [Minimum - Maximum] angegeben. Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Test (abhängige Stichproben) ermittelt, wobei Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p < 0,05$ als signifikant gewertet wurden.

4. Resultate

Im folgenden Kapitel werden die Untersuchungsergebnisse für die Zellen aus bronchoalveolärer Lavage (BAL) und Blut beschrieben.

Die BAL-Zellen wurden 10 min und 72 h nach Allergen- bzw. NaCl-Provokation untersucht, während die Zellen aus dem Blut vor und 72 h nach Allergenprovokation isoliert und analysiert wurden. Es erfolgte eine durchflusszytometrische Untersuchung der Gesamtzellzahl, der Zellverteilung sowie der Expression von Oberflächenmolekülen.

Folgende Bezeichnungen werden für die aus der BAL und dem Blut gewonnenen Proben verwendet:

- K-10 min BAL, 10 min nach segmentaler NaCl-Instillation
- K-72 h BAL, 72 h nach segmentaler NaCl-Instillation
- P-10 min BAL, 10 min nach segmentaler Allergenprovokation
- P-72 h BAL, 72 h nach segmentaler Allergenprovokation
- Blut-10 min Blutentnahme vor segmentaler Allergenprovokation
- Blut-72 h Blutentnahme 72 h nach segmentaler Allergenprovokation

4.1. Differentialzytologie der Leukozyten aus BAL und Blut

4.1.1. BAL-Flüssigkeit

Von 100 ml instillierter 0,9%iger NaCl-Lösung betrug die zurück gewonnene Menge (BAL-Recovery) 10 min nach Provokation aus dem NaCl-provozierten Segment $66,8 \pm 3,7$ ml, aus dem allergenprovozierten Segment $60,6 \pm 4,0$ ml. 72 h nach Provokation konnten aus dem NaCl-provozierten Segment $69,6 \pm 3,2$ ml und aus dem allergenprovozierten Segment $64,3 \pm 5,1$ ml zurück gewonnen werden. Die hier gewonnenen, nahezu unveränderten Recovery-Werte decken sich mit aus der Literatur ermittelten Erfahrungswerten (47).

4.1.2. Zellverteilung in der BAL

Zwischen den NaCl- und allergenprovozierten Segmenten bestand nach 10 min hinsichtlich der Zellzahl und Zellverteilung im Mittel kein Unterschied. Jedoch schwankten die Werte im Vergleich der Probanden untereinander sowie bei jedem einzelnen Probanden hinsichtlich der NaCl-Provokation und der Allergenprovokation relativ stark. Die Gesamtzellzahl betrug 10 min nach NaCl-Provokation 70,54 [41,33–180,0] $\times 10^3/\text{ml}$ und auf der allergenprovozierten Lungenseite 70,54 [20,46–245,65] $\times 10^3/\text{ml}$. 72 h später zeigte sie sich im NaCl-provozierten Segment leicht erhöht mit 98,8 [55,63–368,57] $\times 10^3/\text{ml}$, im allergenprovozierten Segment gut verdreifacht mit 250,0 [125,83–4240,63] $\times 10^3/\text{ml}$ (P2 gegen P1: $p = 0,012$; P2 gegen K1: $p = 0,012$; P2 gegen K2: $p = 0,012$).

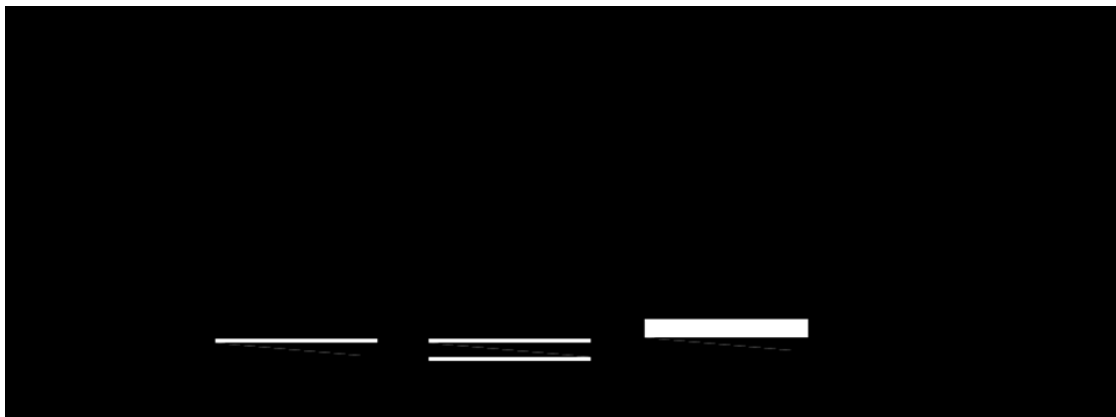


Abbildung 4.1: Gesamtzellzahlen in der BAL

Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Zellzahlen in der BAL 10 Minuten und 72 Stunden nach NaCl- bzw. Allergeninstillation. Die Zellzahlen sind in [$\times 10^3/\text{ml}$] zurückgewonnener BAL-Flüssigkeit angegeben. GZz = Gesamtzellzahlen; $n = 8$; * $p = 0,012$

Diese Veränderungen ließen sich vor allem auf die Zunahme der eosinophilen Granulozyten 72 h nach Allergenprovokation zurückführen: K-10 min: 0,0 [0 -1,81] $\times 10^3/\text{ml}$; P-10 min: 0,0 [0-3,19] $\times 10^3/\text{ml}$; K-72 h: 1,1 [0-11,75] $\times 10^3/\text{ml}$; P-72 h: 74,25 [0-2714,0] $\times 10^3/\text{ml}$ (P2 gegen P1: $p = 0,018$; P2 gegen K1: $p = 0,018$; P2 gegen K2: $p = 0,018$).

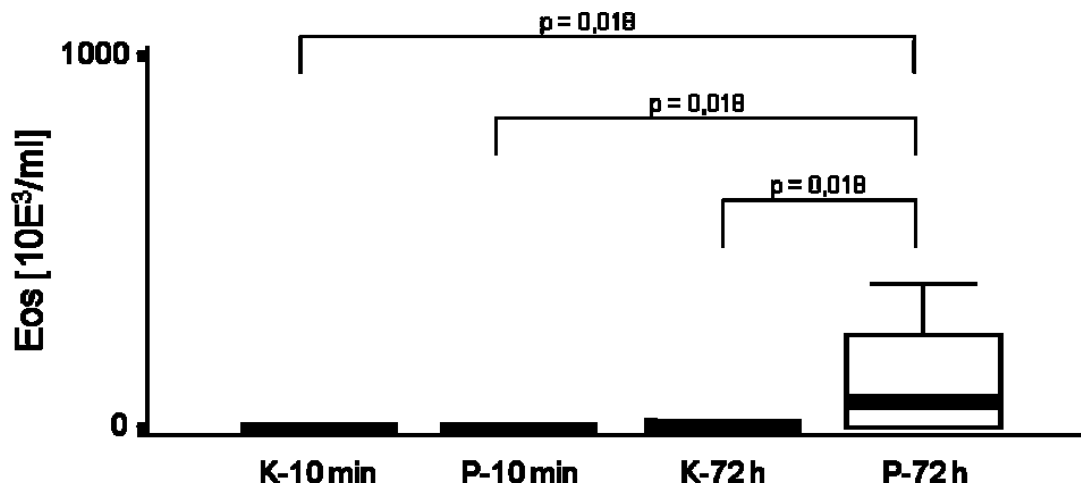


Abbildung 4.2: Eosinophile Granulozyten in der BAL

Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der eosinophilen Granulozyten in der BAL 10 Minuten und 72 Stunden nach NaCl- bzw. Allergeninstillation. Die Zellzahlen sind in $[x10^3/ml]$ zurückgewonnener BAL-Flüssigkeit angegeben. Eos = eosinophile Granulozyten; n = 8

Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten zeigte nach NaCl-Instillation einen sechsfachen, nach Allergenprovokation einen 30-fachen Anstieg: K-10 min: $0,34 [0-1,51] \times 10^3/ml$; P-10 min: $0,20 [0-2,87] \times 10^3/ml$; K-72 h: $1,84 [0,37-37,86] \times 10^3/ml$; P-72 h: $6,32 [0,66-76,25] \times 10^3/ml$ (P2 gegen K1: $p = 0,012$; P2 gegen P1: $p = 0,012$; P2 gegen K2: $p = 0,017$).

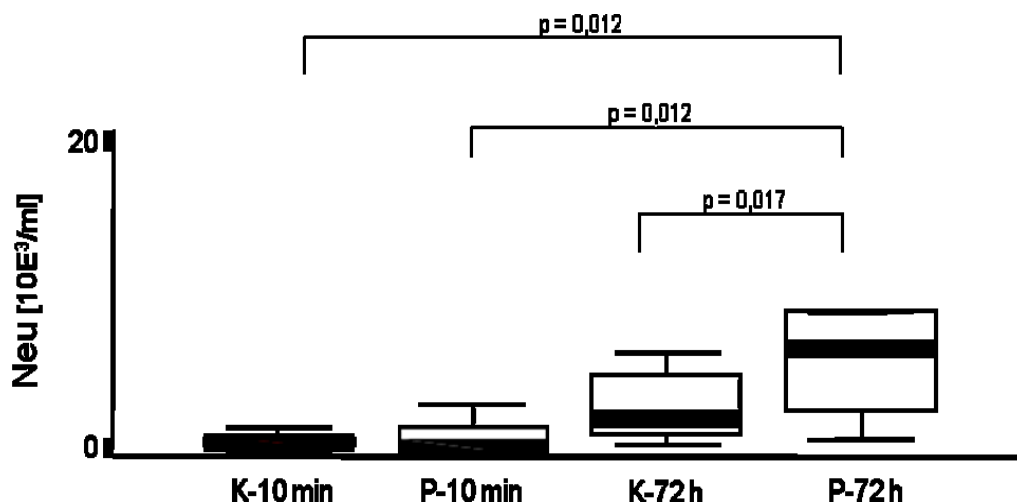


Abbildung 4.3: Neutrophile Granulozyten in der BAL

Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der neutrophilen Granulozyten in der BAL 10 Minuten und 72 Stunden nach NaCl- bzw. Allergeninstillation. Die Zellzahlen sind in $[x10^3/ml]$ zurückgewonnener BAL-Flüssigkeit angegeben. Neu = neutrophile Granulozyten; n = 8

Bei den Makrophagen zeigte sich eine zweifache Zunahme in der NaCl-provozierten Lungenseite von K-10 min: $70,59 [48,55-170,46] \times 10^3/ml$ auf K-72 min: $120,62 [62,91-457,0] \times 10^3/ml$ bei etwa vierfacher Erhöhung in der allergenprovozierten Lungenseite P-10 min : $85,32 [19,56-232,63] \times 10^3/ml$ auf P-72 h: $234,29 [74,65-$

1289,13] x 10³/ml (P2 gegen P1: p = 0,017; P2 gegen K1: p = 0,012; P2 gegen K2: = 0,012).

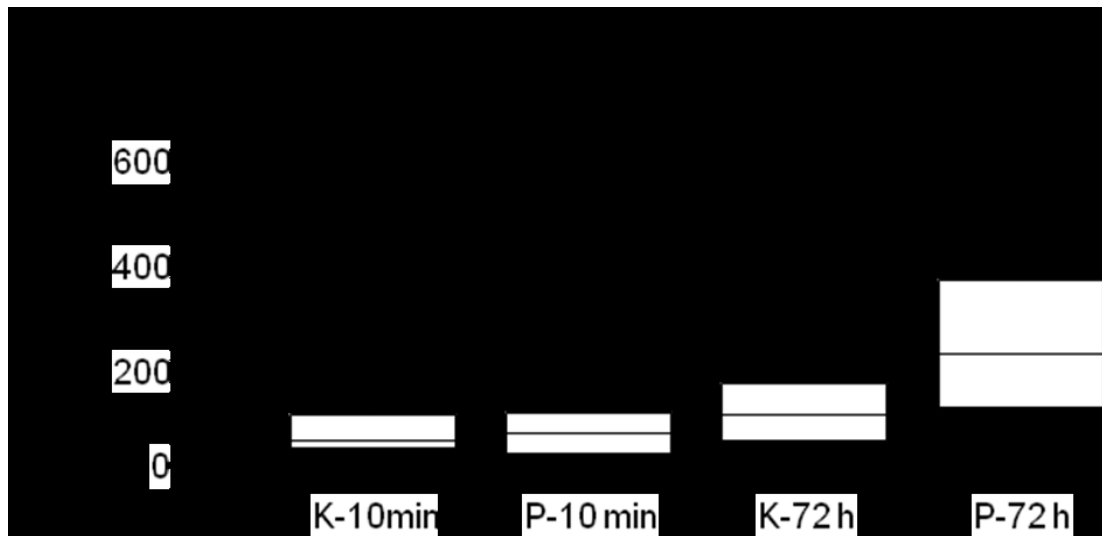


Abbildung 4.4: Makrophagen in der BAL

Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Makrophagen in der BAL 10 Minuten und 72 Stunden nach NaCl- bzw. Allergeninstillation. Die Zellzahlen sind in [x10³/ml] zurückgewonnener BAL-Flüssigkeit angegeben. Makros = Makrophagen; n = 8

Die Lymphozyten zeigten keinen Anstieg nach NaCl-Instillation: K-10 min: 6,16 [1,07-9,58] x 10³/ml; K-72 h: 8,28 [3,13-25,29] x 10³/ml, während sie sich nach Allergenprovokation annähernd vervierfachen: P-10 min: 3,22 [0,9-9,09] x 10³/ml; P-72 h: 14,80 [8,5-161,13] x 10³/ml (P2 gegen P1: p = 0,012; P2 gegen K1: p = 0,017; P2 gegen K2: p = 0,036).

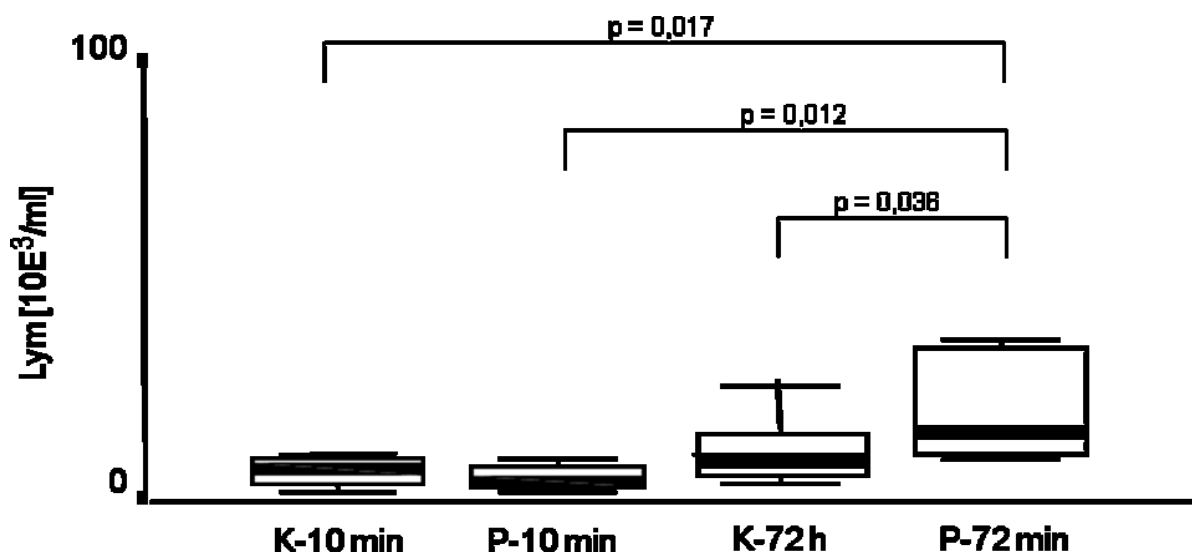


Abbildung 4.5: Lymphozyten in der BAL

Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Lymphozyten in der BAL 10 Minuten und 72 Stunden nach NaCl- bzw. Allergeninstillation. Die Zellzahlen sind in [x10³/ml] zurückgewonnener BAL-Flüssigkeit angegeben. Lym = Lymphozyten; n = 8

4.1.3. Differentialzytologie des Blutes

Die Gesamtleukozytenzahl im Blut zeigte keine Veränderung nach Allergenprovokation: Blut-10 min: 7,95 [4,87-11,3] $\times 10^6/\mu\text{l}$; Blut-72 h: 6,61 [5,04-10,2] $\times 10^6/\mu\text{l}$ ($p = \text{n.s.}$). Zu beobachten war eine Abnahme der neutrophilen Granulozyten: Blut-10 min: 5,1 [2,06-7,91] $\times 10^6/\mu\text{l}$ auf Blut-72 h: 3,03 [2,05-5,83] $\times 10^6/\mu\text{l}$ ($p = 0,012$). Die Anzahl der Monozyten, Lymphozyten und Basophilen blieb im Wesentlichen konstant: Monozyten Blut-10 min: 0,55 [0,24-0,79] $\times 10^6/\text{ml}$ auf Blut-72 h: 0,43 [0,27-0,78] $\times 10^6/\mu\text{l}$ ($p = \text{n.s.}$), Lymphozyten Blut-10 min: 2,32 [1,16-2,60] $\times 10^6/\mu\text{l}$ auf Blut-72 h: 2,03 [1,69-2,59] $\times 10^6/\mu\text{l}$ ($p = \text{n.s.}$), Basophile Blut-10 min: 0,4 [0,2-2,0] $\times 10^6/\mu\text{l}$ vor und Blut-72 h: 0,65 [0,2-0,94] $\times 10^6/\mu\text{l}$ 72 h nach SAP ($p = \text{n.s.}$). Lediglich die Zahl der Eosinophilen zeigte einen deutlichen Anstieg von Blut-10min: 3,77 [1,4-6,0] $\times 10^6/\mu\text{l}$ auf Blut-72 h: 8,1 [1,5-12,5] $\times 10^6/\mu\text{l}$ ($p = 0,012$) nach 72 Stunden.

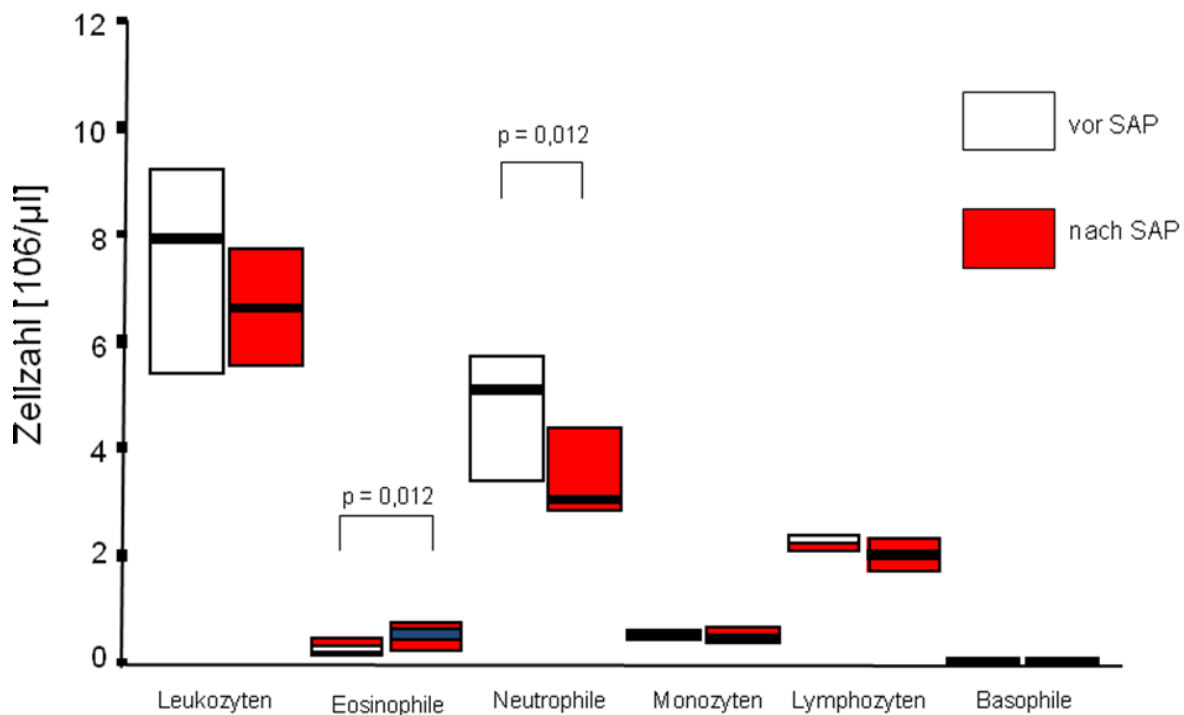


Abbildung 4.6: Differentialzytologie des Blutes

Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Gesamt-Leukozytenzahlen im Blut und des Differentialblutbildes vor und 72 Stunden nach Allergenprovokation, angegeben in [$\times 10^6/\mu\text{l}$]; SAP = segmentale Allergenprovokation; $n = 8$.

4.2. Expression von Oberflächenmolekülen auf Leukozyten

Leukozyten aus dem peripheren Blut und der BAL wurden mit Antikörpern gegen CD49f, CD66acde, CD69, CDw125 und CD66B direkt markiert und durchflusszytometrisch untersucht. Ebenso wurden Leukozyten mit IL13RA-Antikörpern indirekt markiert und nachfolgend durchflusszytometrisch gemessen.

4.2.1. CD49f-Expression

Die CD49f-Expression auf eosinophilen Granulozyten zeigte sich nach 72 Stunden im provozierten Segment wesentlich stärker ausgeprägt als in den Kontrollsegmenten: K-10 min: 140,72 [0-683,43] [SMF]; K-72 h: 115,15 [0-427,21] [SMF]; P-10 min: 100,41 [0-300,95] [SMF]; P-72 h: 375,70 [0-1136,83] [SMF] (P-72 h gegen P-10 min: $p = 0,025$; P-72 h gegen K-10 min: $p = 0,05$; P-72 h gegen K-72 h: $p = 0,036$).

