

Aus der  
Medizinischen Klinik - Innenstadt  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Einfluss von Zigarettenrauchextrakt und Nikotin auf  
die bronchiale Kontraktion in murinen  
Lungenschnitten**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Eugen Streck  
aus Dshetygara / Kasachstan

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. R. M. Huber
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Helmut Kreppel Prof. Dr. Dr. h.c. Erika von Mutius
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. A. Bergner
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	11.11.2010

---

<b>1 INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>3 TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>4 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>5 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>5.1 Anatomie der Lunge und des Bronchialbaums</b>	<b>1</b>
5.1.1 Trachea	1
5.1.2 Ungleichher Aufbau der beiden Lungenhälften	1
5.1.3 Dichotome Aufzweigung der Atemwege	1
5.1.4 Bronchialschleimhaut und Alveolen	2
<b>5.2 Asthma bronchiale</b>	<b>3</b>
5.2.1 Epidemiologie	3
5.2.2 Klinisches Bild	3
5.2.3 Diagnostik	4
5.2.4 Pathogenese	4
5.2.4.1 Entzündungszellen	4
5.2.4.2 Dyskriinie	6
5.2.4.3 Rolle der glatten Muskulatur	6
5.2.5 Medikamentöse Therapieansätze	7
<b>5.3 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren</b>	<b>8</b>
5.3.1 Aufbau, Vorkommen und Funktionen	8
5.3.2 Agonisten und Antagonisten	10
<b>5.4 Tabakrauch und Nikotin</b>	<b>10</b>
<b>6 FRAGESTELLUNG</b>	<b>12</b>
<b>7 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
<b>7.1 Medien und Lösungen</b>	<b>14</b>
7.1.1 Agar-DMEM-Mischlösung zur Lungenfüllung	14
7.1.2 DMEM für Kultivierung der Lungenschnitte (DMEM PS/FZ)	14
7.1.3 Herstellung von sHBSS	14
7.1.4 Herstellung von Zigarettenrauchextrakt	15
7.1.5 Herstellung der Nikotin-Lösung	16
7.1.6 Hexamethonium	17
<b>7.2 Vorbereitung der Lungenschnitte</b>	<b>17</b>
7.2.1 Versuchstiere	17
7.2.2 Präparieren der Mauslunge	18
7.2.3 Befüllen der Lunge mit Agar-DMEM-Mischung	19
7.2.4 Herstellung der Lungenschnitte	20
7.2.5 Auswaschen der Agarose	22

7.2.6 Kulturbedingungen	22
7.2.7 Beurteilung der Vitalität der Lungenschnitte	23
<b>7.3 Versuchsdurchführung</b>	<b>23</b>
7.3.1 Übersicht über die durchgeführten Versuche	23
7.3.2 Untersuchung der akuten Wirkung von Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien	24
7.3.3 Untersuchung der akuten Wirkung von Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien nach Inkubation mit Hexamethonium bzw. reinem Nikotin	26
7.3.4 Untersuchung des Kontraktionsverhalten der Bronchien nach Inkubation mit CSE bzw. reinem Nikotin	27
<b>7.4 Mikroskopieren und Bearbeiten der Bilder</b>	<b>28</b>
<b>7.5 Statistik</b>	<b>29</b>
<b>8 ERGEBNISSE</b>	<b>30</b>
<b>8.1 Untersuchung der akuten Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien</b>	<b>30</b>
8.1.1 Übersicht	30
8.1.2 Änderung der bronchialen Querschnittfläche nach temporärer Gabe von DMEM, CSE oder Nikotin auf Lungenschnitte (BALB/c vs. T-bet KO)	32
8.1.3 Änderung der bronchialen Querschnittfläche nach Stimulation mit ACh (BALB/c vs. T-bet KO)	34
8.1.4 Mittlere Geschwindigkeit der Kontraktion der Bronchien nach Ach-Gabe in der 1. Minute (BALB/c vs. T-bet KO)	36
<b>8.2 Untersuchung der akuten Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien nach Inkubation mit Hexamethonium bzw. reinem Nikotin</b>	<b>38</b>
8.2.1 Übersicht	38
8.2.2 Akute Wirkung von Nikotin bzw. CSE auf bronchiale Kontraktilität in Balb/c–Lungenschnitten, nachdem sie mit Hexamethonium bzw. Nikotin inkubiert wurden	39
8.2.3 Änderung der bronchialen Querschnittfläche nach Stimulation mit ACh (BALB/c vs. T-bet KO)	41
8.2.4 Mittlere Geschwindigkeit der Kontraktion der Bronchien nach Stimulation mit Acetylcholin in der 1. Minute (BALB/c vs. T-bet KO)	43
<b>8.3 Durch Acetylcholin vermittelte Kontraktion der Bronchien nach Inkubation der Lungenschnitte mit Zigarettenrauchextrakt bzw. Nikotin</b>	<b>45</b>
8.3.1 Übersicht	45
8.3.2 Durch ACh vermittelte Kontraktion der Bronchien in BALB/c- und T-bet KO-Lungenschnitten, die mit CSE 5% bzw. Nikotin inkubiert wurden	46
8.3.3 Mittlere Geschwindigkeit der Kontraktion der Bronchien nach Stimulation mit ACh in der 1. Minute (BALB/c vs. T-bet KO)	48

---

<b>8.4 Dilatativer Effekt der temporären Gabe von CSE 5% bzw. Nikotin in allen Versuchsgruppen</b>	<b>50</b>
<b>8.5 ACh-vermittelte Kontraktion (ACh <math>10^{-5}</math> M) der Bronchien nach der temporären und dauerhaften Exposition gegenüber CSE 5% bzw. Nikotin in allen Versuchsgruppen</b>	<b>53</b>
<b>9 DISKUSSION</b>	<b>61</b>
<b>9.1 Diskussion der Materialien und Methoden</b>	<b>61</b>
9.1.1 Diskussion der Versuchstiere	61
9.1.2 Diskussion der verwendeten Lösungen	62
9.1.2.1 Agar-DMEM-Mischung zur Füllung der Lunge	62
9.1.2.2 Nährmedium DMEM mit Antibiotika-/Antimykotikazusatz	62
9.1.2.3 Einsatz von sHBSS	62
9.1.2.4 CSE und Nikotin	63
9.1.3 Erstellen der Lungenschnitte	66
<b>9.2 Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>68</b>
9.2.1 Akute Exposition gegenüber CSE/Nikotin	68
9.2.2 Akute Exposition gegenüber Nik bzw. CSE nach Inkubation der Lungenschnitte mit Hexamethonium bzw. reinem Nikotin	71
9.2.3 Bronchiale Kontraktion nach Inkubation mit CSE/Nikotin	76
<b>10 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>79</b>
<b>11 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>82</b>
<b>12 DANKSAGUNG</b>	<b>92</b>
<b>13 LEBENSLAUF</b>	<b>93</b>

---

## 2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	Seite		Seite
Abb. 1	15	Abb. 25	71
Abb. 2	19	Abb. 26	72
Abb. 3	21	Abb. 27	73
Abb. 4	25	Abb. 28	74
Abb. 5	29	Abb. 29	74
Abb. 6	32	Abb. 30	74
Abb. 7	34	Abb. 31	77
Abb. 8	36	Abb. 32	77
Abb. 9	39		
Abb. 10	41		
Abb. 11	43		
Abb. 12	46		
Abb. 13	48		
Abb. 14	50		
Abb. 15	51		
Abb. 16	53		
Abb. 17	55		
Abb. 18	57		
Abb. 19	59		
Abb. 20	65		
Abb. 21	70		
Abb. 22	70		
Abb. 23	70		
Abb. 24	71		

## 3 TABELLENVERZEICHNIS

	Seite
Tabelle 1	5
Tabelle 2	6
Tabelle 3	9
Tabelle 4	31
Tabelle 5	28
Tabelle 6	45

#### 4 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>M</b>	Mol
<b>ACh</b>	Acetylcholin	<b>mg</b>	Milligramm
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>BGA</b>	Blutgasanalyse	<b>min</b>	Minute
<b>bzw.</b>	beziehungsweise	<b>ml</b>	Milliliter
<b>ca.</b>	circa	<b>µl</b>	Mikroliter
<b>cm</b>	Zentimeter	<b>mM</b>	Millimol
<b>COPD</b>	Chronic Obstructive Pulmonary Disease	<b>mm</b>	Millimeter
<b>CSE</b>	Zigarettenrauchextrakt	<b>nAChR</b>	nikotinerger Acetylcholinrezeptor
<b>d.h.</b>	das heißt	<b>Nik</b>	Nikotin
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium	<b>NNK</b>	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
<b>DMPP</b>	Dimethylpyrazolphosphat	<b>NNN</b>	N-Nitroso-Nornikotin
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm	<b>PAF</b>	Plättchen-aktivierender Faktor
<b>FEV1</b>	Forciertes Expiratorisches Volumen in 1 Sekunde	<b>PEF</b>	peak expiratory flow
<b>FZ</b>	Fungizone	<b>PS</b>	Penstrep
<b>g</b>	Gramm	<b>s</b>	Sekunde
<b>GABA</b>	γ-Aminobuttersäure	<b>s.</b>	siehe
<b>h</b>	Stunde	<b>SR</b>	Sarkoplasmatisches Retikulum
<b>HBSS</b>	Hank's Buffered Salt Solution	<b>TH1</b>	T-Helferzelle Typ 1
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	<b>TH2</b>	T-Helferzelle Typ 2
<b>HM, Hex</b>	Hexamethonium	<b>temp.</b>	temporär
<b>IFNγ</b>	Interferon Gamma	<b>TNF</b>	Tumor-Nekrose-Faktor
<b>IgE</b>	Immunglobulin E	<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>IL</b>	Interleukin	<b>UE</b>	Untereinheit
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositoltriphosphat	<b>vergl.</b>	vergleiche
<b>KG</b>	Kontrollgruppe	<b>vs.</b>	versus
<b>KHK</b>	koronare Herzkrankheit	<b>L, l</b>	Liter
<b>L, l</b>	Liter	<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem
		<b>5HT<sub>3</sub>-R</b>	5-hydroxytryptamine 3 (=Serotonin)-Rezeptor

### 5.1 Anatomie der Lunge und des Bronchialbaums

#### 5.1.1 Trachea

Die Trachea ist ca. 10-12 cm lang und verläuft entlang der Hals- und Brustwirbelsäule nicht streng in der Mittellinie, sondern etwas nach rechts verschoben. Ihr Beginn am oberen Ringknorpel projiziert sich je nach Lebensalter auf den 4.-7. Halswirbel. Ihr unteres Ende, die Bifurcatio tracheae, wo sie sich in den rechten und linken Hauptbronchus teilt, liegt beim Erwachsenen in Höhe des 4.-5. Brustwirbels. Der rechte Hauptbronchus verläuft steiler als der linke.

#### 5.1.2 Ungleicher Aufbau der beiden Lungenhälften

Die menschliche Lunge ist zwar ein paarig angelegtes Organ, die rechte und linke Lunge sind aber nicht gleich aufgebaut.

Rechts zweigt von dem Hauptbronchus zunächst der Oberlappenbronchus ab (Segment 1-3). Der verbleibende Bronchus intermedius teilt sich in den Mittellappen (Segment 4-5) und Unterlappen (Segment 6-10). Der linke Hauptbronchus teilt sich dagegen direkt in den Oberlappen (Segment 1-5) und Unterlappen (Segment 6-10), so wird dem Herzen Platz gemacht. Im linken Unterlappen ist im Gegensatz zum rechten das Segment 7 nicht angelegt und wird beim Zählen einfach übersprungen. Aus diesem Grund werden von der rechten Lunge etwa 55% und von der linken nur 45% der Vitalkapazität erbracht.

#### 5.1.3 Dichotome Aufzweigung der Atemwege

Jeder Lobärbronchus teilt sich weiter in Segment- und Subsegmentbronchien. Nach ca. 23 Aufzweigungen sind die Alveolen erreicht. Die Segmentbronchien teilen sich in 6-12 Aufzweigungen zuerst in weitere mittlere Bronchi (ca. 2 mm Durchmesser) auf und dann in die kleinen Bronchi (ca. 1 mm Durchmesser).

Trachea, Hauptbronchen und große Bronchen besitzen in ihrer Wand Knorpelspannen, während mittlere und kleine Bronchen mit vielgestaltigen Knorpelplatten versehen sind, durch deren Einbau in den äußeren längsgespannten Fasermantel, Tunica fibromusculocartilaginea,



## Einleitung

---

diese passiv offengehalten werden. In den kleinen Bronchi nimmt die Dicke der innen liegenden Tunica muscularis zu.

Nach ca. 7 Aufzweigungen folgen diesen kleinen Bronchen Bronchioli, denen alle Knorpel Elemente fehlen und die je ein Lungenläppchen (Lobulus pulmonis) versorgen. Nach weiteren 3-4 gleichmäßig dichotomen Aufzweigungen folgen dann die Bronchioli terminales mit 0,3-0,4 mm Durchmesser, das Ende des konduktiven Bronchialbaumes. Durch ihre kräftig entwickelte glatte Muskulatur können sie ihr Lumen stark verengen oder verschließen. Obwohl der Durchmesser der Atemwege immer kleiner wird, steigt die Gesamtfläche des Querschnitts exponentiell an.

Mit 2-3 weiteren Aufzweigungen beginnt dann der respiratorische Bronchialbaum mit Bronchioli respiratorii, in deren Wänden sich einzelne Alveolen oder Gruppen von Alveolen ausbilden. Bronchioli respiratorii teilen sich mit 5 bis maximal 8 weiteren gleichförmigen Aufzweigungen zu den Ductus alveolares, die vollständig aus unmittelbar aneinander liegenden Alveolen bestehen und meist in zwei kurzen Sacculi alveolares gleicher Struktur enden. (aus Anatomie: makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, Benninghoff A., 15. Auflage)

Die von einem Bronchiolus terminalis ausgehenden Abzweigungen des respiratorischen Bronchialbaumes bilden einen Acinus pulmonis, der 1500-4000 Alveolen umfasst und einen Durchmesser von 2,5-5 mm besitzt.

### 5.1.4 Bronchialschleimhaut und Alveolen

In der Schleimhaut der Bronchien liegen etwa bis zur 7. Aufzweigung zahlreiche zilienträgende Epithelzellen sowie schleimproduzierenden Becherzellen. Nach der 7. Aufteilung wird das Epithel dünner, auch Becherzellen verschwinden zunehmend.

Jede Lunge enthält ca.  $300 \times 10^6$  Alveolen mit einer Gesamtoberfläche von ca. 50-100 m<sup>2</sup>.

Das Alveolen auskleidende Epithel besteht aus großen Pneumozyten Typ I mit extrem ausgezogenem Zytoplasma, welches den eigentlichen Gasaustausch ermöglicht, und aus Pneumozyten Typ II, die den Regenerationspool für Pneumozyten Typ I bilden und Surfactant produzieren.

### 5.2 Asthma bronchiale

#### 5.2.1 Epidemiologie

Asthma ist die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des Menschen überhaupt. Etwa 5 % der erwachsenen Menschen und 4,7 % der Kinder im Alter zwischen 0-17 Jahre leiden in Deutschland an Asthma bronchiale (1), wobei die Prävalenz in Industrieländern in den letzten Jahrzehnten anstieg (2, 3, 4).

Männer sind zweimal häufiger betroffen als Frauen. Eine bronchiale Hyperreagibilität besteht bei ca. 11 % der Erwachsenen.

Die Asthamortalität ist mit ca. 0,5-3/100.000 Einwohner gering.

#### 5.2.2 Allgemeine Symptomatik

Asthma bronchiale ist definiert als anfallsweise Atemnot durch reversible Obstruktion der unteren Luftwege, ausgelöst durch entzündliche Schleimhautschwellung, glattmuskuläre Bronchokonstriktion sowie Dyskrinie (Hypersekretion zähen Schleims). Als Folge der chronischen Entzündungsprozesse kann es zu einer Veränderung der Luftwegsmatrix kommen, wodurch die Obstruktion im Spätstadium irreversibel werden kann („airway remodeling“) (5).

Asthmasymptome bestehen aus Triade von Dyspnoe, Husten und Giemen. Zu Beginn eines Anfalls verspüren Patienten Engegefühl in der Brust, oft begleitet von unproduktivem Husten. Typisch sind raue Atmung, Auftreten von trockenen Atemgeräuschen, verlängerte Expirationsphase, Tachypnoe, Tachykardie und milde systolische Hypertonie. Wegen Überblähung der Lungenflügel nimmt der sagittale Thoraxdurchmesser zu.

Bei hochgradiger Obstruktion wird die Atemhilfsmuskulatur, meist im Sitzen (Orthopnoe), sichtbar eingesetzt, es entwickelt sich oft ein Pulsus paradoxus.

In Extremfällen kann das Giemen drastisch zurückgehen oder sogar verschwinden, das Husten wird ineffizient und Patienten entwickeln eine Schnappatmung.

Das Ende eines Anfalls ist oft durch Husten und Expektorieren eines dicken, fädigen Schleims gekennzeichnet (aus Harrisons Innere Medizin, 16. deutsche Auflage).

Im Intervall sind Asthmatiker häufig beschwerdefrei. Eine persistierende Belastungsdyspnoe und nächtlicher Husten weisen auf ein schweres Asthma hin.

### 5.2.3 Diagnostik

Die Diagnose von Asthma wird durch den Nachweis einer reversiblen Atemwegsobstruktion gestellt. Mittels der Spirometrie wird aus dem Verhältnis von Einsekundenkapazität (FEV1) zur Vitalkapazität (VC) die relative Sekundenkapazität (FEV1 in % der VC) errechnet, die als Maß für die Einengung der Atemwege herangezogen wird. Der Diagnosestellung und Therapieüberwachung dient u.a. auch der PEF-Wert (peak expiratory flow). Dies ist der Maximalwert des Luftflussvolumens (Durchfluss) beim Ausatmen. Er dient als Indikator für den freien Querschnitt in der Luftröhre beim Ausatmen. Dieser Wert sinkt meist schon vor dem Asthmaanfall.

Positive Reaktionen (Quaddeln und Rötung) auf kutane Allergietests, der Nachweis einer Sputumeosinophilie sowie die Bestimmung von Serum-IgE sind ebenfalls hilfreich, aber nicht spezifisch für Asthma.

Auch folgende Verfahren werden zur Asthmadagnostik herangezogen: EKG (z. B. Erkennen der Rechtsherzbelastung im Anfall), BGA (z. B. Erniedrigung von pO<sub>2</sub> und pCO<sub>2</sub> im Anfall bei Hyperventilation), Röntgenthorax (z. B. Zeichen der Lungenüberblähung und Ausschluss der Komplikationen wie Pneumothorax).

### 5.2.4 Pathogenese

#### 5.2.4.1 Entzündungszellen

Das klinische Bild und Pathophysiologie des Asthma bronchiale werden durch Interaktionen unterschiedlicher ortsständigen und immigrierten Entzündungszellen bestimmt, die durch Entzündungsmediatoren und Zytokine vermittelt werden. Die wichtigsten inflammatorischen Zellen, die bei Entwicklung und Persistenz der Erkrankung betroffen sind, sind Mastzellen, Eosinophilen und Lymphozyten (6-8). Jeder der Hauptzelltypen kann mehrere Mediatoren synthetisieren und abgeben, welche die Entzündungsreaktionen auslösen und verstärken können (5) und letztendlich zu chronischen, pathologischen Veränderungen wie Bronchokonstriktion, Plasmaexsudation sowie strukturellen Veränderungen führen.

Die aktivierten Mastzellen setzen viele Mediatoren frei, die unterschiedliche biologische Effekte wie Chemotaxis und Kontraktion der bronchialen und vaskulären glatten Muskulatur hervorrufen (Tab. 1). Eine Studie zeigte, dass die glattmuskuläre Schichten der Atemwege bei Asthmatikern in viel höherem Maße durch tryptase-positive Mastzellen infiltriert sind als bei der Kontrollgruppe (24).

## Einleitung

---

MEDIATOREN	EFFEKT BEI ASTHMA
Histamin	Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur, Schleimsekretion
Chemotaktischer Faktor	Chemotaxis von Eosinophilen und Neutrophilen
Tryptase	Synthese von Bradykinin
Superoxide	Zytotoxizität
Leukotriene C4, D4, E4	Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur, Schleimsekretion, Schleimhautschwellung
Prostaglandin D2	Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur
Thromboxan	Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur
Bradykinin	Schleimhautschwellung, Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur
PAF	Bronchokonstriktion (?)
Granulozyten-monozytenkolonie stimulierender Faktor	Stimulierung und Ausreifung von Eosinophilen
IL-3, IL-5	Stimulierung und Ausreifung von Eosinophilen

**Tab. 1.** Wichtige Mediatoren der Mastzellen und ihre Effekte

Bei der für Asthma charakteristischen chronischen eosinophilen Entzündung (9) synthetisieren und setzen die einzelnen aktivierten Eosinophilen ebenfalls einige Mediatoren frei, zu deren Effekten zum Beispiel Atemwegsentzündung und Kontraktion der glatten Muskelzellen gehören. Die wichtigsten Mediatoren der Mastzellen und ihre Effekte sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.

## Einleitung

MEDIATOREN	EFFEKT BEI ASTHMA
Major basic protein	Zytotoxizität, Epithelschäden
Eosinophil cationic protein	Zytotoxizität, Neurotoxizität
PAF	Bronchokonstriktion (?)
Leukotrien B4	Schleimhautentzündung, Chemotaxis
Leukotrien C4	Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur, Schleimsekretion, Schleimhautschwellung
15-Hydroxyeicosatetraensäure	Aktivierung von Mastzellen

**Tab. 2.** Wichtige Mediatoren der Eosinophilen und ihre Effekte

Die zentrale Rolle bei Initiierung und Aufrechterhaltung der entzündlichen Prozesse bei Asthma bronchiale wird den T-Lymphozyten zugeschrieben (10, 11, 21), die durch antigenpräsentierende Makrophagen aktiviert werden und dann die B-Lymphozyten zur erhöhten Produktion und Freisetzung von IgE-Antikörper stimulieren (12). Außerdem synthetisieren T-Lymphozyten bestimmte Zytokine, die bei Asthma eine wichtige Rolle spielen (10, 11, 13-18). Diese Zytokine bewirken unterschiedlichste biologische und pathogenetische Effekte wie Selbstregulation der T-Lymphozyten (IL-2), Initiieren der humoralen (IgE) Antwort (IL-4, IL-5, IL-6) und Stimulation und Aktivierung der Eosinophilen (IL-5) und Mastzellen (IL-3).

### 5.2.4.2 Dyskrinie

Wie bereits erwähnt, ist Dyskrinie, d. h. Hypersekretion zähen Schleims, eines der wichtigsten Merkmale des Asthma bronchiale (9). Zusammen mit der bronchialen Hyperreagibilität ist Dyskrinie durch Verlegung der unteren Atemwege mit Symptomatik und Morbidität des Asthma eng gekoppelt (19, 20). Durch Blockade des IL-13 lässt sich die Schleimsekretion reduzieren (16, 17).

### 5.2.4.3 Rolle der glatten Muskulatur

Bronchiale Hyperreagibilität, d. h. exzessive Kontraktion der Atemwege als Antwort auf unterschiedliche Agonisten, ist Hauptkriterium von Asthma (29, 30), wobei sie mit dem erhöhten basalen Tonus korreliert (31).

## Einleitung

---

Das Hauptmerkmal, das der Kontraktion der glatten Muskelzellen zugrunde liegt, ist die Erhöhung der intrazellulären Konzentration des freien Calciums ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Die Rolle des intrazellulären freien Calciums ( $Ca^{2+}$ -signaling) bei der bronchialen Hyperreagibilität wird diskutiert (28, 32 – 38).

Eine Erhöhung der Zellzahl und Vergrößerung der glatten Muskelzellen bei Asthma wurde bereits in vielen Fällen demonstriert (21, 22, 23) und sind bei chronischen Verläufen in die Entstehung des „airway remodeling“ miteinbezogen. Einige Wissenschaftler glauben, dass die myozytäre Hyperplasie den Hauptmechanismus darstellt (27). Andere behaupten, dass abhängig vom Asthma-Typ und betroffenen Arealen entweder myozytäre Hyperplasie oder Hypertrophie wichtigere Rolle spielen (26). Eindeutig ist, dass beide Abnormitäten zur Persistenz der bronchialen Hyperreagibilität und Bronchospasmen beitragen können (22, 25).

### 5.2.5 Medikamentöse Therapieansätze

Zur Behandlung von Asthma stehen vor allem zwei Substanzgruppen zur Verfügung: sog. „Anfallsmedikamente“ und „Langzeitmedikamente“.

Akutmedikamente wie Betamimetika, Methylxanthine und Anticholinergika verhindern die Kontraktion der glatten Muskelzellen. Die Betamimetika sind Medikamente der Wahl bei akutem Asthmaanfall (39, 40).

Langzeitmedikamente, die die Entzündungsreaktionen verhindern und/oder umkehren, sind z. B. Glukokortikoide und Mastzellstabilisatoren. Leukotrien-Antagonisten sind relativ neue Arzneimittel, die auch zu dieser Substanzgruppe gehören. Montelukast ist der einzige in Deutschland zugelassene Leukotrien-Antagonist und wird intensiv untersucht und getestet (41, 42, 44, 45, 46).

Es werden zahlreiche Studien durchgeführt, um Darreichungsformen (47, 48), verschiedene Wirkstoffe und Kombinationen aus ihnen (43) oder unterschiedliche Therapieschemata (49) zu vergleichen, zu untersuchen und zu optimieren.

### 5.3 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChRs)

#### 5.3.1 Aufbau, Vorkommen und Funktionen

nAChRs gehören wie Glycin-, GABA<sub>A</sub>- und 5HT<sub>3</sub>-Rezeptoren zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle (53, 54) und sind nur für Kationen (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) durchlässig. Rezeptorprotein besteht aus fünf homologen oder identischen Untereinheiten (UE), die zusammen einen Kanal bilden, der die Zellmembran durchspannt (55, 56, 57, 58). Es existieren viele nAChR-Isotypen. Man unterscheidet nAChRs von muskulärem Typ und nAChRs von neuronalem Typ. Die nAChRs von muskulärem Typ finden sich an der neuromuskulären Endplatte und bestehen aus zwei  $\alpha$ -UE, einer  $\beta$ -UE, einer  $\gamma$ - oder  $\varepsilon$ -UE und einer  $\delta$ -UE.

Der Begriff „neuronale nAChRs“ entspricht nicht der Wirklichkeit (54), weil diese Rezeptoren nicht nur in autonomen Ganglien und in ZNS (59, 60), sondern auch in der Zellmembran vieler nicht-neuronalen Zellen wie Lymphozyten (64) oder Plattenepithelzellen der Mundschleimhaut (65) sitzen. Auch in der Membran der bronchialen glatten Muskelzellen finden sich nAChRs. Die nAChRs von neuronalem Typ bestehen entweder nur aus zwei unterschiedlichen UE-Typen ( $\alpha$  und  $\beta$ ) oder aus fünf  $\alpha$ -UE. Bis jetzt wurden zehn verschiedene  $\alpha$ - und vier verschiedene  $\beta$ -UE identifiziert.

Abhängig davon, aus welchen UE die nAChRs bestehen, weisen sie unterschiedliche physiologische und pharmakologische Eigenschaften (56, 62).