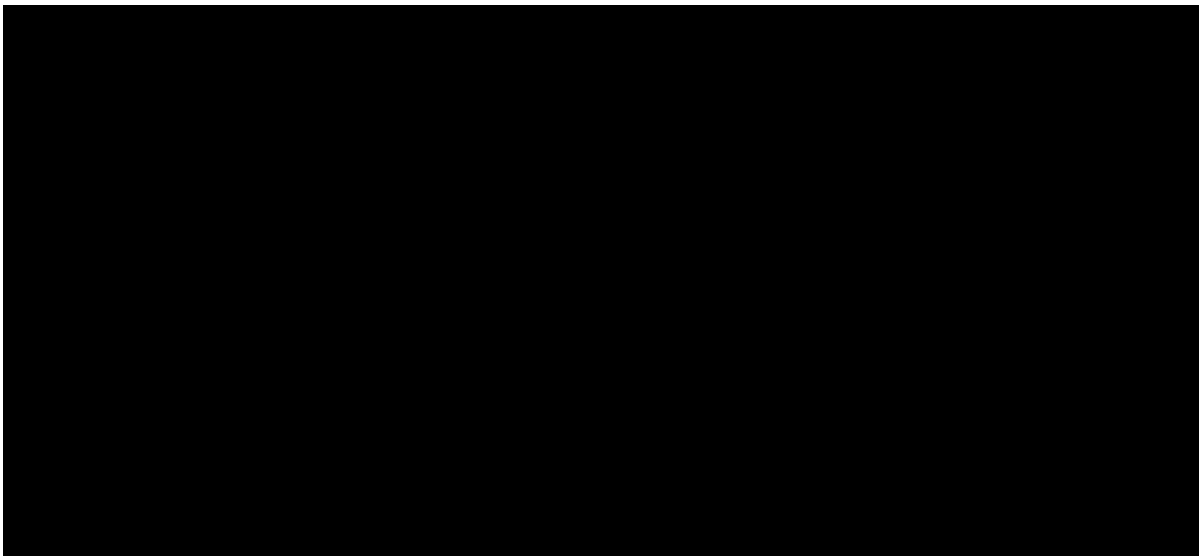


Abbildung 4.7: CD49f-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus der BAL
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD49f auf eosinophilen Granulozyten $n = 8$.

Im Blut kam es 72 Stunden nach Allergenprovokation zu einem deutlichen Abfall der CD49f tragenden Eosinophilen: Blut-10 min: 1641,42 [289,47-3360,69] [SMF]; Blut-72 h: 783,13 [0-1752,56] [SMF] ($p = n.s.$).

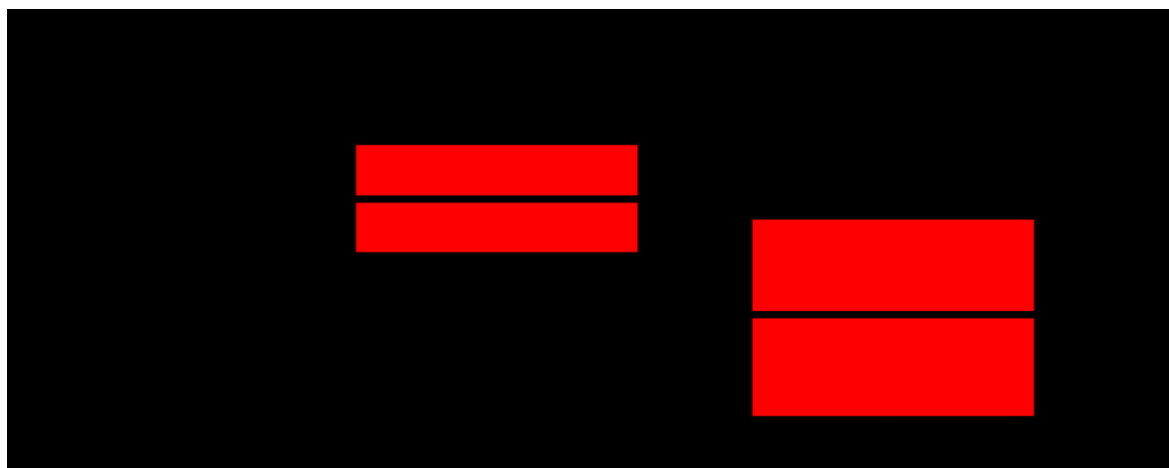


Abbildung 4.8: CD49f-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus dem Blut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD49f auf eosinophilen Granulozyten; $n = 8$.

Auf neutrophilen Granulozyten aus der BAL fand sich sowohl 72 h nach NaCl-Instillation wie auch 72 h nach Allergenprovokation eine erhöhte Expression von CD49f im Vergleich zu der BAL nach 10 min: K-10 min: 148,21 [0-1183,02] [SMF]; K-72 h: 624,61 [0-1427,19] [SMF], P-10 min: 248,23 [0-788,98] [SMF]; P-72 h: 524,79 [0-942,44] [SMF] ($p = n.s.$).

Die CD49f-Expression auf Neutrophilen des Blutes war vor Provokation deutlich höher als in der BAL und fiel dann nach Provokation ab: Blut-10 min: 796,91 [272,55-1207,57] [SMF]; Blut-72 h: 410,98 [0-1286,68] [SMF] ($p = n.s.$).

Makrophagen aus der BAL wiesen keine signifikante Erhöhung der CD49f-Expression nach 72 h sowohl auf der NaCl-instillierten als auch auf der allergenprovozierten Seite auf: K-10 min: 130,10 [0-176,37] [SMF]; K-72 h: 148,95 [0-188,71] [SMF]; P-10 min: 121,98 [0-196,76] [SMF]; P-72 h: 141,24 [0-193,25] [SMF] ($p = n.s.$ – keine Abbildung).

Die CD49f-Expression auf Blutmonozyten zeigte nach 72h einen Abfall um annähernd ein Drittel des Wertes vor Allergenprovokation: Blut-10 min: 75,38 [24,37-167,08] [SMF]; Blut-72 h: 49,49 [0-111,81] [SMF] ($p = n.s.$ – keine Abbildung).

Die bei Lymphozyten aus der BAL gemessenen Werte der Expression von CD49f zeigten keine verwertbaren Ergebnisse. Die Zahl der CD49f-tragenden Lymphozyten des peripheren Blutes änderte sich nicht wesentlich: Blut-10 min: 21,13 [2,54-68,29] [SMF]; Blut-72 h: 18,05 [0-58,45] [SMF] ($p = \text{n.s.}$ – keine Abbildung).

4.2.2. CD66acde-Expression

Die Expression von CD66acde auf eosinophilen Granulozyten war 10 Minuten nach Provokation in allergenprovozierten und in nicht provozierten Segmenten annähernd gleich: K-10 min: 56,3 [0-109,1] [SMF]; P-10 min: 50,65 [0-126,66] [SMF]. Nach 72 Stunden war im allergenprovozierten Segment ein deutlicher Anstieg auf über das Zweifache messbar, während die Expression in den NaCl-gespülten Segmenten nahezu unverändert blieb: K-72 h: 71,17 [0-195,48] [SMF]; P-72 h: 135,24 [0-389,74] [SMF] (P-72 h gegen P-10 min: $p = 0,025$; P-72 h gegen K-10 min: $p = 0,036$; P2 gegen K2: $p = 0,05$).

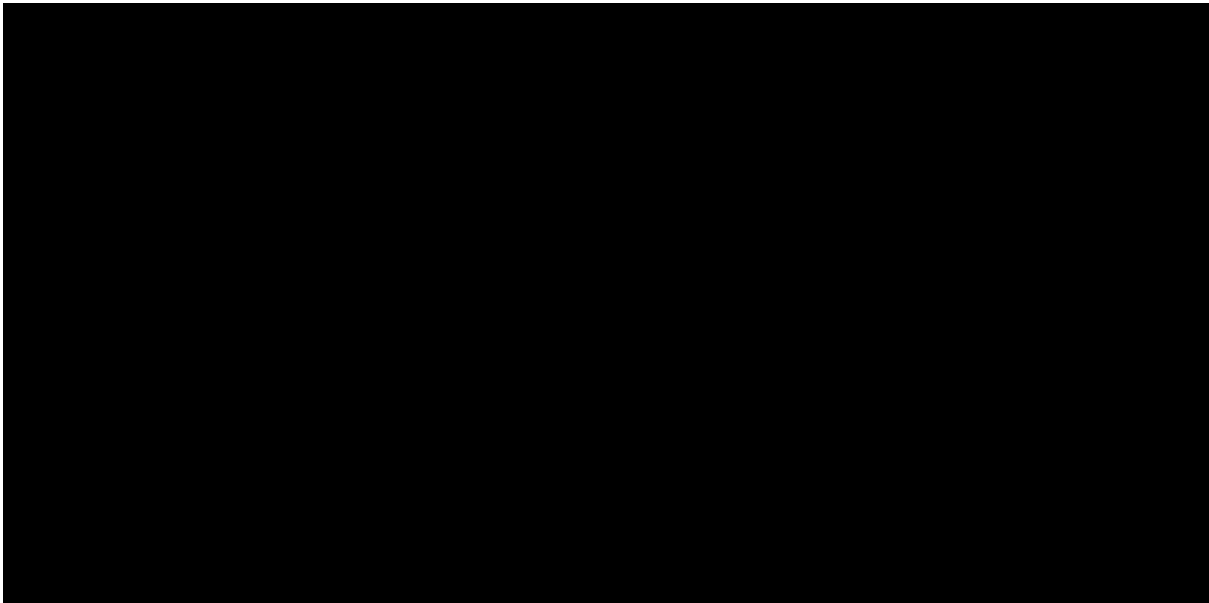


Abbildung 4.9: CD66acde-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus der BAL. Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD66acde auf eosinophilen Granulozyten; $n = 8$.

Annähernd gleiche Werte wie in der BAL 10 Minuten nach Provokation ergaben sich bei den eosinophilen Granulozyten des Blutes: Blut-10 min: 55,83 [20,11-77,65] [SMF]; Blut-72 h: 33,05 [0-142,29] [SMF] ($p = \text{n.s.}$).

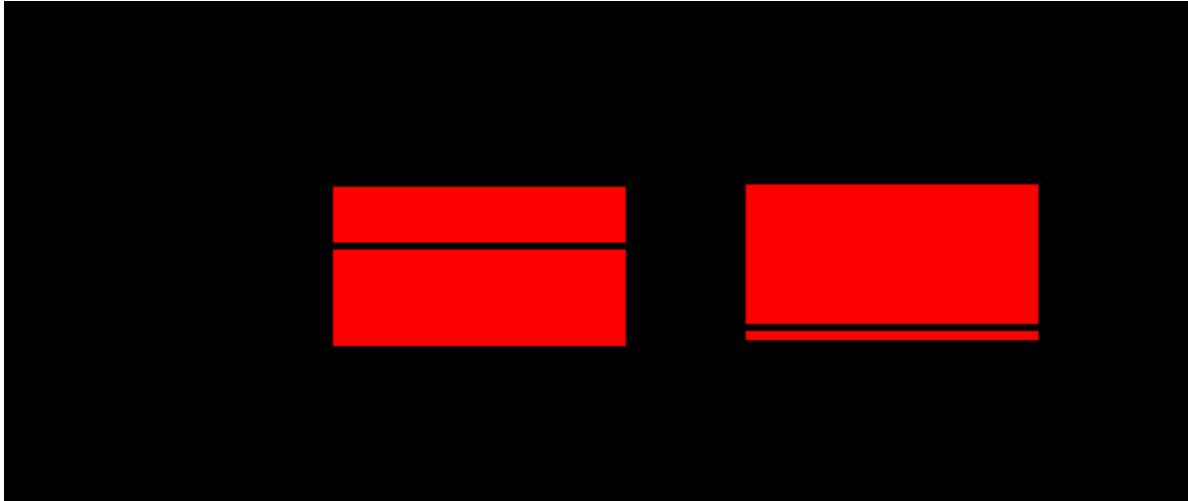


Abbildung 4.10: CD66acde-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus dem Blut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD66acde auf eosinophilen Granulozyten; n = 8; p = n.s.

Die Expression von CD66acde auf neutrophilen Granulozyten stieg sowohl im NaCl-instillierten, als auch im allergenprovozierten Segment leicht an: K-10 min: 288,94 [0-706,09] [SMF]; P-10 min: 203,63 [42,19-692,36] [SMF]; K-72 h: 478,60 [0-724,67] [SMF]; P-72 h: 315,77 [0-972,86] [SMF] (p = n.s.).

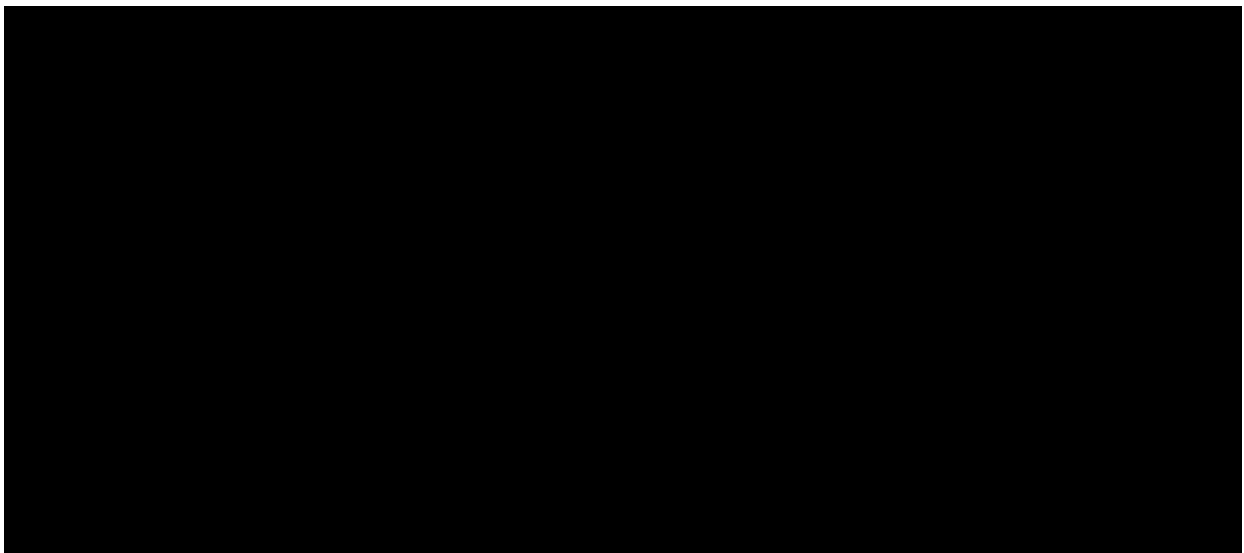


Abbildung 4.11: CD66acde-Expression auf neutrophilen Granulozyten aus der BAL
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD66acde auf neutrophilen Granulozyten; n = 8; p = n.s.

Auf den neutrophilen Granulozyten im Blut bewegte sich die Expression von CD66acde insgesamt auf niedrigerem Niveau als in der BAL, blieb jedoch nach 72

Stunden annähernd konstant: Blut-10 min: 173,78 [81,39-237,41] [SMF]; Blut-72 h: 148,40 [83,96-241,33] [SMF] ($p = n.s.$).

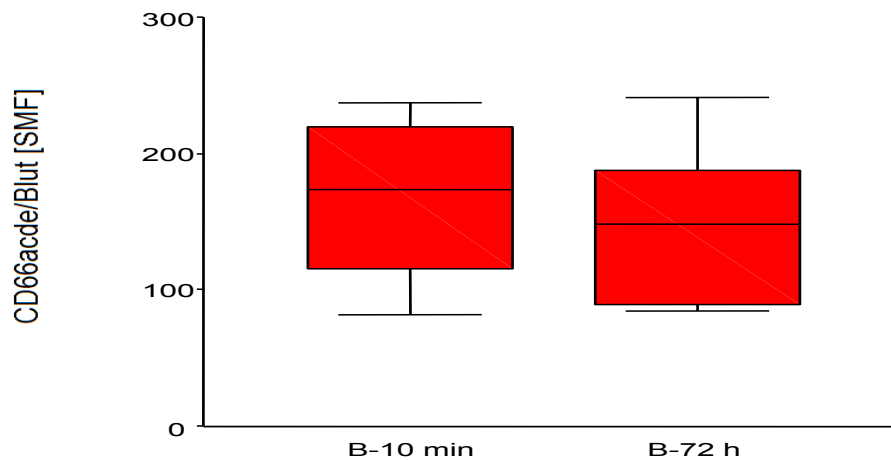


Abbildung 4.12: CD66acde-Expression auf neutrophilen Granulozyten aus dem Blut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD66acde auf neutrophilen Granulozyten; $n = 8$; $p = n.s.$

Die Expression von CD66acde auf Makrophagen der BAL lag 10 min nach NaCl- und Allergenprovokation auf etwa dem gleichen Niveau: K-10 min: 127,45 [0-265,88] [SMF]; P-10 min: 151,41 [0-249,5] [SMF]. 72h nach Provokation war im Kontrollsegment ein leichter Anstieg, im allergenprovozierten Segment keine wesentliche Veränderung zu beobachten: K-72 h: 172,95 [0-391,61] [SMF]; P-72 h: 142,28 [0-568,66] [SMF] ($p = n.s.$).

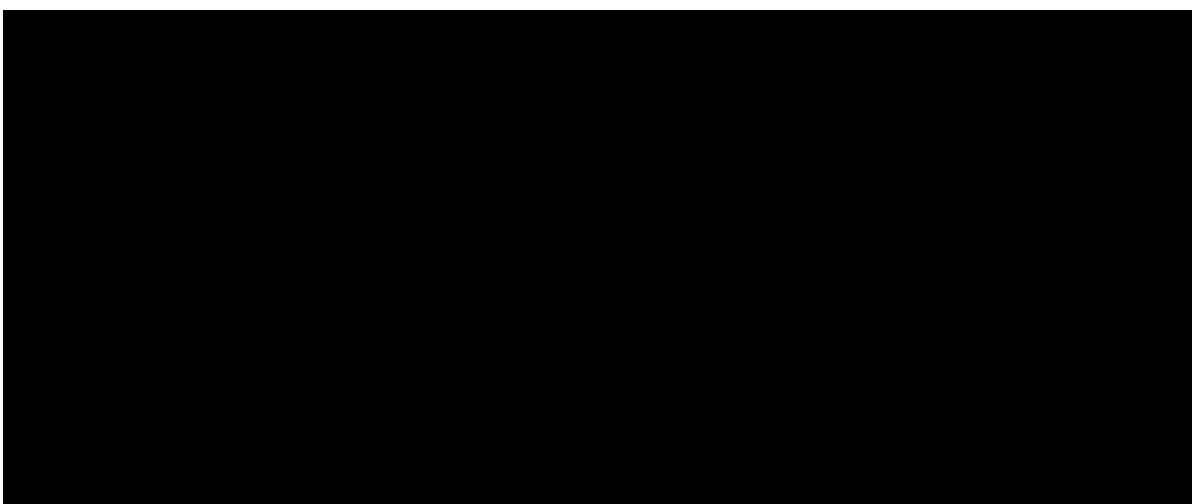


Abbildung 4.13: CD66acde-Expression auf Makrophagen aus der BAL
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD66acde auf Makrophagen; $n = 8$; $p = n.s.$

Die Blutmonozyten zeigten eine äußerst geringe Expression, nach Provokation trat keine signifikante Veränderung auf: Blut-10 min: 2,71 [0,72-7,11] [SMF]; Blut-72 h: 1,33 [0-6,85] [SMF] ($p = n.s.$).

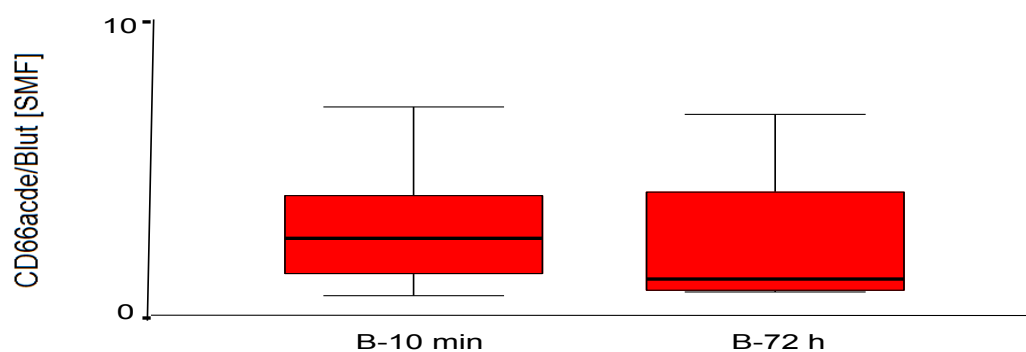


Abbildung 4.14: CD66acde-Expression auf Monozyten aus dem Blut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD66acde auf Monozyten; $n = 8$; $p = n.s.$

Auch für den Marker 66acde auf Lymphozyten konnten in der BAL keine verwertbaren Daten gewonnen werden. Die Expression auf den Lymphozyten des Blutes war nach 10 Minuten und nach 72 Stunden weitgehend gleich bleibend: Blut-10 min: 2,46 [1,18-5,08] [SMF]; Blut-72 h: 2,45 [0,55-4,84] [SMF].

4.2.3. CD66b-Expression

In der BAL war zehn Minuten nach Provokation zwischen NaCl-provozierten und allergenprovozierten Segmenten bezüglich der CD66b-Expression auf eosinophilen Granulozyten nur ein geringfügiger Unterschied nachzuweisen: K-10 min: 9,70 [1,48-59,04] [SMF]; P-10 min: 12,51 [2,83-54,30] [SMF]. 72 Stunden nach Provokation kam es im NaCl-provozierten Segment zu einem geringen und im allergenprovozierten Segment zu einem starken Anstieg der Expression: K-72 h: 14,99 [0-71,58] [SMF]; P-72 h: 102,12 [0-152,58] [SMF] (P-72 h gegen P-10 min: $p = 0,036$; P-72 h gegen K-10 min: $p = 0,017$; P-72 h gegen K-72: h $p = 0,012$).