Stimulation der nAChRs durch Agonisten führt zum Ca<sup>2+</sup>-Einstrom entweder direkt über nAChR (abhängig von UE-Zusammensetzung des Rezeptors) oder über Änderung des Membranpotentials, was zur Öffnung der Ca<sup>2+</sup>-L-Kanäle (63) führt. Lange anhaltende Agonisten-Exposition hat Inaktivierung der nAChRs (56) zur Folge.

Die nikotinergen Acetylcholinrezeptoren einiger Zelltypen der Lunge, ihre UE und Funktionen sind in der Tabelle 3 zusammengefasst (54).

Unter pathologischen Bedingungen, wie chronischer Zigarettenkonsum, wurde gezeigt, dass z. B.  $\alpha$ 3-UE-enthaltende nAChRs bei Entwicklung atherosklerotischer Plaques und Tumorwachstum eine Rolle spielen (66).

ZELLTYP	UNTEREINHEITEN	FUNKTION
respiratorische Epithelzellen	$\alpha 1, \alpha 3, \alpha 5, \alpha 6, \alpha 7, \alpha 9, \beta 1, \beta 2, \beta 4, \delta, \epsilon$	Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ , proliferativer Stimulus, Modulation der Adhäsion und Motilität (68-74)
pulmonale neuroendokrine Zellen	$\alpha 7, \beta 2$	Aktivierung der Sekretion, proliferativer Stimulus (74-77)
vaskuläre und bronchiale glatte Muskelzellen	$\alpha 7$	Hemmung der Kontraktion? (67, 78, 79)
Endothelzellen	$\alpha 7$	Hemmung der „Aktivierung“, Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen, zytoskelettale Reorganisation, Hemmung der Leukozytenadhäsion und – permeation (70, 74, 79-82)
Fibroblasten	$\alpha 1, \alpha 3, \alpha 5, \alpha 6, \alpha 7, \alpha 9, \beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4, \delta, \epsilon$	Aktivierung der MAP-Kinase, wachstumsfördernder Effekt, Stimulation der Fibronectinexpression und Kollagensynthese (73, 78, 83, 85)
Alveolarmakrophagen	$\alpha 4, \alpha 7, \beta 2$	Hemmung der TNF $\alpha$ -, IL-6-, IL-10-Freisetzung, Suppression der antimikrobiellen Aktivität von IL-12 (74, 86-88)

**Tab. 3.** Nikotinerge ACh-Rezeptoren einiger Zelltypen der Lunge, ihre Untereinheiten und Funktionen



### 5.3.2 Agonisten und Antagonisten

Acetylcholin (ACh) ist der körpereigene Agonist sowohl für nikotinische als auch für muskarinische AChRs und wurde bereits in vielen Geweben außerhalb des ZNS gefunden (89).

Nikotin ist eine biologisch wichtige Substanz aus Tabakpflanze. Wirkung von Nikotin wird durch Signalübertragung in die Zelle vermittelt, indem es mit hoher Affinität an nikotinische ACh-Rezeptoren bindet und Ionenkanäle für Kationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) öffnet. Akute, kurzzeitige Nikotinexposition *in vitro* führt zur Aktivierung der nAChRs-Funktionen. Eine chronische Einwirkung von Nikotin bewirkt dagegen die Inaktivierung (56) und erhöht gleichzeitig die Expression (up-regulation) der nAChRs *in vitro* (53, 90, 91, 97).

1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium (DMPP) ist ein synthetischer nAChR-Agonist. DMPP ist hydrophiler als Nikotin, kann deswegen die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren und keine Abhängigkeit verursachen (92). Nachgewiesene Wirkungen von DMPP sind z. B. Reduktion der Freisetzung von IL-1 und TNF in isolierten Milzzellen (93), Relaxation der glatten Muskulatur der Atemwege (67) und Reduktion der entzündlichen Prozesse in der Lunge und präventive Funktion bei bronchialen Hyperreagibilität bei Mäusen (94).

Zwei wichtige nAChR-Antagonisten sind Hexamethonium, ein allgemeiner Antagonist, der alle nAChR-Subtypen blockiert, und  $\alpha$ -Bungarotoxin (Schlangengift), ein Antagonist, der spezifisch an  $\alpha 7$ -UE der nAChR mit hoher Affinität bindet (95, 96).

### 5.4 Tabakrauch und Nikotin

Zigarettenrauchen ist ein wichtiger Risikofaktor für Entstehung von chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen, Lungenkarzinomen und KHK (119, 98).

Besondere Bedeutung hat Zigarettenrauchexposition bei Asthma bronchiale. Zigarettenrauch verstärkt bronchiale Hyperreagibilität bei chronischen Aktiv- und Passivrauchern (99, 100), induziert neutrophile Entzündung der Atemwege (101) und vermindert Wirksamkeit der medikamentösen Therapie (102). Bei Kindern mit Asthma, deren Eltern rauchen, kommt es zur Verschlimmerung der Symptomatik (103, 104).

Der Tabakrauch (das Rauchaerosol) ist ein Stoffgemisch aus fest-flüssigen Partikeln (Phasenanteil: 5-10%, Partikeldurchmesser: 0,1-1,0  $\mu\text{m}$ , Partikelkonzentration:  $10^7$ - $10^{10}$

## Einleitung

---

Teilchen pro ml Rauch), aus Dämpfen (kondensierbare Gasdampfphase aus verdampften Flüssigkeiten) und der Gasphase.

Der Tabakrauch enthält über 4000 verschiedene chemische Komponenten. Nikotin, ein tertiärer Alkaloid, ist der wichtigste chemisch und pharmakologisch aktive Bestandteil des Tabakrauchs, der aufgrund seiner Lipophilie die Blut-Hirn-Schranke leicht passiert und bei chronischer Exposition Abhängigkeit verursacht (112). Auch die tabakspezifischen Kanzerogene N'-nitrosonornikotin (NNN) und 4(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) gehören zur Gruppe der bedeutendsten Inhaltsstoffe des Tabakrauchs, die für gesundheitsschädliche Konsequenzen des Rauchens verantwortlich sind.

Viele Studien haben aber gezeigt, dass Nikotin antiinflammatorische Eigenschaften besitzt: z.B. bei Typ I Diabetes im Tiermodell (113) oder bei Behandlung der Colitis ulcerosa bei Menschen (114). In vitro reduziert Nikotin Freisetzung von IL-1 $\beta$  und TNF in Alveolarmakrophagen (115), Lymphozytenproliferation (116), und Expression von CD28-Molekülen in T-Zellen (117) und von B7-Molekülen in Alveolarmakrophagen (118).

### 6 FRAGESTELLUNG

Die im Kapitel 5 dargestellten Hintergründe und Fakten lassen es lohnenswert erscheinen, die Wirkung von Zigarettenrauch/Nikotin auf bronchiale Kontraktilität in der gesunden Lunge im Vergleich zum Asthma bronchiale in vitro zu untersuchen. Insbesondere gilt dies für eine temporäre Exposition gegenüber Zigarettenrauch.

Mit Hilfe von in unserem Labor hergestelltem Zigarettenrauchextrakt (CSE) sowie einer reinen Nikotininlösung sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Hauptaufgaben bearbeitet werden:

1. Untersuchung der akuten Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien. Wie reagiert die bronchiale glatte Muskulatur auf den akuten Reiz durch CSE/Nikotin in vitro? Ändert sich danach die muskuläre Antwort nach anschließender Stimulation mit Acetylcholin?
2. Untersuchung der akuten Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien nach Inkubation mit Hexamethonium bzw. reinem Nikotin. Wie ändert sich die Reaktion der glatten Muskulatur auf den akuten Reiz durch CSE/Nikotin in vitro nach Blockade der neuronalen nikotinergen ACh-Rezeptoren? Führt die dauerhafte Exposition der Lungenschnitte gegenüber einem nACh-Rezeptoragonist zu gleichen Ergebnissen (Diese Teiluntersuchung wurde nur mit Lungenschnitten von BALB/c-Mäusen durchgeführt.)?
3. Durch Acetylcholin vermittelte Kontraktion der Bronchien nach Inkubation der Lungenschnitte mit Zigarettenextrakt bzw. Nikotin. Wie ändert die bronchiale Kontraktion nach Stimulation mit Acetylcholin in vitro im Vergleich zu akutem Reiz durch CSE/Nikotin?

Ausgehend davon, dass Nikotin ein Bestandteil des Zigarettenrauchs ist, erscheint es sinnvoll, die Ergebnisse der Experimente mit Nikotin mit denen der Experimente mit CSE zu vergleichen.

Es ist bekannt, dass chronisches Zigarettenrauchen ein wichtiger Risikofaktor für Entstehung der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen ist bzw. diese im Verlauf negativ beeinflussen kann. Zigarettenrauch verstärkt bronchiale Hyperreagibilität bei chronischen

## **Fragestellung**

---

Aktiv- und Passivrauchern und hat somit besondere Bedeutung bei Entstehung und Verlauf des Asthma bronchiale (s. Punkt 5.4). Diese Tatsache bewegte uns dazu, dass wir unsere Versuche sowohl mit Lungenschnitten von gesunden Mäusen vom Wildtyp (BALB/c) als auch mit Lungenschnitten von Mäusen mit ausgeschaltetem T-bet-Gen (T-bet KO, ein experimentelles Modell für Asthma bronchiale) durchführten. Wie unterscheidet sich die bronchiale Kontraktilität der gesunden Lunge in unseren Versuchen von der in der Lunge mit hyperreagiblem Bronchialsystem?

## 7 MATERIAL UND METHODEN

### 7.1 Medien und Lösungen

#### 7.1.1 Agar-DMEM-Mischung zur Lungenfüllung

Zur Herstellung einer doppelkonzentrierten DMEM-Lösung (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) wurde ein Fläschchen (17,3 g) DMEM-Pulver (mit L-Glutamin und 4,5 g Glukose, D1152, SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in 500 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Mit Hilfe von einem pH-Meter wurde der pH-Wert gemessen und bei Bedarf mit NaOH (1 M) oder HCl (1 M) auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in Filtrierflasche (Nalgene®, Kleinfeld Labortechnik GmbH, Deutschland) steril filtriert.

Zur Anfertigung des Agarose-Gels (3,5 %) wurden 5,25 g Agarose-Pulver Typ VII-A, low gelling (A0701, SIGMA-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) in 150 ml destilliertem Wasser verrührt und in einer Mikrowelle so lange erhitzt, bis die Flüssigkeit klar wurde. Heiße Agarose wurde á 20 ml aliquotiert und autoklaviert. Diese Substanz ist bei 37°C flüssig und nimmt bei Raumtemperatur wieder den Gelzustand an, so dass bei der Lungenfüllung höhere Temperaturen und damit verbundene Gewebsschaden in Lungenschnitten konnten vermieden werden.

20 ml der 3,5 %en Agarose und 20 ml der doppelkonzentrierten DMEM-Lösung ergaben 40 ml Agar-DMEM-Mischung zur Füllung der Mäuselunge beim Präparieren.

#### 7.1.2 DMEM für Kultivierung der Lungenschnitte (DMEM PS/FZ)

Eine Flasche (500 ml) DMEM-Kulturmedium-Fertiglösung (mit L-Glutamin und 4,5 g/l Glukose, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) wurde unter sterilen Bedingungen mit 1,2 ml Streptomycin (Penstrep = PS) und 2,4 ml Amphotericin B (Fungizone = FZ) supplementiert und im Kühlschrank bei 4-7° C maximal 30 Tage gelagert.

#### 7.1.3 Herstellung von sHBSS

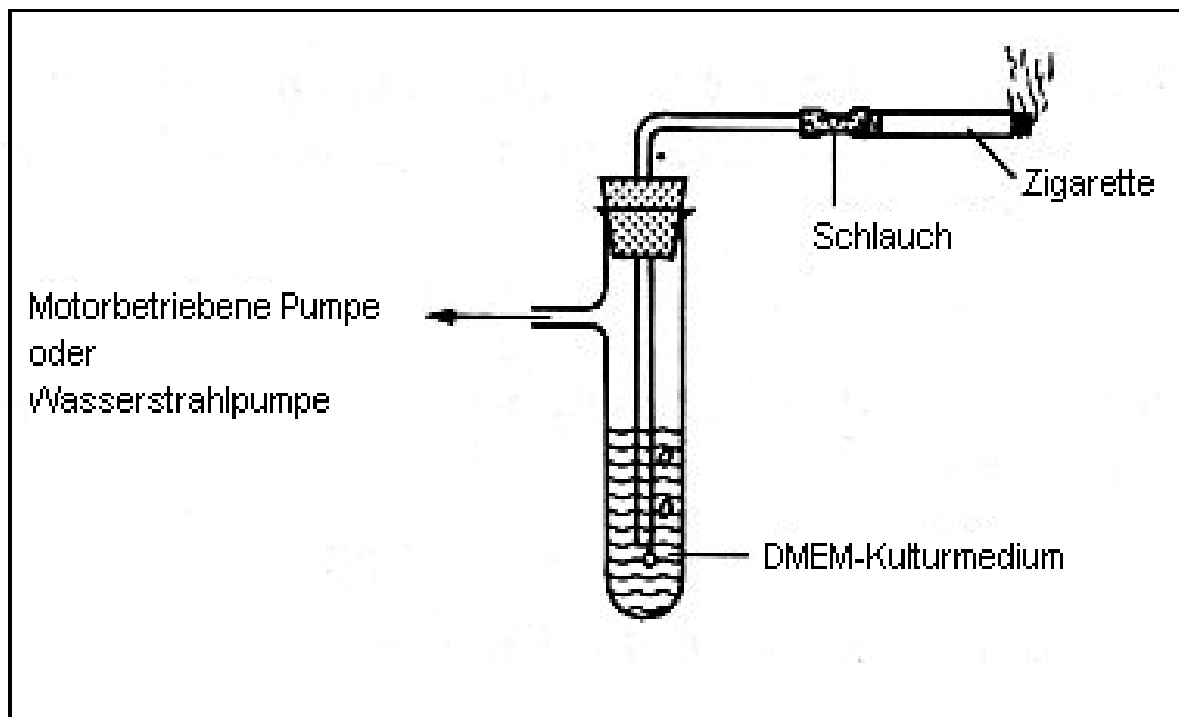
Ein Fläschchen (9,7 g) HBSS-Pulver (Hank's balanced salts, H1387, SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurde in 975 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 25 ml HEPES 1 M (Gibco, 15630-056, Scotland) supplementiert. Mit Hilfe von einem pH-Meter wurde der

pH-Wert gemessen und bei Bedarf mit NaOH (1 M) oder HCl (1 M) auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in Filtrierflasche (Nalgene®, Kleinfeld Labortechnik GmbH, Deutschland) steril filtriert und im Kühlschrank bei 4-7° C maximal 30 Tage gelagert.

#### 7.1.4 Herstellung von Zigarettenrauchextrakt

Wir bedanken uns an dieser Stelle bei Dr. Jörres für seine freundliche Unterstützung.

Unter dem Abzug wurde mittels einer motorbetriebenen Probennahmepumpe oder einer Wasserstrahlpumpe durch einen kurzen Schlauch der Hauptstromrauch einer Zigarette innerhalb von 5 Minuten in 10 ml DMEM-Kulturmedium (Invitrogen/Gibco) mittels einer Waschflasche (Impinger, DEHA Haan&Wittmer GmbH) aufgenommen, die seitens des Herstellers speziell für die Probennahme konstruiert war. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zeigt Abbildung 1.



**Abb.1.** Schematische Darstellung der Gewinnung des Zigarettenrauchextrakts

Die Flasche war mit 30 ml Medium gefüllt, so dass nacheinander 3 Zigaretten abgeraucht werden konnten. Die Saugleistung war so eingestellt, dass die Zigarette in 5 Minuten bis nahe dem Filter abgeraucht wurde.

Im Unterschied zu einigen anderen Experimentatoren, die oft Kentucky-Referenzzigaretten ohne Filter verwendeten (119, 120), wurden handelsübliche Zigaretten der Marke Gauloise Blondes (nominell Teer 10 mg, Nikotin 0,8 mg) mit Filter verwendet. Beim Abrauchen wurden die Filter auf der Zigarette belassen, um im Rahmen des Möglichen realitätsnahe Bedingungen herzustellen.

Der in DMEM aufgenommene Extrakt wurde steril filtriert (Vacuum Driven Disposable Filtration System Stericup, Millipore), aliquotiert und bei -32°C gelagert.

Der wie beschrieben gewonnene Zigarettenrauchextrakt (cigarette smoke extract, CSE) wurde als Stammlösung der Konzentration 100 % definiert. Die bei wiederholtem Abrauchen von bis zu 30 Zigaretten erzielten Nikotinkonzentrationen im CSE betragen zwischen 132 und 200 µg/ml und lagen im Mittel bei 168 µg/ml. Wiederholungsmessungen ergaben einen Variationskoeffizienten von 8-10 %.

### 7.1.5 Herstellung der Nikotin-Lösung

Zur Herstellung der Nikotinlösung verwendeten wir Nikotin 400 mg/ml. 20 ml DMEM PS/FZ wurden unter sterilen Bedingungen mit 10 µl Nikotin supplementiert und in Eppendorf-1,5 ml-Reaktionsgefäße á 1 ml aliquotiert. Bei jedem Versuch wurde eine frisch zubereitete Lösung verwendet.

Die hergestellte Nikotin-Lösung wurde als Nikotin-Stammlösung der Konzentration 100 % definiert, da die Nikotinkonzentration ähnlich so hoch ist wie in CSE-Stammlösung (ca. 200 µg/ml).

### 7.1.6 Hexamethonium

Als Hemmer der nikotinergeren Acetylcholinrezeptoren verwendeten wir in unseren Versuchen Hexamethoniumchlorid (FW 273,3; H2138, SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Zur Herstellung einer 10 mM Lösung unter sterilen Bedingungen wurden 27,3 mg Hexamethoniumchlorid in 10 ml DMEM PS/FZ aufgelöst. Vor jedem Versuch wurde eine frische Lösung hergestellt.

Die wie beschrieben hergestellte Hexamethonium-Lösung 10 mM wurde als Stammlösung der Konzentration 100 % definiert.

## 7.2 Vorbereitung der Lungenschnitte

### 7.2.1 Versuchstiere

Für unsere Versuche verwendeten wir BALB/c-Mäuse (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland) und T-bet knock-out-Mäuse (Charles River Breeding Labs, Needham, MA). Als Auswahlkriterium wurde gefordert, dass Tiere zwischen 6 und 10 Wochen alt und 30 bis 50 g schwer sind. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Mäuse keine sichtbare Verletzungen oder Krankheitszeichen aufweisen.

BALB/c-Mäuse sind immunkompetente Inzuchtmäuse vom Wildtyp.

T-bet knock-out-Mäuse können als ein experimentelles Modell für das Asthma bronchiale bezeichnet werden. Durch Ausschalten des Steuer-Gens T-bet verschiebt sich deutlich das zahlenmäßige Verhältnis zweier Immunzellarten: die Tiere besitzen eine geringere Zahl der T-Helfer-Lymphozyten vom Typ 1 (TH1), dafür aber mehr T-Helfer-Lymphozyten vom Typ 2 (TH2). Entsprechend ist auch das Muster der Immunbotenstoffe, die von diesen Zellarten produziert werden, verändert (121) – hin zu einem Proteincocktail, der Entzündungsprozessen Vorschub leistet. Dieser Mechanismus spielt eine wichtige Rolle bei Entstehung von Asthma bronchiale.

Mäuse, denen das Gen T-bet fehlt, entwickeln ähnliche Krankheitssymptome wie Menschen mit akutem oder chronischem Asthma.



### 7.2.2 Präparation der Mauslunge

Nach dem Herstellen der Agar-DMEM-Mischung für Lungenfüllung (s. Punkt 6.1.1) wurde sie in einem Thermosbehälter in 39°C warmem Wasser bis zum Zeitpunkt der Lungenfüllung flüssig gehalten.

Durch intraperitoneale Injektion von 0,5 ml Pentobarbital-Lösung (6 mg/ml) wurden die Tiere eingeschläfert. Nach dem Eintritt des Exitus (nach ca. 1-2 Minuten) wurde die Maus in eine Präparationswanne mit Silikonbeschichtung überführt.

Die Maus wurde auf dem Rücken möglichst gerade liegend mit Nadeln fixiert, Hals überstreckt. Das Fell auf der Brust und Hals wurde mit Ethanol 70 % aus einer Sprühflasche gründlich desinfiziert. Mit Hilfe einer Pinzette wurde das Halsfell unter dem Kinn hochgehoben und Haut mit einer kleinen Schere vorsichtig, so dass darunter liegende Weichteile und Brustkorb nicht beschädigt wurden, in Richtung Bauch bis Beginn des Abdomens geschnitten. Die Haut wurde mit Hilfe von einem Skalpell auf die beiden Seiten vom Schnitt weg präpariert bis gesamter Brustkorb zu sehen war.

Der auf der Trachea gelegene Thymus wurde vollständig weggeschnitten. Die Trachea wurde scharf frei präpariert bis der weiße Trachealknorpel zu sehen war.

Um die Vertrocknung des Gewebes und Ansammlungen von geronnenem Blut, die zum Erschweren der Präparation führen, zu vermeiden, wurde die gesamte frei präparierte Oberfläche in regelmäßigen Abständen mit sHBSS aus einer 10 ml Spritze gespült. Die sich in der Präparierwanne ansammelnde Flüssigkeit wurde durch Abtupfen entfernt.

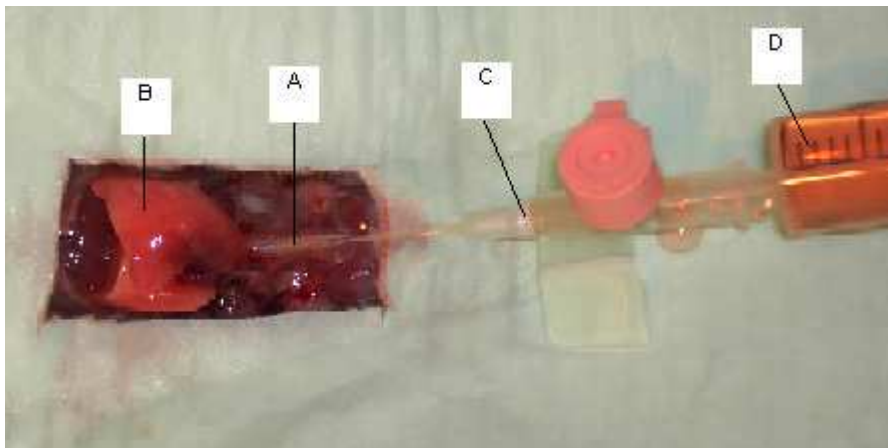
Mit einer kleinen Schere wurde dann am Jugulum eingestochen und am Sternum entlang der Thorax bis zur Diaphragma eröffnet, ohne Herz oder Lunge zu beschädigen. Die Rippen wurden abpräpariert, so dass sich die Lunge beim Befüllen entfalten konnte. Dabei wurde darauf geachtet, dass a) das Zwerchfell und darunter liegende Gedärme nicht verletzt wurden, um eventuelle Kontaminationen durch Bakterien aus dem Darmtrakt zu vermeiden, und b) die Lunge nicht angeschnitten und dadurch das Hinauslaufen der Agarose beim Lungenfüllen verhindert wurde.

### 7.2.3 Befüllen der Lunge mit Agar-DMEM-Mischung

Vor dem Befüllen der Lunge wurde mit der kleinen Schere die Herzspitze abgeschnitten, um Blut abzulassen. Dadurch wurde die Erhöhung des intrapulmonalen Druckes beim Lungenfüllen und damit die Lungenparenchymschädigung vermieden. Nachdem die Maus über den Schnitt entblutet war, wurde die Lunge mit sHBSS gespült bis sie blutfrei war.

Zum Befüllen der Lunge verwendeten wir eine krankenhausbliche Venenverweilkanüle (20G x 1 $\frac{1}{4}$ '', Braun) und eine 5 ml Einmalspritze (BD Discardit™ II). Mit der Venenverweilkanüle wurde flach im oberen Drittel der Trachea eingestochen und Katheter vorsichtig bis vor die Bifurcatio tracheae vorgeschoben. Die Nadel wurde entfernt. Das andere Ende der Venenverweilkanüle wurde mit Knetgummi am Boden der Präparierwanne fixiert, so dass das unbeabsichtigte Hinausrutschen der Katheterspitze aus der Trachea beim Befüllen vermieden wurde.

Die 5 ml Einmalspritze wurde mit dem flüssigen Agar-Medium-Gemisch gefüllt und an die Venenverweilkanüle angeschlossen. Die Agar-DMEM-Mischung wurde langsam durch den Katheter in die Lunge instilliert, bis sie an den Rändern der Lungenlappen hellrosa erschien und die Lappen (ohne zu platzen) vollständig gefüllt waren (Abb. 2)



**Abb. 2.** Mit Agar-DMEM-Gemisch gefüllte Lunge in situ:

A – Trachea,

B – gefüllte Lunge,

C – Venenverweilkanüle,

D – Spritze

Die befüllte Lunge wurde mitsamt Präparierwanne und ohne Entfernen der Spritze umgehend auf ca. 4°C gekühlt, indem sie in eine Gefriertruhe gestellt wurde, und bis zur vollständigen Aushärtung der Agarose dort belassen. Als „Gelierprobe“ wurde ein Klecks Agar-DMEM-Mischung in Präparierwanne neben der Maus gespritzt.

Nach dem Festwerden der Agarose wurden die Venenverweilkanüle mit der Spritze entfernt und Trachea, Ösophagus und umliegendes Gewebe unterhalb des Kehlkopfes mit Hilfe eines Skalpell durchtrennt. Um mehr Stabilität zu bekommen, geschah die Entnahme von Herz und Lunge in Verbund. Nach dem Durchtrennen des Ösophagus, der Aorta und Vena cava knapp oberhalb der Diaphragma wurden die Lunge mit dem Herzen aus dem Brustkorb entfernt.

Das gesamte Herz-Lungen-Paket wurde in ein 50ml-Zentrifugierröhrchen (Bluecap) mit sHBSS überführt und gekühlt zur Schneidemaschine transportiert.

### 7.2.4 Herstellen der Lungenschnitte

Das Schneiden der Lunge wurde möglichst steril unter einem Labor-Abzug durchgeführt.

Vor dem Schneiden wurde das Herz-Lungen-Paket in eine große ( 100 x 20 mm ) Zellkulturschale (Fa. Falcon, Deutschland) überführt und dort die einzelnen Lungenlappen mit Hilfe eines Skalpell am Hilus voneinander getrennt. Das Herz und die Trachea wurden verworfen. Die abgetrennten Lungenlappen wurden in einem 50ml-Zentrifugierröhrchen mit gekühltem sHBSS zwischengelagert.

Zum Schneiden des mit Agar-DMEM-Mischung gefüllten Lungengewebes wurde eine spezielle oszillierende Gewebe-Schneidemaschine angewandt (OTS Tissue Slicer 4000, Electron Microscopy Sciences, Washington) (Abb.3)

Zunächst wurden aus den einzelnen Lungenlappen mit Hilfe einer Tissue-slicer-Klinge (Blade) ca. 0,5 x 0,5 cm große Gewebeblöcke so herausgeschnitten, dass die nach distal verlaufenden Bronchien möglichst quer angetroffen wurden. Die Lungengewebeblöcke wurden aus den mittleren Bereichen der Lungenlappen herausgeschnitten, so dass die Wahrscheinlichkeit Bronchien mit möglichst dicker Schicht der glatten Muskulatur am größten und die Wahrscheinlichkeit Bronchialknorpel anzutreffen eher gering war.



**Abb. 3.** Gewebe-Schneidemaschine OTS-4000:

A – Operationsarm

B – Wanne mit Schneideunterlage

C – Bedienungsinstrumente

D – Lichtquelle

Die wie beschrieben vorbereiteten Gewebestücke wurden mit Hilfe von Gewebekleber (Quick Bond, Aron Alpha, Electron Microscopy Sciences, Washington) auf der Schneideunterlage des Tissue Slicers befestigt. Die Schneideunterlage mit dem befestigten Gewebestück wurde während des Schneidevorganges in Wanne des Slicers mit gekühltem (4°C) sHBSS versenkt. Das Gewebe wurde mit einer Klinge geschnitten, die an einem variabel in vier Raumrichtungen verstellbaren Operationsarm befestigt war. Die Oszillationsfrequenz der Klinge (60-10000/min) wurde mit 5000/min, der Vorwärtsschub der Klinge während des Schneidevorganges (0-5 mm/s) mit 0,1 bis 0,5 mm/s vorgegeben und die Schnittstärke wurde fest auf 200 µm eingestellt.

Die angefertigten Schnitte wurden in kleine (35 x 10 mm) mit Zellkulturmedium (DMEM PS/FZ) gefüllte Petrischalen (Fa. Falcon, Deutschland) überführt. Jede Zellkulturschale enthielt 6-8 Lungenschnitte. Für das Umsetzen der Schnitte aus der Schneidemaschine in die Petrischale eignete sich ein kleiner Laborspatel, der die feine Struktur des Gewebes unbeschädigt ließ.

### 7.2.5 Auswaschen der Agarose

Bei der im Inkubationsschrank herrschenden Temperatur von 37°C würde sich die noch in den Schnitten eventuell befindliche Agarose nicht wieder verflüssigen (Schmelzpunkt liegt bei 60°C) und die Durchführung der Versuche in vielen Fällen unmöglich machen bzw. die Ergebnisse verfälschen. Das vorsichtige Schütteln der Schalen mit Lungenschnitten kombiniert mit regelmäßigem Mediumwechsel während der ersten Stunde eliminierte aber die Agarose fast vollständig.

### 7.2.6 Kulturbedingungen

Die Lungenschnitte werden frei schwimmend in kleinen (35 x 10 mm) Zellkulturschalen im DMEM mit Zusatz von Antibiotika (Penstrep) und Antimykotika (Fungizone) kultiviert. Jede Zellkulturschale enthielt 6-8 Lungenschnitte. Inkubation der Lungenschnitte erfolgte im Inkubator (HERA Cell 240, Heraeus, Hanau) bei 100 % Luftfeuchtigkeit, 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> und dauerte 24-48 Stunden.

### 7.2.7 Beurteilung der Vitalität der Lungenschnitte

Um die Vitalität der erstellten Lungenschnitte zu prüfen, wurde unter dem Lichtmikroskop (Olympus CX 31, Deutschland) der Zilienschlag des Flimmerepithels beurteilt. Weiterhin wurde an einzelnen Schnitten Kontraktionsfähigkeit der quer angeschnittenen Bronchien mit Acetylcholin in einer Konzentration von  $10^{-5}$  mol/L provoziert.

## 7.3 Versuchsdurchführung

### 7.3.1 Übersicht über die durchgeführten Versuche

- I. Untersuchung der akuten Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien:
  - A. Kontrollgruppe; BALB/c vs. T-bet
  - B. Akute Wirkung von Nikotin; BALB/c vs. T-bet
  - C. Akute Wirkung von CSE; BALB/c vs. T-bet
- II. Untersuchung der akuten Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien nach Inkubation mit Hexamethonium bzw. reinem Nikotin:
  - A. Akute Wirkung von Nikotin nach Inkubation mit Hexamethonium; BALB/c vs. T-bet
  - B. Akute Wirkung von CSE nach Inkubation mit Hexamethonium; BALB/c vs. T-bet
  - C. Akute Wirkung von Nikotin nach Inkubation mit reinem Nikotin in BALB/c
- III. Untersuchung des Kontraktionsverhaltens der Bronchien (nach Stimulation mit Acetylcholin) nach Inkubation mit CSE bzw. reinem Nikotin:
  - A. Kontrollgruppe; BALB/c vs. T-bet
  - B. Kontraktionsverhalten der Bronchien nach Inkubation mit reinem Nikotin; BALB/c vs. T-bet
  - C. Kontraktionsverhalten der Bronchien nach Inkubation mit CSE; BALB/c vs. T-bet

### 7.3.2 Untersuchung der akuten Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien

Durch diese Versuche wollten wir untersuchen welche akuten Auswirkungen das Nikotin bzw. CSE auf die glatte Muskulatur der Bronchien hat und ob sich auch die Kontraktilität der Bronchien nach anschließender Stimulation mit Acetylcholin ändert.

Als Auswahlkriterium für Lungenschnitte wurde gefordert, dass ein vitaler Lungenschnitt (s. Punkt 7.2.7) mindestens ein quer angeschnittener Bronchus mit glatter Muskulatur besitzt (Abb. 4).

Wie oben beschrieben besteht die I. Teiluntersuchung aus drei Versuchsreihen:

**Versuchsreihe A:** Kontrollgruppe; BALB/c vs. T-bet KO

**Versuchsreihe B:** Akute Wirkung von Nikotin; BALB/c vs. T-bet KO

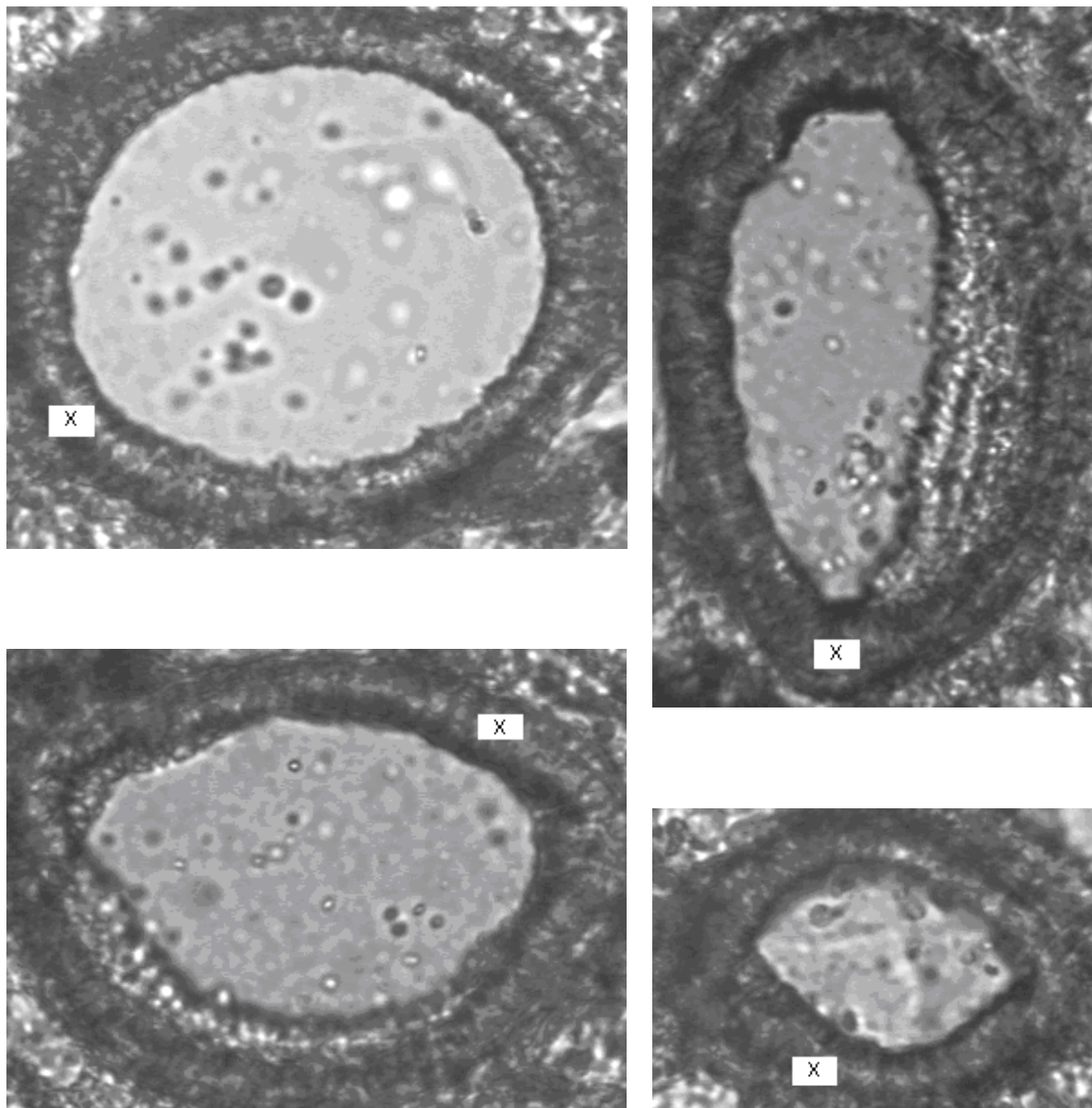
**Versuchsreihe C:** Akute Wirkung von CSE; BALB/c vs. T-bet KO

Inkubationszeit für diese Versuche betrug 24 Stunden in DMEM PS/FZ.

Der erste Schritt unserer I. Teiluntersuchung war identisch für alle drei Versuchsreihen: Zum Durchführen eines Versuches wurde jeweils ein einzelner Lungenschnitt in eine kleine (35 x 10 mm) Zellkulturschale mit 1800 µl 37°C warmem sHBSS überführt und diese auf dem Objektisch des Mikroskops platziert. Zu Beginn des Versuches wurden bei Versuchsreihe A 200 µl DMEM PS/FZ, bei Versuchsreihe B 200 µl der 5 %igen Nikotinlösung (s. Punkt 7.1.5) und bei Versuchsreihe C 200 µl der verdünnten CSE-Stammlösung (5% bzw. 10%) (s. Punkt 7.1.5) auf einen Schnitt gegeben und Aufnahme mittels digitaler High Performance CCD Kamera (Chroma Phor Analysen-Technik GmbH) gestartet.

Der letzte Schritt dieser Teiluntersuchung war für alle drei Versuchsreihen ebenfalls identisch: Nach Ablauf von 2,5 min wurden 200 µl ACh in Konzentration  $10^{-5}$  mol/l auf den Schnitt pipettiert und die Aufnahme für weitere 2,5 min fortgeführt.

Ergebnisse der Versuche über Lungenschnitte der BALB/c-Mäuse wurden mit denen der T-bet knock-out-Mäusen verglichen.



**Abb. 4.** Beispiele von Querschnitten der Bronchien

X – Bronchialepithel über der glatten Muskulatur



### 7.3.3 Untersuchung der akuten Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien nach Inkubation mit Hexamethonium bzw. reinem Nikotin

Hier wollten wir untersuchen, ob eine Blockade der nikotinergeren Acetylcholinrezeptoren die Wirkung der akuten Nikotin- bzw. CSE-Exposition auf die glatte Muskulatur verändert und ob sie dann die Kontraktion der Bronchien nach anschließender Stimulation mit ACh beeinflusst.

Desweiteren wollten wir überprüfen, ob die länger anhaltende Nikotinexposition die akute Wirkung von Nikotin beeinträchtigt.

Auch in diesem Fall wurde als Auswahlkriterium für Lungenschnitte gefordert, dass ein vitaler Lungenschnitt (s. Punkt 7.2.7) mindestens einen quer angeschnittenen Bronchus mit glatter Muskulatur besitzt (Abb. 4).

Die II. Teiluntersuchung bestand ebenfalls aus drei Versuchsreihen:

**Versuchsreihe A:** Akute Wirkung von Nikotin nach Inkubation mit Hexamethonium; BALB/c vs. T-bet

**Versuchsreihe B:** Akute Wirkung von CSE nach Inkubation mit Hexamethonium; BALB/c vs. T-bet

**Versuchsreihe C:** Akute Wirkung von Nikotin nach Inkubation mit reinem Nikotin in BALB/c

Für Versuchsreihen A und B war der erste Schritt der II. Teiluntersuchung identisch: Nach dem Auswaschen der Agarose wurden leere Zellkulturschalen (35 x 10 mm) mit je 3 ml DMEM PS/FZ gefüllt und je 100 µl der  $10^{-2}$  M Hexamethoniumlösung dazugegeben. In jede Schale wurden 6-8 Lungenschnitte überführt und 48 Stunden inkubiert.

Vor dem Mikroskopieren wurde jeweils ein einzelner Lungenschnitt in eine kleine (35 x 10 mm) Zellkulturschale mit 1800 µl 37°C warmem sHBSS, das mit 100 µl der  $10^{-2}$  M Hexamethoniumlösung supplementiert war, überführt und diese auf dem Objektisch des Mikroskops platziert. Zu Beginn des Versuches wurden bei Versuchsreihe A 200 µl der 5 %igen Nikotinlösung (s. Punkt 7.1.5) und bei Versuchsreihe B 200 µl der 5 %igen CSE-Stammlösung (s. Punkt 7.1.4) auf den Schnitt gegeben und Aufnahme mittels digitaler High Performance CCD Kamera (Chroma Phor Analysen-Technik GmbH) gestartet. Nach Ablauf

von 2,5 min wurden in beiden Versuchsreihen 200 µl ACh in Konzentration  $10^{-5}$  mol/l auf den Schnitt pipettiert und die Aufnahme für weitere 2,5 min fortgeführt.

Ergebnisse der Versuche über Lungenschnitte der Balb/c-Mäuse wurden mit denen der T-bet knock-out-Mäusen verglichen.

In Versuchsreihe C inkubierten wir die Lungenschnitte mit verdünnter Nikotin-Stammlösung. Durch Verdünnen der Nikotin-Stammlösung mit DMEM PS/FZ in Verhältnis 1:19 erhielten wir eine 5 %ige Nikotinlösung. Die Lungenschnitte (6-8 pro Zellkulturschale) wurden in dieser 5 %igen Nikotinlösung 48 Stunden inkubiert.

Zum Durchführen dieser Versuchsreihe wurde analog den Versuchsreihen A und B jeweils ein einzelner Lungenschnitt in eine kleine (35 x 10 mm) Zellkulturschale mit 1800 µl 37°C warmem sHBSS überführt und diese auf dem Objektisch des Mikroskops platziert. Zu Beginn des Versuches wurden 200 µl der 5 %igen Nikotinlösung (s. Punkt 7.1.5) auf den Schnitt gegeben und Aufnahme mittels digitaler Kamera gestartet. Im letzten Schritt, nach Ablauf von 2,5 min, wurden 200 µl ACh in Konzentration  $10^{-5}$  mol/l auf den Schnitt pipettiert und die Aufnahme für weitere 2,5 min fortgeführt.

Die Versuchsreihe C der II. Teiluntersuchung wurde nur mit Lungenschnitten von BALB/c-Mäusen durchgeführt.

### 7.3.4 Untersuchung des Kontraktionsverhaltens der Bronchien nach Inkubation mit CSE bzw. reinem Nikotin

Bei dieser Teiluntersuchung wollten wir herausfinden, ob die länger anhaltende Nikotin- bzw. CSE-Exposition die durch Acetylcholin hervorgerufene Kontraktion der Bronchien im Vergleich zur Kontrollgruppe beeinflusst.

Als Auswahlkriterien für Lungenschnitte gelten hier auch die in Punkt 7.3.2 genannten Kriterien.

Die drei Versuchsreihen der III. Teiluntersuchung sind:

**Versuchsreihe A:** Kontrollgruppe; BALB/c vs. T-bet KO

**Versuchsreihe B:** Kontraktionsverhalten der Bronchien nach Inkubation mit reinem Nikotin; BALB/c vs. T-bet KO

**Versuchsreihe C:** Kontraktionsverhalten der Bronchien nach Inkubation mit CSE; BALB/c vs. T-bet KO

Der erste Schritt der III. Teiluntersuchung war nach Auswaschen der Agarose die 48-stündige Inkubation der Lungenschnitte für Versuchsreihe A nur in DMEM PS/FZ, für Versuchsreihe B in DMEM PS/FZ mit 5 %-iger Nikotinlösung (s. Punkt 7.3.3) und für Versuchsreihe C in DMEM PS/FZ mit 5 %-iger und mit 10%-iger CSE-Lösung. Jede Zellkulturschale (35 x 10 mm) enthielt 6-8 Schnitte.

Der zweite Schritt war identisch für alle drei Versuchsreihen: Zum Durchführen eines Versuches wurde jeweils ein einzelner Lungenschnitt in eine kleine (35 x 10 mm) Zellkulturschale mit 1800 µl 37°C warmem sHBSS überführt und diese auf dem Objektisch des Mikroskops platziert. Zu Beginn des Versuches wurden 200 µl Acetylcholin der Konzentration  $10^{-5}$  mol/l auf den Schnitt gegeben und Aufnahme mittels digitaler High Performance CCD Kamera (Chroma Phor Analysen-Technik GmbH) für 4 min gestartet. Nach Ablauf der Zeit wurde der Versuch beendet.

Zuletzt wurden die Ergebnisse der Versuche über Lungenschnitte der BALB/c-Mäuse mit denen der T-bet knock-out-Mäusen verglichen.

### **7.4 Mikroskopieren und Bearbeiten der Bilder**

Zum Mikroskopieren wurden die Lungenschnitte einzeln in eine kleine (35 x 10 mm) Zellkulturschale (Fa. Falcon, Deutschland) mit 1800 µl sHBSS überführt und durch ein aus Gold hergestelltes Gitter in einer Position festgehalten.

Die Bilder wurden durch eine eingebaute digitale High Performance CCD Kamera (Chroma Phor Analysen-Technik GmbH) (Abb. 5) aufgenommen und mit Hilfe der ScionImage-Software (Scion Corporation, USA), einer Bild-Analyse-Software, bearbeitet.

Die Aufnahmen liefen mit Geschwindigkeit 1 Bild/sec.

Gemessen wurde die Änderung der Querschnittfläche der Bronchien in Prozent (%).

## 7.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels „Sigma Stat for Windows“ (Version 2.0, Copyright© 1992-1997 SPSS Inc.).

Als Tests wurden beim Vergleich von zwei Stichproben der „Mann-Whitney Runk Sum Test“ beziehungsweise beim Vergleich von mehr als zwei Stichproben die „Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance On Ranks, All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newmann-Keuls Method)“ angewendet.

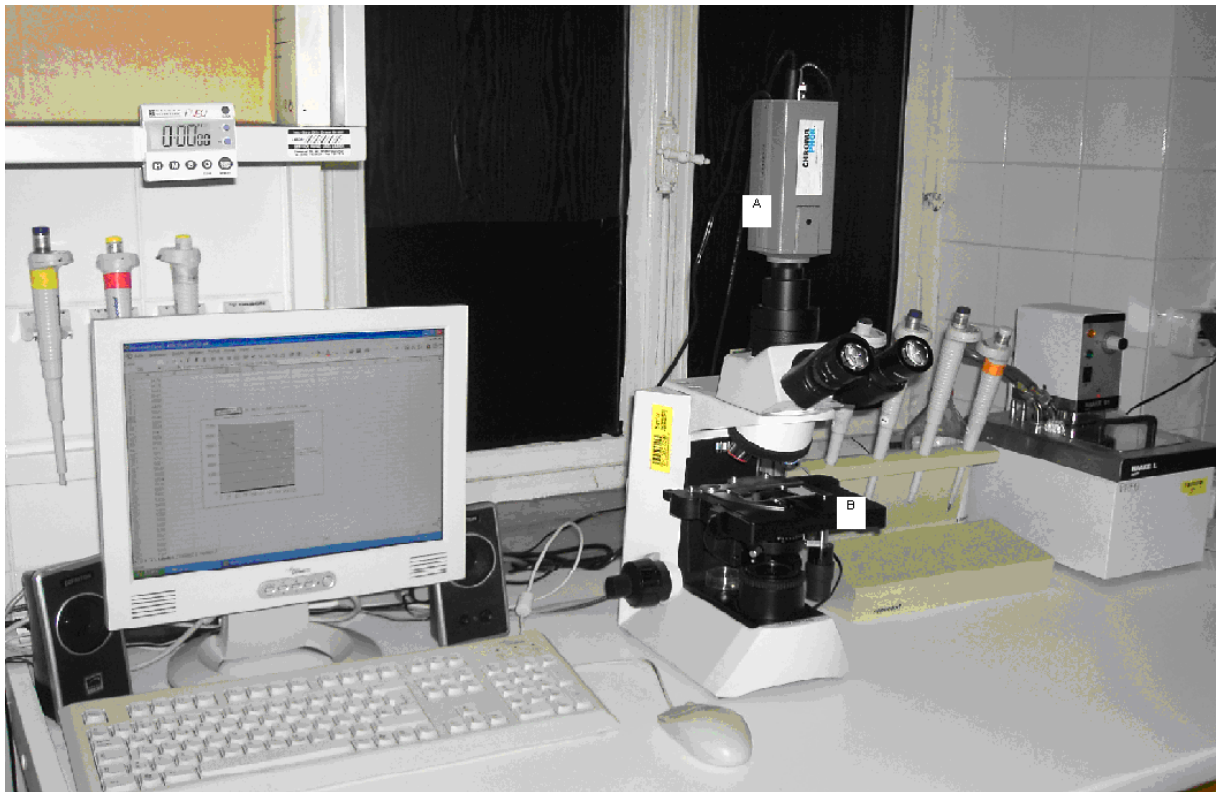


Abb. 5. Mikroskop mit eingebauter Digitalkamera

A – Kamera

B – Objektisch

## **8 ERGEBNISSE**

### **8.1 Untersuchung der akuten Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien**

#### **8.1.1 Übersicht**

Die Ergebnisse der Versuche zur Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Anschließend werden die einzelnen Parameter graphisch dargestellt.

Bei der Auswertung der Versuche nach Zugabe von Nikotin bzw. CSE ist die Änderung der Querschnittsfläche der Bronchien als prozentuelle Änderung des Ausgangswertes zu betrachten. Nach der darauf folgenden Zugabe von ACh  $10^{-5}$  M wurde betrachtet, wie sich die Ausmaße der maximalen Kontraktion der Bronchien prozentuell in Bezug auf Ausgangswert im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Nikotin bzw. CSE verändern. Außerdem wurde die maximale mittlere Geschwindigkeit der Bronchokontraktion als durchschnittliche prozentuelle Veränderung der Querschnittsfläche in der ersten Minute gemessen.

Ergebnisse

		Änderung der Querschnittsfläche nach Zugabe des Nic, CSE od. DMEM (% Ausgangswertes)		Änderung der Querschnittsfläche nach Zugabe von ACh (% der Ausgangsfläche)		Mittlere Geschwindigkeit der Kontraktion in der 1. min (% Fläche pro min)	
		BALB/c	T-bet	BALB/c	T-bet	BALB/c	T-bet
<b>Kontrollgruppe</b>	n	15	12	15	12	15	12
	Mittelwert	-3,07	5,3	17,1	45,25	0,16	0,73
	Standardabweichung	5,69	20,85	10,16	22,1	0,12	0,54
	Median	-2,81	6,66	19,53	38,69	0,13	0,5
<b>CSE (5%)</b>	n	11	10	7	8	7	9
	Mittelwert	30,73	33,23	54,62	42,24	1,42	1,09
	Standardabweichung	20,25	20,33	25,11	19,11	0,67	0,64
	Median	27,86	30,55	60,23	44,07	1,55	1,18
<b>CSE (10%)</b>	n	7	7	5	8	7	8
	Mittelwert	67,35	59,83	36,67	35,63	1,29	0,91
	Standardabweichung	62,2	102,8	30,08	23,88	1,1	1,1
	Median	52,9	8,02	18,83	29,5	1,13	0,56
<b>Nikotin</b>	n	9	5	9	6	9	6
	Mittelwert	9,54	4,75	10,63	12,35	0,2	0,19
	Standardabweichung	5,44	4,34	5,97	6,88	0,84	0,12
	Median	8,37	2,63	8,69	11,23	0,19	0,18

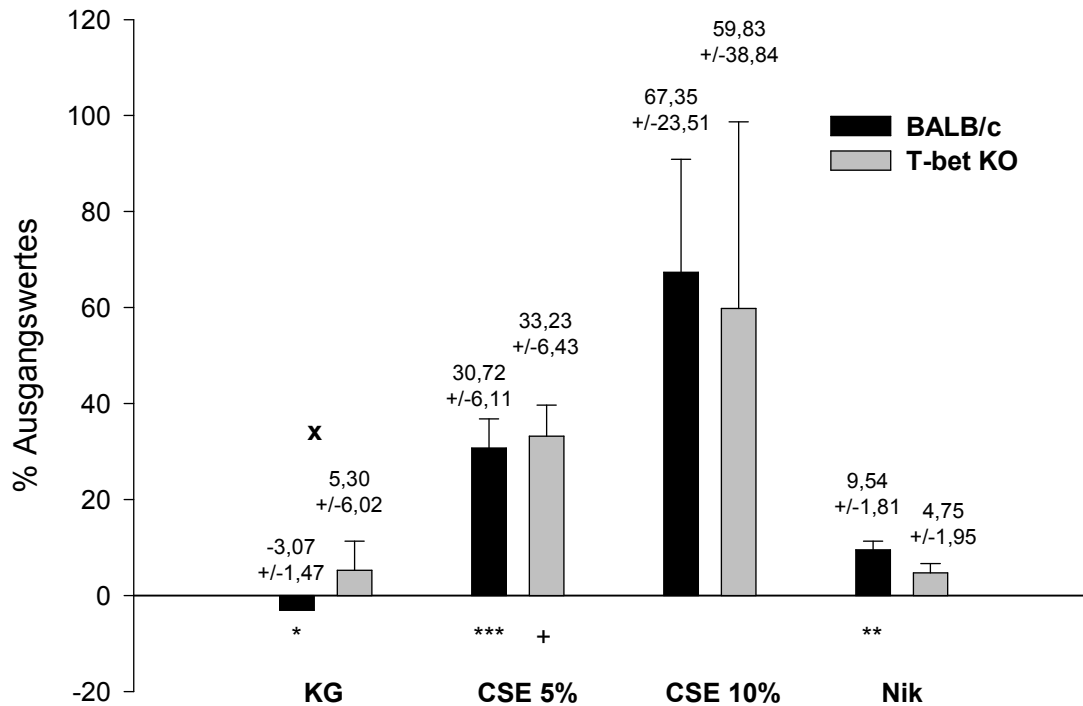
**Tab. 4. Versuche zur akuten Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktibilität der Bronchien**

Aufgeführt sind Mittelwert, Standardabweichung und Median der Versuchsgruppen Kontrollgruppe, akute Wirkung von CSE 5%, akute Wirkung von CSE 10% und akute Wirkung von reinem Nikotin.

Es folgt die graphische Darstellung der einzelnen Parameter.