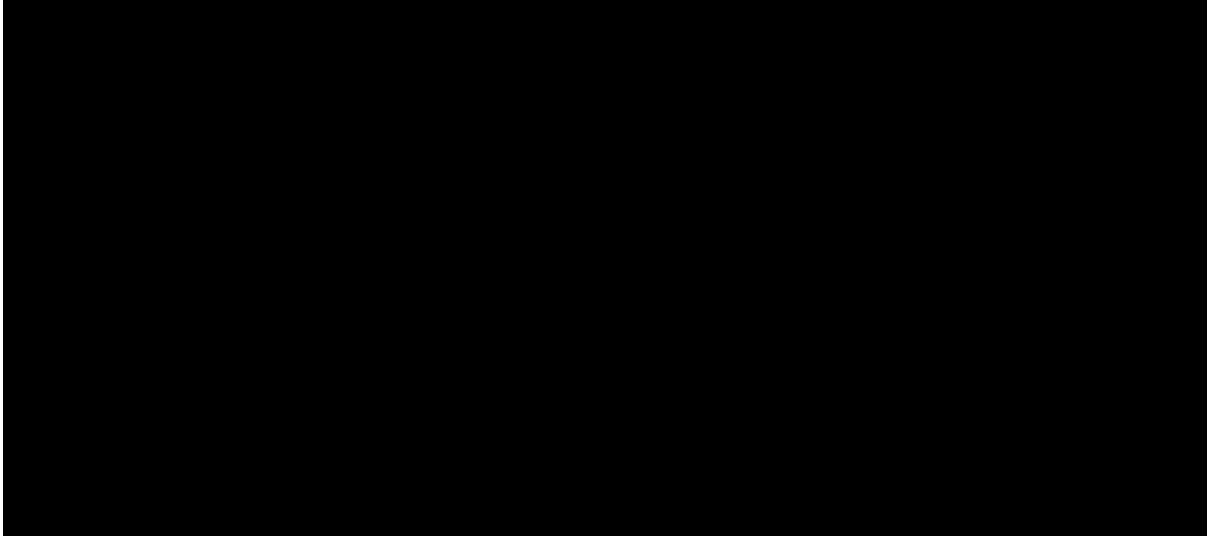


Abbildung 4.15: CD66b-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus der BAL
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD66b auf eosinophilen Granulozyten; n = 8; p = 0,012

Im Blut war ein Trend zum Abfall CD66b-tragender Eosinophilen 72 Stunden nach Allergenprovokation zu beobachten: Blut-10 min: 130,72 [71,46-265,45] [SMF]; Blut-72 h: 84,23 [0-169,42] [SMF] (p = 0,069).

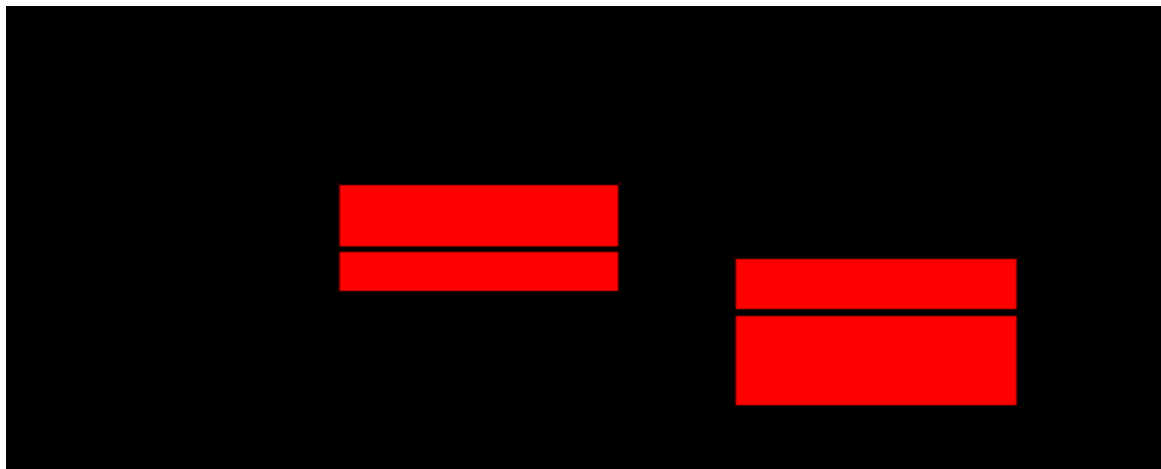


Abbildung 4.16: CD66b-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus dem Blut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD66b auf eosinophilen Granulozyten; n = 8.

Die Expression von CD66b auf neutrophilen Granulozyten ließ sich im allergenprovozierten Segment nach zehn Minuten stärker beobachten als im NaCl-provozierten Segment. 72 Stunden nach Provokation stieg die Provokation in beiden beobachteten Lungenteilen auf etwa das Doppelte an: K-10 min: 138,46 [0-484,02] [SMF]; P-10 min: 178,29 [0-361,24] [SMF]; K-72 h: 298,20 [0-530,52] [SMF]; P-72 h: 294,92 [0-429,75] [SMF] (p = n.s.).

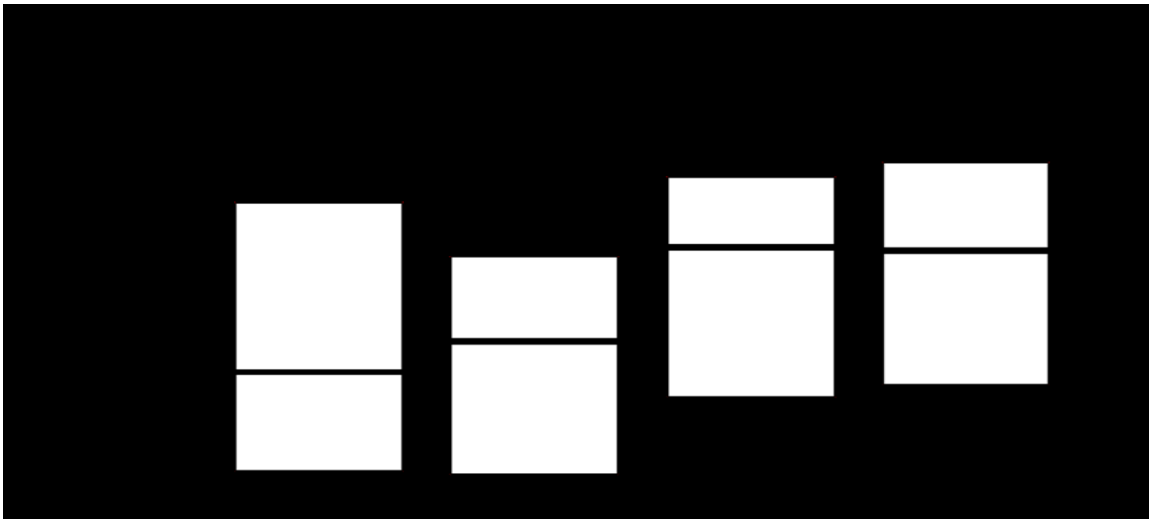


Abbildung 4.17: CD66b-Expression auf neutrophilen Granulozyten aus der BAL
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD66b auf neutrophilen Granulozyten; n = 8.

Im Blut kam es dagegen nach 72 Stunden zu einem Abfall CD66b-tragender Neutrophiler: Blut-10 min: 241,89 [145,44-763,10] [SMF]; Blut-72 h: 185,75 [0-349,19] [SMF] (p = 0,069).

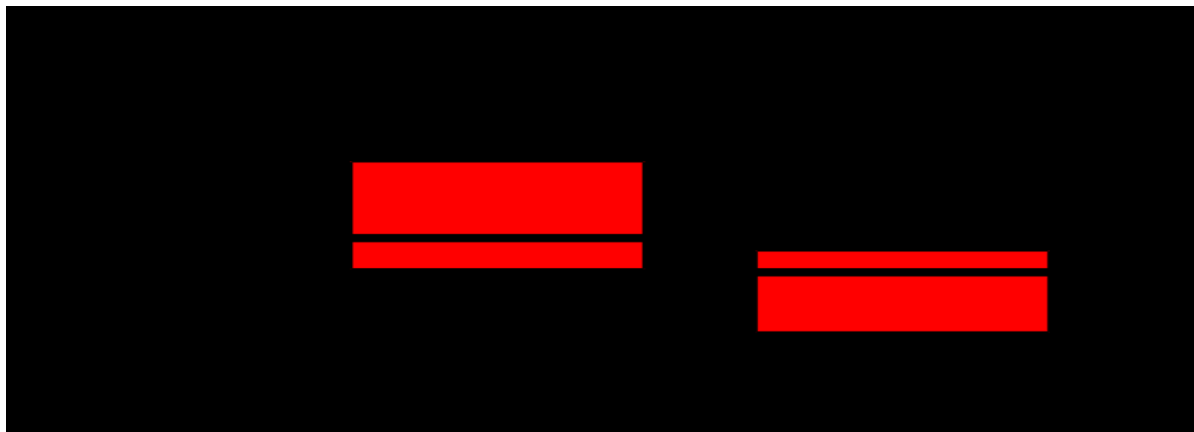


Abbildung 4.18: CD66b-Expression auf neutrophilen Granulozyten aus dem Blut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD66b auf neutrophilen Granulozyten; n = 8; p = n.s.

Auf den Makrophagen der BAL ließ sich sowohl im allergenprovozierten Segment, als auch im Kontrollsegment nach 72 Stunden keine Veränderung der Expression von CD66b nachweisen: K-10 min: 9,19 [0-25,19] [SMF] P-10 min: 10,82 [0-52,25] [SMF]; K-72 h: 11,99 [0-57,13] [SMF]; P-72 h: 11,45 [0-41,37] [SMF] (p= n.s.).

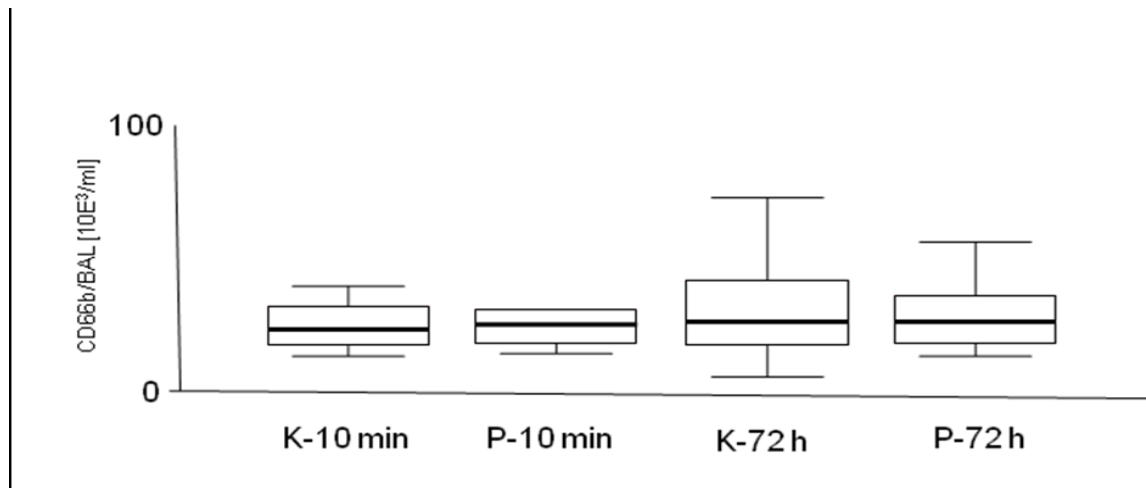


Abbildung 4.19: CD66b-Expression auf Makrophagen aus der BAL. Dargestellt sind die Mediane \pm und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD66b auf Makrophagen; $n = 8$; $p = n.s.$

Auch im Blut war die Expression auf Monozyten vor Provokation vergleichbar zur Expression nach Provokation: Blut-10 min: 2,34 [0,62-5,61] [SMF]; Blut-72 h: 1,28 [0-5,72] [SMF] ($p = n.s.$).

Bei den Blutlymphozyten kam es nach 72 Stunden ebenfalls zu keiner wesentlichen Veränderung der Expression: Blut-10 min: 0,44 [0,1-2,54] [SMF]; Blut-72 h: 0,33 [0-2,53] [SMF].

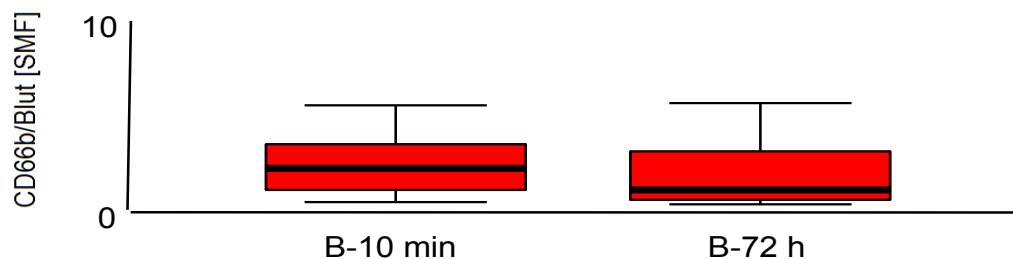


Abbildung 4.20: CD66b-Expression auf Monozyten aus dem Blut. Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD66b auf Monozyten; $n = 8$; $p = n.s.$

4.2.4. CD69-Expression

Die Expression von CD69 auf eosinophilen Granulozyten aus der BAL zeigte 10 min nach Provokation keine verwertbaren Ergebnisse: K-10 min: 0 [0-422,7] [SMF]; P-10 min 28,57 [0-529,88] [SMF]. Nach 72 h ließ sich jedoch ein deutlich höherer Wert der CD69-Expression im allergenprovozierten Segment gegenüber dem NaCl-instillierten

Segment nachweisen: K-72 h: 73,55 [0-801,47] [SMF]; P-72 h: 336,28 [0-1024,58] [SMF] ($p = n.s.$).

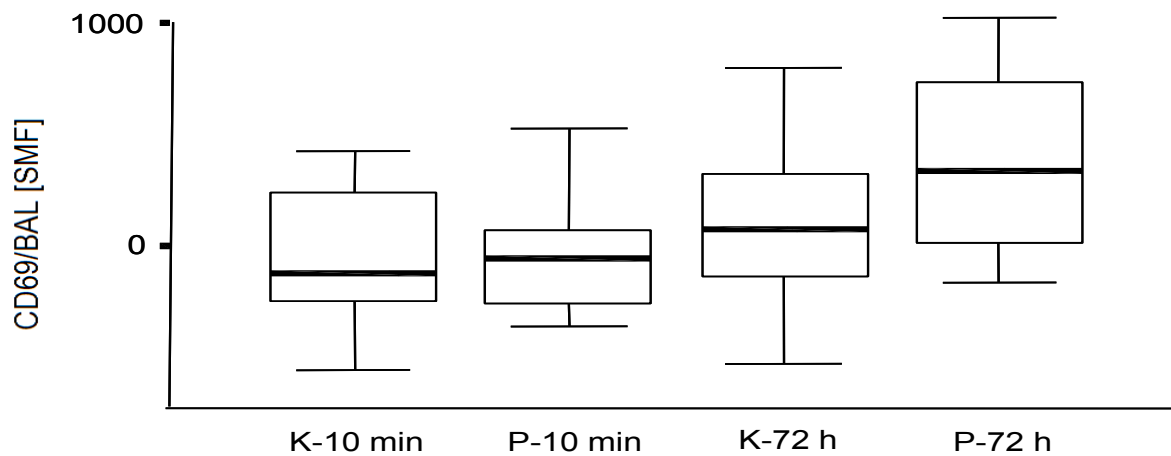


Abbildung 4.21: CD69-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus der BAL. Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD69 auf eosinophilen Granulozyten; $n = 8$; $p = n.s.$

Die CD69-Expression auf den Eosinophilen des Blutes war 72 h nach Allergenprovokation geringfügig höher als 10 min nach Provokation: Blut-10 min: 1,56 [0-8,26] [SMF]; Blut-72 h: 4,90 [0-20,08] [SMF] ($p = n.s.$).

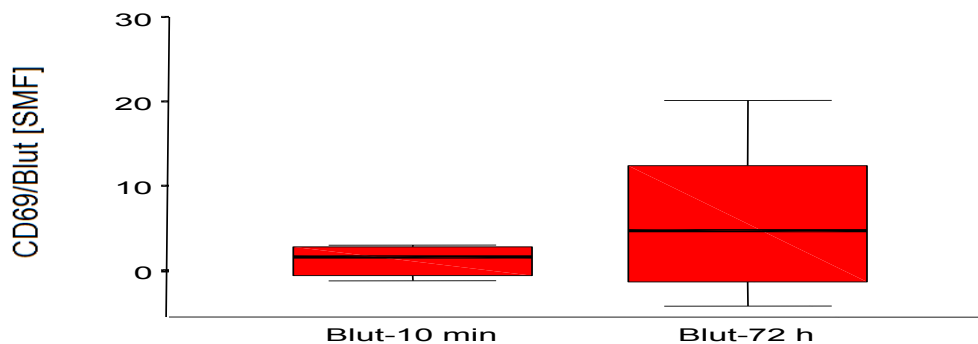


Abbildung 4.22: CD69-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus dem Blut. Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CD69 auf eosinophilen Granulozyten; $n = 8$; $p = n.s.$

Bezüglich der CD69-Expression auf neutrophilen Granulozyten aus der BAL fielen starke Schwankungen der einzelnen Werte auf. 10 min nach Provokation waren die Werte für NaCl-Provokation und Allergenprovokation bezüglich der Expression von CD69 auf Granulozyten annähernd gleich: K-10 min: 62,12 [4,02-173,04] [SMF]; P-10 min: 72,43 [0-126,86] [SMF] (K-10 min gegen P-10 min: $p = n.s.$). 72 h nach Provokation waren die Werte in allen beobachteten Lungenabschnitten annähernd gleich geblieben: K-72 h: 60,80 [10,16-307,25] [SMF]; P-72 h: 75,92 [46,42-312,69] [SMF] ($p = n.s.$ – keine Abbildung).

Die neutrophilen Granulozyten des Blutes zeigten ebenfalls nur einen minimalen Unterschied der CD69-Expression 10 min und 72 h nach Provokation: Blut-10 min: 1,51 [0-10,08] [SMF]; Blut-72 h: 1,77 [0-35,32] [SMF] (p = n.s. – keine Abbildung).

Die Makrophagen aus BAL und Blut zeigten keine verwertbaren Ergebnisse bezüglich der Expression von CD69.

Ebenso nicht verwertbar waren die Messungen der Expression von CD69 auf Lymphozyten des Blutes.

4.2.5. CDw125-Expression

Bei etwas höheren Ausgangswerten im nicht provozierten Segment im Vergleich zum allergenprovozierten Segment kam es 72 Stunden nach Allergenprovokation in allen Segmenten zu einem Abfall der CDw125-tragenden Eosinophilen; dabei war im allergenprovozierten Segment die Anzahl CDw125-tragender Eosinophiler signifikant niedriger als im NaCl-provozierten Segment: K-10 min: 113,86 [0-197,92] [SMF]; P-10 min: 73,40 [0-176,68] [SMF]; K-72 h: 99,74 [17,68-2221,61] [SMF]; P-72 h: 39,46 [0-76,58] [SMF] (K-72 h gegen P-72 h: p= 0,012).

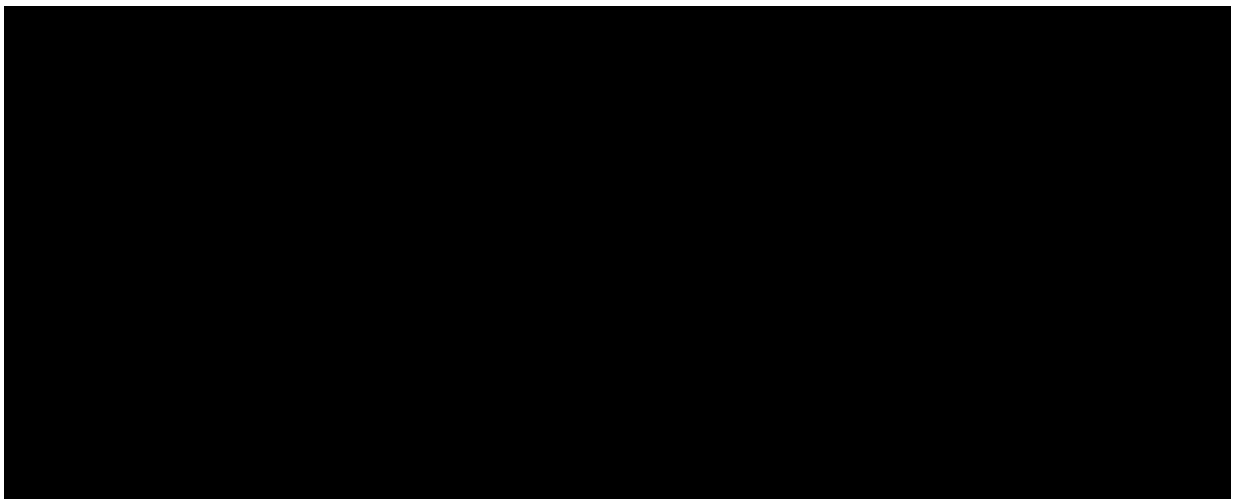


Abbildung 4.23: CDw125-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus der BAL
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CDw125 auf eosinophilen Granulozyten; n = 8.

Im Blut war keine Veränderung der CDw125-Expression auf Eosinophilen nachweisbar: Blut-10 min: 33,60 [18,59-45,24] [SMF]; Blut-72 h: 32,41 [2,34-143,16] [SMF] ($p = n.s.$).