**8.1.2 Änderung der bronchialen Querschnittsfläche nach temporärer Gabe von DMEM, CSE oder Nikotin auf Lungenschnitte (BALB/c vs. T-bet KO)**

**Abb. 6: Akute Wirkung von CSE bzw. Nik; BALB/c vs. T-bet KO**



- \* mit  $p < 0,05$  signifikant gegenüber CSE 5%, CSE 10% und Nikotin bei BALB/c
- \*\* mit  $p < 0,05$  signifikant gegenüber KG, CSE 5% und CSE 10% bei BALB/c
- \*\*\* mit  $p < 0,05$  signifikant gegenüber KG und Nikotin bei BALB/c
- + mit  $p < 0,05$  signifikant gegenüber KG und Nik bei T-bet KO
- x mit  $p = 0,023$  signifikanter Unterschied zw. BALB/c und T-bet KO

Abbildung 6 zeigt die Änderung der bronchialen Querschnittsfläche nach Zugabe von DMEM, CSE oder Nikotin. Auf der X-Achse sind die Versuchsgruppen Kontrollgruppe, CSE 5%, CSE 10% und Nikotin, auf der Y-Achse die prozentuale Änderung der bronchialen Querschnittsfläche aufgetragen. Die angegebenen Werte verstehen sich als Mittelwert +/- Standardabweichung.

Bei BALB/c zeigt der Vergleich der Versuchsgruppen CSE 5% und CSE 10% jedoch keine statistisch signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance On Ranks, Sigma Stat. Soft.).

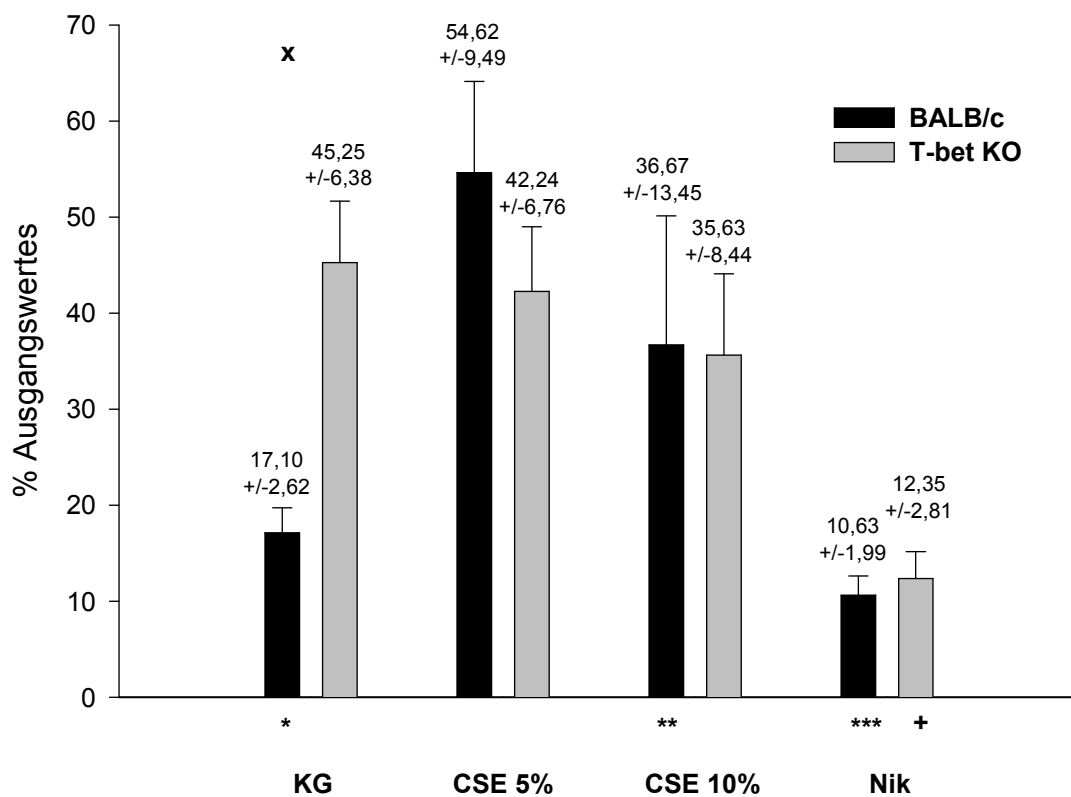
In T-bet KO-Lungenschnitten konnten wir auch beim Vergleich der Versuchsgruppen CSE 10%, Nik und KG untereinander sowie beim Vergleich der Versuchsgruppen CSE 5% und CSE 10% keine statistisch signifikante Unterschiede feststellen (Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance On Ranks, Sigma Stat. Soft.).

Bei Gegenüberstellen von BALB/c und T-bet KO zeigte sich nur in der Versuchsgruppe KG mit  $p=0,23$  ein signifikanter Unterschied. In den anderen Versuchsgruppen (Nik, CSE 5% und CSE 10%) stellten wir zwischen BALB/c und T-bet KO jedoch keine statistisch signifikante Unterschiede fest (t-test, Sigma Stat. Soft.).



### 8.1.3 Änderung der bronchialen Querschnittsfläche nach Stimulation mit ACh (BALB/c vs. T-bet KO)

**Abb. 7:**  
Bronchiale Kontraktion nach Stimulation mit ACh; BALB/c vs. T-bet KO



- \* mit  $p < 0,05$  signifikant gegenüber CSE 5% und CSE 10% bei BALB/c
- \*\* mit  $p < 0,05$  signifikant gegenüber KG und Nikotin bei BALB/c
- \*\*\* mit  $p < 0,05$  signifikant gegenüber CSE 5% und CSE 10% bei BALB/c
- + mit  $p < 0,05$  signifikant gegenüber KG, CSE 5% und CSE 10% bei T-bet KO
- x mit  $p < 0,001$  signifikanter Unterschied zw. BALB/c und T-bet KO

Abbildung 7 zeigt graphische Darstellung der ACh-Wirkung auf die bronchiale Kontraktilität, nachdem die Lungenschnitte 2,5 min dem CSE- bzw. Nikotin-Einfluss ausgesetzt wurden.

## Ergebnisse

---

Auf der X-Achse sind die Versuchsgruppen Kontrollgruppe, CSE 5%, CSE 10% und Nikotin, auf der Y-Achse die prozentuale Änderung der bronchialen Querschnittsfläche aufgetragen. Die angegebenen Werte verstehen sich als Mittelwert +/- Standardabweichung.

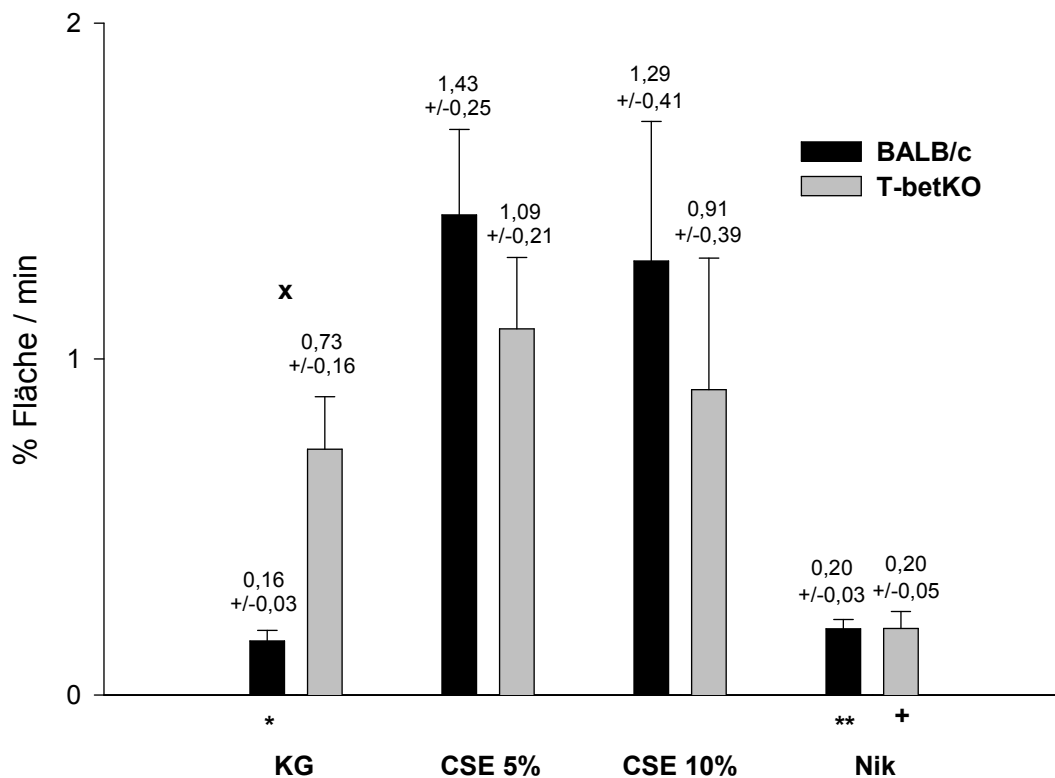
Der Vergleich der Versuchsgruppen CSE 5% und CSE 10% sowie KG und Nikotin ergab bei BALB/c jedoch keine statistisch signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance On Ranks, Sigma Stat. Soft.).

In den T-bet KO-Lungenschnitten erwies sich nur der Unterschied zwischen Versuchsgruppe Nik und anderen Versuchsgruppen (KG, CSE 5% und CSE 10%) mit  $p < 0,05$  als signifikant. Der Vergleich der Versuchsgruppen CSE 5%, CSE 10% und KG untereinander zeigte keine statistisch signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance On Ranks, Sigma Stat. Soft.).

Analog dem Punkt 8.1.2 war auch hier nach dem Gegenüberstellen von BALB/c und T-bet KO nur in der Kontrollgruppe der Unterschied mit  $p < 0,001$  signifikant, in allen anderen Versuchsgruppen (CSE 5%, CSE 10% und Nik) gab es zwischen BALB/c und T-bet KO keinen statistisch signifikanten Unterschied (t-test, Sigma Stat. Soft.).

8.1.4 Mittlere Geschwindigkeit der Kontraktion der Bronchien nach ACh-Gabe in der 1. Minute (BALB/c vs. T-bet KO)

**Abb. 8:**  
Mittlere Geschwindigkeit der bronchialen Kontraktion in der 1. Minute; BALB/c vs. T-bet KO



- \* mit  $p < 0,05$  signifikant gegenüber CSE 5% und CSE 10% bei BALB/c
- \*\* mit  $p < 0,05$  signifikant gegenüber CSE 5% und CSE 10% bei BALB/c
- + mit  $p < 0,05$  signifikant gegenüber KG, CSE 5% und CSE 10% bei T-bet KO
- x mit  $p < 0,001$  signifikanter Unterschied zw. BALB/c und T-bet KO

Abbildung 8 zeigt die mittlere Geschwindigkeit der bronchialen Querschnittänderung nach Stimulation mit Acetylcholin in der ersten Minute. Auf der X-Achse sind die Versuchsgruppen Kontrollgruppe, CSE 5%, CSE 10% und Nikotin, auf der Y-Achse die

prozentuale Änderung der bronchialen Querschnittsfläche pro Minute aufgetragen. Die angegebenen Werte verstehen sich als Mittelwert +/- Standardabweichung.

Der Vergleich der Versuchsgruppen CSE 5% und CSE 10% sowie KG und Nikotin zeigt bei BALB/c keine statistisch signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance On Ranks, Sigma Stat. Soft.).

Bei T-bet KO konnten wir nach dem Vergleichen von Kontrollgruppe, CSE 5%- und CSE 10%- Versuchsgruppen untereinander keine statistische Signifikanz feststellen. Nur der Unterschied zwischen der Versuchsgruppe Nik und allen anderen (CSE 5%, CSE 10% und KG) war mit  $p < 0,05$  signifikant (Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance On Ranks, Sigma Stat. Soft.).

Die mittlere Geschwindigkeit der bronchialen Kontraktion in BALB/c-Lungenschnitten unterschied sich von der in den T-bet KO-Lungenschnitten mit  $p < 0,001$  nur in der Kontrollgruppe signifikant. Auch hier stellten wir nach Auswertung der Ergebnisse in allen anderen Versuchsgruppen (CSE 5%, CSE 10% und Nik) zwischen BALB/c und T-bet KO keinen statistisch signifikanten Unterschied fest (t-test, Sigma Stat. Soft.).

## 8.2 Untersuchung der akuten Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien nach Inkubation mit Hexamethonium bzw. reinem Nikotin

### 8.2.1 Übersicht

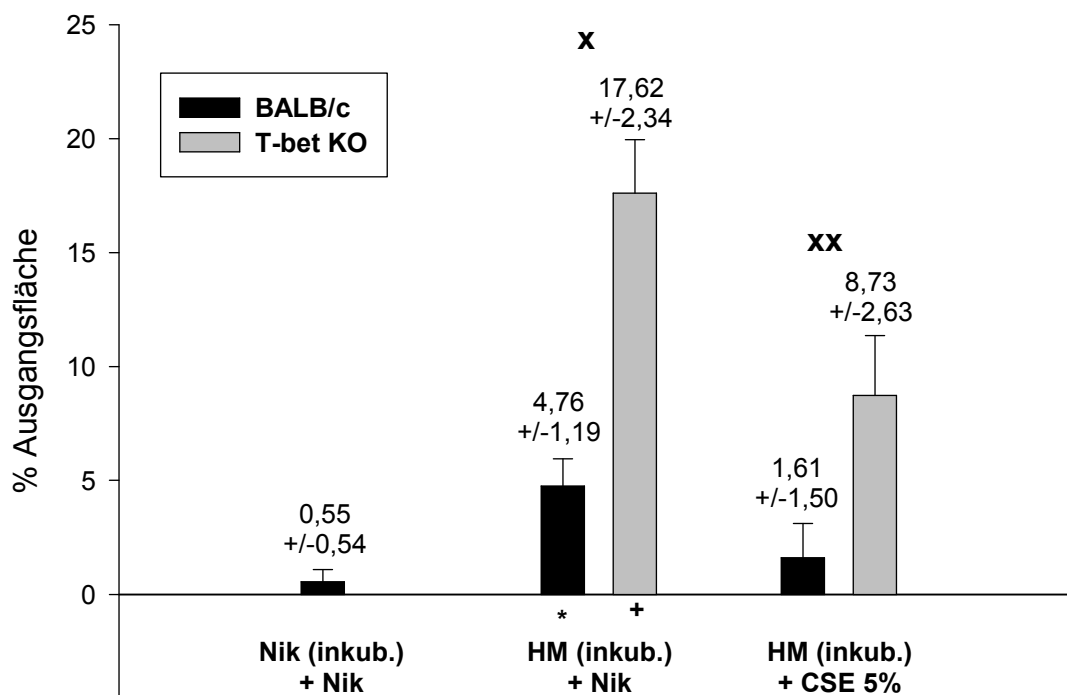
Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche zur Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien nach 48-stündiger Inkubation der Lungenschnitte mit Zugabe von Hexamethonium (HM) bzw. Nikotinlösung beschrieben. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Anschließend werden die einzelnen Parameter graphisch dargestellt.

		Änderung der Querschnittfläche nach Zugabe des Nic, CSE od. DMEM (% Ausgangswertes)		Änderung der Querschnittfläche nach Zugabe von ACh (% der Ausgangsfläche)		Mittlere Geschwindigkeit der Kontraktion in der 1. min (% Fläche pro min)	
		BALB/c	T-bet	BALB/c	T-bet	BALB/c	T-bet
<b>HM (inkub.) + Nik</b>	n	11	11	11	11	11	11
	Mittelwert	4,76	17,62	46,47	64,07	0,72	1,02
	Standardabweichung	3,94	7,75	25,76	16,88	0,42	0,22
	Median	3,26	17,79	45,51	69,06	0,8	1,01
<b>HM (inkub.) + CSE (5%)</b>	n	8	10	8	10	8	10
	Mittelwert	1,61	8,73	43,71	55,9	0,89	0,95
	Standardabweichung	4,25	8,33	29,97	22,04	0,51	0,34
	Median	0,82	4,8	44,73	66,46	0,87	1,03
<b>Nik (inkub.) + Nik</b>	n	17		22		19	
	Mittelwert	0,55		17,54		0,16	
	Standardabweichung	2,24		11,18		0,10	
	Median	0,86		13,43		0,15	

**Tab. 5. Versuche zur akuten Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien nach Inkubation mit Zusatz von Hexamethonium bzw. reinem Nikotin**

**8.2.2 Akute Wirkung von Nikotin bzw. CSE auf bronchiale Kontraktilität in BALB/c – und T-bet KO-Lungenschnitten, nachdem sie mit Hexamethonium bzw. Nikotin inkubiert wurden**

**Abb. 9:**  
**Änderung der bronchialen Querschnittsfläche nach Zugabe von CSE bzw. Nikotin; BALB/c vs. T-bet KO**



- \* mit  $p=0,007$  signifikanter Unterschied zu [Nik (inkub.) + Nik] bei BALB/c
- + mit  $p=0,02$  signifikanter Unterschied zu [HN (inkub.) + Nik] bei T-bet KO
- x mit  $p<0,001$  signifikanter Unterschied zw. BALB/c und T-bet KO
- xx mit  $p=0,043$  signifikanter Unterschied zw. BALB/c und T-bet KO

Abbildung 9 zeigt die Änderung der bronchialen Querschnittsfläche nach Auftropfen von CSE 5% oder Nikotin zu den mit Zugabe von Hexamethonium bzw. Nikotin inkubierten Lungenschnitten. Auf der X-Achse sind die Versuchsgruppen, auf der Y-Achse die

prozentuale Änderung der bronchialen Querschnittfläche aufgetragen. Die angegebenen Werte verstehen sich als Mittelwert +/- Standardabweichung.

Versuche zur akuten Wirkung von Nikotin auf die bronchiale Kontraktilität nach dauerhafter Exposition der Lungenschnitte (48-stündige Inkubation) gegenüber reinem Nikotin (Versuchsgruppe [Nik (inkub.) + Nik]) wurden nur mit BALB/c-Lungenschnitten durchgeführt.

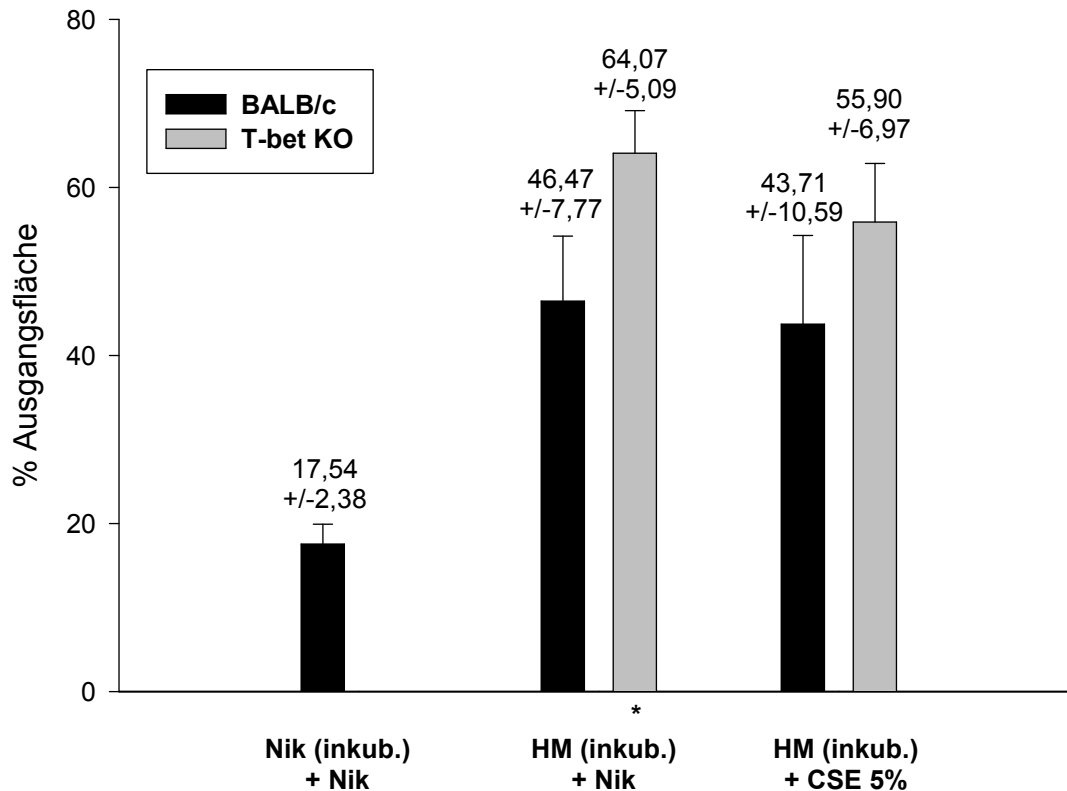
Der Vergleich zwischen [HM (inkub.) + CSE 5%] und [HM (inkub.) + Nik] zeigt bei BALB/c keine statistisch signifikanten Unterschiede (One Way Analysis Of Variance, Sigma Stat. Soft.)

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte aber, dass der Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen ([HM (inkub.) + CSE 5%] und [HM (inkub.) + Nik]) bei T-bet KO mit  $p=0,02$  statistisch signifikant war (t-test, Sigma Stat. Soft.).

Der Vergleich zwischen BALB/c und T-bet KO in Versuchsgruppen [HM (inkub.) + CSE 5%] und [HM (inkub.) + Nik] zeigte ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied (t-test, Sigma Stat. Soft.).

### 8.2.3 Änderung der bronchialen Querschnittfläche nach Stimulation mit ACh (BALB/c vs. T-bet KO)

**Abb. 10:** Bronchiale Kontraktion nach Stimulation mit ACh; BALB/c vs. T-bet KO



\* mit  $p=0,002$  signifikanter Unterschied zu [Nik (inkub.) + Nik] bei BALB/c

Abbildung 10 zeigt die Änderung der bronchialen Querschnittfläche (Kontraktion) nach Auftropfen von Acetylcholin (nach Ablauf von 2,5 min nach CSE 5%- bzw. Nikotin-Zugabe) zu den mit Zugabe von Hexamethonium bzw. Nikotin inkubierten Lungenschnitten. Auf der X-Achse sind die Versuchsgruppen, auf der Y-Achse die prozentuale Änderung der bronchialen Querschnittfläche aufgetragen. Die angegebenen Werte verstehen sich als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.



Versuche zur akuten Wirkung von Nikotin auf die bronchiale Kontraktilität nach dauerhafter Exposition der Lungenschnitte (48-stündige Inkubation) gegenüber reinem Nikotin (Versuchsgruppe [Nik (inkub.) + Nik]) wurden nur mit BALB/c-Lungenschnitten durchgeführt.

Der Vergleich zwischen Versuchsgruppen [HM (inkub.) + CSE 5%] und [HM (inkub.) + Nik] bei BALB/c zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede (One Way Analysis Of Variance, Sigma Stat. Soft.)

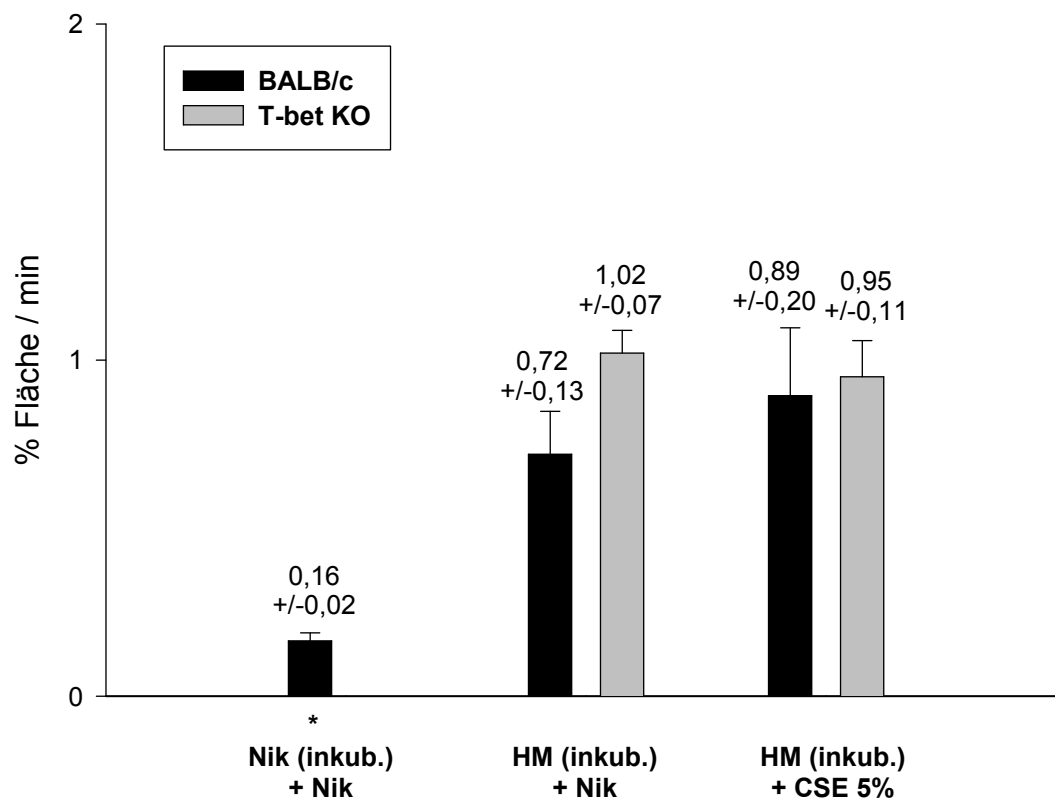
In T-bet KO-Lungenschnitten konnten wir beim Vergleich der Versuchsgruppen [HM (inkub.) + CSE 5%] und [HM (inkub.) + Nik] auch keinen statistisch signifikanten Unterschied feststellen (t-test, Sigma Stat. Soft.).

Das Ausmaß der bronchialen Kontraktion nach Stimulation mit Acetylcholin in den BALB/c-Lungenschnitten unterschied sich nicht signifikant von dem in den T-bet KO-Lungenschnitten in allen Versuchsgruppen ([HM (inkub.) + CSE 5%] und [HM (inkub.) + Nik]) (t-test, Sigma Stat. Soft.).

### 8.2.4 Mittlere Geschwindigkeit der Kontraktion der Bronchien nach Stimulation mit Acetylcholin in der 1. Minute (BALB/c vs. T-bet KO)

Abb. 11:

Mittlere Geschwindigkeit der Kontraktion in der 1. Minute; BALB/c vs. T-bet KO



\*

mit  $p < 0,05$  signifikanter Unterschied zu [HN (inkub.) + Nik]

Abbildung 11 zeigt die mittlere Geschwindigkeit der bronchialen Querschnittänderung nach Zugabe von Acetylcholin (nach Ablauf von 2,5 min nach CSE 5%- bzw. Nikotin-Zugabe) zu den mit Zugabe von Hexamethonium bzw. Nikotin inkubierten Lungenschnitten in der ersten Minute. Auf der X-Achse sind die Versuchsgruppen, auf der Y-Achse die prozentuale Änderung der bronchialen Querschnittfläche pro Minute aufgetragen. Die angegebenen Werte verstehen sich als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

Versuche zur akuten Wirkung von Nikotin auf die bronchiale Kontraktilität nach dauerhafter Exposition der Lungenschnitte (48-stündige Inkubation) gegenüber reinem Nikotin (Versuchsgruppe [Nik (inkub.) + Nik]) wurden nur mit BALB/c-Lungenschnitten durchgeführt.

Der Vergleich zwischen Versuchsgruppen [HM (inkib.) + CSE 5%] und [HM (inkub.) + Nik] bei BALB/c zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied (One Way Analysis Of Variance, Sigma Stat. Soft.)

In T-bet KO-Lungenschnitten konnten wir beim Vergleich der Geschwindigkeiten der bronchialen Kontraktion zwischen Versuchsgruppen [HM (inkib.) + CSE 5%] und [HM (inkub.) + Nik] auch keinen statistisch signifikanten Unterschied feststellen (t-test, Sigma Stat. Soft.).

Die mittlere Geschwindigkeit der bronchialen Kontraktion in BALB/c-Lungenschnitten unterschied sich von der in den T-bet KO-Lungenschnitten nicht signifikant in allen Versuchsgruppen ([HM (inkib.) + CSE 5%] und [HM (inkub.) + Nik]) (t-test, Sigma Stat. Soft.).

### 8.3 Durch Acetylcholin vermittelte Kontraktion der Bronchien nach Inkubation der Lungenschnitte mit Zigarettenrauchextrakt bzw. Nikotin

#### 8.3.1 Übersicht

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche zur durch Acetylcholin vermittelten Kontraktion der Bronchien nach 48-stündiger Inkubation der Lungenschnitte mit Zugabe von CSE 5% bzw. Nikotinlösung beschrieben. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Anschließend werden die einzelnen Parameter graphisch dargestellt.

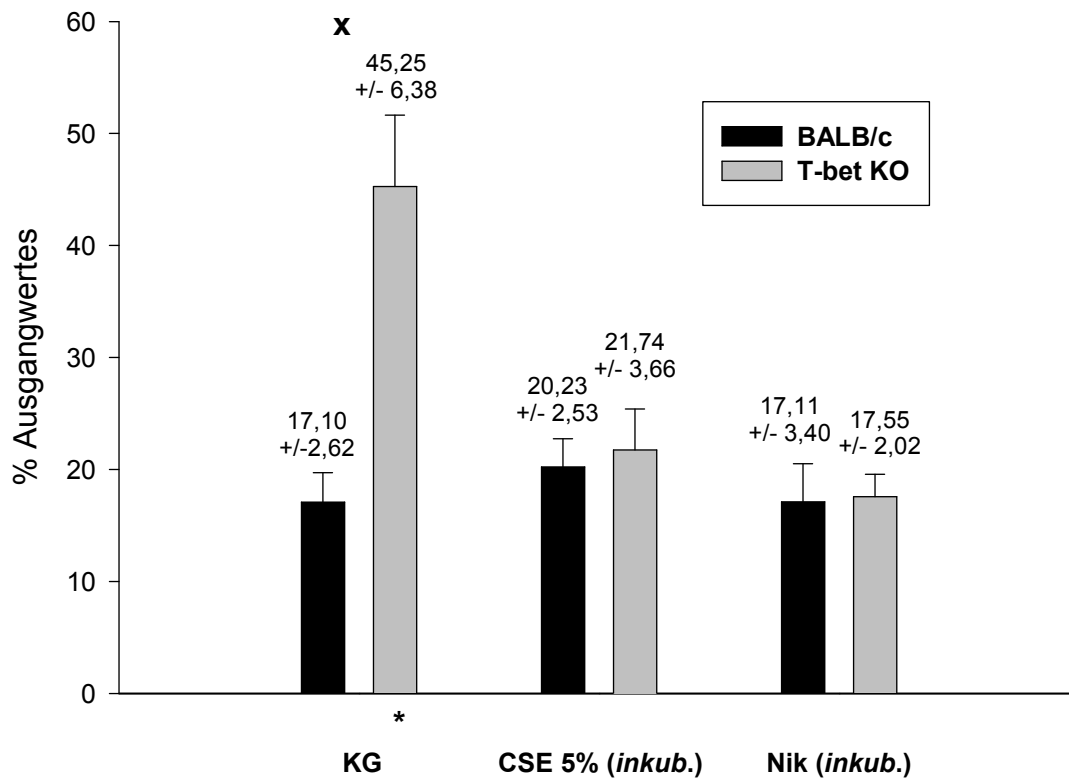
		Änderung der Querschnittfläche nach Zugabe von ACh (% der Ausgangsfläche)		Mittlere Geschwindigkeit der Kontraktion in der 1. min (% Fläche pro min)	
		BALB/c	T-bet	BALB/c	T-bet
<b>Kontrollgruppe</b>	n	15	12	15	12
	Mittelwert	17,1	45,25	0,16	0,73
	Standardabweichung	10,16	22,1	0,12	0,54
	Median	19,53	38,69	0,13	0,5
<b>CSE (5%)</b>	n	32	26	32	26
	Mittelwert	20,23	21,74	0,21	0,23
	Standardabweichung	14,3	18,65	0,17	0,25
	Median	14,54	18,03	0,14	0,2
<b>Nikotin</b>	n	19	25	19	25
	Mittelwert	17,11	17,55	0,3	0,21
	Standardabweichung	14,82	10,12	0,56	0,14
	Median	11,31	13,97	0,14	0,15

**Tab. 6. Zusammengefasste Ergebnisse der Versuche zur durch Acetylcholin vermittelten Kontraktion der Bronchien nach Inkubation mit Zusatz von CSE 5% bzw. Nikotin**

**8.3.2 Durch ACh vermittelte Kontraktion der Bronchien in BALB/c- und T-bet KO-Lungenschnitten, die mit CSE 5% bzw. Nikotin inkubiert wurden**

**Abb. 12:**

**Änderung der bronchialen Querschnittfläche nach Stimulation mit ACh (BALB/c)**



\* mit  $p=0,002$  signifikanter Unterschied zu CSE 5% (inkub.) bei T-bet KO  
mit  $p<0,001$  signifikanter Unterschied zu Nik (inkub.) bei T-bet KO  
(One Way Analysis Of Variance, Sigma Stat. Soft.)

x mit  $p<0,001$  signifikanter Unterschied zwischen BALB/c und T-bet KO in der Versuchsgruppe KG  
(t-test, Sigma Stat. Soft.)

Abbildung 12 zeigt die Änderung der bronchialen Querschnittfläche (Kontraktion) nach Auftropfen von Acetylcholin zu den mit Zugabe von CSE 5% bzw. Nikotin inkubierten Lungenschnitten. Auf der X-Achse sind die Versuchsgruppen, auf der Y-Achse die

## Ergebnisse

---

prozentuale Änderung der bronchialen Querschnittfläche aufgetragen. Die angegebenen Werte verstehen sich als Mittelwert +/- Standardabweichung.

Der Vergleich zwischen allen Versuchsgruppen (KG, Nik (inkub.) und CSE 5% (inkub.)) bei BALB/c zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede (One Way Analysis Of Variance, Sigma Stat. Soft.)

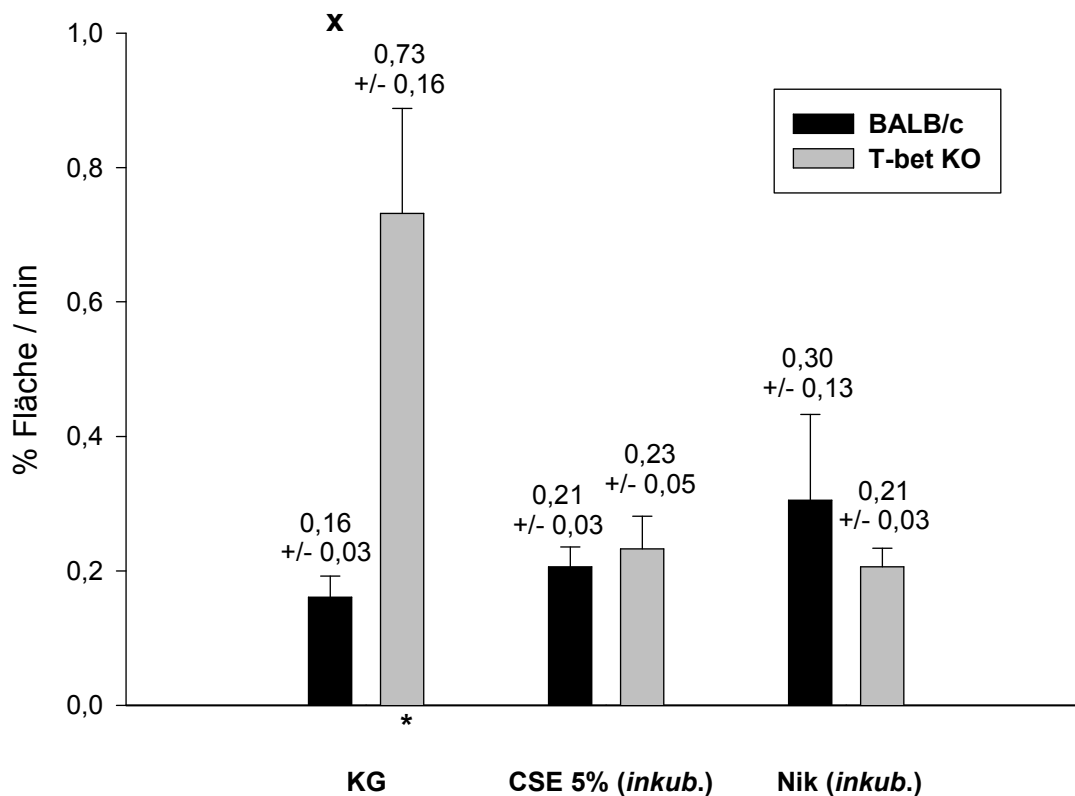
In den T-bet KO-Lungenschnitten erwies sich nur der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und anderen Versuchsgruppen (CSE 5% (inkub.) und Nik. (inkub.)) mit entsprechend  $p=0,002$  und  $p<0,001$  als signifikant. Der Vergleich der Versuchsgruppen CSE 5% (inkub.) und Nik. (inkub.) untereinander zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance On Ranks, Sigma Stat. Soft.).

Nach Auswertung der Ergebnisse in allen Versuchsgruppen (KG, CSE 5% (inkub.) und Nik. (inkub.)) konnten wir nur in der Kontrollgruppe zwischen BALB/c und T-bet KO einen statistisch signifikanten Unterschied feststellen (t-test, Sigma Stat. Soft.).

### 8.3.3 Mittlere Geschwindigkeit der Kontraktion der Bronchien nach Stimulation mit ACh in der 1. Minute (BALB/c vs. T-bet KO)

Abb. 13:

Mittlere Geschwindigkeit der Kontraktion der Bronchien nach ACh-Zugabe in der 1. Minute (BALB/c)



\* mit  $p < 0,001$  signifikanter Unterschied zu CSE 5% (inkub.) bei T-bet KO  
 mit  $p < 0,001$  signifikanter Unterschied zu Nik (inkub.) bei T-bet KO  
 (One Way Analysis Of Variance, Sigma Stat. Soft.)

x mit  $p < 0,001$  signifikanter Unterschied zwischen BALB/c und T-bet KO in der Versuchsgruppe KG  
 (t-test, Sigma Stat. Soft.)

Abbildung 13 zeigt die mittlere Geschwindigkeit der bronchialen Querschnittänderung nach Zugabe von Acetylcholin zu den mit Zugabe von Zigarettenrauchextrakt bzw. Nikotin inkubierten Lungenschnitten in der ersten Minute. Auf der X-Achse sind die Versuchsgruppen, auf der Y-Achse die prozentuale Änderung der bronchialen Querschnittsfläche pro Minute aufgetragen. Die angegebenen Werte verstehen sich als Mittelwert +/- Standardabweichung.

Der Vergleich zwischen allen Versuchsgruppen (KG, Nik (inkub.) und CSE 5% (inkub.)) bei BALB/c zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede (One Way Analysis Of Variance, Sigma Stat. Soft.)

Analog dem Punkt 8.3.2 erwies sich in den T-bet KO-Lungenschnitten nur der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und anderen Versuchsgruppen (CSE 5% (inkub.) und Nik. (inkub.)) mit jeweils  $p < 0,001$  als signifikant. Der Vergleich der Versuchsgruppen CSE 5% (inkub.) und Nik. (inkub.) untereinander zeigte keine statistisch signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance On Ranks, Sigma Stat. Soft.).

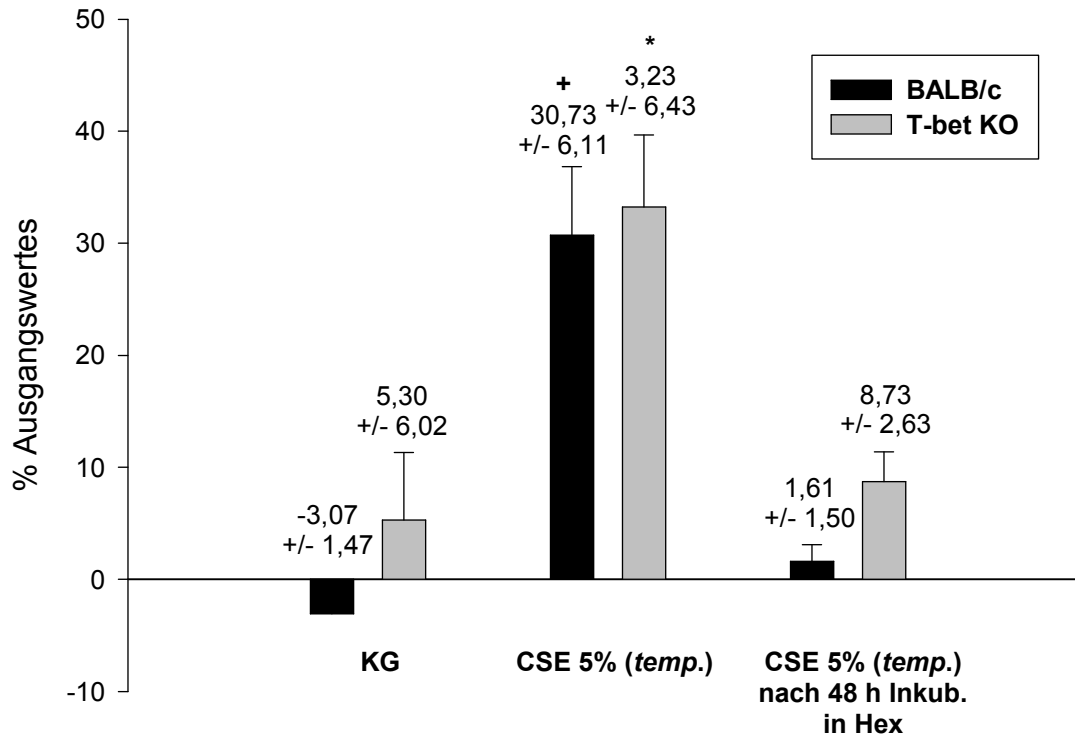
Nach Auswertung der Ergebnisse in allen Versuchsgruppen (KG, CSE 5% (inkub.) und Nik. (inkub.)) konnten wir auch hier nur in der Kontrollgruppe zwischen BALB/c und T-bet KO einen statistisch signifikanten Unterschied feststellen (t-test, Sigma Stat. Soft.).



## 8.4 Dilatativer Effekt der temporären Gabe von CSE 5% bzw. Nikotin in allen Versuchsgruppen

Abb. 14:

Bronchiale Dilatation nach temporärer Exposition gegenüber CSE 5% (BALB/c vs. T-bet KO)



**BALB/c:** + mit  $p < 0,05$  signifikanter Unterschied zu den Versuchsgruppen [KG] und [CSE 5% (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex]

**T-bet KO:** \* mit  $p = 0,003$  signifikanter Unterschied zu Versuchsgruppe [KG] und mit  $p < 0,012$  signifikanter Unterschied zu Versuchsgruppe [CSE 5% (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex]

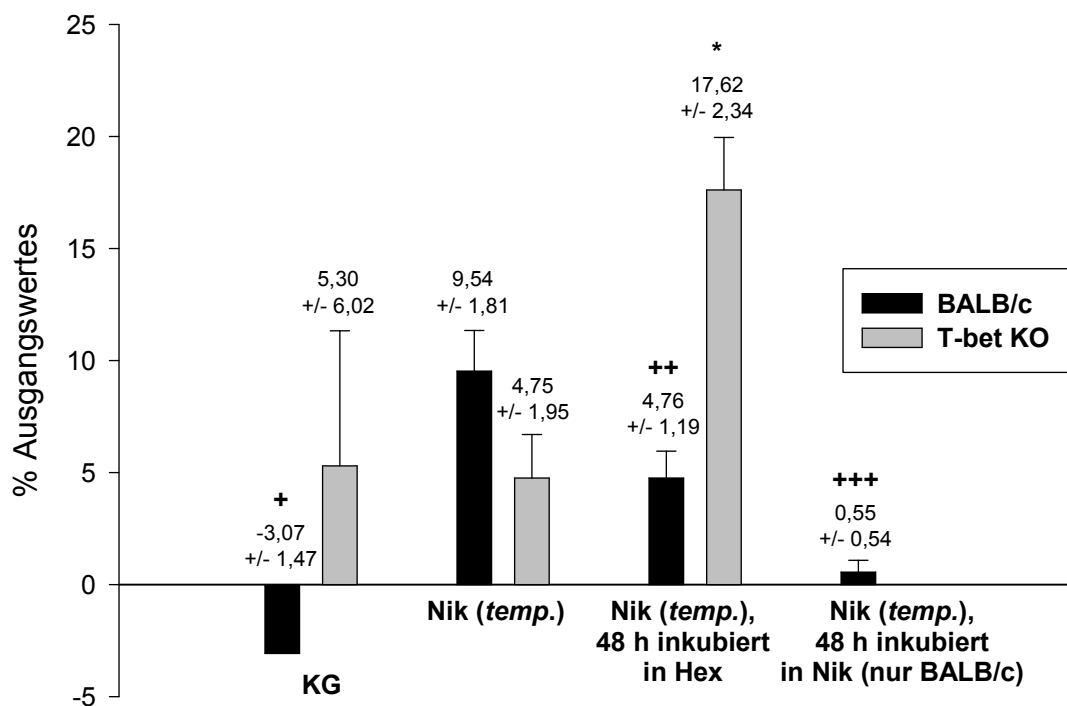
**BALB/c vs. T-bet KO:** [KG]: signifikanter Unterschied (s. Abb. 12)  
 [CSE 5% (temp.)]: kein signifikanter Unterschied  
 [CSE 5% (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex]: signifikanter Unterschied (s. Abb. 21)

(t-test, Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance On Ranks, Sigma Stat. Soft.)

Abbildung 14 zeigt den Vergleich der Änderung der bronchialen Querschnittfläche nach temporärer Exposition gegenüber CSE 5% in Versuchsgruppen [KG], [CSE 5% (temp.)] und [CSE 5% (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex] und gleichzeitig den Vergleich zwischen BALB/c und T-bet KO in diesen Versuchsgruppen. Auf der X-Achse sind die Versuchsgruppen, auf der Y-Achse die prozentuale Änderung der bronchialen Querschnittfläche aufgetragen.

**Abb. 15:**

**Bronchiale Dilatation nach temporärer Exposition gegenüber Nik in allen Versuchsgruppen (BALB/c vs. T-bet KO)**



**BALB/c:** + mit  $p < 0,001$  signifikanter Unterschied zu den Versuchsgruppen [Nik (temp.)] und [Nik (temp.) nach 48 h Inkub. mit Hex]

++ signifikanter Unterschied mit  $p < 0,001$  zu Versuchsgruppe [KG], mit  $p = 0,035$  zu Versuchsgruppe [Nik (temp.)] und mit  $p = 0,001$  zu Versuchsgruppe [Nik (temp.) nach 48 h Inkub. mit Nik]

	+++	<b>mit <math>p &lt; 0,001</math> signifikanter Unterschied zu Versuchsgruppe [Nik (temp.)]</b>
<b>T-bet KO:</b>	*	<b>mit <math>p = 0,004</math> signifikanter Unterschied zu Versuchsgruppe [Nik (temp.)]</b>
<b>BALB/c vs. T-bet KO:</b>		<b>[KG]: signifikanter Unterschied (s. Abb. 12)</b> <b>[Nik (temp.)]: kein signifikanter Unterschied</b> <b>[Nik (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex]: signifikanter Unterschied (s. Abb. 21)</b>

(t-test, Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance On Ranks, Sigma Stat. Soft.)

Abbildung 15 zeigt den Vergleich der Änderung der bronchialen Querschnittfläche nach temporärer Exposition gegenüber reinem Nikotin in Versuchsgruppen [KG], [Nik (temp.)], [Nik (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex] und [Nik (temp.) nach 48 h Inkub. mit Nik] und gleichzeitig den Vergleich zwischen BALB/c und T-bet KO in diesen Versuchsgruppen.

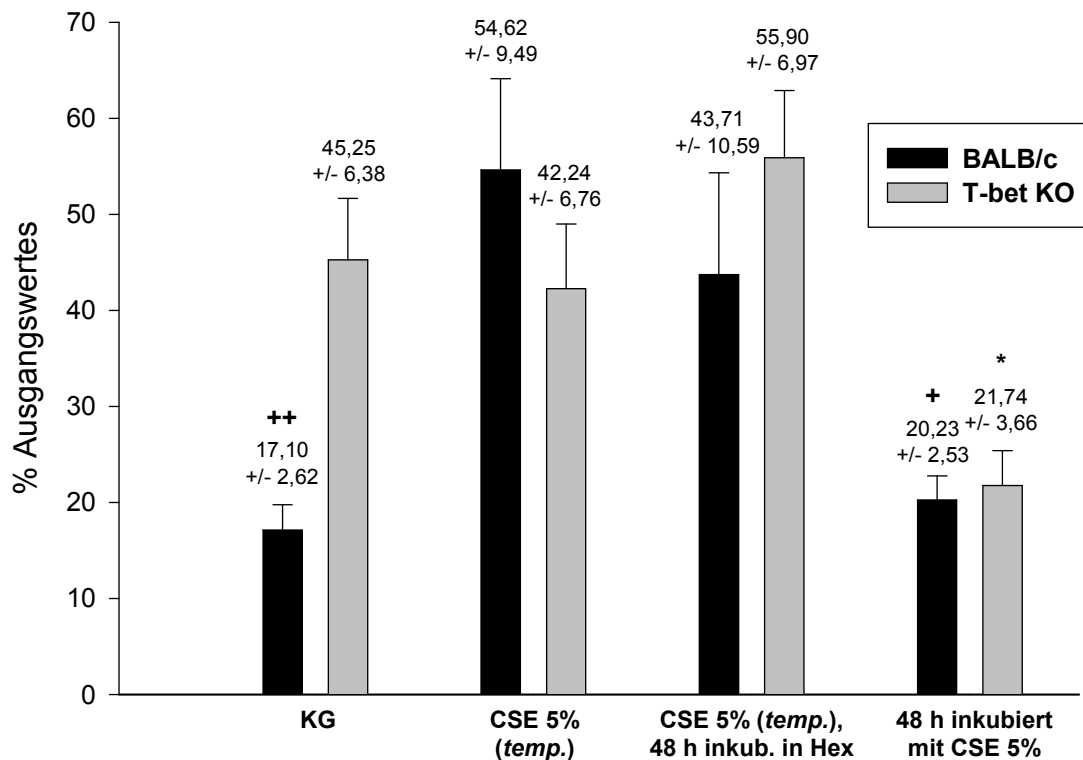
Die Teiluntersuchung, Auswirkung der temporären Exposition gegenüber reinem Nikotin auf bronchiale Kontraktilität nach 48-stündiger Kultivierung der Lungenschnitte mit Zugabe von Nikotinlösung, erfolgte nur bei BALB/c.

Auf der X-Achse sind die Versuchsgruppen, auf der Y-Achse die prozentuale Änderung der bronchialen Querschnittfläche aufgetragen.

**8.5 ACh-vermittelte Kontraktion (ACh  $10^{-5}$  M) der Bronchien nach der temporären und dauerhaften Exposition gegenüber CSE 5% bzw. Nikotin in allen Versuchsgruppen**

**Abb. 16:**

**ACh-vermittelte Kontraktion (ACh  $10^{-5}$  M) der Bronchien nach der temporären und dauerhaften Exposition gegenüber CSE 5% (BALB/c vs. T-bet KO)**



**BALB/c:**

- + mit  $p < 0,001$  signifikanter Unterschied zu Versuchsgruppe [CSE 5% (temp.)] und mit  $p = 0,038$  [CSE 5% (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex]
- ++ mit  $p < 0,001$  signifikanter Unterschied zu Versuchsgruppe [CSE 5% (temp.)] und mit  $p = 0,038$  [CSE 5% (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex]

**T-bet KO:** \* **signifikanter Unterschied zu den Versuchsgruppen [KG] (p=0,002), [CSE 5% (temp.)] (p=0,011) und [CSE 5% (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex] (p<0,001)**

**BALB/c vs. T-bet KO:** **[KG]: signifikanter Unterschied (s. Abb. 12)**  
**[CSE 5% (temp.)]: kein signifikanter Unterschied**  
**[CSE 5% (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex]: kein signifikanter Unterschied**  
**[48 h Inkub. mit CSE 5%]: kein signifikanter Unterschied**

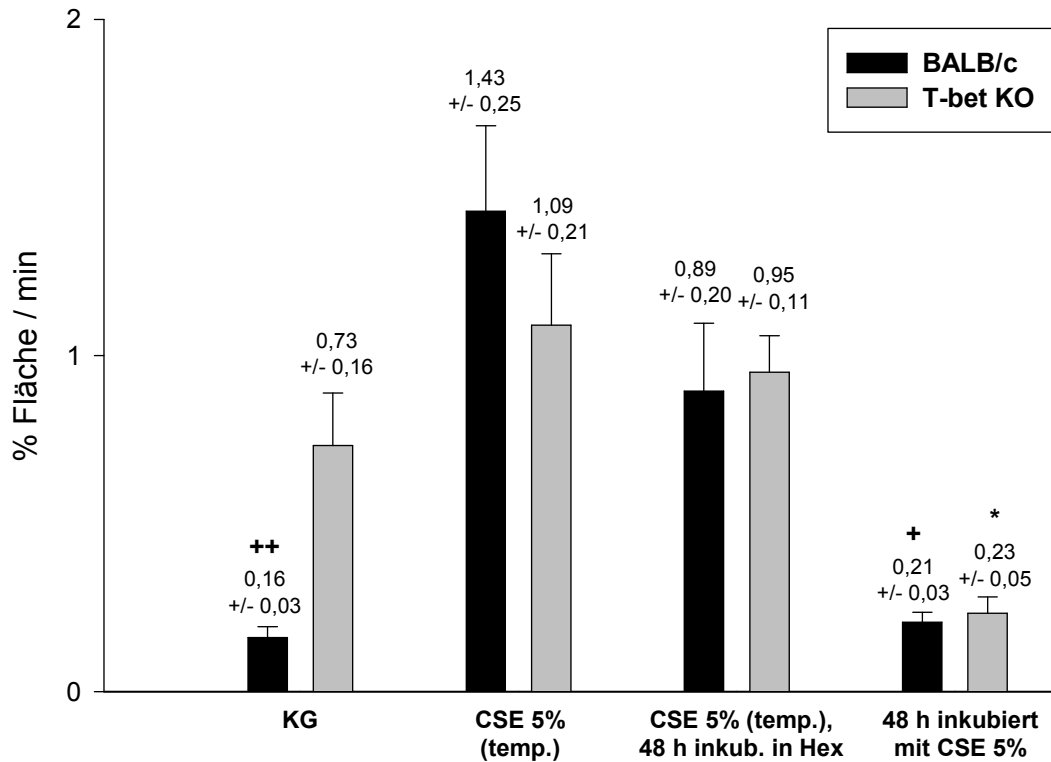
(t-test, Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance On Ranks, Sigma Stat. Soft.)