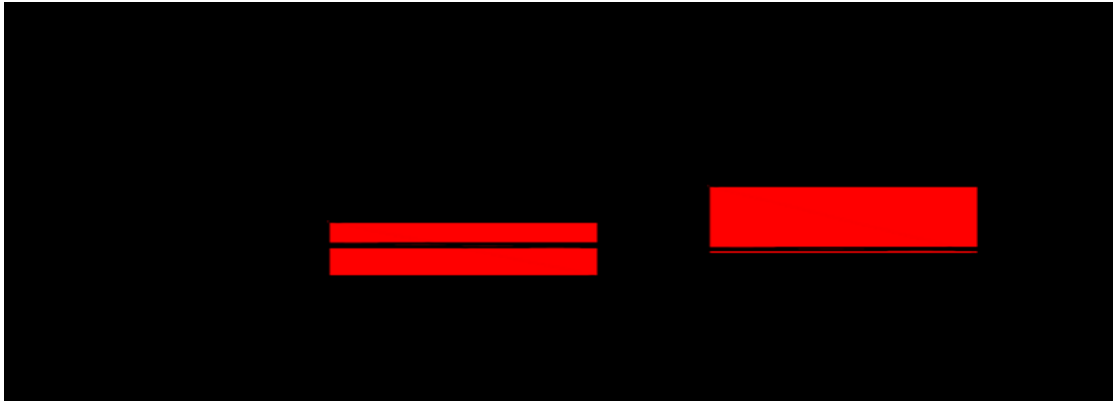


Abbildung 4.24: CDw125-Expression auf eosinophilen Granulozyten aus dem Blut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Durchschnittsfluoreszenzen von CDw125 auf eosinophilen Granulozyten; $n = 8$; $p = n.s.$

Zehn Minuten nach Provokation lag der Expressionswert für CDw125 auf Neutrophilen in der BAL im provozierten Segment etwa gleich hoch wie im Kontrollsegment und fiel dann nach 72 Stunden auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes ab, im Kontrollsegment dagegen war nur ein leichter Abfall zu verzeichnen: K-10 min: 81,33 [0-103,89] [SMF]; P-10 min: 94,78 [64,94-155,16] [SMF]; K-72 h: 72,35 [48,94-1105,95] [SMF]; P-72 h: 59,09 [0-142,03] [SMF]; ($p = n.s.$). Im Blut war ein leichter Abfall der CDw125-Expression auf Neutrophilen zu messen: Blut-10 min: 62,23 [20,46-83,86] [SMF]; Blut-72 h: 51,43 [32,71-1246,10] [SMF] ($p = n.s.$ – keine Abbildung).

Die CDw125-Expression auf Makrophagen in der BAL zeigte 72 Stunden nach Provokation keine wesentliche Veränderung im Vergleich zu provoziertem und Kontrollsegment 10 Minuten nach Provokation: K-10 min: 127,45 [0-265,88] [SMF]; P-10 min: 151,41 [0-249,50] [SMF]; K-72 h: 172,95 [0-391,61] [SMF]; P-72 h: 142,28 [0-568,66] [SMF] (K-72 h gegen P-10 min: $p = 0,069$). Bei den Monozyten im Blut war allenfalls ein leichter Abfall bezüglich der CDw125-Expression zu verzeichnen: Blut-10 min: 2,71 [0,72-7,11] [SMF]; Blut-72 h: 1,33 [0-6,85] [SMF] ($p = n.s.$ – keine Abbildung).

Die Untersuchung der Lymphozyten aus der BAL zeigte keine verwertbaren Ergebnisse. Die Expression von CDw125 auf Blutlymphozyten war vor und nach

Provokation annähernd unverändert: Blut-10 min: 13,53 [3,39-23,44] [SMF]; Blut-72 h: 10,90 [1,81-25,96] [SMF] ($p = \text{n.s.}$ – keine Abbildung).

4.2. Lymphozyten-Marker

Weiterhin wurden durchflusszytometrisch die Lymphozyten - Subpopulationen differenziert. Hierbei wurden CD3- (T-Zellen), CD3/4- (T-Helferzellen), CD3/8- (T-Suppressorzellen), CD16/56- (NK-Zellen), CD19- (B-Zellen), CD3/4/57-, CD3/8/57- und CD3/16/56/57-positive Zellen gemessen und deren prozentualer Anteil rechnerisch ermittelt.

4.3.1. CD3-Expression

4.3.1.1. CD3-Expression absolut in der BAL und im Blut

In der BAL kam es 72 Stunden nach Allergenprovokation im provozierten Segment zu einem signifikanten Anstieg der T-Zellen, während sich die Absolutzahl der T-Zellen im Kontrollsegment nur geringfügig veränderte: K-10 min: 5,91 [0,72-22,98] [$\times 10^3$]; P-10 min: 2,77 [1,25-8,66] [$\times 10^3$]; K-72 h: 8,39 [2,31-29,13] [SMF]; P-72 h: 13,47 [7,85-114,90] [SMF] (P-72 h gegen P-10 min: $p = 0,028$).



Abbildung 4.25: CD3⁺ Lymphozyten aus der BAL absolut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Zellzahlen von CD3-positiven Lymphozyten. Die Zellzahlen sind in [$\times 10^3$ /ml] angegeben. Zz = Zellzahl; n = 7.

Im Blut kam es zu einem allerdings nicht signifikanten Abfall der T-Zellen: Blut-10 min: 1645,09 [684,0-1850,0] [$\times 10^3/\text{ml}$]; Blut-72 h: 1325,49 [1178,0-8340,15] [$\times 10^3/\text{ml}$] ($p = \text{n.s.}$).

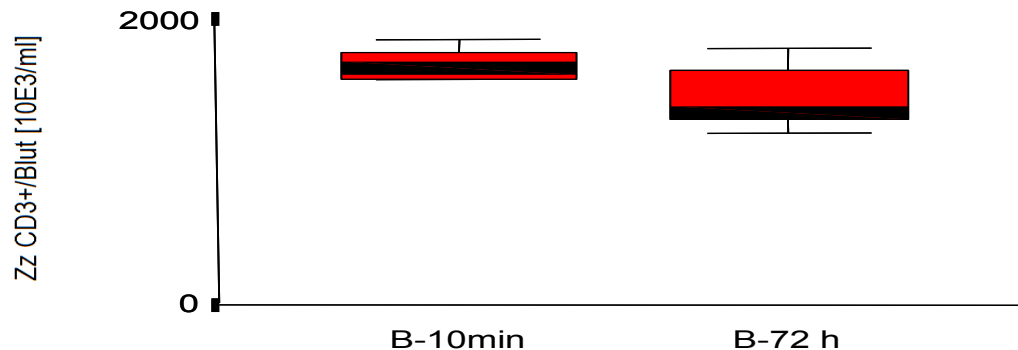


Abbildung 4.26: CD3⁺ Lymphozyten aus dem Blut absolut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der Zellzahlen CD3-positiver Lymphozyten. Zz = Zellzahl; n = 7; p = n.s.

4.3.1.2. CD3-Expression prozentual in der BAL und im Blut

Die prozentuale Anteil CD3-positiver Lymphozyten blieb 72 Stunden nach Provokation im provozierten Segment nahezu unverändert bei ebenfalls annähernd gleich bleibenden Werten im Kontrollsegment: K-10 min: 92,17 [87,8-97,1] [% der Lymphozyten]; P-10 min: 92,59 [86,3-95,5] [% der Lymphozyten]; K-72 h: 92,90 [85,8-97,1] [% der Lymphozyten]; P-72 h: 92,30 [84,1-94,3] [% der Lymphozyten] (P-72 h gegen K-10 min: $p = 0,028$; P-72 h gegen P-10 min: $p = 0,063$; P-72 h gegen K-72 h: $p = 0,091$).

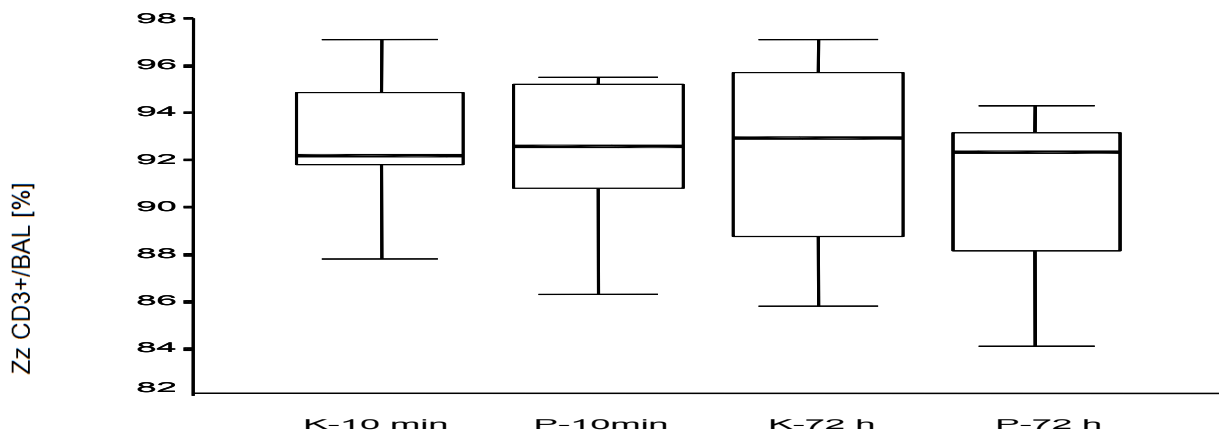


Abbildung 4.27: Anteil CD3⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten aus der BAL
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] des prozentualen Anteils von CD3-exprimierenden Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten. Zz = Zellzahl; n = 7; p = n.s.

Im Blut kam es prozentual zu einer geringfügigen Abnahme CD3-positiver Zellen:
 Blut-10 min: 76,16 [59,0-83,13] [% der Lymphozyten]; Blut-72 h: 69,30 [64,5-81,77]
 [% der Lymphozyten] (p= n.s.).

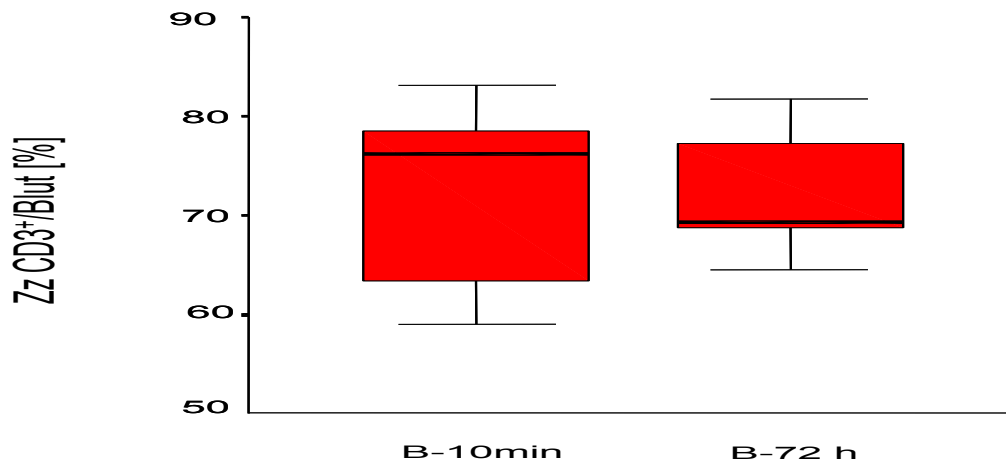


Abbildung 4.28: Anteil CD3⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten aus dem Blut
 Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] des prozentualen Anteils von
 CD3-exprimierenden Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten. Zz = Zellzahl; n = 7; p = n.s.

4.3.2.1. CD3/4-Expression absolut in der BAL und im Blut

Hinsichtlich der Expression von CD3/4 auf Lymphozyten der BAL war im provozierten Segment nach 72 Stunden ein Anstieg zu verzeichnen, während im Kontrollsegment eine gleich bleibende Expression zu finden war: K-10 min: 3,74 [0,22-14,19] [x10E3/ml]; P-10 min: 1,78 [0,84-2,78] [x10E3/ml]; K-72 h: 3,74 [1,65-20,94] [x10E3/ml]; P-72 h: 9,71 [3,09-79,85] [x10E3/ml] (P-72 h gegen P-10 min: p = 0,018; P-72 h gegen K-72 h: p = 0,091).



Abbildung 4.29: CD3⁺/4⁺ Lymphozyten aus der BAL absolut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der absoluten Zellzahl CD3/4-positiver Lymphozyten. Die Zellen sind in [x10³/ml] angegeben. Zz = Zellzahl; n = 7; p = n.s.

Im Blut kam es zu einem leichten Abfall der T-Helferzellen 72 Stunden nach Provokation: Blut-10 min: 832,00 [392,0-1184,0] [x10E3/ml]; Blut-72 h: 796,00 [574,99-3337,05] [x10E3/ml] (p = n.s.).

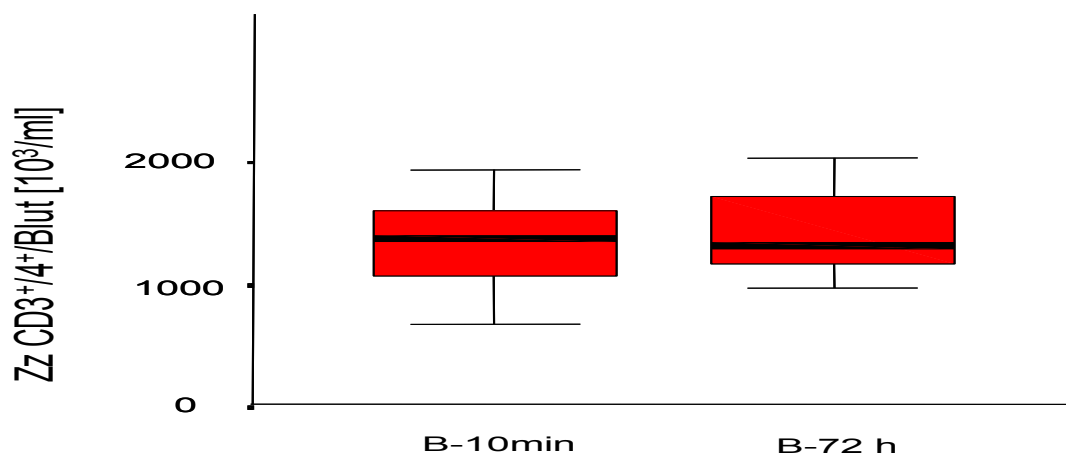


Abbildung 4.30: CD3⁺/4⁺ Lymphozyten aus dem Blut absolut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der CD3/4-positiven Lymphozyten. Die Zellzahlen sind in [x10³/ml] angegeben. Zz = Zellzahl; n = 7; p = n.s.

4.3.2.2. CD3/4-Expression prozentual in der BAL und im Blut

Weder im allergenprovozierten, noch im Kontrollsegment konnte 72 Stunden nach Provokation eine signifikante Veränderung bezüglich des prozentualen Anteils CD3/4-positiver Lymphozyten nachgewiesen werden: K-10 min: 58,90 [28,82-64,8] [% der Lymphozyten]; P-10 min: 61,20 [30,5-66,3] [% der Lymphozyten]; K-72 h:

55,30 [31,9-70,2] [% der Lymphozyten]; P-72 h: 60,10 [36,1-65,30] [% der Lymphozyten] (p = n.s. – keine Abbildung).

Auch im Blut kam es diesbezüglich zu keiner wesentlichen Veränderung: Blut-10 min: 36,00 [21,47-50,40] [% der Lymphozyten]; Blut-72 h: 37,10 [32,72-48,50] [% der Lymphozyten] (p = n.s. – keine Abbildung).

4.3.3.1. CD3/8-Expression absolut in der BAL und im Blut

In der BAL war im provozierten Segment 72 Stunden nach Provokation ein deutlicher Anstieg CD3/8-positiver Lymphozyten erkennbar, während es im NaCl-provozierten Kontrollsegment lediglich zu einem leichten Anstieg kam: K-10 min: 2,07 [0,39-7,88] [$\times 10^3/\text{ml}$]; P-10 min: 0,96 [0,42-5,55] [$\times 10^3/\text{ml}$]; K-72 h: 3,04 [0,61-8,43] [$\times 10^3/\text{ml}$]; P-72 h: 4,97 [2,56-34,87] [$\times 10^3/\text{ml}$] (P-72 h gegen P-10 min: p = 0,028; K-72 h gegen K-10 min: p = 0,063).

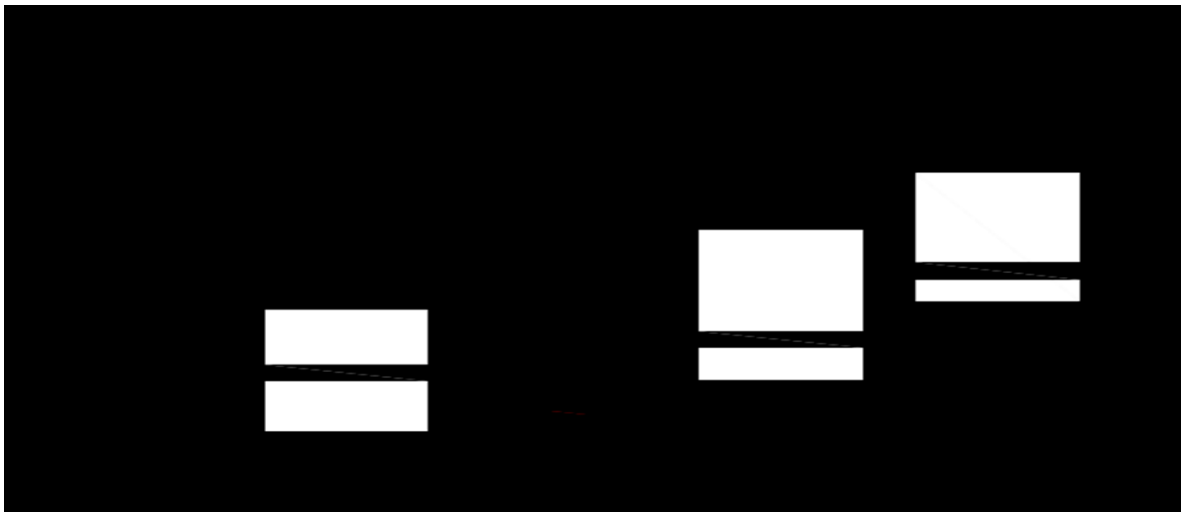


Abbildung 4.31: CD3⁺/8⁺ Lymphozyten aus der BAL absolut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der CD3/8-pos. Lymphozyten. Die Zellen sind in [$\times 10^3/\text{ml}$] angegeben. Zz = Zellzahl; n = 7.

Im peripheren Blut war dagegen ein Abfall sichtbar, welcher allerdings nur von dezentem Ausmaß war: Blut-10 min: 538,00 [241,0-765,0] [$\times 10^3/\text{ml}$]; Blut-72 h: 469,00 [270,4-2229,51] [$\times 10^3/\text{ml}$] (p = n.s.)

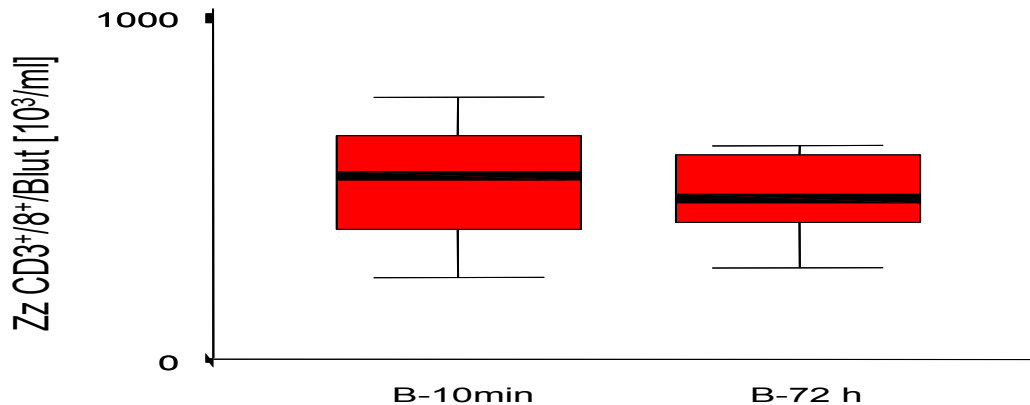


Abbildung 4.32: CD3⁺/8⁺ Lymphozyten aus dem Blut absolut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der CD3/8-pos. Lymphozyten. Die Zellen sind in [$\times 10^3/\text{ml}$] angegeben. Zz = Zellzahl; n = 7; p = n.s.

4.3.3.2. CD3/8-Expression prozentual in der BAL und im Blut

In der BAL war sowohl im Kontrollsegment, als auch im allergenprovozierten Segment keine Veränderung der prozentualen Verteilung von T-Suppressorzellen zu beobachten: K-10 min: 33,00 [23,7-52,5] [% der Lymphozyten]; P-10 min: 32,50 [23,6-61,0] [% der Lymphozyten] (p = n.s.); K-72 h: 32,80 [15,6-63,1] [% der Lymphozyten]; P-72 h: 27,05 [17,2-57,9] [% der Lymphozyten] (p = n.s. – keine Abbildung). Auch im Blut kam es zu keiner signifikanten Veränderung bezüglich der T-Suppressorzellverteilung vor und nach Provokation: Blut-10 min: 20,80 [16,45-33,1] [% der Lymphozyten]; Blut-72 h: 22,84 [16,0-32,5] [% der Lymphozyten] (p = n.s. – keine Abbildung)

4.3.4.1. CD16/56- Expression absolut in der BAL und im Blut

Während es im allergenprovozierten Segment 72 Stunden nach Provokation zu einer signifikanten Zunahme der NK-Zellen kam, blieb die Anzahl der NK-Zellen im NaCL-provozierten Segment annähernd gleich: K-10 min: 0,26 [0,04-0,79] [$\times 10^3/\text{ml}$]; P-10 min: 0,12 [0,09-0,38] [$\times 10^3/\text{ml}$]; K-72 h: 0,47 [0,16-1,6] [$\times 10^3/\text{ml}$]; P-72 h: 1,52 [0,41-4,11] [$\times 10^3/\text{ml}$] (P-72 h gegen P-10 min: p = 0,018; P-72 h gegen K-72 h: p = 0,028).

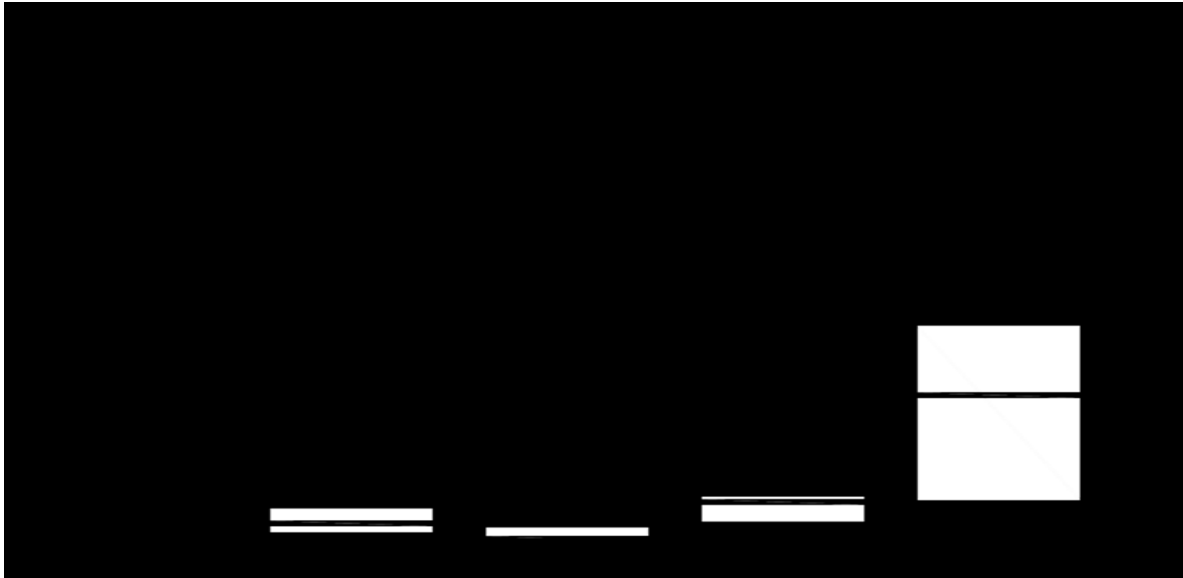


Abbildung 4.33: CD16⁺/56⁺ Lymphozyten aus der BAL absolut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der CD16/56-pos. Lymphozyten. Die Zellen sind in [x10³/ml] angegeben. Zz = Zellzahl; n = 7.

Im peripheren Blut war allenfalls ein leichter Anstieg der NK-Zellen 72 Stunden nach Allergenprovokation zu verzeichnen: Blut-10 min: 383,00 [199,0-876,0] [x10E3/ml]; Blut-72 h: 411,00 [144,0-1267,7] [x10E3/ml]; (p = n.s.)

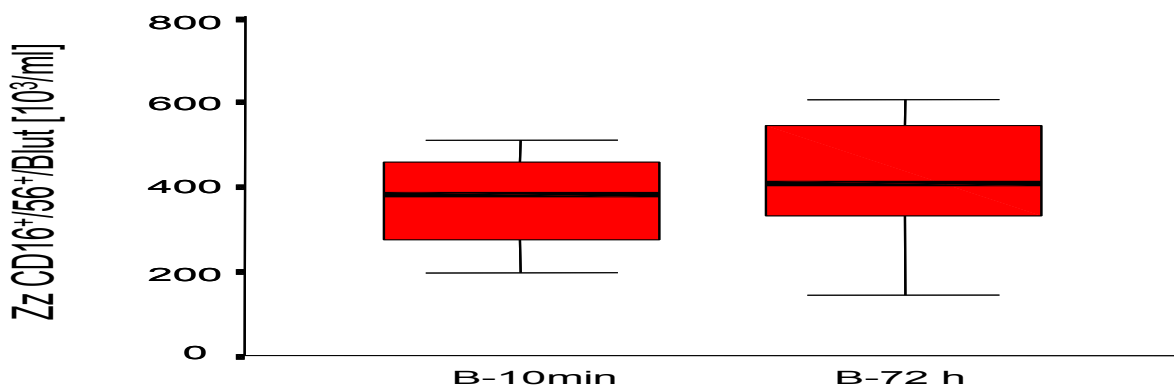


Abbildung 4.34: CD16⁺/56⁺ Lymphozyten aus dem Blut absolut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der CD16/56-pos. Lymphozyten. Die Zellen sind in [x10³/ml] angegeben. Zz = Zellzahl; n = 7; p = n.s.

4.3.4.2. CD16/56-Expression prozentual in der BAL und im Blut

Weder im NaCl-instillierten, noch im allergenprovozierten Segment war 72 Stunden nach Provokation ein signifikanter prozentualer Anstieg der NK-Zellen zu verzeichnen: K-10 min: 5,33 [2,9-10,2] [% der Lymphozyten]; P-10 min: 5,50 [3,8-

11,5] [% der Lymphozyten]; K-72 h: 5,20 [1,9-9,5] [% der Lymphozyten]; P-72 h: 5,00 [3,19-10,2] [% der Lymphozyten] ($p = n.s.$ – keine Abbildung).

Auch im Blut kam es prozentual gesehen zu keiner wesentlichen Veränderung bezüglich der Anzahl der NK-Zellen: Blut-10 min: 18,89 [8,6-33,7] [% der Lymphozyten]; Blut-72 h: 19,40 [8,3-24,2] [% der Lymphozyten] ($p = n.s.$ – keine Abbildung).

4.3.5.1. CD19-Expression absolut in der BAL und im Blut

In der BAL beobachteten wir im allergenprovozierten Segment eine signifikante Zunahme der B-Zellen zum Zeitpunkt 72 Stunden nach Allergenprovokation. Auch im NaCl-provozierten Segment war ein Trend zum Anstieg der B-Zellen erkennbar: K-10 min: 0,04 [0-29] [$\times 10^3/\text{ml}$]; P-10 min: 0,05 [0,02-0,09] [$\times 10^3/\text{ml}$]; K-72 h: 0,18 [0,05-0,87] [$\times 10^3/\text{ml}$]; P-72 h: 0,32 [0,09-10,62] [$\times 10^3/\text{ml}$] (P-72 h gegen P-10 min: $p = 0,028$; P-72 h gegen K-72 h: $p = 0,028$; P-72 h gegen K-10 min: $p = 0,028$).

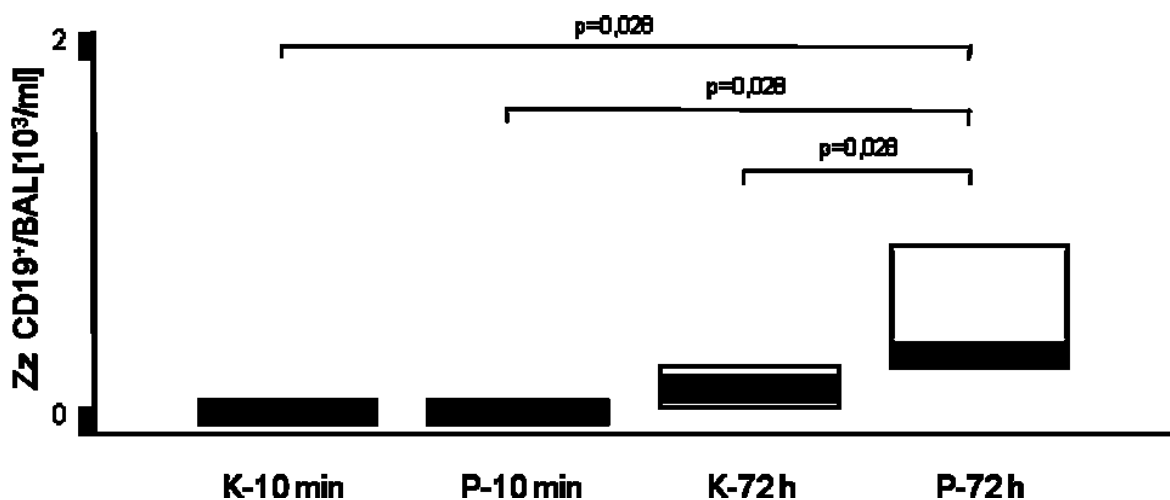


Abbildung 4.35: CD19⁺ Lymphozyten aus der BAL absolut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der CD19-pos. Lymphozyten. Die Zellen sind in [$\times 10^3/\text{ml}$] angegeben. Zz = Zellzahl; $n = 7$.

Im Blut stieg die Zahl der B-Zellen nach 72 Stunden geringfügig an: Blut-10 min: 153,00 [87,0-212,0] [$\times 10^3/\text{ml}$]; Blut-72 h: 202,00 [63,0-592,15] [$\times 10^3/\text{ml}$] ($p = n.s.$)

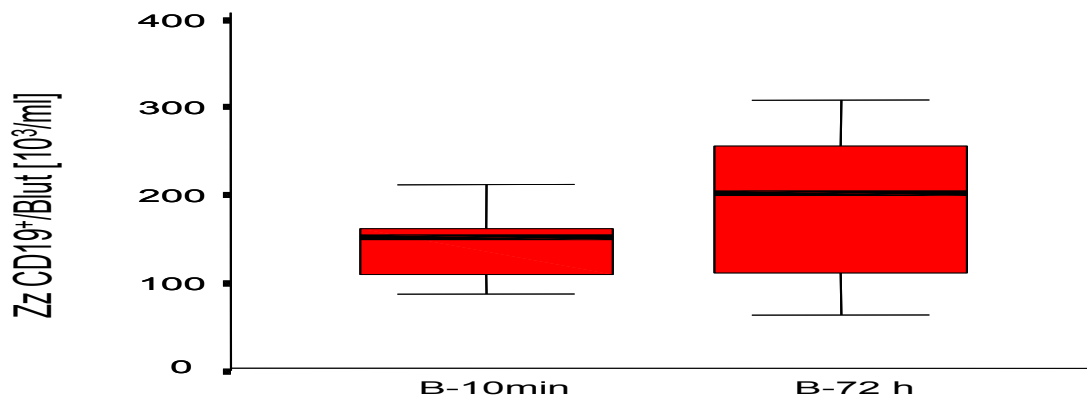


Abbildung 4.36: CD19⁺ Lymphozyten aus dem Blut absolut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] der CD19-pos. Lymphozyten. Die Zellen sind in [$\times 10^3/\text{ml}$] angegeben. Zz = Zellzahl; n = 7; p = n.s.

4.3.5.2. CD19-Expression prozentual in der BAL und im Blut

Bei den durch BAL gewonnenen Zellen ließ sich prozentual eine signifikant höhere Zahl an B-Zellen im provozierten Segment gegenüber dem Kontrollsegment 72 Stunden nach Allergenprovokation nachweisen. Im provozierten Segment war ein Trend zum Anstieg der B-Zellen nach Allergenprovokation erkennbar: K-10 min: 1,80 [0-2,76] [% der Lymphozyten]; P-10 min: 1,85 [0,6-3,6] [% der Lymphozyten]; K-72 h: 2,10 [0,5-5,0] [% der Lymphozyten]; P-72 h: 2,90 [1,0-8,24] [% der Lymphozyten] (P-72 h gegen K-10 min: p = 0,018; P-72 h gegen P-10 min: p = 0,075)

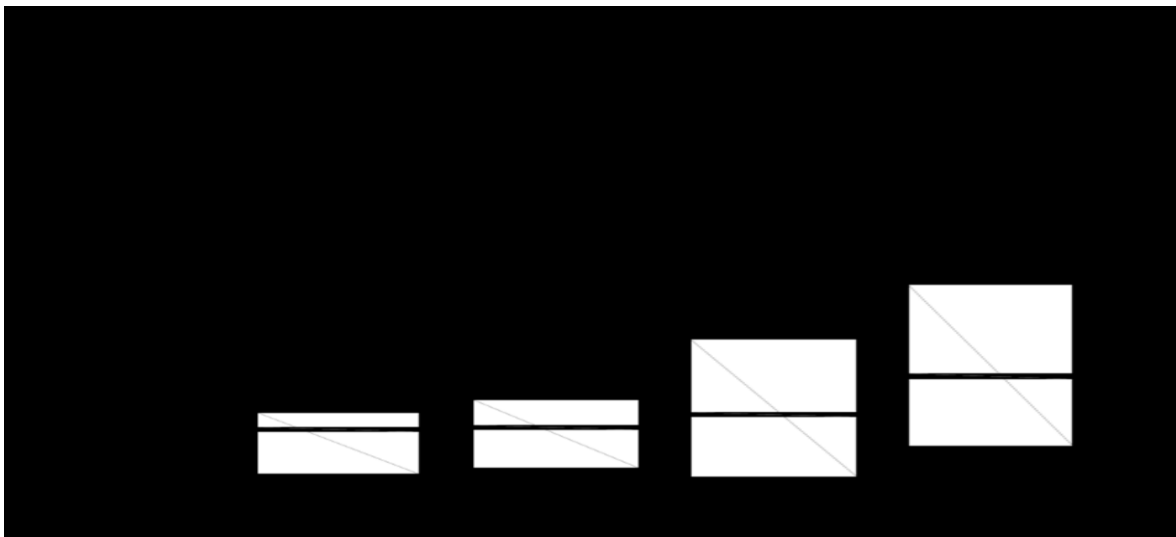


Abbildung 4.37: Anteil CD19⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten aus der BAL
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] des prozentualen Anteils von CD19-exprimierenden Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten. Zz = Zellzahl; n = 7.

Im Blut kam es 72 Stunden nach Allergenprovokation zu einem nicht signifikanten prozentualen Anstieg der B-Zellen: Blut-10 min: 5,90 [3,7-13,7] [% der Lymphozyten]; Blut-72 h: 7,20 [3,7-16,1] [% der Lymphozyten] (p = n.s.)

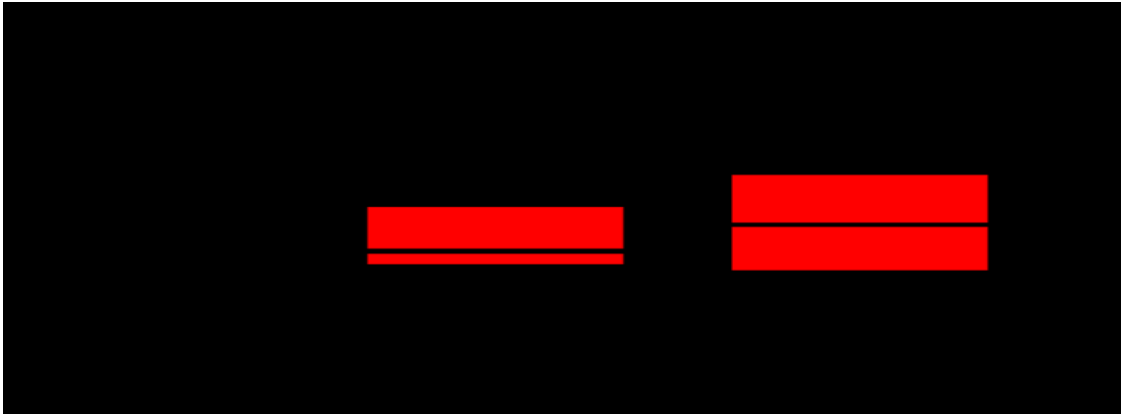


Abbildung 4.38: Anteil CD19⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten aus dem Blut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] des prozentualen Anteils von CD19-exprimierenden Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten. Zz = Zellzahl; n = 7; p = n.s.

4.3.6.1. CD3/4/57-Expression prozentual in der BAL und im Blut

Bezüglich der Expression CD3/4/57- positiver Zellen in der BAL war 72 Stunden nach Allergenprovokation vor allem im provozierten Segment ein deutlicher Abfall zu verzeichnen, während es im Kontrollsegment eher zu einem leichten Anstieg der CD3/4/57- positiven Zellen kam: K-10 min: 7,51 [3,23-14,83] [% der Lymphozyten]; P-10 min: 11,08 [3,76-23,16] [% der Lymphozyten]; K-72 h: 10,38 [4,06-14,6] [% der Lymphozyten]; P-72 h: 6,23 [2,24-10,78] [% der Lymphozyten] (P-72 h gegen P-10 min: p = 0,043).

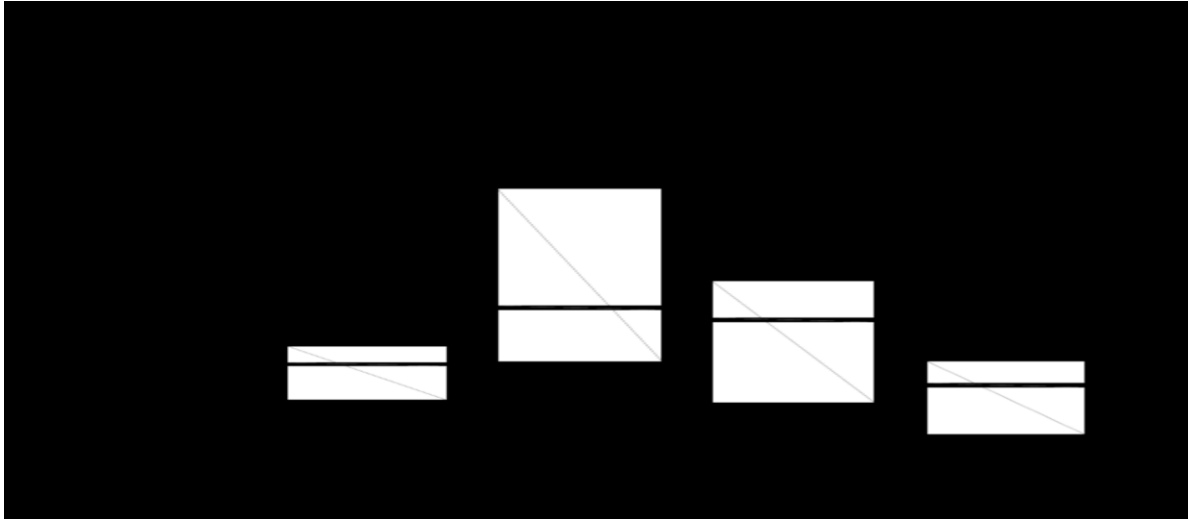


Abbildung 4.39: Anteil $CD3^+/4^+/57^+$ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten aus der BAL
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] des prozentualen Anteils von
 $CD3/4/57$ -exprimierenden Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten. Zz = Zellzahl; $n = 7$.

Im Blut war ein Abfall der $CD3/4/57$ -positiven Zellen auf etwa die Hälfte messbar:
Blut-10 min: 3,40 [0,57-16,87] [% der Lymphozyten]; Blut-72 h: 1,76 [1,18-50,0] [%
der Lymphozyten]; ($p = n.s.$)

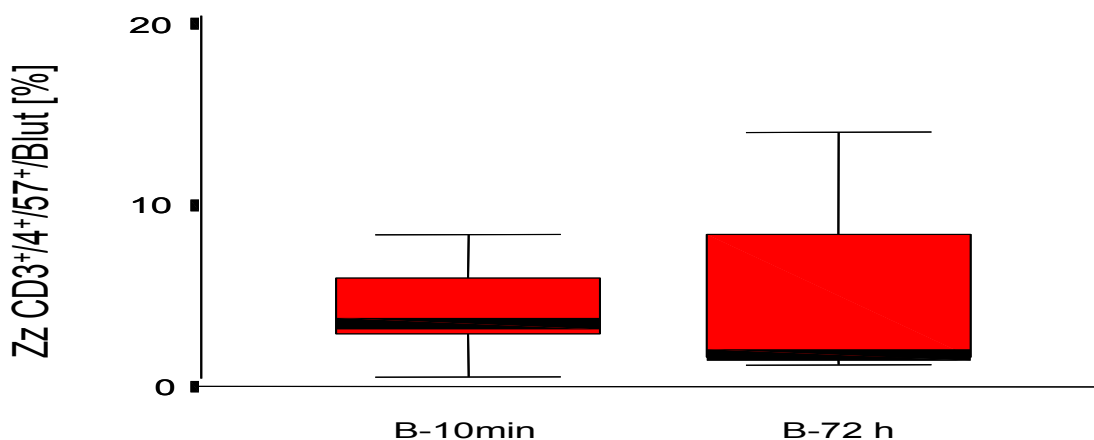


Abbildung 4.40: Anteil $CD3^+/4^+/57^+$ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten aus dem Blut
Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] des prozentualen Anteils von
 $CD3/4/57$ -exprimierenden Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten. Zz = Zellzahl; $n = 7$; $p = n.s.$

4.3.6.2. $CD3/8/57$ -Expression prozentual in der BAL und im Blut

Im allergenprovozierten Segment war 72 Stunden nach Allergenprovokation eine
Abnahme der $CD3/8/57$ -positiven Zellen auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes zu

verzeichnen. Im Kontrollsegment dagegen kam es zu einer- wenn auch leichten- Zunahme der Zellzahl: K-10 min: 10,87 [5,21-18,27] [% der Lymphozyten]; P-10 min: 16,73 [10,08-23,26] [% der Lymphozyten]; K-72 h: 15,26 [3,68-20,2] [% der Lymphozyten]; P-72 h: 8,29 [3,47-13,24] [% der Lymphozyten] (P-72 h gegen P-10 min: $p = 0,018$; P-72 h gegen K-72 h: $p = 0,043$).