Abbildung 16 zeigt die graphische Darstellung der bronchialen Kontraktion nach temporärer Gabe von Acetylcholin (ACh  $10^{-5}$  M) in den Versuchsgruppen [KG], [CSE 5% (temp.)], [CSE 5% (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex] und [48 h Inkub. mit CSE 5%] im Vergleich untereinander. Ergebnisse mit BALB/c-Lungenschnitten sind denen mit T-bet KO gegenübergestellt.

Auf der X-Achse sind die Versuchsgruppen, auf der Y-Achse die prozentuale Änderung der bronchialen Querschnittfläche aufgetragen.

Abb. 17:

Mittlere Geschwindigkeit der ACh-vermittelten Kontraktion (ACh  $10^{-5}$  M) der Bronchien nach der temporären und dauerhaften Exposition gegenüber CSE 5% in allen Versuchsgruppen (BALB/c vs. T-bet KO)



**BALB/c:** + mit  $p < 0,001$  signifikanter Unterschied zu Versuchsgruppen [CSE 5% (temp.)] und [CSE 5% (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex]

++ mit  $p < 0,001$  signifikanter Unterschied zu Versuchsgruppe [CSE 5% (temp.)] und mit  $p = 0,001$  [CSE 5% (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex]

**T-bet KO:** \* mit  $p < 0,001$  signifikanter Unterschied zu Versuchsgruppen [KG], [CSE 5% (temp.)] und [CSE 5% (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex]

**BALB/c vs. T-bet KO:** [KG]: signifikanter Unterschied (s. Abb. 12)

**[CSE 5% (temp.)]: kein signifikanter Unterschied**

**[CSE 5% (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex]: kein signifikanter Unterschied**

**[48 h Inkub. mit CSE 5%]: kein signifikanter Unterschied**

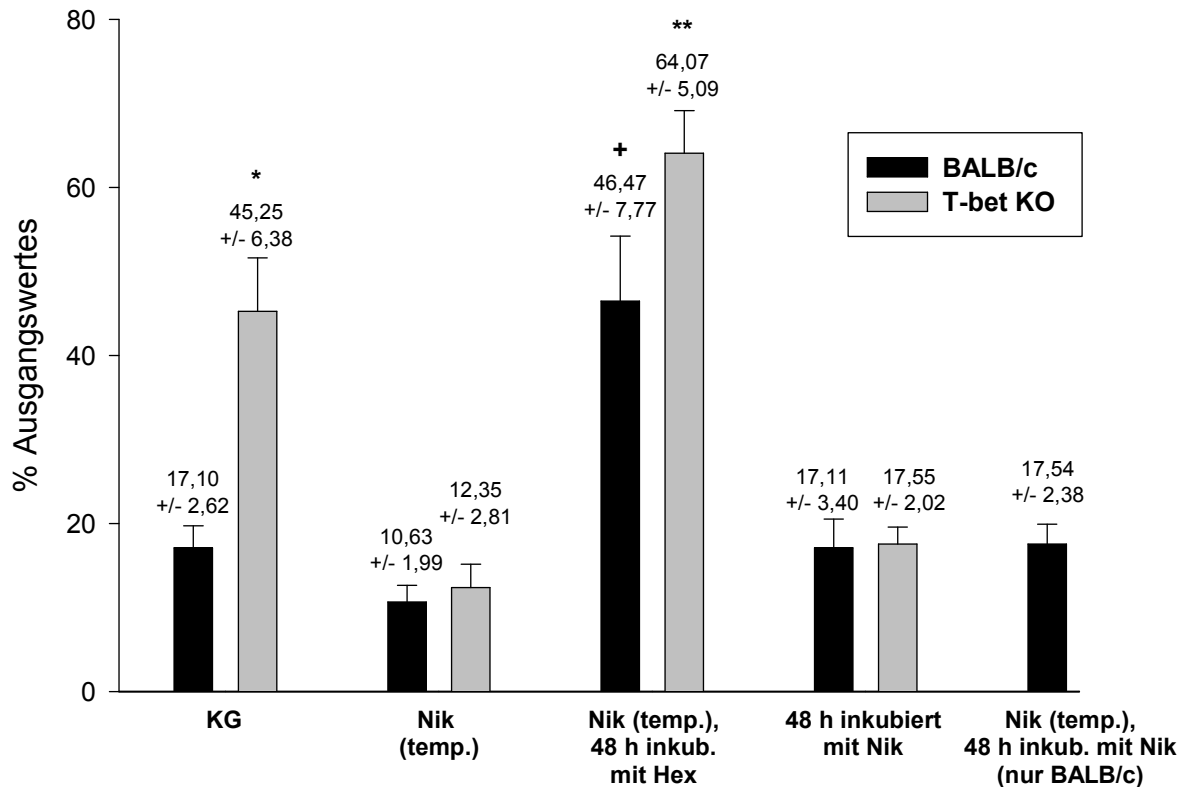
(t-test, Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance On Ranks, Sigma Stat. Soft.)

Abbildung 17 zeigt die graphische Darstellung der mittleren Geschwindigkeit der bronchialen Kontraktion in der 1. Minute nach temporärer Gabe von Acetylcholin (ACh  $10^{-5}$  M) in den Versuchsgruppen [KG], [CSE 5% (temp.)], [CSE 5% (temp.) nach 48 h Inkub. mit Hex] und [48 h Inkub. mit CSE 5%] im Vergleich untereinander. Ergebnisse mit BALB/c-Lungenschnitten sind denen mit T-bet KO gegenübergestellt.

Auf der X-Achse sind die Versuchsgruppen, auf der Y-Achse die prozentuale Änderung der bronchialen Querschnittfläche aufgetragen.

**Abb. 18:**

**ACh-vermittelte Kontraktion (ACh  $10^{-5}$  M) der Bronchien nach der temporären und dauerhaften Exposition gegenüber Nikotin in allen Versuchsgruppen (BALB/c vs. T-bet KO)**



**BALB/c:** + mit  $p=0,001$  signifikanter Unterschied zu den Versuchsgruppen [KG], [Nik (temp.)], [48 h Inkub. mit Nik] und [Nik (temp.) nach 48 h Inkub. mit Nik]

**T-bet KO:** \* signifikanter Unterschied zu Versuchsgruppen [Nik (temp.)] ( $p=0,003$ ), [Nik (temp.) nach 48 h Inkub. mit Hex] ( $p=0,033$ ) und [48 h Inkub. mit Nik] ( $p<0,001$ )

\*\* signifikanter Unterschied zu Versuchsgruppen [KG] ( $p=0,033$ ), [Nik (temp.)] ( $p<0,001$ ) und [48 h Inkub. mit Nik] ( $p<0,001$ )

**BALB/c vs. T-bet KO:** [KG]: signifikanter Unterschied (s. Abb. 12)



**[Nik (temp.)]: kein signifikanter Unterschied**

**[Nik (temp.) nach 48 h Inkub. mit Hex]: kein signifikanter Unterschied**

**[48 h Inkub. mit Nik]: kein signifikanter Unterschied**

(t-test, Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance On Ranks, Sigma Stat. Soft.)

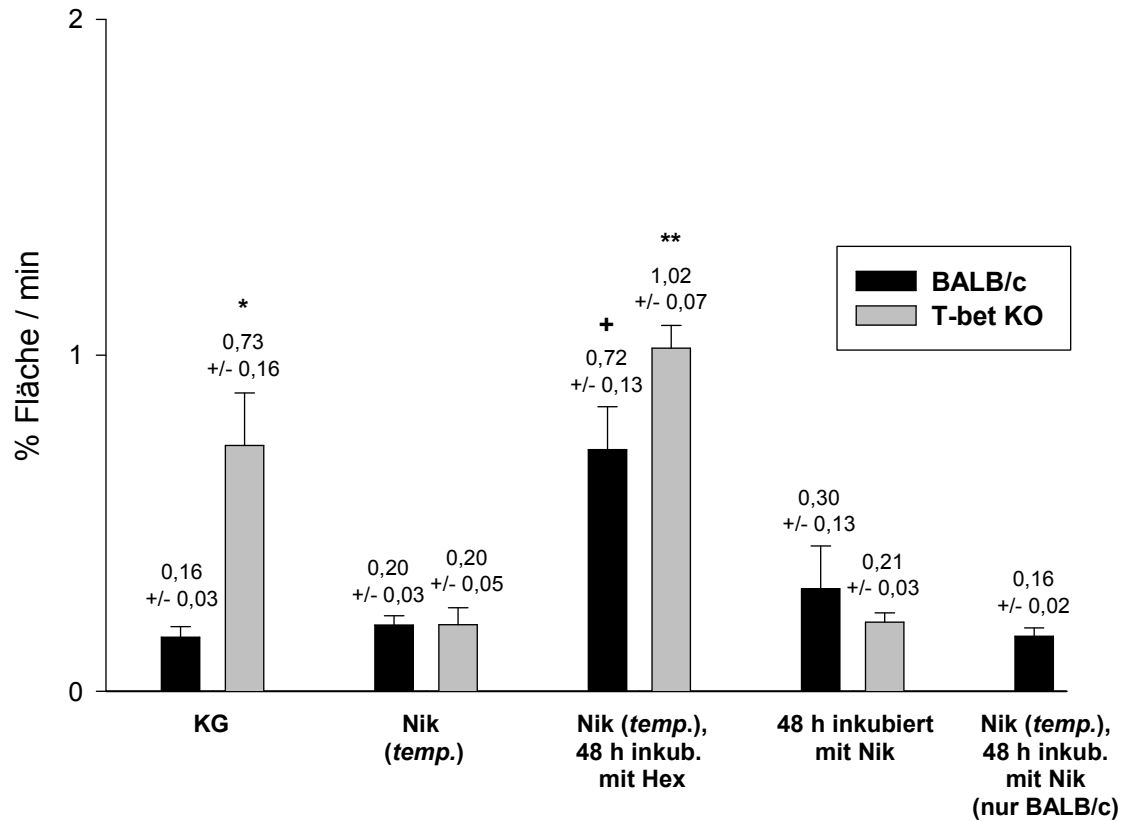
Abbildung 18 zeigt die graphische Darstellung der bronchialen Kontraktion nach temporärer Gabe von Acetylcholin (ACh  $10^{-5}$  M) in den Versuchsgruppen [KG], [Nik (temp.)], [Nik (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex], [48 h Inkub. mit Nik] und [Nik (temp.) nach 48 h Inkub. mit Nik] im Vergleich untereinander. Ergebnisse mit BALB/c-Lungenschnitten sind denen mit T-bet KO gegenübergestellt.

Die Teiluntersuchung in der Versuchsgruppe [Nik (temp.) nach 48 h Inkub. mit Nik] erfolgte nur bei BALB/c.

Auf der X-Achse sind die Versuchsgruppen, auf der Y-Achse die prozentuale Änderung der bronchialen Querschnittfläche aufgetragen.

**Abb. 19:**

**Mittlere Geschwindigkeit der ACh-vermittelten Kontraktion (ACh  $10^{-5}$  M) der Bronchien nach der temporären und dauerhaften Exposition gegenüber Nikotin in allen Versuchsgruppen (BALB/c vs. T-bet KO)**



**BALB/c:** + mit  $p < 0,001$  signifikanter Unterschied zu Versuchsgruppen [KG], [48 h Inkub. mit Nik], [Nik (temp.) nach 48 h Inkub. mit Nik] und mit  $p = 0,002$  zu Versuchsgruppe [Nik (temp.)]

**T-bet KO:** \* signifikanter Unterschied zu Versuchsgruppen [Nik (temp.)] ( $p = 0,032$ ) und [48 h Inkub. mit Nik] ( $p < 0,001$ )

\*\* signifikanter Unterschied zu Versuchsgruppen [Nik (temp.)] ( $p < 0,001$ ) und [48 h Inkub. mit Nik] ( $p < 0,001$ )

**BALB/c vs. T-bet KO:** [KG]: signifikanter Unterschied (s. Abb. 14)

[Nik (temp.)]: kein signifikanter Unterschied

**[Nik (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex]: kein signifikanter Unterschied**

**[48 h Inkub. mit Nik]: kein signifikanter Unterschied**

(t-test, Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance On Ranks, Sigma Stat. Soft.)

Abbildung 19 zeigt graphische Darstellung der mittleren Geschwindigkeit der bronchialen Kontraktion in der 1. Minute nach temporärer Gabe von Acetylcholin (ACh  $10^{-5}$  M) in den Versuchsgruppen [KG], [Nik (temp.)], [Nik (temp.) nach 48 h Inkub mit Hex], [48 h Inkub. mit Nik] und [Nik (temp.) nach 48 h Inkub. mit Nik] im Vergleich untereinander. Ergebnisse mit BALB/c-Lungenschnitten sind denen mit T-bet KO gegenübergestellt.

Die Teiluntersuchung in der Versuchsgruppe [Nik (temp.) nach 48 h Inkub. mit Nik] erfolgte nur bei BALB/c.

Auf der X-Achse sind die Versuchsgruppen, auf der Y-Achse die prozentuale Änderung der bronchialen Querschnittfläche aufgetragen.

## 9 DISKUSSION

### 9.1 Diskussion der Materialien und Methoden

#### 9.1.1 Diskussion der Versuchstiere

Eines der Ziele unserer Versuche war, festzustellen, ob ein Unterschied bei der Auswirkung von Zigarettenrauchextrakt bzw. reinem Nikotin *in vitro* auf bronchiale Kontraktilität in gesunder Lunge und bei Asthma bronchiale besteht. Für unsere Versuche verwendeten wir BALB/c-Mäuse (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland) und T-bet knock-out-Mäuse (Charles River Breeding Labs, Needham, MA). Als Auswahlkriterium wurde gefordert, dass Tiere zwischen 6 und 10 Wochen alt und 30 bis 50 g schwer sind. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Mäuse keine sichtbaren Verletzungen oder Krankheitszeichen aufweisen.

BALB/c-Mäuse sind immunkompetente Inzuchtmäuse vom Wildtyp.

Die Vermutung, dass das Gen T-bet eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentstehung spielt, bestätigte sich, als die Wissenschaftler Mäuse mit defekter T-bet-Anlage untersuchten (121, 122). Ein Ungleichgewicht zwischen T-Helfer-Lymphozyten vom Typ 2 (TH2) und Typ 1 (TH1) zugunsten einer Prädominanz von TH2 wird ursächlich für die Pathogenese von Asthma bronchiale verantwortlich gemacht. Der Transkriptionsfaktor T-bet ist für die Zelldifferenzierung von naiven zu TH1 Lymphozyten erforderlich und reguliert die Expression des TH1 Zytokins IFN $\gamma$  (121). Durch Ausschalten dieses Transkriptionsfaktors kommt es in der Lunge zu einer Anhäufung von TH2-Zellen, die gegenüber den regulatorischen T-Zellen ein Übergewicht erreichen. Durch die Zytokine der TH2-Zellen, wie IL-4 und IL-13, kommt es zur Aktivierung von Mastzellen, zur Histaminfreisetzung, zum Matrixumbau und schließlich zum Remodelling (122). Die zentrale Bedeutung dieser Befunde ist, dass T-bet knock-out-Mäuse spontan ein asthmaähnliches Krankheitsbild entwickeln.

Die Atemwege der Tiere mit defekter T-bet-Anlage weisen dieselben Veränderungen auf wie die von Asthmapatienten: Die Wände der Bronchien sind verdickt und entzündlich verändert. Zudem verengen sich die Atemwege – ebenso wie bei Asthmatikern – besonders stark, wenn sie mit der Substanz Acetylcholin gereizt werden (vergl. 31).

So können die T-bet knock-out-Mäuse als ein experimentelles Modell für das Asthma bronchiale bezeichnet werden.

### 9.1.2 Diskussion der verwendeten Lösungen

#### 9.1.2.1 Agar-DMEM-Mischung zur Füllung der Lunge

Ein bekanntes Verfahren zur Herstellung eines 2% Agarose-Gels zur Lungenfüllung wurde bereits beschrieben und von Forschungsteams angewandt (28, 31).

Durch die Verwendung vom Nährmedium DMEM statt sHBSS bei Herstellung von Agarose-Gel wurde versucht die Substitution von Nährsubstanzen an Flimmerepithel für den Zeitraum der Herstellung der Lungenschnitte ununterbrochen zu gewährleisten und somit einen möglichen negativ beeinflussenden Faktor (Substratmangel) auszuschalten.

Der Anteil des Agarose-Pulvers wurde von 2% auf 3,5% erhöht mit dem Vorteil, dass das Kollabieren der Lunge beim Schneidvorgang besser vermieden wurde und sich die Anzahl der brauchbaren Lungenschnitte erhöhte. Der Nachteil war, dass sich das Auswaschen der Agarose aus den Atemwegen schwieriger durchführen ließ. So war die Versuchsdurchführung beim Mikroskopieren durch das an den Bronchialwänden haftende Agarose-Gel manchmal teilweise oder auch ganz unmöglich.

#### 9.1.2.2 Nährmedium DMEM mit Antibiotika-/Antimykotikazusatz

Beim Inkubieren der Lungenschnitte wurde das Nährmedium DMEM (mit L-Glutamin und 4,5 g Glukose, D1152, SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland) mit Antibiotika (Penstrep) und Antimykotika (Fungizone) substituiert und somit der Befall der Schnitte während der Kultivierungszeit durch Bakterien und Pilze, was zur Verfälschung der Ergebnisse oder zum Absterben der Lungenschnitte führen könnte, vermieden.

Um den für Zellkulturen optimalen pH-Wert von 7,2-7,4 aufrechtzuerhalten und Abfall in den alkalischen Bereich zu vermeiden, wurden die Lungenschnitte in DMEM in einer Brutschrankatmosphäre mit CO<sub>2</sub>-Begasung (5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Der Zusatz von Phenolrot erlaubte optische Kontrolle über mögliche pH-Schwankungen (s. Punkt 7.1.3).

#### 9.1.2.3 Einsatz von sHBSS

Wenn sich die Lungenschnitte zum Zwecke des Passagierens und Auswaschens der Agarose aus Bronchien oder beim Mikroskopieren außerhalb des DMEM-Mediums befanden, wurde

in unserem Fall sHBSS (Hank's buffered salt solution supplementiert mit 25 mM HEPES) ohne Phenolrot als Puffersystem zur Stabilisierung der Zellen eingesetzt.

Der Vorteil der Anwendung von sHBSS zum Mikroskopieren ist, dass der optimale pH-Wert von 7,2-7,4 im Vergleich zu DMEM-Nährmedium ohne CO<sub>2</sub>-Begasung aufrechterhalten werden kann und somit pH-Schwankungen außerhalb des Brutschranks als möglicher Störfaktor umgangen wurden.

Als Puffersubstanz wurde bei sHBSS 25 mM HEPES (Kurzbezeichnung für 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) verwendet, eine Puffersubstanz, die bei einer Säurekonstante von  $pK_s = 7,55$  eine gute Pufferkapazität zwischen pH 6,8–8,2 besitzt (123). Der Nachteil ist, dass HEPES, besonders in höheren Konzentrationen, zelltoxisch ist und somit die Vitalität der Lungenschnitte sowie Kontraktilität der Bronchien negativ beeinflussen könnte. Deswegen war die längere Verweildauer der Lungenschnitte in sHBSS zu vermeiden, in unseren Versuchen betrug sie im Durchschnitt ca. 5 min zum Auswaschen des Agarosegels und 3-5 min zum Mikroskopieren.

### 9.1.2.4 CSE und Nikotin

Der chronische Konsum von Tabakrauch ist unter anderem ein gesicherter Risikofaktor für verschiedene Arten von Krebs, pulmonale Erkrankungen wie COPD sowie Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (s. Punkt 5.4)

Das Zigarettenrauchen ist nach wie vor der Gegenstand zahlreicher Studien, verschiedene Forschergruppen untersuchen unter Anwendung unterschiedlicher Methoden und Techniken die Auswirkungen von Zigarettenrauch und Nikotin auf physiologische und pathophysiologische Prozesse sowie deren Rolle bei der Genese verschiedener Erkrankungen.

Zur Erfassung der Wirkungen des Rauchens auf bronchiale Kontraktilität haben wir das Modell der Exposition von Lungenschnitten gegenüber Zigarettenrauchextrakt (cigarette smoke extract, CSE) angewendet. Von der Methode mit Verwendung von Tabakauszug (smokeless tobacco extract: Tabak im Kulturmedium für 2 h bei 37<sup>0</sup> ziehen lassen und dann zentrifugieren), wie sie von SHAOBIN ZHANG und THOMAS M. PETRO beschrieben wurde (128), haben wir abgesehen, da die chemische Zusammensetzung der Lösung möglichst dem *Rauch* einer Zigarette entsprechen sollte.

Bei der Methode der Herstellung von CSE, die wir bei unseren Untersuchungen verwendeten, handelt es sich um Begasung eines flüssigen Kulturmediums mit Zigarettenrauch. Dabei wurde Zigarettenrauch unter standardisierten Bedingungen in Kulturmedium aufgenommen, so dass primär die wasserlöslichen Komponenten vorlagen (s. Punkt 6.1.4). Diese Methode eignet sich sehr gut zur Erfassung der Wirkungen von Zigarettenrauch auf vitales Gewebe *in vitro* und wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben und je nach Fragestellung modifiziert (119, 129).

Der Nachteil der von uns angewandten Technik war, dass die eingestellte Absaugrate (eine Zigarette in 5 min) jedoch nicht zu einer vollständigen Aufnahme des erzeugten Rauchs führte und ein Teil als Nebenstromrauch in den Abzug entwich. Der Vorteil war, dass wir Zigaretten mit Filter (Marke Gauloise Blondes, nominell Teer 10 mg, Nikotin 0,8 mg) verwendeten: Da die Filter der Zigaretten die Zusammensetzung des Rauchs durch teilweise Absorption hoch siedender (vorwiegend kanzerogener) Komponenten beeinflussen können (und sollen), wurden sie beibehalten, um nicht möglicherweise toxische, zellulär wirkungsvolle, beim üblichen Rauchen von Zigaretten aber relativ zum Gesamtrauch teils ausgefilterte Komponenten übermäßig zu repräsentieren.

Nikotin (S- (-)-nicotine) ist das Hauptalkaloid der Tabakpflanze und primär verantwortlich für Suchtpotential und vielfältige pharmakologische Effekte des Rauchens (127). Eine vereinfachte Übersicht über Wirkung von Nikotin bei chronischer Exposition zeigt Abb. 20. Reines Nikotin ist bei Zimmertemperatur eine ölige, farblose Flüssigkeit, die sich an der Luft rasch braun färbt. Beim Umgang mit hochkonzentrierten Nikotinlösungen war das Einhalten strengster Sicherheitsmaßnahmen wie das Tragen der Handschuhe und Arbeiten unter dem Abzug vorgeschrieben, da Nikotin eine hochgiftige Substanz ist. Bei unseren Versuchen verwendeten wir eine Nikotinlösung der Konzentration 400 mg/ml zur Herstellung der Nikotin-Stammlösung (vergl. Punkt 6.1.5). Der Vorteil dabei war, dass wir durch Verdünnen des Konzentrats eine Nikotinkonzentration erreichen konnten (ca. 200 µg/ml), die mit der des CSE vergleichbar war.

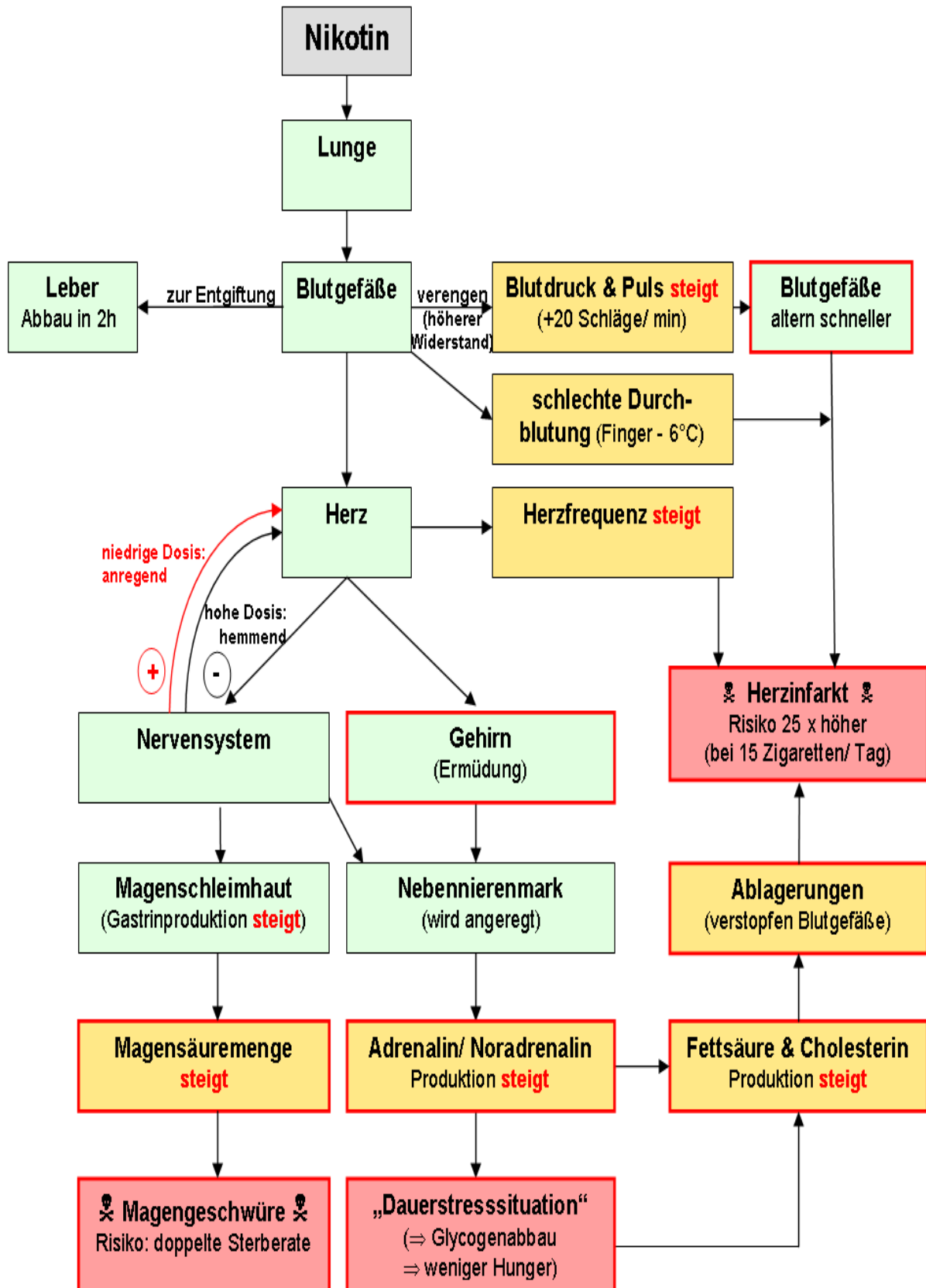


Abb. 20: Vereinfachte Übersicht über Wirkung von Nikotin



### 9.1.3 Erstellen der Lungenschnitte

Um die Bronchokonstriktion untersuchen zu können, wie es das Ziel unserer Untersuchungen war, ist es wichtig, Studien an der glatten Muskulatur der Atemwege durchzuführen. Erstmals wurde die Methode, Lungenschnitte zur Ermittlung einer Bronchokonstriktion zu verwenden, von DANDURAND et al. (1993) beschrieben (124). Die verwendeten Schnitte wurden aus Rattenlungen gewonnen, hatten eine Schichtdicke von 500-1000 µm und konnten unter Zellkulturbedingungen gelagert werden. Basierend auf dieser Methode entwickelten MARTIN et al. (1996) eine Technik, um Lungenschnitte aus der Mäuselunge mit einer Schichtdicke von 250 µm zu erstellen (125). Durch die erheblich geringere Dicke der Schnitte – bei unseren Untersuchungen wurde die Schnittdicke fest auf 200 µm eingestellt – sinkt die Gefahr, dass die Schnittebene nicht im rechten Winkel zu dem zu schneidenden Bronchus liegt oder der Verlauf des Bronchus innerhalb des Schnittes nicht gradlinig ist. Weiterhin wird die Aufnahme von Nährstoffen und Sauerstoff durch das Gewebe verbessert (125). Die in unserer Arbeit verwendete Methode zum Anfertigen von Lungenschnitten aus Lungengewebe lehnt sich an das von MARTIN et al. (1996) beschriebene Verfahren zum Erstellen von Lungenschnitten aus der Mäuselunge an. Die Bezeichnung dieser Methode als *ex-vivo*-Untersuchung erscheint durch die Erhaltung der Vitalität der Lungenschnitte über mindestens 24 Stunden, angemessener als der Terminus *in-vitro*-Untersuchung.

Um die Schneidfähigkeit des Lungengewebes zu erreichen, war ein wichtiger Schritt die Füllung der Lunge mit Agaroselösung zur Stabilisierung des weichen Gewebes. Dies war bei den Mäusen mit den beschriebenen Techniken (s. Punkt 6.2.3) über die Trachea leicht durchzuführen. Dabei war aber die äußerste Vorsicht geboten, da makroskopische Veränderungen in Form von Atelektasen bei zu schwacher oder in Form von Emphysemen bei zu starker Befüllung der Lunge beobachtet werden konnten, wodurch die Verwendbarkeit der Lungenschnitte eingeschränkt oder unmöglich wurde.

Eine gewebsschädigende Eigenschaft der Agarose konnte aufgrund der vorhandenen Vitalität (Zilienschlag des Flimmerepithels, Kontraktionsfähigkeit der Broncholi) der Lungenschnitte nicht beobachtet werden. Auch MARTIN et al. (1996) konnten keine Gewebsschäden durch die Befüllung des Lungengewebes mit Agaroselösung feststellen.

Die erstellten Lungenschnitte wurden bei 37°C in einem Inkubationsschrank gelagert. Die noch in den Schnitten nach dem Auswaschen vorhandene Agarose konnte durch mehrfachen Mediumwechsel meistens vollständig entfernt werden.

Ein guter Parameter zum Nachweis der Vitalität der Lungenschnitte ist der Zilienschlag des Flimmerepithels. Die Ziliarbewegung kann unter dem Mikroskop beobachtet werden; sie ist ein zuverlässiger Beweis für eine vorhandene Vitalität (126). Die direkte Bronchokonstriktion nach Zugabe von ACh auf den Lungenschnitt ist ebenfalls eine aussagekräftige Untersuchung, mit dem Nachteil, dass das Gewebe im Anschluss an die Auswertung nicht mehr verwendet werden kann.

Zur Bestimmung einer erfolgten Bronchokonstriktion bzw. -dilatation wurde die Fläche des Bronchulus anhand der Epithelgrenze festgelegt und ausgemessen. Auch WOHLSEN et al. (2003) beschrieben die Verwendung der Bronchusfläche zur Berechnung einer Bronchokonstriktion als zuverlässige Methode (126). Die Änderung der bronchialen Querschnittsfläche bei Konstriktion bzw. Dilatation wurde in Relation zum Ausgangswert in Prozent angegeben.

Damit die angefertigten Lungenschnitte in den Untersuchungen ausgewertet werden konnten, mussten zusätzlich zu dem vorhandenen Zilienschlag weitere Bedingungen erfüllt sein. Für eine vollständige Kontraktion war es notwendig, dass die glatte Muskulatur um den Bronchulus unversehrt war. Ebenso musste die Epithelgrenze kontinuierlich und abgegrenzt sein, um ein exaktes Ausmessen des Bronchiallumens zu ermöglichen. Ein Verlauf des Bronchulus im rechten Winkel zur Schnittebene des Lungenschnittes war notwendig, damit ein Ausmessen des gesamten Bronchiallumens gewährleistet werden konnte. Es durften keine Agarose oder Zelldetritus im Lumen vorhanden sein, da es sonst zu einer unvollständigen Kontraktion kam.

## 9.2 Diskussion der Ergebnisse

### 9.2.1 Akute Exposition gegenüber CSE/Nikotin

Akute Exposition der Lungenschnitte gegenüber CSE/Nikotin war die erste Teiluntersuchung unserer Arbeit. Das Ergebnis war eine deutliche Dilatation der bronchialen glatten Muskulatur mit Vergrößerung der Querschnittfläche einzelner Bronchien sowohl bei BALB/c- als auch bei T-bet KO-Mäusen. Somit zeigte der Vergleich unserer Ergebnisse mit Literaturangaben eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Börjesson/Nordgren/Delbro, die über Relaxation der glatten Muskulatur in Ratten nach Exposition gegenüber nACh-Rezeptor-Agonist DMPP berichteten (130).

Innerhalb beider Versuchsgruppen sahen Ergebnisse wie folgt aus (Abb. 21):

- BALB/c

Im Vergleich zu Kontrollgruppe führte eine einmalige Exposition gegenüber CSE/Nikotin zur signifikanten Vergrößerung der bronchialen Querschnittfläche. Interessant dabei war, dass Zigarettenrauchextrakt zu einer deutlich stärkeren Dilatation führte als reines Nikotin (Abb. 6). Auch innerhalb der CSE-Gruppe zeigten sich deutliche Unterschiede: Bei CSE 10% war die Dilatation mit 67% des Ausgangswertes (n=11) doppelt so stark ausgefallen als CSE 5% mit knapp 31% des Ausgangswertes (n=7). Dies könnte darauf hindeuten, dass das Ausmaß der Dilatation nach Exposition gegenüber CSE konzentrationsabhängig ist. Welche Konzentration zu maximal möglicher Dilatation führt, haben wir jedoch nicht festgestellt.

- T-bet KO

Hier waren die Ergebnisse denen in der BALB/c-Versuchsgruppe sehr ähnlich: eine einmalige Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt/Nikotin führte zur signifikanten Vergrößerung der Querschnittfläche, wobei auch hier die Dilatation durch CSE stärker ausgeprägt war als durch Nikotin. Diesmal zeigte aber die CSE-Gruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied bei der Anwendung verschiedener Konzentrationen (CSE 10% mit 59% des Ausgangswertes (n=7) vs. CSE 5% mit 33% des Ausgangswertes (n=10)) (Abb. 6). Die Ursache dafür könnte eine zu hohe Streubreite der Standardabweichung in der CSE-Gruppe sein. Die Tendenz zur

stärkeren Dilatation bei höheren Konzentrationen ist allenfalls zu erkennen. Bemerkenswert ist, dass innerhalb der T-bet KO-Versuchsgruppe kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Nikotin-Gruppe vorliegt (s. unten). Ein Grund dafür könnte der erhöhte Basaltonus der glatten Bronchialmuskulatur bei Hyperreagibilität sein (28, 31).

Wie bereits dargestellt, haben wir die Wirkung der akuten Exposition gegenüber CSE mit der Wirkung der akuten Exposition gegenüber Nikotin verglichen. Wichtig ist in diesem Kontext zu erwähnen, dass Nikotinderivate Nitrosamine wie NNN (N'-nitrosoornikotin) und NNK (4(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon) als Agonisten an nACh-Rezeptoren wirken können, welche die  $\alpha 7$ -Untereinheiten besitzen. Erstaunlicherweise binden diese  $\alpha 7$ -Untereinheiten enthaltenden nACh-Rezeptoren NNK mit höherer Affinität als Nikotin (131-135). Dies wäre eine Erklärung dafür, dass Zigarettenrauchextrakt zur stärkeren Dilatation führt als Nikotin.

Anschließend wurden den durch CSE/Nik vorbehandelten Lungenschnitten  $10^{-5}$  M ACh zugesetzt (Abb. 22). Als Antwort zeigte sich eine deutliche Kontraktion der glatten Muskulatur in allen Versuchsgruppen. In der Kontrollgruppe war die Kontraktion bei T-bet KO mit 45,3% deutlich stärker ausgefallen als bei BALB/c mit 17,1% ( $p < 0,001$ ). Die gleichen Ergebnisse wurden bereits von A. Bergner et al. (28, 31) ausführlich beschrieben und stehen mit der Hyperreagibilität der Atemwege bei erhöhtem Basaltonus der glatten Muskulatur in T-bet KO im Zusammenhang. In allen anderen Versuchsgruppen (CSE 5%, CSE 10% sowie Nik) konnten wir keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen BALB/c und T-bet KO feststellen.

Bemerkenswert ist, dass akute Exposition gegenüber CSE zu einer signifikant stärkeren Kontraktion der glatten Muskulatur in BALB/c-Gruppe in Vergleich zu Kontrolle zeigte. Bei den durch reines Nikotin vorbehandelten BALB/c-Lungenschnitten konnte dagegen keine statistisch signifikante Steigerung der Kontraktion gezeigt werden. Andererseits führte die akute Exposition gegenüber CSE in der T-bet-KO-Gruppe nicht zu einer signifikanten Steigerung der Kontraktion nach ACh-Zugabe im Vergleich zu Kontrollgruppe. Die durch reines Nikotin vorbehandelten Bronchien in den T-bet KO-Lungenschnitten kontrahierten

nach ACh-Zugabe signifikant weniger ausgeprägt als Kontrollgruppe. Abb. 23 zeigt, dass die Geschwindigkeit der Kontraktion eng mit dem Ausmaß der Kontraktion korreliert.

Somit könnte man folgendes vermuten:

- eine akute Exposition der gesunden Lunge gegenüber CSE in vitro führt zur Hyperreagibilität der glatten Muskulatur und somit zur stärkeren Obstruktion des Atemweges bei gleichzeitiger Exposition gegenüber ACh
- das reine Nikotin hemmt in T-bet Ko-Lungenschnitten in vitro die Kontraktion nach ACh-Zugabe und wirkt somit protektiv auf glatte bronchiale Muskulatur bei Hyperreagibilität

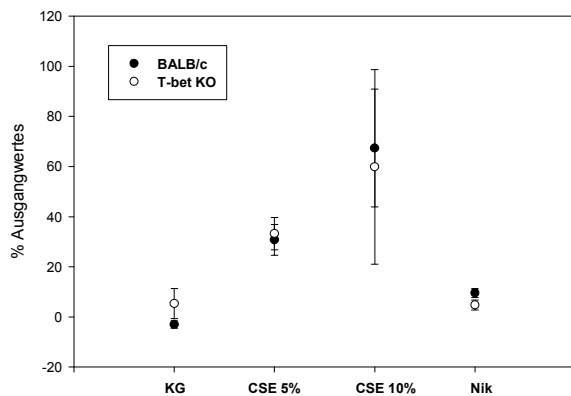


Abb. 21: Dilatation nach CSE/Nik-Zugabe

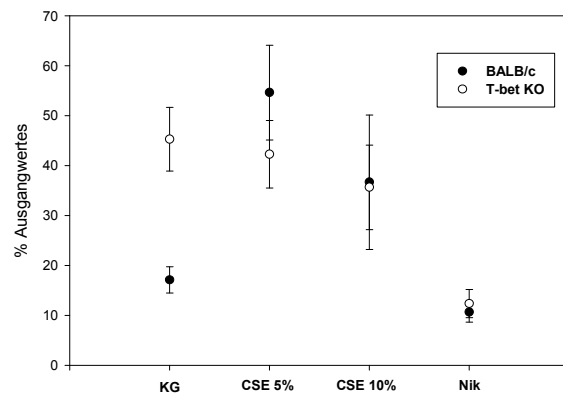


Abb. 22: ACh-vermittelte Kontraktion

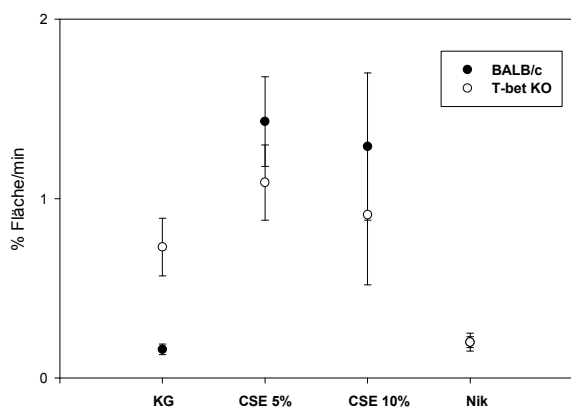


Abb. 23: Geschwindigkeit der Kontraktion

9.2.2 Akute Exposition gegenüber Nik bzw. CSE nach Inkubation der Lungenschnitte mit Hexamethonium bzw. reinem Nikotin

Das Ziel unserer zweiten Teiluntersuchung war die akute Wirkung von CSE/Nik auf die bronchiale glatte Muskulatur nach Inkubation der Lungenschnitte mit Zusatz von Hexamethonium bzw. reinem Nikotin zu zeigen.

Zunächst verglichen wir die akute Wirkung von CSE und reinem Nikotin in BALB/c-Gruppe nach 48-stündiger Inkubation mit und ohne Zusatz von Hexamethonium (Abb. 24). In den mit Zusatz von Hexamethonium inkubierten Lungenschnitten ist die durch CSE 5% bedingte bronchiale Dilatation signifikant schwächer ausgefallen als in den Lungenschnitten, die ohne Hexamethonium inkubiert wurden (1,61% vs.30,7%). Ähnliche Ergebnisse lieferte auch der Vergleich der CSE-Wirkung in den T-bet KO-Lungenschnitten (Abb. 25).

Nach Zugabe von Nikotin zeigte sich bei T-bet KO eine signifikant stärkere Dilatation in den mit Hexamethonium inkubierten Lungenschnitten (17,6% vs. 4,75%), wohingegen bei BALB/c kein signifikanter Unterschied gezeigt werden konnte.

Bemerkenswert ist, dass in den mit Hexamethonium inkubierten T-bet KO-Lungenschnitten die durch Nikotin bedingte Dilatation signifikant stärker ausgeprägt war als durch CSE 5% (17,6% vs. 8,73%). Bei BALB/c war dies nicht der Fall.

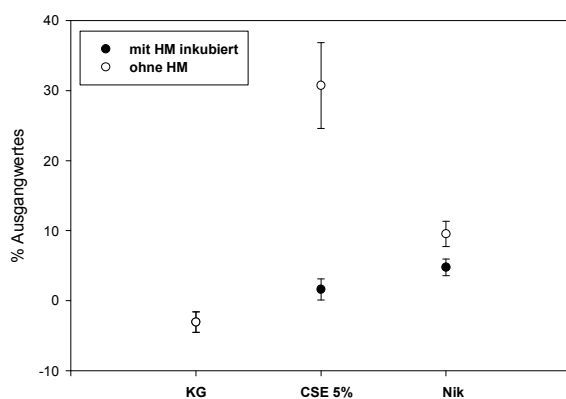


Abb. 24: Dilatation in BALB/c

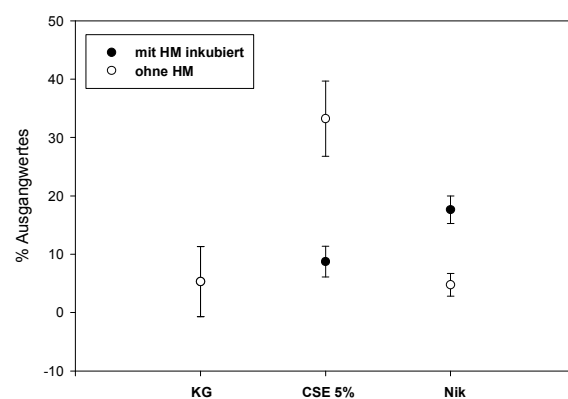
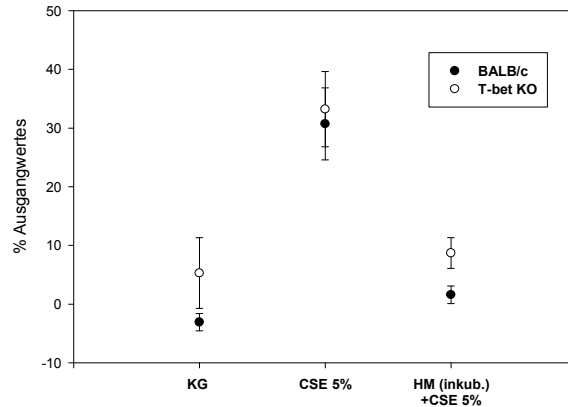


Abb. 25: Dilatation in T-bet KO

So konnten wir zeigen, dass nACh-Rezeptor-Antagonist Hexamethonium die durch CSE vermittelte Dilatation sowohl in BALB/c- als auch in T-bet KO-Lungenschnitten signifikant hemmt (Abb. 26).



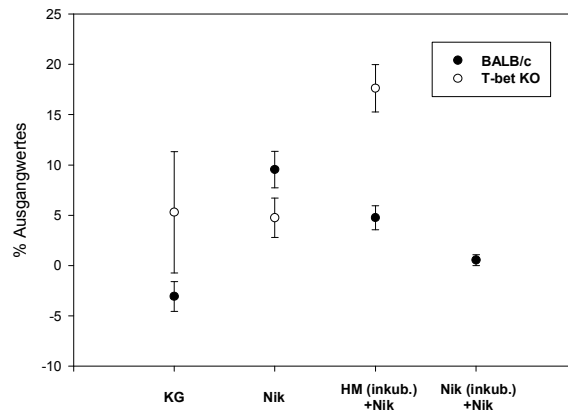
**Abb. 26: CSE vermittelte Dilatation, BALB/c vs. T-bet KO**

Die verringerte Dilatation in Gegenwart von Hexamethonium deutet auf Beteiligung der neuronalen nACh-Rezeptoren hin.

Interessanterweise führte Hexamethonium zu keiner Einschränkung der Dilatation durch reines Nikotin in T-bet KO-Lungenschnitten. Umgekehrt fiel hier die bronchiale Dilatation signifikant stärker aus als in den ohne Hexamethonium inkubierten Lungenschnitten (Abb. 25): 17,6% vs. 4,75% ( $p=0,004$ ).

Galzi et al (56) zeigte in seiner Arbeit, dass langanhaltende (chronische) Exposition gegenüber nACh-Rezeptor-Agonisten zur Inaktivierung der nACh-Rezeptoren führt. Es erschien uns sinnvoll diese These in unsere Arbeit zu integrieren. So kamen wir zum Entschluss, die mit Zugabe von einem nACh-Rezeptor-Agonisten inkubierten Lungenschnitte wiederholt der akuten Exposition gegenüber Nikotin auszusetzen und Ergebnisse mit Versuchen mit Inkubation ohne Zusatz von nAChR-Agonisten zu vergleichen. Da wir bei T-betKO zwischen Kontrollgruppe und akuter Exposition gegenüber Nikotin keinen signifikanten Unterschied im Hinblick auf Dilatation der glatten Muskulatur feststellen konnten, wurde dieser Versuch nur mit BALB/c-Lungenschnitten durchgeführt. Als nACh-Rezeptor-Agonisten nahmen wir für diesen Versuch reines Nikotin. Das Ergebnis war eine signifikante Einschränkung der Dilatation der bronchialen Muskulatur nach temporärer

Nikotingabe im Vergleich zu BALB/c-Lungenschnitten, die ohne Zusatz von Nikotin inkubiert wurden (Abb. 27): 0,55% vs. 9,54% ( $p < 0,001$ ).

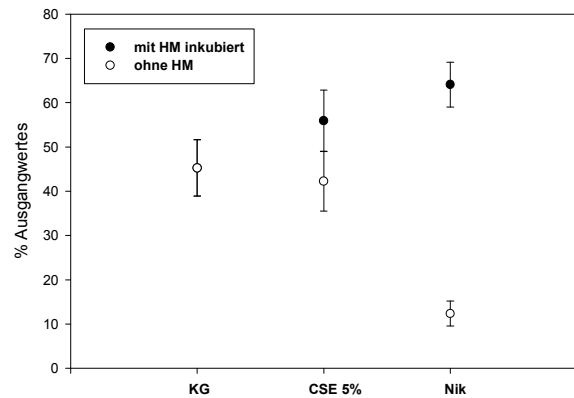
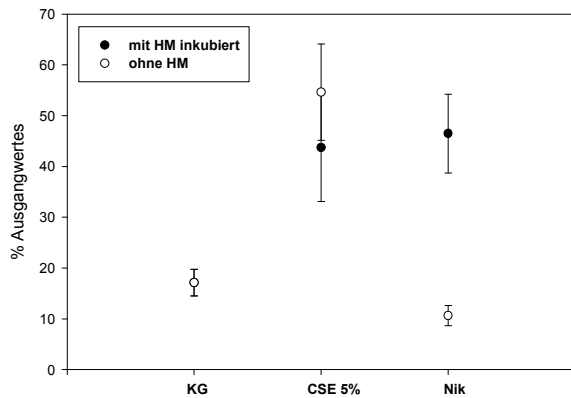


**Abb. 27: Dilatation, Nikotin, BALB/c vs. T-bet KO**

Diese Ergebnisse korrelieren eng mit der Aussage von Galzi et al und könnten nochmals darauf hindeuten, dass nACh-Rezeptoren in den Mechanismus der bronchialen Dilatation unmittelbar involviert sind.

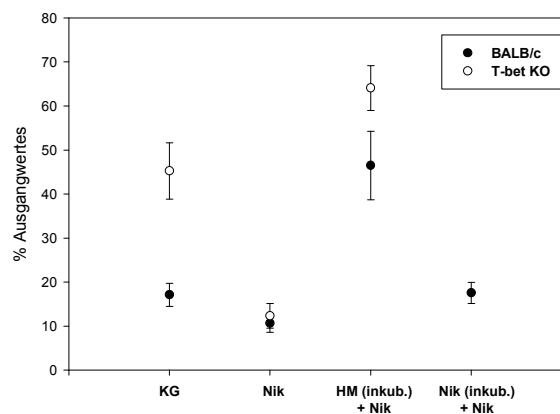
Der nächste Schritt in diesem Versuch war Zugabe von  $10^{-5}$  M ACh zu den mit CSE bzw. Nikotin vorbehandelten Lungenschnitten. Auch hier zeigte sich als Antwort eine deutliche Kontraktion der glatten Muskulatur in allen Versuchsgruppen. Sowohl bei BALB/c als auch bei T-bet KO führte die Zugabe von ACh nach vorherigen Vorbehandlung mit reinem Nikotin in den mit Hexamethonium inkubierten Lungenschnitten zu signifikant stärker ausgeprägter Kontraktion als in den Lungenschnitten, die ohne Hexamethonium inkubiert wurden (Abb. 28 und 29): bei BALB/c 46,67% vs. 10,63% mit  $p = 0,001$  und bei T-bet KO 64,07% vs. 12,35% mit  $p < 0,001$ . Im gleichen Versuch nach temporärer Vorbehandlung mit 5%igem CSE zeigte sich weder bei BALB/c noch bei T-bet KO ein signifikanter Unterschied.





**Abb. 28: ACh-vermittelte Kontraktion, BALB/c**      **Abb. 29: ACh-vermittelte Kontraktion, T-bet KO**

Bei BALB/c führten wir diesen Versuch auch mit den Lungenschnitten durch, die zuerst mit Zugabe von Nikotin inkubiert und vor ACh-Gabe nochmals mit reinem Nikotin temporär vorbehandelt wurden. Es zeigte sich in diesem Teilversuch keine signifikant stärker ausgeprägte Kontraktion der glatten Muskulatur im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Nikotin-Gruppe (Abb. 30). Ein deutlicher Unterschied bestand aber im Vergleich zu BALB/c-Lungenschnitten, die mit Hexamethonium inkubiert wurden (17,1% vs. 46,5%;  $p=0,001$ ).



**Abb. 30: ACh-vermittelte Kontraktion, T-bet KO vs. BALB/c**

Diese Teiluntersuchung lässt uns folgende Vermutungen aufstellen:

- Hexamethonium, ein spezifischer Antagonist an neuronalen nACh-Rezeptoren, führt zur Verringerung der durch CSE-vermittelten bronchialen Dilatation. Folglich scheinen die neuronalen nACh-Rezeptoren eine sehr wichtige Rolle in der Regulation der bronchialen Kontraktilität zu spielen. So konnten wir zeigen, dass die neuronalen ACh-Rezeptoren bei akuter Exposition gegenüber CSE eine aktive konzentrationsabhängige bronchiale Dilatation *in vitro* sowohl in der gesunden BALB/c- als auch in der T-bet KO-Lunge bewirken.

Es scheint, dass CSE eine oder mehrere Substanzen enthält, die mit höherer Affinität an die neuronalen nACh-Rezeptoren binden als das reine Nikotin. Es könnte z. B., wie bereits von Arbeitsgruppen Schuller und Plummer beschrieben, auch das tabakspezifische Kanzerogen NNK (4(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon) sein: es bindet mit sehr hoher Affinität an  $\alpha 7$ -Untereinheiten der neuronalen nACh-Rezeptoren (132-134).

- Blockade der neuronalen nACh-Rezeptoren führt zur signifikanten Steigerung der ACh-vermittelten Kontraktion der bronchialen glatten Muskeln nach Vorbehandlung mit reinem Nikotin *in vitro*, sowohl in gesunder BALB/c- als auch in T-bet KO-Lunge. Diese Ergebnisse korrelieren mit Arbeiten von Sekhon et al und Brüggmann et al, die bereits vermuteten, dass die neuronalen nACh-Rezeptoren die Hemmung der Kontraktion der glatten Muskulatur bewirken. (78, 79).

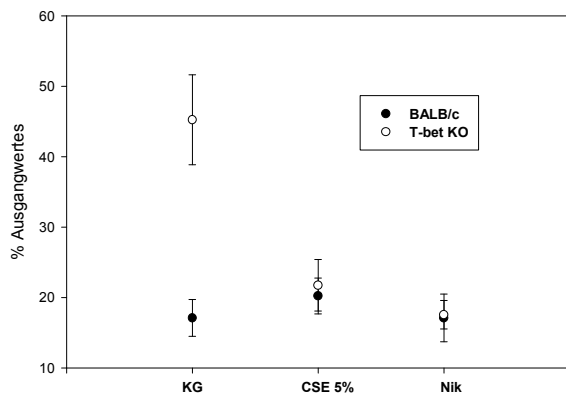
Interessanterweise fällt die ACh-vermittelte Kontraktion der glatten Muskulatur nach Vorbehandlung mit CSE auch bei blockierten neuronalen nACh-Rezeptoren bei BALB/c sowie bei T-bet KO nicht stärker aus. Ein Grund dafür könnte z. B. eine höhere Affinität bestimmter Wirkstoffe des CSE an neuronalen nACh-Rezeptoren als Hexamethonium sein, möglicherweise auch von dem bereits beschriebenen Kanzerogen NNK. Eine weitere Vermutung wäre, dass bei über 4000 Substanzen, die im CSE enthalten sind, auch andere, komplexere Mechanismen zur Regulation der bronchialen Kontraktilität existieren. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung sind notwendig.