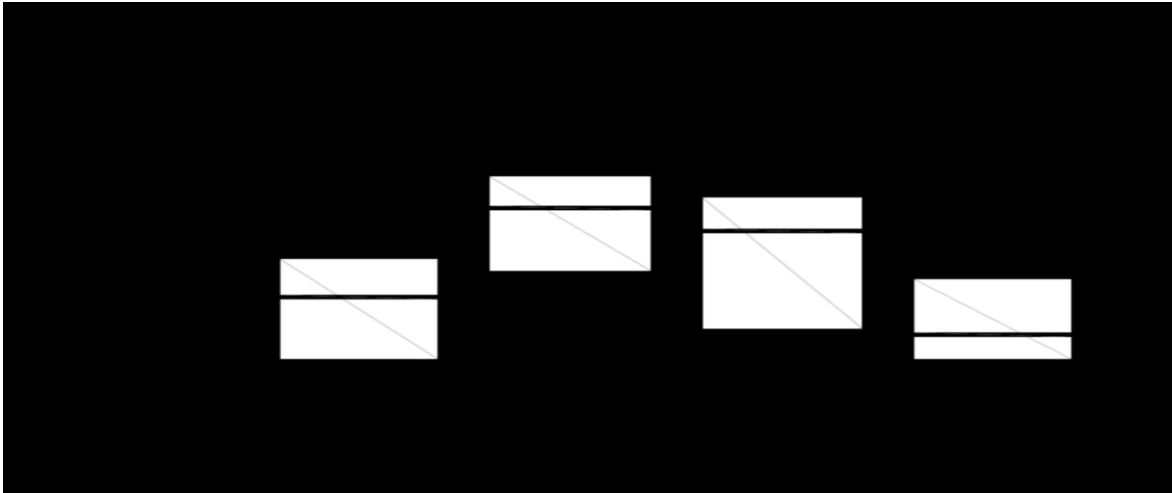


Abbildung 4.41: Anteil CD3⁺/8⁺/57⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten aus der BAL. Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] des prozentualen Anteils von CD3/8/57-exprimierenden Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten. Zz = Zellzahl; n = 7.

Im Blut kam es 72 Stunden nach Allergenprovokation zu einem leichten, nicht signifikanten Abfall CD3/8/57-positiver Zellen: Blut-10 min: 22,36 [4,44-26,88] [% der Lymphozyten]; Blut-72 h: 16,12 [8,26-65,2] [% der Lymphozyten]; ($p = n.s.$)

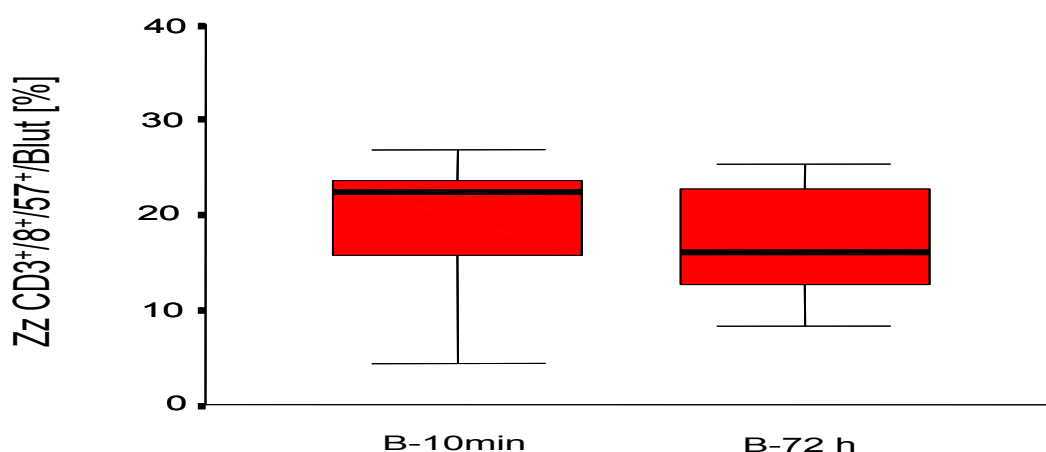


Abbildung 4.42: Anteil CD3⁺/8⁺/57⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten aus dem Blut. Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] des prozentualen Anteils von CD3/8/57-exprimierenden Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten. Zz = Zellzahl; n = 7; $p = n.s.$

4.3.6.3 CD3/16/56/57-Expression prozentual in der BAL und im Blut

In der BAL war im provozierten Segment 72 Stunden nach Allergenprovokation ein nicht signifikanter Abfall der CD3/16/56/57-positiven Zellen auf annähernd ein Drittel des Ausgangswertes zu beobachten. Im Kontrollsegment kam es dagegen zu einem ebenfalls nicht signifikanten Anstieg der CD3/16/56/57-positiven Zellen: K-10 min: 17,14 [5,77-28,43] [% der Lymphozyten]; P-10 min: 36,42 [9,39-42,99] [% der Lymphozyten]; K-72 h: 21,34 [1,67-49,6] [% der Lymphozyten]; P-72 h: 10,37 [2,59-29,93] [% der Lymphozyten] (p = n.s.).

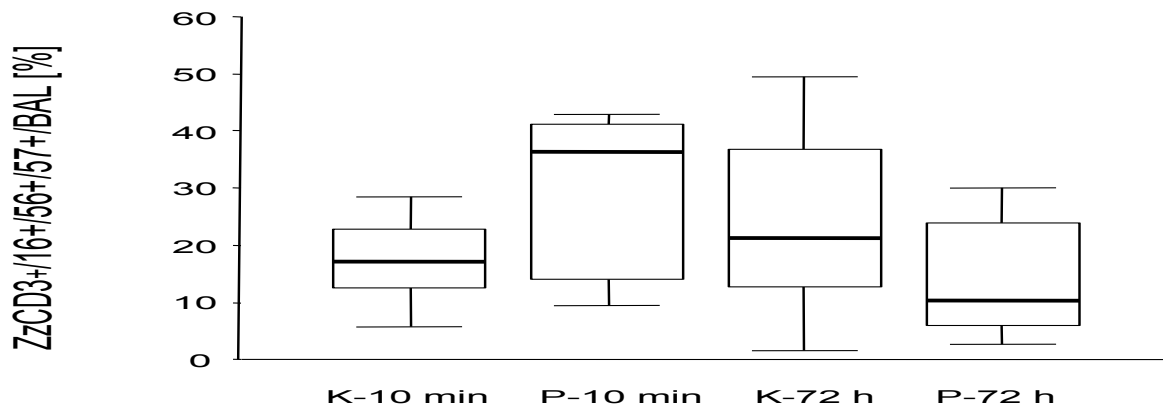


Abbildung 4.43: Anteil CD3⁺/16⁺/56⁺/57⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten aus der BAL. Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] des prozentualen Anteils von CD3/16/56/57-exprimierenden Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten. n = 7; p = n.s.

Im Blut war die Zellzahl der CD3/16/56/57-tragenden Zellen vor und 72 Stunden nach Allergenprovokation prozentual annähernd gleich bleibend: Blut-10 min: 31,23 [9,0-42,6] [% der Lymphozyten]; Blut-72 h: 30,03 [4,91-48,6] [% der Lymphozyten]; (p = n.s.)

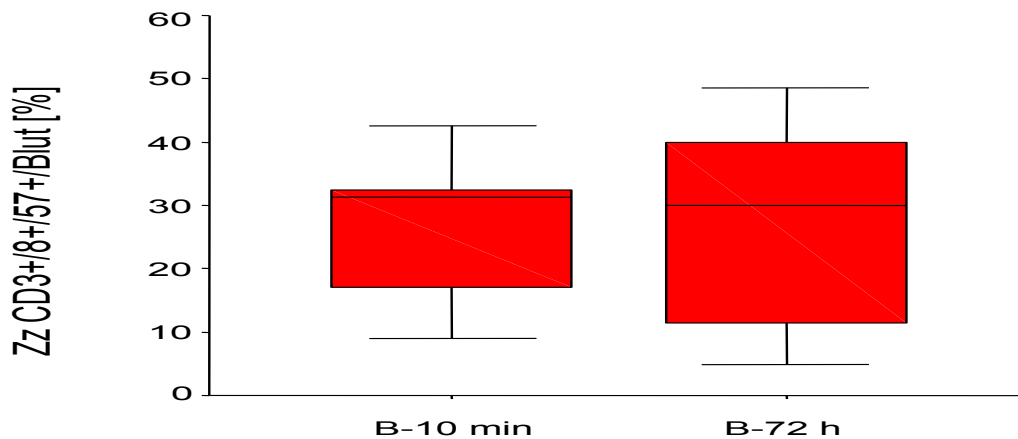


Abbildung 4.44: Anteil CD3⁺/16⁺/56⁺/57⁺ Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten aus der BAL. Dargestellt sind die Mediane und Spannweiten [Minimum - Maximum] des prozentualen Anteils von CD3/16/56/57-exprimierenden Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten. Zz = Zellzahl; n = 7; p = n.s.

5. Diskussion

Asthma bronchiale ist gekennzeichnet durch eine chronische Entzündung der Atemwege, welche pathogenetisch vor allem auf die asthmatische Spätreaktion zurückzuführen ist. Dabei kommt es zur Migration von Entzündungszellen ins Bronchialgewebe und zur Freisetzung bestimmter Zytokine durch aktivierte T-Zellen, welche die Rekrutierung und Interaktion der beteiligten Zellen regulieren (69). Die Erforschung der asthmatischen Entzündung in vivo soll zum genaueren Verständnis der Pathophysiologie beitragen und somit Wegbereiter für die Entwicklung neuer Therapieansätze sein.

5.1. Zellzusammensetzung der BAL und des Blutes

Der Vorteil der segmentalen Allergenprovokation mit anschließender bronchoalveolärer Lavage besteht darin, dass sich die entzündlichen Vorgänge beim Asthma bronchiale in vivo am Menschen beobachten lassen. Leukozyten aus dem peripheren Blut wandern ins Entzündungsgebiet und führen zu einer Infiltration des peribronchialen Gewebes, vor allem durch eosinophile Granulozyten. Auch neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten sind verstärkt zu finden. Diese messbaren Veränderungen werden in der Regel von den Probanden gut toleriert (58).

In dieser Studie beobachteten wir 72 Stunden nach Allergenprovokation einen Anstieg der Gesamtzellzahl um etwa das Dreifache sowie eine erhebliche Zunahme der eosinophilen Granulozyten, die den Hauptanteil des Zellanstiegs ausmachten. Diese Veränderungen der Zellzahlen lassen sich somit in die in anderen Studien erhobenen Verläufe einordnen (39, 40, 62). Im Vergleich mit früheren Studien und nach Einordnung unserer Daten stellten wir fest, dass das Maximum der Eosinophilen-Infiltration nicht im Zeitraum von 72 Stunden liegt, sondern bei etwa 42 Stunden (62). Weiterhin markiert das Maximum der Eosinophilen-Infiltration nicht gleichzeitig das Maximum der Atemwegsobstruktion, welches bei 4-12 Stunden liegt (9).

Weiterhin fiel eine starke Diskrepanz im Vergleich zum Mausmodell auf: Hierbei lag der maximale Anstieg der Eosinophilen bei vier Tagen, während es in der zeitlichen Einordnung unserer Daten nach 72 Stunden bereits zu einem deutlichen Abfall der eosinophilen Granulozyten gekommen war, wenn auch der Wert noch deutlich erhöht im Vergleich zum Ausgangswert war (69).

Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten stieg 72 Stunden nach Allergenprovokation dagegen um den Faktor 30 (bei relativ geringer Neutrophilenzahl). Wie schon bei der Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Eosinophilen-Infiltration zeigte sich auch bei der zeitlichen Einordnung unserer Neutrophilen-Werte, dass im Zeitraum von 72 Stunden nach Allergenprovokation das Maximum der Infiltration dieser Zellen bereits weit überschritten war (62). Bei einem Maximum bei etwa 18 Stunden nach Provokation wird in früheren Studien den neutrophilen Granulozyten eher ein Zusammenhang mit der asthmatischen Reaktionsschwere (62) zugeschrieben als den eosinophilen Granulozyten, was mit einer Tendenz zur fixierten Atemwegsobstruktion und somit einem schlechteren Ansprechen auf inhalative Steroide einhergeht. Ebenfalls bekannt ist ein Auftreten der neutrophilen Granulozyten im Status asthmaticus als dominierende Zellgruppe (60).

Hinsichtlich der Makrophagen wurde ein vierfacher Anstieg beobachtet, während die Zahl der Lymphozyten sich ebenfalls vervierfachte.

In der zeitlichen Einordnung unserer Werte im Vergleich zu früheren Studien (62) fiel auch hier auf, dass das Infiltrationsmaximum dieser Zellen sich bei circa 18 Stunden zeigte und somit zum Zeitpunkt 72 Stunden nach Provokation bereits deutlich überschritten war. Ein deutlicher Abfall der Lymphozytenzahlen tritt bereits nach 42 Stunden ein. Auch dies steht wiederum in deutlicher Diskrepanz zum Mausmodell, wo der maximale Lymphozyten-Anstieg nach etwa zwei Wochen zu finden ist.

Die nahtlose Einordnung der von uns erhobenen Zellzahlen in frühere Untersuchungen und der deutliche Gegensatz zu den am Tiermodell erhobenen Zellzahlverläufen unterstützen die These, dass die am Mausmodell erhobenen wissenschaftlichen Erkenntnisse im Bereich der Ursachenforschung beim Asthma bronchiale nicht 1:1 auf den Menschen übertragbar sind. Dies ist insbesondere daher wichtig, da in der Vergangenheit bereits häufig Mausmodelle genutzt wurden, um zum besseren Verständnis der Pathogenese bei Asthma beizutragen. Frühere Vergleiche zwischen Maus und Mensch zeigen nicht nur eine stark abweichende

Kinetik der beteiligten Zellen (62), sondern gehen auch auf die strukturellen Unterschiede zwischen diesen beiden Versuchsgruppen ein: So sind nicht nur die Atemwege dieser beiden Gruppen unterschiedlich aufgebaut, auch reagieren die Zielzellen unterschiedlich stark auf Zytokinreize und auch die chronischen Folgeerscheinungen des Asthma bronchiale, das Remodeling der Atemwege, spiegeln sich unterschiedlich wider (106).

Diese Beobachtungen der Zellkinetik heben erneut die Bedeutung der asthmatischen Spätreaktion hervor, die erst Stunden nach dem Allergenreiz durch eine Migration von Entzündungszellen hervorgerufen wird (47).

Das Kontrollsegment betreffend wurde kein wesentlicher Anstieg der Gesamtzellzahl beobachtet. Die Zahl der eosinophilen Granulozyten war 72 Stunden nach Allergenprovokation hingegen leicht gestiegen.

Im Bereich der neutrophilen Granulozyten verzeichneten wir nach 72 Stunden einen Anstieg um den Faktor sechs. Bei den Makrophagen wurde ein Anstieg um das Doppelte des Ausgangswertes gemessen, während die Zahl der Lymphozyten im Kontrollsegment nach 72 Stunden annähernd gleich blieb.

Der Anstieg der Neutrophilen sowohl im Kontroll- als auch im allergenprovozierten Segment könnte als unspezifische Antwort auf die Bronchoskopie gewertet werden (90, 26, 57). Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass die etwas stärkere Zunahme im allergenprovozierten Segment einen Nebeneffekt der Eosinophilen-Rekrutierung darstellt (24).

Bei der Analyse des peripheren Blutes zeigte sich nach 72 Stunden ein Abfall der Gesamtzellzahl, was vor allem auf eine Reduktion der neutrophilen Granulozyten zurückzuführen war bei annähernd konstanter Anzahl von Monozyten, Lymphozyten sowie basophilen Granulozyten. Ein signifikanter Anstieg war lediglich im Bereich der eosinophilen Granulozyten zu verzeichnen, die Anzahl war hier nach 72 Stunden annähernd doppelt so hoch wie vor Provokation.

5.2. Differenzierung der Lymphozyten aus BAL und Blut

Eine wichtige Rolle bezüglich der Aktivierung von Zytokinen im Bereich des Asthma bronchiale spielen bekannterweise die Lymphozyten und hierbei vor allem die CD3-positiven T-Lymphozyten. In dieser Arbeit untersuchten wir unter anderem die Verteilung der lymphozytären Subpopulationen. Hierbei wurden CD3- (T-Zellen),

CD3/4- (T-Helferzellen), CD3/8- (T-Suppressorzellen), CD16/56- (NK-Zellen), CD19- (B-Zellen), CD3/4/57-, CD3/8/57- und CD3/16/56/57-positive Zellen gemessen und deren prozentualer Anteil rechnerisch ermittelt.

72 Stunden nach Allergenprovokation wurde im provozierten Segment ein Anstieg der T-Zellzahl auf das 4,5-fache beobachtet bei gleichzeitiger leichter Reduktion des prozentualen Anteils der T-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl. Parallel dazu war im Blut ein leichter Abfall der CD3-positiven Lymphozyten erkennbar.

Dies lässt sich durch die Migration von T-Lymphozyten aus dem Blut ins allergenprovozierte Lungengewebe erklären und wurde bereits in früheren Studien zu anderen Untersuchungszeitpunkten beschrieben (25, 26, 32).

Ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg kam es bei der Zahl der T-Helferzellen im provozierten Segment bei annähernd gleich bleibender prozentualer Verteilung. Im Blut kam es wiederum zu einer leichten Verminderung CD4-positiver Zellen, was sich ebenfalls durch die Migration dieser Zellen ins beanspruchte Lungengewebe erklären lässt.

Ebenso verhielt es sich bei der Zahl der T-Suppressorzellen. Auch die Zahl der NK-Zellen stieg 72 Stunden nach Provokation signifikant an; hierbei wurde allerdings auch eine leichte Zunahme im Blut beobachtet.

In einer Studie von Azzawi et al. wurden im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden deutlich erhöhte Zellzahlen für CD3-, CD4- sowie CD8-positive Lymphozyten gemessen, was für eine wichtige Rolle dieser Zellen bei der Asthmaentstehung spricht (2).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich ebenfalls im Rattenmodell mit inhalativer Provokation. Auch hier waren besonders im Bereich der T-Helfer- und – Suppressorzellen deutliche Anstiege nach Provokation zu verzeichnen, was sich besonders am frühen Zeitpunkt nach Provokation nachweisen ließ (48). Auch hier zeigten sich zum Teil erhebliche Unterschiede zwischen prozentualer und absoluter Verteilung der T-Zellen.

Bezüglich der B-Lymphozyten wurde ebenfalls eine signifikante Zunahme 72 Stunden nach Allergenprovokation sowohl im allergenprovozierten als auch im Kontrollsegment beobachtet. Auch der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten zeigte, vor allem im provozierten Segment, einen Trend zu einer Zunahme der B-Lymphozyten.

Diese von uns beobachtete Erhöhung der Gesamtlymphozytenzahl bei allerdings nahezu gleich bleibender prozentualer Verteilung der Lymphozytensubpopulationen ist bekanntermaßen auch zu anderen Beobachtungszeitpunkten, z.B nach 6, nach 24 und nach 48 Stunden vorzufinden (25, 52, 32).

5.2.1. Expression von CD3 auf BAL- und Blutlymphozyten

72 Stunden nach Provokation kam es zu einem starken Anstieg der Absolutzahl der T-Lymphozyten im allergenprovozierten Segment, im Blut dagegen zeigte sich ein Trend zum Abfall der CD3-positiven Lymphozyten. Bei der prozentualen Auswertung kam es allerdings zu keiner nennenswerten Veränderung der T-Lymphozyten. Diese Beobachtungen, insbesondere auch das Fehlen einer Veränderung in der prozentualen Zellverteilung, decken sich mit früheren Studien (25, 52). In der zeitlichen Einordnung unserer Werte fiel auf, dass die Gesamt-Lymphozytenzahl zwar deutlich erhöht im Vergleich zum Ausgangswert direkt nach Provokation lag, jedoch im zeitlichen Ablauf nach einem Peak bei 42 Stunden schon deutlich abgefallen war. Bekannt ist, dass T-Zellen durch Produktion von Zytokinen, insbesondere von IL-5, die IgE-Produktion regulieren können und somit einen wichtigen Faktor bei der Pathogenese des Asthmas darstellen (2). Dies basiert unter anderem auf einer Regulierungs- und Kontrollfunktion auf unreife und auch reife Eosinophile (24). Eine Aktivierung von T-Zellen spielt somit nicht nur eine grundsätzliche Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthmas, sondern auch bei der akuten Exazerbation (50) und scheint darüber hinaus mit der Schwere der Erkrankung zu korrelieren (69)

Unsere Ergebnisse einer vermehrten T-Zellantwort noch 72 Stunden nach Allergenprovokation (noch bestehenden T-Zellerhöhung noch nach 72 Stunden) stützen diese Aussagen.

5.2.2. Expression von CD3/4 auf BAL- und Blutlymphozyten

T-Helferzellen zeigten ebenfalls 72 Stunden nach Allergenprovokation im provozierten Segment zu einem deutlichen Anstieg, während im Kontrollsegment

keine wesentliche Veränderung zu verzeichnen war. Auch die T-Helferzellen betreffend kam es zu einem leichten, wenn auch nicht signifikanten Abfall im Blut. Diese Beobachtung deckt sich mit früher erhobenen Ergebnissen (70, 102) und spricht für eine Einwanderung der T-Helferzellen aus dem Blut in das allergenprovozierte Lungensegment. Im direkten Vergleich war bei gesunden Kontrollprobanden kein Abfall der T-Helferzellen im peripheren Blut zu verzeichnen (102), während sich bei keiner der unterschiedlichen Gruppen eine Veränderung der prozentualen Verteilung zeigte, was wiederum den bereits früher publizierten Ergebnissen anderer Forschungsgruppen entspricht (25, 52, 32) und sich mit unseren aktuellen Beobachtungen deckt. Weiterhin haben frühere Untersuchungen gezeigt (49), dass bei Kindern mit klinisch kaum apparenter Milchallergie deutlich höhere Konzentrationen an T-Helferzellen im peripheren Blut vorhanden sind, als bei Kindern mit ausgeprägten klinischen Verläufen bei Milchallergie. Dies könnte ebenfalls für eine Migration der entsprechenden Zellen „an den Schauplatz des Geschehens“ bei ausgeprägten Symptomen wie der asthmatischen Spätreaktion sprechen.

Diese von uns erhobenen Zahlen lassen sich in die zeitlichen Verläufe früherer Studien einordnen. So wird beispielsweise in einer Studie von Krug et al. (57) ein starker Anstieg CD4-positiver T-Zellen 24 Stunden nach Allergenprovokation im Sinne einer Rekrutierung CD4-positiver Zellen in die Atemwege nach segmentaler Allergenprovokation beschrieben (70). Weiterhin gehen die erhöhten Zellzahlen CD4-positiver Lymphozyten einher mit der nach 72 Stunden noch deutlich erhöhten Anzahl eosinophiler Granulozyten. Ein entsprechender Zusammenhang mit der Produktion von Interleukin-5 durch T-Helferzellen mit konsekutiver Chemotaxis und Reifung und verlängertem Überleben der Zellen wurde bereits früher beschrieben (52). Weiterhin werden die Degranulation, Zytotoxizität, Adhäsion sowie die Produktion von Superoxiden durch eosinophile Granulozyten von Lymphokinen wie IL-5 beeinflusst (26).

Laut einer Studie von Hutchison et al. (41) existieren zwei Höhepunkte des Auftretens von Antigen-spezifischen T-Helferzellen in der Lunge. Der erste Peak trat hier noch vor dem Nachweis der T-Zellteilung in den Lymphknoten auf, was mit dem vermehrten Auftreten neutrophiler Granulozyten korrelierte und mit chemotaktischen Vorgängen in Verbindung gebracht wurde. Der zweite Peak zeigte sich mit dem Auftreten dieser Zellen in den Lymphknoten, was mit dem Höhepunkt der Infiltration

eosinophiler Granulozyten in den Bronchialraum zusammenfällt. Besonders auffällig war dieser Effekt zwei Tage nach Allergenstimulation.

In einer Studie bei Kindern mit allergischen Erkrankungen wurde ein Zusammenhang zwischen der Anzahl CD4-positiver T-Zellen und einem erhöhten IgE-Level beschrieben, wobei sich bei schwer erkrankten Kindern deutlich höhere Zahlen dieser Subgruppe nachweisen ließen (61). Dies deckt sich mit den IgE-vermittelten Symptomen einer asthmatischen Spätreaktion, welche durch vermehrte Migration CD4-positiver T-Lymphozyten erklärbar ist.

Den T-Lymphozyten kommt somit eine wichtige Rolle bei der Regulation der asthmatischen Spätreaktion zu, was durch hohe Zellzahlen bei der asthmatischen Spätreaktion (32) und die lang anhaltende Infiltration 72 Stunden nach Allergenprovokation untermauert wird.

5.2.3. Expression von CD3/8 auf BAL- und Blutlymphozyten

CD3/8-positiven Zellen zeigten eine deutlicher Zunahme im allergenprovozierten Segment 72 Stunden nach Provokation, was sich in der prozentualen Verteilung jedoch, wie auch schon bei den T-Helferzellen, nicht widerspiegelte. Ein leichter Anstieg der T-Suppressorzellen war im Kontrollsegment zu verzeichnen, was für eine unspezifische Reaktion spricht.

Auch hier deckt sich sowohl der beobachtete deutliche Anstieg CD8-positiver T-Lymphozyten im zeitlichen Ablauf, als auch das Fehlen einer Veränderung in der prozentualen Verteilung der Lymphozytensubpopulationen mit früheren Studien (57, 25, 52, 32). Dennoch scheinen CD8-positive T-Lymphozyten eine nicht unerhebliche Rolle in der Entstehung und vor allem Unterhaltung des allergischen Asthmas zu spielen, indem sie die inadäquate Immunantwort verstärken. Dies geschieht durch eine Regulation der IgE-Produktion sowie die Modulation über lokale Lymphknoten (56, 104). Der hier beobachtete Anstieg der absoluten Zahl an CD8-positiven T-Zellen könnte diese wichtige Rolle dieser Subpopulation bestätigen.

5.2.4. Expression von CD16/56 auf BAL- und Blutlymphozyten

Bei den natürlichen Killerzellen konnte ebenfalls eine signifikante Zunahme im allergenprovozierten Segment gemessen werden, dies zeigte sich ebenfalls sowohl im Vergleich zum ersten Messzeitpunkt, als auch im Vergleich zum Kontrollsegment. Auch hier ergab sich jedoch keine prozentuale Veränderung im Gesamtlymphozytenpool. Dies spricht für eine eher unspezifische Reaktion der NK-Zellen, ohne eine spezifische Immunantwort. Auch der Verlauf des veränderten NK-Zell-Levels deckt sich mit früher erhobenen Studien (71, 46 und 56-59) und weist auf eine zwar unspezifische, jedoch pathologische Rolle beim Asthma bronchiale hin.

5.2.5. Expression von CD19 auf BAL- und Blutlymphozyten

Die B-Lymphozytenzahl, die nach 72 Stunden im allergenprovozierten Lungensegment ermittelt wurde, zeigte sich deutlich erhöht gegenüber der ersten Messung. Ein leichter Anstieg war hier jedoch auch im Kontrollsegment zu beobachten, was wiederum am ehesten für eine unspezifische Reizung spricht.

Bei der prozentualen Zellverteilung allerdings war ein deutlich höherer Anteil an B-Zellen im allergenprovozierten Segment im Vergleich zum Kontrollsegment nachweisbar. Dies könnte auf die zielgerichtete Immunantwort durch die immunkompetenten B-Lymphozyten drei Tage nach Reizung durch ein Allergen zurückzuführen sein.

5.2.6. Expression von CD57 auf T-Helfer-, T-Suppressor- und NK-Zellen in der BAL und im Blut

Dem Oberflächenmarker CD57 wird eine Funktion bei Zell-Zelladhäsionen zugeschrieben, bei der Bestimmung dieses Moleküls auf T-Helfer-, T-Suppressor- und NK-Zellen zeigte sich bei jeder dieser Zellgruppen eine Abnahme der Expression von CD57 im allergenprovozierten Segment, sowie ein Trend zur Zunahme im Kontrollsegment nach 72 Stunden. Auf den Lymphozyten des Blutes war dagegen

ein leichter Abfall dieses Markers zu beobachten. In der Literatur wird ein Zusammenhang zwischen der Expression von CD57 auf T-Zellen und einer frühen Aktivierung zirkulierender Effektor-T-Zellen beschrieben, korrelierend mit einer vermehrten IL-4-Produktion (79). Dies deutet auf eine lediglich frühzeitige Funktion hin, welche nach 72 Stunden bereits beendet zu sein scheint. Auch bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wie der Wegener-Granulomatose oder der Polyangiitis wurden erhöhte Werte für CD57 auf T-Helferzellen gemessen, was jeweils mit der Schwere der Erkrankungen korrelierte und bei Patienten in Remission oder bei leichten Verläufen kaum nachweisbar war (42). Dies stützt die These, dass es sich hierbei eher um einen frühen Marker bei akuten Verläufen handelt.

5.3. Expression der Oberflächenmarker auf Leukozyten

5.3.1. Expression von CD49f auf BAL- und Blutleukozyten

Bei der Untersuchung der Expression von CD49f zeigte sich ein signifikanter Anstieg dieses Oberflächenmarkers im allergenprovozierten Segment 72 Stunden nach Provokation. Der Anstieg war sowohl im Vergleich zum Kontrollsegment, als auch im Vergleich zu den direkt nach Provokation gemessenen Werten zu verzeichnen.

Im Blut dagegen kam es zu einem deutlichen, wenn auch nicht signifikanten Abfall der CD49f-tragenden Eosinophilen. Dies ist als Hinweis darauf zu werten, dass die Fähigkeit der Eosinophilen zur Migration und Diapedese im Rahmen der asthmatischen Entzündung zunimmt. Weiterhin spielt das Oberflächenmolekül CD49f eine Rolle bei der T-Zellaktivierung, auch dies steht im Einklang mit unseren Untersuchungsergebnissen, da es auch hier im gleichen Zeitraum zu einer deutlichen Zunahme der Absolutzellzahl im allergenprovozierten Segment kommt, wohingegen im Blut eher ein Trend zum Abfall der Anzahl der T-Zellen zu verzeichnen ist, was ein Hinweis für die Migration der Lymphozyten aus dem peripheren Blut in das Bronchialsystem ist.

5.3.2. Expression von CD66acde und CD66b auf BAL- und Blutleukozyten

Bezüglich der Expression des Oberflächenmarkers CD66acde kam es ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg auf den eosinophilen Leukozyten im allergenprovozierten Segment nach 72 Stunden.

Bei den neutrophilen Leukozyten war ein Anstieg der Expression von CD66acde zu erkennen, allerdings kam es nicht nur im allergenprovozierten, sondern auch im Kontrollsegment nach 72 Stunden zu einem deutlichen Anstieg dieses Markers. Dies lässt auf eine eher allgemeine, unspezifische Aktivierung der neutrophilen Granulozyten schließen.

Im Gegensatz dazu war bei den Makrophagen lediglich im NaCl-provozierten Kontrollsegment ein Anstieg der Expression dieses untersuchten Markers zu beobachten.

Dies alles steht im Einklang mit der für CD66acde bekannten Funktion der Granulozytenaktivierung (85), was wiederum zu Zellaggregation und Aktivierung der Proteinkinase führt (81). Diese wiederum spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der Zellen, was zum Beispiel zur Aktivierung von Neutrophilen und deren Anheftung an Fibronectin führt (73).

Ebenfalls dem Marker CD66b direkt wird eine Neutrophilen-aktivierende Funktion zugeschrieben. Auch dies spiegelt sich in einem deutlichen Anstieg der neutrophilen Granulozyten nach 72 Stunden sowohl im allergenprovozierten, als auch im Kontrollsegment wider.

Im Blut dagegen war ein Trend zum Abfall der CD66b-exprimierenden Neutrophilen zu beobachten. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits im Zusammenhang mit allergischer Rhinitis berichtet (53); auch hier wurde eine mit verursachende Rolle neutrophiler Granulozyten im Entzündungsprozess angenommen.

Laut früherer Studien (81) führt die Granulozytenstimulation über CD66b zu einer Freisetzung von bereits intrazellulär gespeichertem Interleukin-8, was wiederum als chemotaktischer Reiz für andere Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen, wirkt. Dies wird durch den von uns beobachteten Anstieg CD66b-tragender Granulozyten bestätigt.

Weitere Studien beschreiben einen möglicherweise kausalen Zusammenhang zwischen dem gehäuften Vorkommen CD66b-exprimierender neutrophiler Granulozyten und dem Auftreten von Colitis ulcerosa (51). Eine mögliche ähnliche

Pathogenese dieser beiden entzündlichen Erkrankungen, des allergischen Asthma bronchiale und der Colitis ulcerosa, bleibt zu untersuchen.

Weiterhin kommt es auch bei diesem Oberflächenmolekül zu einem deutlichen Anstieg der Expression bei den eosinophilen Granulozyten im allergenprovozierten Segment im Vergleich zum Zeitpunkt zehn Minuten nach Provokation sowie auch im Vergleich zum Kontrollsegment, während im Blut eher ein Trend zur Abnahme der CD66b-tragenden Eosinophilen zu verzeichnen war.

Hinsichtlich der CD66b-Expression von Makrophagen kam es zu keiner wesentlichen Veränderung nach Provokation sowie zwischen provoziertem und Kontrollsegment.

5.3.3. Expression von CD69 auf BAL- und Blutleukozyten

Bezüglich der Expression von CD69 war nach 72 Stunden ein signifikanter Anstieg der eosinophilen Granulozyten im allergenprovozierten Segment im Vergleich zum Kontrollsegment zu verzeichnen. Dieser Anstieg war allerdings lediglich auf den Eosinophilen zu beobachten. Der Oberflächenmarker CD69 kommt auf einer Vielzahl von Zellen der hämatopoetischen Reihe vor und gilt insbesondere als Aktivierungsmarker von T-Lymphozyten und Eosinophilen.

Nach Testi et al. beginnt die CD69-Expression auf T-Lymphozyten in vitro 2-3 Stunden nach Aktivierung und erreicht ihr Maximum nach 18-24 Stunden (92, 108). In der vorliegenden Arbeit konnte 72 Stunden nach Allergenexposition noch eine deutliche Steigerung der Expression von CD69 auf eosinophilen Granulozyten des allergenstimulierten Lungensegmentes beobachtet werden. Dies bestätigt die Bedeutung von CD69 als Aktivierungsmarker auf Eosinophilen, die bereits in früheren Studien gezeigt wurde (39, 44). Weiter zeigte sich auch eine Abhängigkeit der Eosinophilenaktivierung von der Allergenexposition (46).

10 Minuten nach NaCl- und Allergenprovokation zeigte sich bereits eine basale CD69-Expression auf Eosinophilen. Dies entspricht einem ständigen Aktivierungszustand von Eosinophilen bei Asthmatikern im Gegensatz zu Gesunden (36, 74). In vitro steigt die CD69-Expression auf eosinophilen Granulozyten nach Stimulation mit IL-3, IL-5, IL-13, und GM-CSF. Da in anderen Studien eine erhöhte Konzentration von IL-5, IL-13 und GM-CSF in der BAL nach segmentaler Allergenprovokation nachgewiesen wurde (44, 98), könnte es sich bei der verstärkten

CD69-Expression auf Eosinophilen um einen Effekt dieser Zytokine im peribronchialen Gewebe handeln.

Über die Wirkung von CD69 auf der Oberfläche von Eosinophilen ist wenig bekannt. Walsh et al. beschrieben eine erhöhte Apoptoseneigung nach Kreuzvernetzung durch Antikörper (100). Die Apoptose von Eosinophilen wäre beim Asthma bronchiale ein wünschenswerter Vorgang, da hierdurch ihre entzündungsfördernde Wirkung gebremst würde. Jedoch scheint gerade dieser Mechanismus bei eosinophilen Granulozyten von Asthmatikern gehemmt zu sein (84).

Eine frühere Studie (101), in der jedoch lediglich ein Mausmodell untersucht wurde, beschreibt einen möglicherweise direkten Zusammenhang zwischen der Präsenz CD69-tragender Eosinophiler und einer Entzündung der Atemwege.

5.3.4. Expression von CDw125 auf BAL- und Blutleukozyten

Das Oberflächenmolekül CDw125 ist Bestandteil des IL-5-Rezeptors. Dieser besteht aus einer α - und einer β -Kette, wobei die α -Kette als spezifische Bindungsstelle für IL-5 dient (14, 35). Durch alternatives Spleißen kann eine membrangebundene und eine lösliche Form der α -Kette entstehen. Zu 90% liegt sie in löslicher Form vor und kann so die Wirkung von IL-5 antagonisieren (13). Das von uns gemessene Oberflächenmolekül CDw125 hat seine Bedeutung als Bestandteil der α -Kette. Wie frühere Studien zeigen konnten, steigt nach Allergenprovokation die Produktion von IL-5 in der Bronchialschleimhaut.

So wurde 42 Stunden nach segmentaler Allergenprovokation vermehrt IL-5 in der BAL nachgewiesen (9). Nach inhalativer Allergenprovokation konnte in Bronchialbiopsien eine Zunahme der IL-5 mRNA vor allem in Th2-Lymphozyten beobachtet werden (5). Die Abnahme von IL-5R α auf Eosinophilen der BAL 72 Stunden nach segmentaler Allergenprovokation ließe sich mit einer Herunterregulierung des Rezeptors durch die erhöhte IL-5-Konzentration erklären. Somit läge ein Kompensationsmechanismus vor, der eine überschießende Wirkung dieses Zytokins verhindert.

Diese Vermutung wird durch in vitro Untersuchungen von Wang et al. unterstützt, bei denen es nach Kultivierung von Bluteosinophilen mit IL-3, IL-5 und GM-CSF zu einer

Herabregulation der IL-5R α mRNA kam. Die mRNA für IL-3R α und GM-CSFR α wurde hingegen hochreguliert (103). Es wäre denkbar, dass anstelle der membrangebundenen Form mehr von der löslichen Variante des IL-5R α produziert wird, die in der Lage ist, IL-5 abzufangen und so seine Wirkung zu dämpfen.

Devos et al. beschrieben eine rekombinante Form der löslichen α -Kette, die mit dem membrangebundenen Rezeptor auf Eosinophilen um das freie IL-5 konkurriert und dadurch die IL-5-vermittelte Proliferation der Zellen hemmen kann (21). Je größer die Menge der löslichen IL-5R α -Kette, umso höher ist die gemessene FEV₁.

Die membrangebundene Variante dagegen zeigt eine negative Korrelation zur FEV₁ (107). Dies hebt die Bedeutung von löslichem IL-5R α als Gegengewicht zur proinflammatorischen Wirkung von IL-5 hervor.

Auch hinsichtlich der Expression von CDw125 zeigten sich in unseren Untersuchungen die einzigen Veränderungen in der Zellgruppe der eosinophilen Granulozyten; hierbei kam es insbesondere zu einer signifikant geringeren Expression im allergenprovozierten Segment nach 72 Stunden im Vergleich zum untersuchten Kontrollsegment. Dies könnte sich durch die oben beschriebenen Mechanismen der Herunterregulierung des Rezeptors als Kompensationsmechanismus erklären.

5.4. Besonderheiten des Mausmodells

Auffällig ist insbesondere eine deutliche Diskrepanz der hier beschriebenen Kinetik der Zellpopulationen im Vergleich zur bekannten Zellkinetik beim Mausmodell. Dies kann, wie andere Studien belegen, in der nicht unbeträchtlichen Differenz der Physiologie und Pathophysiologie der einzelnen Unterarten begründet sein, lediglich große Tierarten eignen sich hinsichtlich der pathophysiologischen Vorgänge zum Vergleich mit dem Menschen (54).

Dieser Aspekt ist für weitere Folgestudien enorm wichtig, da die Übertragbarkeit des bislang standardmäßig angewandten Mausmodells stark bezweifelt werden muss. Diese Studie beweist die erhebliche Diskrepanz der zellulären Vorgänge beim Asthma bronchiale zwischen den einzelnen Arten und stellt damit die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Tier auf den Menschen in Frage.

6. Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit untersuchte die Früh- und Spätreaktion der asthmatischen Entzündung am Modell der segmentalen Allergenprovokation. Hierfür wurden 8 Probanden mit allergischem Asthma bronchiale segmental provoziert und nach 10 Minuten und 72 Stunden bronchoalveolär lavagiert.

Weiterhin erfolgten unmittelbar vor und 72 Stunden nach SAP Blutentnahmen zur Zellgewinnung. Die aus der BAL und dem Blut gewonnenen Zellen wurden unter dem Mikroskop differentiell ausgezählt und durchflusszytometrisch auf oben genannte Oberflächenmoleküle untersucht.

- 72 Stunden nach SAP wurde eine signifikante Zunahme des Adhäsionsmoleküls CD49f auf eosinophilen Granulozyten gemessen, was für deren verstärkte Migration ins Entzündungsgebiet spricht.
- Auch die Expression von CD69 auf Eosinophilen war nach diesem Zeitraum noch immer deutlich erhöht. Dies ist als Hinweis auf eine, über das Maximum der zellulären Infiltration, welches bei ca. 42 Stunden liegt, fortdauernde Aktivierung dieser Zellen durch den Allergenreiz zu werten.
- Weiterhin wurde eine signifikante Abnahme der IL-5R α -Kette auf Eosinophilen beobachtet. Diese Ergebnisse sprechen für eine Herunterregulation des für die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten wichtigen Rezeptors durch seinen eigenen Liganden.
- Die Kinetik der Lymphozyten-Subpopulationen zeigt eine deutlich erhöhte absolute Zahl an T-Lymphozyten. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit nochmals die erhebliche Rolle der T-Lymphozyten bei der Spätreaktion des Asthma bronchiale unterstrichen werden.
- Bei der Einordnung in die bereits beschriebenen zellulären Kinetikvorgänge fällt insbesondere eine deutliche Diskrepanz zum Mausmodell auf, was die Übertragbarkeit der am Mausmodell erhobenen wissenschaftlichen Erkenntnisse im Bereich der Asthmaforschung fraglich macht.

7. Literaturverzeichnis

1. Anonymous (1987) Guidelines for fiberoptic bronchoscopy in adults. American Thoracic Society. Medical Section of the American Lung Association. *Am Rev Respir Dis* 136, 1066
2. Azzawi, M, B Bradley, PK Jeffery, AJ Frew, AJ Wardlaw, G Knowles, B Assoufi, JV Collins, S Durham, AB Kay 1990. Identification of Activated T Lymphocytes and Eosinophils in Bronchial Biopsies in Stable Atopic Asthma. *Am Rev Respir Dis.* 142:1407-1413
3. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998. 392:245-252
4. Beasley R, Crane J, Lai CK, Pearce N (2000) Prevalence and etiology of asthma. [Review] [65 refs]. *J Allergy Clin Immunol* 105, S466-S472
5. Bentley AM, Meng Q, Robinson DS, Hamid Q, Kay AB, Durham SR (1993) Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8, 35-42
6. Betts RJ, Kemeny DM (Singapore 2008). CD8+ T cells in asthma: friend or foe? *Pharmacology and Therapeutics* 2008.09.001
7. Bingham CO III, Austen KF (2000) Mast-cell responses in the development of asthma. [Review] [106 refs]. *J Allergy Clin Immunol* 105, S527-S534
8. Bischoff SC, Sellge G, Manns MP, Lorentz A (2001) Interleukin-4 induces a switch of human intestinal mast cells from proinflammatory cells to Th2-type cells. *Int Arch Allergy Immunol* 124, 151-154
9. Böser K (2001) Immunologische Veränderungen der asthmatischen Spätreaktion 42 Stunden nach segmentaler Allergenprovokation. *Dissertation*. Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik, Abt. Pneumologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

10. Bousquet J, Chanez P, Vignola AM, Lacoste JY, Michel FB (1994) Eosinophil inflammation in asthma. [Review] [105 refs]. *Am J Respir Crit Care Med* 150, S33-S38
11. Bratke K, Lommatzsch M, Julius P, et al. Dendritic cell subsets in human bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge. *Thorax* 2007;62:168-75.,
12. Busse, W. W., and R. F. Lemanske, Jr. 2001. Asthma. *N Engl J Med* 344(5):350-62.
13. Cameron L, Christodoulopoulos P, Lavigne F, Nakamura Y, Eidelman D, McEuen A, Walls A, Tavernier J, Minshall E, Moqbel R, Hamid Q (2000). Evidence for local eosinophil differentiation within allergic nasal mucosa: inhibition with soluble IL-5 receptor. *J Immunol* 164, 1538-1545
14. Carr PD, Gustin SE, Church AP, Murphy JM, Ford SC, Mann DA, Woltring DM, Walker I, Ollis DL, Young IG (2001) Structure of the complete extracellular domain of the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3, and IL-5 receptors reveals a novel dimer configuration. *Cell* 104, 291-300
15. Cebrian M, Yague E, Rincon M, Lopez-Botet M, de Landazuri MO, Sanchez-Madrid F (1988) Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med* 168, 1621-1637
16. Cieslewicz, G., A. Tomkinson, A. Adler, C. Duez, J. Schwarze, K. Takeda, K. A. Larson, J. J. Lee, C. G. Irvin, and E. W. Gelfand. 1999. The late, but not early, asthmatic response is dependent on IL-5 and correlates with eosinophil infiltration. *J Clin Invest* 104(3):301-8.
17. Colavita AM, Reinach AJ, Peters SP (2000) Contributing factors to the pathobiology of asthma. The Th1/Th2 paradigm. [Review] [124 refs]. *Clin Chest Med* 21, 263-277
18. Cooper MD (1987) Current concepts. B lymphocytes. Normal development and function. [Review] [27 refs]. *New Engl J Med* 317, 1452-1456

19. De Maria R, Cifone MG, Trotta R, Rippo MR, Festuccia C, Santoni A, Testi R (1994) Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *J Exp Med* 180, 1999-2004
20. Denburg JA, Sehmi R, Upham J, Wood L, Gauvreau G, O'Byrne P (1999) Regulation of IL-5 and IL-5 receptor expression in the bone marrow of allergic asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol* 118, 101-103
21. Devos R, Plaetinck G, Cornelis S, Guisez Y, Van d, Heyden J, Tavernier J (1995) Interleukin-5 and its receptor: a drug target for eosinophilia associated with chronic allergic disease. [Review] [60 refs]. *J Leukoc Biol* 57, 813-819
22. Dupuis, R, DS Collins, YY Koh, M Pollice, KH Albertine, JE Fish, SP Peters 1992. Effect of antigen dose on the recruitment of inflammatory cells to the lung by segmental antigen challenge. *J Allergy Clin Immunol.* 89:850-7
23. Ferguson AC, Whitelaw M, Brown H (1992) Correlation of bronchial eosinophil and mast cell activation with bronchial hyperresponsiveness in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 90, 609-613
24. Frangova V, Sacco O, Silvestri M, Oddera S, Balbo A, Crimi E, Rossi GA (1996) BAL neutrophilia in asthmatic patients. A by-product of eosinophil recruitment? [see comments]. *Chest* 110, 1236-1242
25. Frew, AJ, AB Kay 1990. Eosinophils and T-lymphocytes in late-phase allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol.* 85(3):533-9.
26. Frew, AJ., J. St.-Pierre, LM. Teran, A. Trefilieff, J. Madden, D. Peroni, KM. Bodey, AF. Walls, PH. Howarth, MP. Carroll, ST. Holgate 1996. Cellular and mediator responses twenty-four hours after local endobronchial allergen challenge of asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol.* 98:133-43
27. Gavioli R, Risso A, Smilovich D, Baldissarro I, Capra MC, Bargellesi A, Cosulich ME (1992) CD69 molecule in human neutrophils: its expression and role in signal-transducing mechanisms. *Cell Immunol* 142, 186-196

28. Gleich, GJ 1990. The eosinophil and bronchial asthma: Current understanding. *J Allergy Clin Immunol.* 85(2):422-36.
29. Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM (1993) The biology of the eosinophilic leukocyte. [Review] [90 refs]. *Annu Rev Med* 44, 85-101
30. Gordon S (1995) The macrophage. [Review] [30 refs]. *Bioessays* 17, 977-986
31. Gosset P, Tsiopoulos A, Wallaert B, Joseph M, Capron A, Tonnel AB (1992) Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by human mononuclear phagocytes from allergic asthmatics after IgE-dependent stimulation. *Am Rev Respir Dis* 146, 768-774
32. Gratziou, C., S. Montefort, L. Teran, PH. Howarth, ST. Holgate 1996. Inflammatory and T-cell Profile of Asthmatic Airways 6 Hours after Local Allergen Provocation. *Am J Respir Crit Care Med.* 153:515-20
33. Grimminger F, Suttrop N, Seeger W (1998) Lungen- und Atemwegserkrankungen; Krankheiten der oberen und unteren Atemwege, Asthma bronchiale. In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K (Hg.) *Innere Medizin.* 4. Aufl. Urban und Schwarzenberg, München, S. 1393-1399
34. Hamann J, Fiebig H, Strauss M (1993) Expression cloning of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain. *J Immunol* 150, 4920-4927
35. Hamelmann E, Gelfand EW (1999) Role of IL-5 in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness. [Review] [100 refs]. *Int Archiv Allergy Immunol* 120, 8-16
36. Hartnell A, Robinson DS, Kay AB, Wardlaw AJ (1993) CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology* 80, 281-286
37. Hashizume H, Horibe T, Yagi H, Seo N, Takigawa M. Compartmental imbalance and aberrant immune function of blood CD123+ (plasmacytoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cells in atopic dermatitis. *J Immunol* 2005;174:2396-403.,

38. Henderson, A. C., E. P. Ingenito, H. Atileh, E. Israel, B. Suki, and K. R. Lutchen. 2003. How Does Airway Inflammation Modulate Asthmatic Airway Constriction? an Antigen Challenge Study. *J Appl Physiol* 18:18.
39. Hochheim D (2000) Untersuchung zur Expression von IL-5R, IL-4R, IL-2- α R, CD49d, CD69 und CD95 nach segmentaler Allergenprovokation beim allergischen Asthma bronchiale. *Dissertation*. Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik, Abt. Pneumologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.
40. Holgate, S.T. 1993. Asthma: past, present and future. *Eur Respir J.* 6:1507-1520
41. Hutchison S, Choo-Kang BSW, Gibson VB, Bundick RV, Leishman AJ, Brewer JM, McInnes IB, Garside P (Glasgow, 2008). An investigation of the impact of the location and timing of antigen-specific T cell division on airways inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*, Volume 155 Issue 1, Pages 107-116.
42. Iking-Konert C, Vogl T, Prior B, Bleck E, Ostendorf B, Aandrassy K, Schneider M, Hänsch GM, Düsseldorf (2009). Expression of CD57 on CD8+ T lymphocytes of patients with Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis: evidence for continuous activation of CD8+ cells. *Clin Exp Rheumatol.* 2009 Jan – Feb; 27 (1 Suppl 52): S19-24
43. Jarjour NN, Sedgwick JB, Swensen CA, Busse WW (1997) Late allergic airway response to segmental bronchopulmonary provocation in allergic subjects is related to peripheral blood basophil histamine release. *J Allergy Clin Immunol* 99, 87-93
44. Julius P (1998) Definition der asthmatischen Entzündung am Modell der Allergenprovokation der Lunge beim Menschen. *Dissertation*. Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik, Abt. Pneumologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.
45. Julius P, Lommatzsch M, Kuepper M, Bratke K, Faehndrich S, Luttmann W, Virchow JC (2008). Safety of segmental allergen challenge in human allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Mar; 121 (3): 712-7

-
46. Julius P., W. Luttmann, B. Knoechel, C. Kroegel, H. Matthys, J.C. Virchow Jr 1999. CD69 surface expression on human lung eosinophils after segmental allergen provocation. *Eur Respir J.* 13:1253-1259
 47. Jungwirt, F. (2001) Einfluß der segmentalen Allergenprovokation auf das Zytokinmuster und die Expression von Oberflächenmolekülen in der bronchoalveolären Lavage und im Blut beim allergischen Asthma bronchiale. *Dissertation.* Medizinische Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.
 48. Jurawitz M-C, Luhrmann A, Tschernig T, Pabst R (Hannover 2009), Kinetics of Regulatory T Cells in the Ovalbumin Asthma Model in the Rat. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149: 16-24
 49. Karlsson MR, Rugtreit J, Brandtzaeg P (2004). Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med.* 2004 Jun 21; 199 (12): 1679-88
 50. Katsunuma T, Kawahara H, Suda T, Ishii T, Ohya Y, Akasawa A, Saito H, Oshida T, Sugita Y (2004). Analysis of gene expressions of T cells from children with acute exacerbations of asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004 May; 134 (1): 29-33
 51. Kayo, S., Y. Ikura, T. Suekane, N. Shirai, Y. Sugama, M. Ohsawa, K. Adachi, K. Watanabe, S. Nakamura, Y. Fujiwara, N. Oshitani, K. Higuchi, K. Maeda, K. Hirakawa, T. Arakawa, M. Ueda 2006. Close association between activated platelets and neutrophils in active the phase of ulcerative colitis in humans. *Inflamm Bowel Dis.* 12(8):727-35
 52. Kelly, EAB., RR. Rodriguez, WW. Busse, NN. Jarjour 1997. The Effect of Segmental Bronchoprovocation with Allergen on Airway Lymphocyte Function. *Am J Respir Crit Care Med.* 156:1421-1428
 53. Kinhult, J., A. Egesten, M. Benson, R. Uddman, LO. Cardell 2003. Increased expression of surface activation markers on neutrophils following migration into the nasal lumen. *Clin Exp Allergy.* 33(8):1141-6
 54. Kirschvink N, Reinhold P (Namur 2008), Use of alternative animals as asthma models. *Curr Drug Targets,* 2008 Jun; 9 (6): 470-84

-
55. Kroegel C, Virchow JC Jr, Luttmann W, Walker C, Warner JA (1994) Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). [Review] [322 refs]. *Eur Respir J* 7, 519-543
 56. Kroegel C, Warner JA, Virchow JC Jr, Matthys H (1994) Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part II). [Review] [245 refs]. *Eur Respir J* 7, 743-760
 57. Krug, N., W. Cruikshank, T. Tschernig, VJ. Erpenbeck, K. Balke, JM. Hohlfeld, DM. Center, H. Fabel 2000. Interleukin 16 and T-cell Chemoattractant Activity in Bronchoalveolar Lavage 24 Hours after Allergen Challenge in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 162(1):105-11
 58. Krug N, Teran LM, Redington AE, Gratziau C, Montefort S, Polosa R, Brewster H, Howarth PH, Holgate ST, Frew AJ, Carroll MP (1996) Safety aspects of local endobronchial allergen challenge in asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 1391-1397
 59. Kummer and Clark/ ST Holgate and A Frew (2002) Respiratory Disease; Asthma. In: Kummer and Clark *Clinical Medicine* 5th Edition Saunders, London, S. 874-84
 60. Lamblin, C., P. Gosset, I. Tillie-Leblond, F. Saulnier, C. H. Marquette, B. Wallaert, and A. B. Tonnel. 1998. Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med* 157(2):394-402.
 61. Lee, J-H; Yu, H-H; Wang, L-C; Yang, Y-H; Lin, Y-T; Chiang, B-L (Taiwan, 2007). The levels of CD4+CD25+ regulatory T cells in paediatric allergic rhinitis and bronchial asthma. *Clin Exp Immunol*, 2007 April; 148 (1): 53-63
 62. Lommatzsch, M., P. Julius, M. Kuepper, H. Garn, K. Bratke, S. Irmscher, W. Luttmann, H. Renz, A. Braun, JC. Virchow 2006. The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 118(1):91-7.
 63. Luttmann W, Knoechel B, Foerster M, Matthys H, Virchow JC Jr, Kroegel C (1996) Activation of human eosinophils by IL-13. Induction of CD69 surface

- antigen, its relationship to messenger RNA expression, and promotion of cellular viability. *J Immunol* 157, 1678-1683
64. Lydyart P, Grossi C (1995) Zellen der Immunantwort. In: Roitt IM, Brostoff J, Male DK (Hg.) *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. 3. Aufl. Thieme, Stuttgart, S. 12– 30
65. Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Rugiu FS, De Carli M, Ricci M, Romagnani S (1992) Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 148, 2142-2147
66. Male D (1995) Zellmigration und Entzündung. In: Roitt IM, Brostoff J, Male DK (Hg.) *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. 3. Aufl. Thieme, Stuttgart, S. 174-180
67. Matsuda H, Suda T, Hashizume H, et al. Alteration of balance between myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood of patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1050-4.
68. Matsumoto K, Appiah-Pippim J, Schleimer RP, Bickel CA, Beck LA, Bochner BS (1998) CD44 and CD69 represent different types of cell-surface activation markers for human eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18, 860-866
69. McFadden ER, Jr, Hejal RB (2000) The pathobiology of acute asthma. [Review] [90 refs]. *Clin Chest Med* 21, 213-224
70. Metzger, HJ, D Zavala, HB Richerson, P Moseley, P Iwamota, M Monick, K Sjoerdsma, GW Hunninghake 1987. Description of the Model and Local Airway Inflammation. *Am Rev Respir Dis*. 135:433-440
71. Meyer EH, DeKruyff RH, Umetsu DT (2008). T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annu Rev Med*. 2008; 59: 281-92
72. Muro S, Minshall EM, Hamid QA (2000) The pathology of chronic asthma. [Review] [191 refs]. *Clin Chest Med* 21, 225-244
73. Nair, KS., SM. Zingde 2001. Adhesion of neutrophils to fibronectin: role of the CD66 antigens. *Cell Immunol* 208(2):96-106

-
74. Okubo Y, Hossain M, Kai R, Sato E, Honda T, Sekiguchi M, Itoh S, Takatsu K (1995) Adhesion molecules on eosinophils in acute eosinophilic pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 151, 1259-1262
 75. Pistoia V (1997) Production of cytokines by human B cells in health and disease. [Review] [81 refs]. *Immunol Today* 18, 343-350
 76. Ramirez R, Carracedo J, Zamzami N, Castedo M, Kroemer G (1994) Pertussis toxin inhibits activation-induced cell death of human thymocytes, pre-B leukemia cells and monocytes. *J Exp Med* 180, 1147-1152
 77. Riede UN, Costabel U (1993) Respiratorisches System; Tracheobronchialsystem, Asthma bronchiale. In: Riede UN, Schaefer HE (Hg.) *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 3. Aufl. Thieme, Stuttgart, S. 612–14
 78. Robinson, D., Q. Hamid, A. Bentley, S. Ying, AB. Kay, SR. Durham 1993. Activation of CD4+ T cells, increased T_{H2}-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 92:313-24
 79. Rojas-Ramos, Enrique; Garfias, Yonathan; Jiménez-Martínez, María del Carmen; Martínez-Jiménez, Norma; Zenteno, Edgar; Gorocica, Patricia; Lascurain, Ricardo. Increased expression of CD30 and CD57 molecules on CD4+ T cells from children with atopic asthma: A preliminary report. *Allergy and Asthma Proceedings, Volume 28, Number 6, November-December 2007*, pp.659-666 (8)
 80. Schroeder JT, Lichtenstein LM, Roche EM, Xiao H, Liu MC (2001) IL-4 production by human basophils found in the lung following segmental allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 107, 265-271
 81. Schroder, AK., P. Uciechowski, D. Fleischer, L. Rink 2006. Crosslinking of CD66B on peripheral blood neutrophils mediates the release of interleukin-8 from intracellular storage. *Hum Immunol*. 67(9):676-82
 82. Sehmi R, Denburg JA (2000) Differentiation of human eosinophils. Role in allergic inflammation. [Review] [99 refs]. *Chem Immunol* 76, 29-44

83. Sibille Y, Marchandise FX (1993) Pulmonary immune cells in health and disease: polymorphonuclear neutrophils. [Review] [130 refs]. *Eur Respir J* 6, 1529-1543
84. Simon HU, Blaser K (1995) Inhibition of programmed eosinophil death: a key pathogenic event for eosinophilia? [see comments]. [Review] [27 refs]. *Immunol Today* 16, 53-55
85. Skubitz, KM., KD. Campbell, K. Ahmed, AP. Skubitz 1995. CD66 family members are associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J. Immunol.* 155(11):5382-90
86. Skubitz, KM. (2), KD. Campbell, AP. Skubitz 1996. CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J Leukoc Biol.* 60(1):106-17
87. Stepling H, Ferlinz R (1996) Atmungsorgane; Erkrankungen der Atemwege, Asthma bronchiale. In: Gross R, Schölmerich P, Gerok W (Hg.) *Die Innere Medizin.* 9. Aufl. Schattauer, Stuttgart, S. 414-420
88. Sur, S, H Kita, GJ Gleich, TC Chenier, LW Hunt 1996. Eosinophil recruitment is associated with IL-5, but not with RANTES, twenty-four hours after allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol.* 97:1272-8
89. Tavernier J, Van der HJ, Verhee A, Brusselle G, Van OX, Vandekerckhove J, North J, Rankin SM, Kay AB, Robinson DS (2000) Interleukin 5 regulates the isoform expression of its own receptor alpha-subunit. *Blood* 95, 1600-1607
90. Teran LM, Carroll MP, Frew AJ, Redington AE, Davies DE, Lindley I, Howarth PH, Church MK, Holgate ST (1996) Leukocyte recruitment after local endobronchial allergen challenge in asthma. Relationship to procedure and to airway interleukin-8 release. *Am J Respir Crit Care Med* 154, 469-476
91. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A (1994) The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. [Review] [39 refs]. *Immunol Today* 15, 479-483
92. Testi R, Phillips JH, Lanier LL (1989) Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor

- cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca⁺⁺] and stimulation of protein kinase C. *J Immunol* 142, 1854-1860
93. Testi R, Pulcinelli F, Frati L, Gazzaniga PP, Santoni A (1990) CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation. *J Exp Med* 172, 701-707
94. Uchida Y, Kurasawa K, Nakajima H, et al. Increase of dendritic cells of type 2 (DC2) by altered response to IL-4 in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:1005-11.
95. Vermaelen K, Pauwels R. Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2005. 172530-551
96. Vignola AM, Bonanno A, Mirabella A, Riccobono L, Mirabella F, Profita M, Bellia V, Bousquet J, Bonsignore G (1998) Increased levels of elastase and alpha1-antitrypsin in sputum of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 505-511
97. Vignola AM, Chanez P, Bonsignore G, Godard P, Bousquet J (2000) Structural consequences of airway inflammation in asthma. [Review] [63 refs]. *J Allergy Clin Immunol* 105, S514-S517
98. Virchow JC Jr, Walker C, Hafner D, Kortsik C, Werner P, Matthys H, Kroegel C (1995) T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 151, 960-968
99. Walker C, Bode E, Boer L, Hansel TT, Blaser K, Virchow JC (1992) Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 146, 109-115
100. Walsh GM, Williamson ML, Symon FA, Willars GB, Wardlaw AJ (1996) Ligation of CD69 induces apoptosis and cell death in human eosinophils cultured with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 87, 2815-2821

-
101. Wang, HY., HH. Shen, JJ. Lee, NA. Lee 2006. CD69 expression on airway eosinophils and airway inflammation in a murine model of asthma. *Chin Med J (Engl)*. 119(23):1983-90
102. Wang L-H, Lin Y-H, Yang J, Guo W (Wuhan, 2009). Insufficient Increment of CD4+CD25+ Regulatory T Cells after Stimulation in vitro with Allergen in Allergic Asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 148: 199-210
103. Wang P, Wu P, Cheewatrakoolpong B, Myers JG, Egan RW, Billah MM (1998) Selective inhibition of IL-5 receptor alpha-chain gene transcription by IL-5, IL-3, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human blood eosinophils. *J Immunol* 160, 4427-4432
104. Wells JW, Cowled CJ, Giorgini A, Kemeny D, Noble A (London, 2006). Regulation of allergic airway inflammation by class I-restricted allergen presentation and CD8 T-cell infiltration. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* Volume 119, Issue 1, January 2007, Pages 226-234
105. Wenzel, S, ST Holgate 2006. The mouse trap: It still yields few answers in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 174(11):1173-6
106. Yamada T, Sun Q, Zeibecoglou K, Bungre J, North J, Kay AB, Lopez AF, Robinson DS (1998) IL-3, IL-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha-subunit, and common beta-subunit expression by peripheral leukocytes and blood dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 101, 677-682
107. Yasruel Z, Humbert M, Kotsimbos TC, Ploysongsang Y, Minshall E, Durham SR, Pfister R, Menz G, Tavernier J, Kay AB, Hamid Q (1997) Membrane-bound and soluble alpha IL-5 receptor mRNA in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 1413-1418
108. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR (1994). The activation antigen CD69. [Review] [60 refs]. *Stem Cells* 12, 456-465

*Für Jörg und Nils
Meinen Eltern
und Nelly*

Danksagung

Bei meinem Doktorvater, Prof. J. Chr. Virchow, möchte ich mich für seine Betreuung und Unterstützung bei meiner Doktorarbeit und für die Übernahme der Dissertation als Doktorvater bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen meinen Probanden, ohne die die praktische Durchführung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank geht auch an alle Mitarbeiter des pneumologischen Labors der Uniklinik Rostock, insbesondere den MtAs Inka und Petra und ganz besonders Kai Bratke, der mir bei allen Irrungen und Wirrungen der Laborarbeit und vor allem bei der praktischen Durchführung der Durchflusszytometrie jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen, vielen Dank Euch allen!!

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Peter Julius, der die Arbeit nicht nur in üblicher Weise betreut hat, sondern mir bei allen Problemen mit überdurchschnittlichem Einsatz geholfen und mich unterstützt hat. Du bist ein echter Held! Und das nicht zuletzt aufgrund der selbstlosen Bewirtung und Unterbringung meiner ganzen Familie, um die letzten Korrekturen durchzuführen.

Last but not least danke ich meiner ganzen Familie für ihre Unterstützung und stets die richtigen Worte zur Aufmunterung.