- Viele Arbeitsgruppen konnten bereits vor einiger Zeit zeigen, dass chronische Nikotinsubstitution zum lebenden Gewebe *in vitro* die Inaktivierung (56) der nACh-Rezeptoren zur Folge hat, aber auch gleichzeitig die Expression (up-regulation) der nACh-Rezeptoren quantitativ erhöht (53, 90, 91, 97). In unserem Versuch führte die 48-stündige Inkubation der BALB/c-Lungenschnitte mit Nikotin nach erneuter akuter Nikotiningabe zwar erwartungsgemäß zu keiner Steigerung der bronchialen Dilatation. Allerdings konnten wir nach Zugabe von ACh eine signifikant stärkere Hemmung der Kontraktion im Vergleich zu Lungenschnitten mit den durch Hexamethonium blockierten nACh-Rezeptoren feststellen. Eine Erklärung dafür könnte eine Kompensation der nikotinbedingten Inaktivierung vieler nACh-Rezeptoren durch gleichzeitig erhöhte Anzahl der Rezeptoren sein.

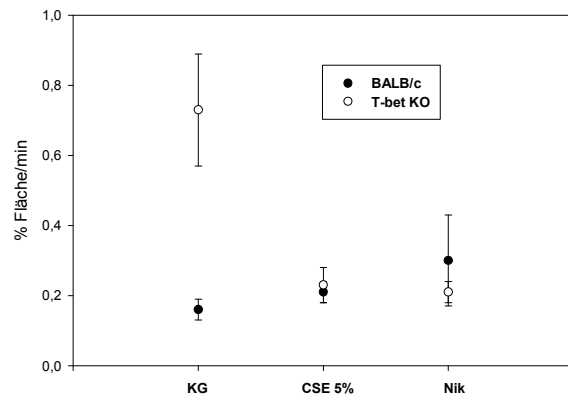
### 9.2.3 Bronchiale Kontraktion nach Inkubation mit CSE/Nikotin

In der dritten Teiluntersuchung untersuchten wir die bronchiale Kontraktilität nach 48-stündiger Inkubation der Lungenschnitte mit CSE bzw. reinem Nikotin. Die Kontraktion der glatten Muskulatur wurde auch hier mit Hilfe von ACh provoziert.

Bei BALB/c konnten wir zwischen den Untergruppen Kontrollgruppe, CSE und Nik nach ACh-Zugabe keinen Unterschied im Kontraktionsausmaß feststellen. Bei T-bet KO fiel die Kontraktion in CSE-Untergruppe sowie in T-bet KO-Untergruppe im Vergleich zu Kontrollgruppe signifikant geringer aus (Abb. 31). Direkter Vergleich zwischen BALB/c und T-bet KO ergab in CSE-Untergruppe und in Nik-Untergruppe keinen signifikanten Unterschied. Identische Ergebnisse zeigten sich auch beim Vergleich der Geschwindigkeit der Kontraktion (Abb. 32).



**Abb. 31: Bronchiale Kontraktion (BALB/c vs. T-bet KO)**



**Abb. 32: Mittlere Geschwindigkeit der Kontraktion (BALB/c vs. T-bet KO)**

Es scheint, dass 48-stündige Inkubation sowohl mit CSE als auch mit Nikotin in BALB/c-Lungenschnitten zu keiner Hemmung der Kontraktion im Vergleich zu Kontrollgruppe führt. Der Grund dafür könnte die Inaktivierung der nACh-Rezeptoren durch im Überschuss vorhandene nACh-Rezeptor-Agonisten sein.

Die Ergebnisse in der T-bet KO-Gruppe müssen kritisch betrachtet werden. Entsprechend der Graphik in der Abb. 31 scheint, dass es nach der 48-stündigen Inkubation der Lungenschnitte mit Zugabe von CSE bzw. Nikotin zur deutlichen Hemmung der Kontraktion im Vergleich zur Kontrollgruppe kommt (entsprechend 21,7% und 17,6% vs. 45,3%). Andererseits könnte die Inaktivierung der nACh-Rezeptoren durch Agonisten und gleichzeitige bronchiale Hyperreagibilität (28, 31) bei T-bet KO zur Vorkontraktion der Bronchiolen in der Inkubationsperiode führen und somit die die Hemmung der Kontraktion nach Zugabe von ACh vortäuschen. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung sind notwendig.

Bemerkenswert ist auch folgender Sachverhalt. Da wir in der ersten Teiluntersuchung feststellen konnten, dass der Ausmaß der bronchialen Dilatation nach akuter Exposition gegenüber CSE konzentrationsabhängig ist (CSE 5% vs. CSE 10%), inkubierten wir auch in unserer dritten Teiluntersuchung die Lungenschnitte mit Zugabe von CSE 5% und CSE 10%. Nach 48 Stunden Inkubationszeit konnten wir allerdings in keinem der Lungenschnitte, die mit Zugabe von CSE 10% inkubiert wurden, Vitalitätszeichen wie Zilienschlag des Flimmerepithels oder Bronchokonstriktion nach Zugabe von ACh (vergl. Punkt 7.2.7)

feststellen. Somit kann man annehmen, dass trotz der ausgeprägten dilatativen Wirkung der akuten Exposition gegenüber CSE 10%, die 48-stündige Inkubation der Lungenschnitte mit Zugabe von CSE der gleichen Konzentration, wahrscheinlich durch hohe Toxizität, zum Absterben des vitalen Gewebe in vitro führt.

## 10. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Auswirkung von reinem Nikotin und von Zigarettenrauchextrakt auf die bronchiale Kontraktilität *in vitro* in gesunder Mäuselunge verglichen mit der Lunge von den Mäusen mit einem Asthma-Modell zu untersuchen.

Zur Herstellung des Zigarettenrauchextrakts wurde der Zigarettenrauch in das flüssige DMEM-Kulturmedium aufgenommen, damit die chemische Zusammensetzung der Lösung möglichst dem Rauch einer Zigarette entspricht.

Als experimentelles Modell für Asthma bronchiale verwendeten wir T-bet knock-out-Mäuse, bei denen durch Ausschalten des Steuer-Gens T-bet die bronchiale Hyperreagibilität provoziert wurde.

Nach dem Herausnehmen des Herz-Lungen-Pakets wurden die einzelnen Lungenlappen in 200-mikrometer dicke Scheiben geschnitten und dann die Lungenschnitte mindestens 24 h lang bei 37°C in DMEM-Nährmedium inkubiert.

Unsere Arbeit wurde in drei Versuchsreihen unterteilt:

1. Untersuchung der akuten Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien
2. Untersuchung der akuten Wirkung von reinem Nikotin bzw. CSE auf die Kontraktilität der Bronchien nach Inkubation mit Hexamethonium bzw. reinem Nikotin
3. Durch Acetylcholin vermittelte Kontraktion der Bronchien nach Inkubation der Lungenschnitte mit Zigarettenextrakt bzw. Nikotin

Bei der Versuchsdurchführung wurden jeweils einzelne Lungenschnitte unter dem Mikroskopobjektiv platziert und der Verlauf der bronchialen Reaktion durch eine Digitalkamera aufgenommen. Die Änderung des bronchialen Querschnitts nach Stimulation mit Nikotin bzw. CSE wurde dann mittels spezieller Software (ScionImage-Software, Scion Corporation, USA) gemessen und ausgewertet.

Die Vermutung einiger Autoren, dass neuronale nikotinerge ACh-Rezeptoren eine Hemmung der Kontraktion der vaskulären und bronchialen glatten Muskulatur bewirkten (67,78, 79), sowie die Diskussion in der wissenschaftlichen Literatur über die Wirkung von Nikotin auf die glatte Muskulatur *in vitro* (67, 130) waren richtungsweisend für unsere Arbeit.

Um die Möglichkeit zu überprüfen, dass die bronchiale Kontraktilität durch Wirkung von Nikotin am nikotineren ACh-Rezeptor beeinflusst werden kann, wurde von uns Hexamethonium, ein neuronaler Antagonist am nikotineren ACh-Rezeptor verwendet.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse lässt folgende Schlussfolgerungen zu:

1. Eine einmalige Exposition gegenüber CSE/Nikotin führt zur bronchialen Dilatation sowohl in der BALB/c- als auch in der T-bet KO-Lunge in vitro. Die bronchiale Dilatation nach Stimulation mit CSE ist konzentrationsabhängig: bei CSE 10% war die Dilatation deutlich stärker ausgefallen als bei CSE 5% .
2. Eine akute Exposition der gesunden Lunge (BALB/c) gegenüber CSE in vitro führt zur Hyperreagibilität der glatten Muskulatur und somit zur stärkeren Obstruktion des Atemweges bei anschließender Stimulation mit ACh.
3. Das reine Nikotin hemmt in T-bet KO-Lungenschnitten in vitro die Kontraktion nach ACh-Zugabe und könnte somit protektiv auf glatte bronchiale Muskulatur bei Hyperreagibilität wirken.
4. Hexamethonium führt zur Verringerung der durch CSE-vermittelten bronchialen Dilatation. Dadurch scheinen die neuronalen nACh-Rezeptoren eine sehr wichtige Rolle in der Regulation der bronchialen Kontraktilität zu spielen. So konnten wir zeigen, dass die neuronalen ACh-Rezeptoren bei akuter Exposition gegenüber CSE eine aktive konzentrationsabhängige bronchiale Dilatation in vitro sowohl in der gesunden BALB/c- als auch in der T-bet KO-Lunge bewirken. Es scheint, dass CSE eine oder mehrere Substanzen enthält, die mit höherer Affinität an die neuronalen nACh-Rezeptoren binden als das reine Nikotin. Es könnte z. B. auch das tabakspezifische Kanzerogen NNK sein.
5. Wir konnten bestätigen, dass die neuronalen nACh-Rezeptoren die Hemmung der Kontraktion der glatten Muskulatur bewirken.
6. In unserem Versuch führte die 48-stündige Inkubation der BALB/c-Lungenschnitte mit Nikotin nach erneuter akuter Nikotingabe zwar erwartungsgemäß zu keiner Steigerung der bronchialen Dilatation. Aber nach Zugabe von ACh konnten wir eine signifikant stärkere Hemmung der Kontraktion im Vergleich zu Lungenschnitten mit den durch Hexamethonium blockierten nACh-Rezeptoren feststellen. Eine Erklärung dafür könnte eine Kompensation der nikotinbedingten Inaktivierung vieler nACh-Rezeptoren durch gleichzeitig erhöhte Anzahl der Rezeptoren sein.

7. Es scheint, dass eine 48-stündige Inkubation sowohl mit CSE als auch mit Nikotin in BALB/c-Lungenschnitten zu keiner Hemmung der Kontraktion im Vergleich zu Kontrollgruppe führt. Der Grund dafür könnte die Inaktivierung der nACh-Rezeptoren durch im Überschuss vorhandene nACh-Rezeptor-Agonisten sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die neuronalen nikotinergen ACh-Rezeptoren die bronchiale Kontraktilität regulieren und dabei durch spezifischen Agonisten Nikotin in vitro beeinflusst werden können.



## 11 LITERATURVERZEICHNIS

1. Kamtsiurius P, Atzpodien K, Ellert U, Schlack R, Schlaud M, Prevalence of somatic diseases in German children and adolescents. Results of the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2007 May; 50(5-6): 686-700
2. Maziak W, The asthma epidemic and our artificial habitats. BMC Pulmonary Medicine 2005, 5:5
3. Whincup PH, Cook DG, Strachan DP, Papacosta O. Time trends in respiratory symptoms in childhood over a 24 year period. Arch Dis Child 1993, 68: 729-734
4. Weitzman M, Gortmaker SL, Sobol AM, Perrin JM. Recent trends in the prevalence and severity of childhood asthma. J Am Med Assoc 1992, 268: 2673-2677
5. Hogg JC. The pathology of asthma. APMIS 1997, 105: 735-745
6. Walls AF, He S, Buckley MG, McEuen AR. Roles of the mast cell and basophil in asthma. Clin Exp Allergy Reviews 2001, 1: 68-72
7. Sampson AP. Eosinophils: provokers or bystanders asthma? Clin Exp Allergy Reviews 2001, 1: 73-76
8. Anderson GP. Lymphocytes: arbiters of airway inflammation. Clin Exp Allergy Reviews 2001, 1: 80-84
9. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M Vignola AM. Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodelling. Am J Respir Crit Care Med 2000, 161: 1720-1745
10. Brusselle G, Kips J, Joos G, Bluethmann H, Pauwels R. Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4deficient mice. Am J Respir Cell Mol Biol 1995, 12: 254-259
11. Lukacs NW, Strieter RM, Chensue SW, Kunkel SL. Interleukin-4-dependent pulmonary eosinophil infiltration in a murine model of asthma. Am J Respir Cell Mol Biol 1994, 10: 526-532
12. Murray RK, Panettieri RA. Jr. Management of asthma: The changing approach. In: Fishman AP, ed. Update: Pulmonary Diseases and Disorders. New York: McGraw-Hill, 1992: 74
13. Corry DB et al. Interleukin-4, but not interleukin-5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. J Exp Med 1996, 183: 254-259
14. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin-5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. J Exp Med 1996, 183: 195-201

15. McLane MP et al. Interleukin-9 promotes allergen-induced eosinophilic inflammation and airway hyperresponsiveness in transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, 19: 713-720
16. Grünig G et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 1998, 282: 2261-2263
17. Wills-Karp M et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998, 282: 2258-2261
18. Kuperman DA et al. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nature Medicine* 2002, 8: 885-889
19. Juniper EF, Frith PA, Hargreave FE. Airway responsiveness to histamine and metacholine: relationship to minimum treatment to control symptoms of asthma. *Thorax* 1981, 36: 575-579
20. Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr p, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med* 1998, 339:1194-1200
21. Elias JA et al. Airway remodelling in asthma. *J Clin Invest* 1999, 104: 1001-1006
22. James AJ. Relationship between airway wall thickness and airway hyperresponsiveness. In *Airway wall remodelling in asthma* AG Stewart, editor. CRC Press. Boca Raton, FL. 1-27
23. Wardlaw AJ, Brightling C, Green R, Woltmann G, Pavord I. Eosinophils in asthma and other allergic diseases. *Br Med Bull* 2000, 56: 985-1003
24. Brightling C et al. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 2002, 346: 1699-1705
25. Pare PD, Roberts CR, Bai TR, Wiggs BJ. The functional consequences of airway remodelling in asthma. *Monaldi Arch Chest Dis* 1997, 52: 589-598
26. Ebina M, Takahashi T, Chiba T, Montomiya M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3D morphometric study. *Am Rev Respir Dis* 1993, 148: 720-726
27. Heard BE, Hossain S. Hyperplasia of bronchial muscle in asthma. *J Pathol* 1973, 110: 319-331
28. Bergner A, Sanderson MJ. Selected Contribution: Airway contractility and smooth muscle Ca<sup>2+</sup> signalling in lung slices from different mouse strains. *J Appl Physiol* 2003, 95: 1325-1332
29. Black JL, Johnson PR. Airway smooth muscle in asthma. *Respirology* 1996, 1: 153-158

30. Nadel JA, Busse WW. Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157: 130-138
31. Bergner A, Kellner J, Kemp da Silva A, Fischer R, Gamarra F Huber RM. Bronchial hyperreactivity is correlated with increased baseline airway tone. *Eur J Med Res* 2006, 11: 1-8
32. Gunst SJ, Tang DD. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2000, 15: 600-616
33. Hall IP. Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2000, 15: 1120-1127
34. Janssen LJ. Ionic mechanisms and Ca<sup>2+</sup> regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, 282: 1161-1178
35. Pabelick CM, Sieck GC, Prakash YS. Invited Review: Significance of spatial and temporal heterogeneity of calcium transients in smooth muscle. *J Appl Physiol* 2001, 91: 488-496
36. Stephens NL. Airway smooth muscle. *Lung* 2001, 179: 333-373
37. Kargacin ME, Kargacin GJ. Direct measurement of Ca<sup>2+</sup> uptake and release by the sarcoplasmic reticulum of saponin permeabilized isolated smooth muscle cells. *J Gen Physiol* 1995, 106: 467-484
38. Missiaen L, De Smedt H, Droogmans G, Himpens B, Casteels R. Calcium ion homeostasis in smooth muscle. *Pharmacol Ther* 1992, 56: 191-231
39. National Asthma Education and Prevention Program. Expert panel report 2: guidelines for the diagnosis and management of asthma. Bethesda, MD: National Institutes of Health; April 1997; Publication No. 55-4051
40. British Thoracic Society. British guidelines on asthma management: 1995 review and position statement. *Thorax* 1997, 52: 1 - 24
41. Busse W et al. Low-dose fluticasone propionate compared with montelukast for first-line treatment of persistent asthma: a randomized clinical trial. *J Allergy Clin Immunol* 2001, 107: 461-468
42. Pearlman DS et al. Fluticasone propionate/salmeterol combination compared with montelukast for the treatment of persistent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002, 88: 227-235
43. Sherman J, Patel P, Hutson A, Chesrown S, Hendeles L. Adherence to oral montelukast and inhaled fluticasone in children with persistent asthma. *Pharmacotherapy* 2001, 21: 1464-1467
44. Deykin A et al. Combination therapy with a long-acting beta-agonist and a leukotriene antagonist in moderate asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 175: 228-234

45. Ducharme FM. Anti-leukotrienes as add-on therapy to inhaled glucocorticoids in patients with asthma: systematic review of current evidence. *BMJ* 2002, 324: 1545
46. Mathison DA, Koziol JA. Marginal utility of montelukast for persistent asthma. *CHEST* 2002, 121: 334-337
47. Marik PE, Varon J. Oral vs inhaled Corticosteroids following emergency department of patients with acute asthma. *CHEST* 2002, 121: 1735-1736
48. Travers AH et al. The effectiveness of IV beta-agonists in treating patients with acute asthma in the emergency department. *CHEST* 2002, 122: 1200-1207
49. Rodrigo GJ, Rodrigo C. Continuous vs intermittent beta-agonists in the treatment of acute adult asthma. *CHEST* 2002, 122: 160-165
50. Dempsey OJ, Kennedy G, Lipworth BJ. Comparative efficacy and anti-inflammatory profile of once-daily therapy with leukotriene antagonist or low-dose inhaled corticosteroid in patients with mild persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002, 109: 68-74
51. Lazarus SC et al. Long-acting beta2-agonist monotherapy vs continued therapy with inhaled corticosteroids in patients with persistent asthma. *JAMA* 2001, 285: 2583
52. Nelson HS et al. Fluticasone propionate/salmeterol combination provides more effective asthma control than low-dose inhaled corticosteroid plus montelukast. *J Allergy Clin Immunol* 2000, 106: 1088-1095
53. Lindstrom J et al. Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Prog Brain Res* 1996, 109: 125-137
54. Racke K, Juergens UR, Matthiesen S. Control by cholinergic mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2006, 533: 57-68
55. Conti-Tronconi BM, McLane KE, Raftery MA, Grando SA, Protti MP. The nicotinic acetylcholine receptor: structure and autoimmune pathology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1994, 29: 69-123
56. Galzi JL, Changeux JP. Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. *Neuropharmacology* 1995, 34: 563-582
57. Lukas RJ, Changeux JP et al. International union of Pharmacology. XX. Current Status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 1999, 51: 397-401
58. Lindstrom JM. Acetylcholine receptors and myasthenia. *Muscle Nerve* 2000, 23: 453-477
59. Klimaschewski L, Reuss S, Spessert R, Lobron C, Wevers A, Heym C, Schroder H. Expression of nicotinic acetylcholine receptors in the rat superior cervical ganglion on mRNA and protein level. *Brain Res Mol Brain Res* 1994, 27: 167-173

60. Rust G, Burgunder JM, Lauterburg TE, Cachelin AB. Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in the rat autonomic nervous system. *Eur J Neurosci* 1994, 6: 478-485
61. Galzi JL, Changeux JP. Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. *Neuropharmacology* 1995, 34: 563-582
62. Sgard F, Charpentier E, Bertrand S, Walker N, Caput D, Graham D, Bertrand D, Besnard F. A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Mol Pharmacol* 2002, 61: 150-159
63. Zia S, Ndoye A, Lee TX, Webber RJ, Grando SA. Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration. *J Pharmacol Exp Ther* 2000, 293: 973-981
64. Heimke C, Stolp M, Reuss S, Wevers A, Reinhardt S, Maelicke A, Schlegel S, Schröder H. Expression of alpha subunit of nicotinic acetylcholine receptors in human lymphocytes. *Neurosci Lett* 1996, 214: 171-174
65. Arredondo J et al. Receptor-Mediated Tobacco Toxicity. Regulation of Gene expression through alpha3beta2 nicotinic receptor in oral epithelial cells. *Am J Pathol* 2005, 166: 597-613
66. Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, Tsao PS, Johnson FL, Cooke JP. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med* 2001, 7: 833-839
67. Dorion G, Israel-Assayag E, Beaulieu MJ, Cormier Y. Effect of 1,1-dimethylphenyl 1,4-piperazinium on mouse tracheal smooth muscle responsiveness. *Am J Physiol, Lung Cell Mol Physiol* 2005, 288: L1139-L1145
68. Zia S, Ndoye A, Nguyen VT, Grando SA. Nicotine enhances expression of the alpha3, alpha4, alpha5 and alpha7 nicotinic receptors modulating calcium metabolism and regulating adhesion and motility of respiratory epithelial cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997, 97: 243-262
69. Maus AD et al. Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacology* 1998, 54: 779-788
70. Wang Y, Pereira EF, Maus AD, Ostlie NS, Navaneetham D, Lei S, Albuquerque EX, Conti-Fine BM. Human bronchial epithelial and endothelial cells express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 2001, 60: 1201-1209
71. Klapproth H, Racke K, Wessler I. Acetylcholine and nicotine stimulate the release of granulocyte-macrophage colony stimulating factor from cultured human bronchial epithelial cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998, 357: 472-475
72. Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in man. *Pharmacol Ther* 1998, 77: 59-79

73. Carlisle DL et al. Nicotine signals through muscle-type and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in both human bronchial epithelial cells and airway fibroblasts. *Respir Res* 2004, 5: 27
74. Sekhon HS, Jia Y, Raab R, Kuryatov A, Pankow JF, Whitsett JA, Lindstrom J, Spindel ER. Prenatal nicotine receptor expression and alters fetal lung development in monkeys. *J Clin Invest* 1999, 103: 637-647
75. Codignola A et al. Serotonin release and cell proliferation are under the control of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in small-cell lung carcinoma cell lines. *FEBS Lett* 1994, 342: 286-290
76. Schuller HM, Plummer HK, Jull BA. Receptor-mediated effects of nicotine and its nitrosated derivative NNK on pulmonary neuroendocrine cells. *Anat Rec* 2003, 270A: 51-58
77. Plummer III HK, Dhar M, Schuller HM. Expression of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in human lung cells. *Respir Res* 2005, 6: 29
78. Sekhon HS, Keller JA, Proskocil BJ, Martin EL, Spindel ER. Maternal nicotine exposure upregulates collagen gene expression in fetal monkey lung. Association with alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, 26: 31-41
79. Brüggmann D, Lips KS, Pfeil U, Haberberger RV, Kummer W. Multiple nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits are expressed in the arterial system of the rat. *Histochem Cell Biol* 2002, 118: 441-447
80. Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Nozadze K, Wessler I. Expression and function of the non-neuronal cholinergic system in endothelial cells. *Life Science* 2003, 72: 2111-2116
81. Albaugh G, Bellavance E, Strande L, Heinburger S, Hewitt CW, Alexander JB. Nicotine induced mononuclear leukocyte adhesion and expression of adhesion molecules, VCAM and ICAM, in endothelial cells in vitro. *Ann Vasc Surg* 2004, 18: 302-307
82. Haberberger RV, Bodenbenner M, Kummer W. Expression of the cholinergic gene locus in pulmonary arterial endothelial cells. *Histochem Cell Biol* 2000, 113: 379-387
83. Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, Sherry B, Balakhaneh D, Huston J, Tracey KJ, Al-Abed Y, Metz CN. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med* 2005, 201: 1113-1123
84. Serobyan N, Schraufstatter IU, Strongin A, Khaldoyanidi SK. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated stimulation of endothelial cells results in the arrest of haematopoietic progenitor cells on endothelium. *Br J Haematol* 2005, 129: 257-265

85. Roman J, Ritzenthaler JD, Gil-Acosta A, Rivera HN, Roser-Page S. Nicotine and fibronectin expression in lung fibroblasts: implications for tobacco-related lung tissue remodeling. *FASEB J* 2004, 18: 1436-1438
86. Matsunaga K, Klein TW, Friedman H, Yamamoto Y. Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to *Legionella pneumophila* infection by nicotine. *J Immunol* 2001, 167: 6518-6524
87. Borovikova LV et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000, 405: 458-462
88. Wang H et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003, 421: 384-388
89. Klapproth H et al. Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn-Schmiedeberg Archives of Pharmacology* 1997, 355: 515-523
90. Lucas RJ. Effects of chronic nicotinic ligand exposure on functional activity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by cells of the PC12 rat pheochromocytoma or the TE671/RD human clonal line. *J neurochem* 1991, 56: 134-145
91. Lucas RJ, Ke L, Bencherif M, Eisenhour CM. Regulation by nicotine of its own receptors. *Drug Dev Res* 1996, 38: 136-148
92. Katzung BG. *Basic and clinical pharmacology*. New York, McGraw-Hill/Appleton and Lange, 1998
93. Fecho K, Maslonek KA, Dycstra LA, Lysle DT. Alterations of immune status induced by the sympathetic nervous system: immunomodulatory effects of DMPP alone and in combination with morphine. *Brain Behav Immun* 1993, 7: 253-270
94. Blanchet MR, Israel-Assayag E, Cormier Y. Modulation of airway inflammation and resistance in mice by a nicotinic receptor agonist. *Eur Respir J* 2005, 26: 21-27
95. Lucas RJ, Bencherif M. Heterogeneity and regulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Int Rev Neurobiol* 1992, 34: 25-131
96. Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 2004, 74: 363-396
97. Peng X, Gerzanich V, Anand R, Wang F, Lindstrom J. Chronic nicotine treatment up-regulates  $\alpha 3$  and  $\alpha 7$  acetylcholine receptor subtypes expressed by the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Mol Pharmacol* 1997, 51: 776-784
98. U.S. Public Health Service. *The Health Consequences of Smoking*. In *Smoking and Welfare*. DHEW Pub. No. (CDC) 79-5006, 1979

99. Gerrard JW et al. Increased non-specific bronchial reactivity in cigarette smokers with normal lung function. *Am Rev Respir Dis* 1980, 122: 577-582
100. O'Connor GT, Weiss ST, Tager IB, Speizer FE. The effect of passive smoking on pulmonary function and non-specific bronchial responsiveness in a population-based sample of children and young adults. *Am Rev Respir Dis* 1987, 135: 800-804
101. Chalmers GW et al. Smoking and airway inflammation in patients with mild asthma. *CHEST* 2001, 120: 1917-1922
102. Lazarus SC et al. Smoking affects response to inhaled corticosteroids or leukotriene receptor antagonists in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 175 (8): 794-750
103. Jacobs van der Bruggen MA, Wijga AH, Brunekreef B, de Jongste JC, Baan CA, Kerkhof M, Smit HA. Do smoking parents underutilize health care services for their children? A cross sectional study within the longitudinal PIAMA study. *BMC Health Serv Res* 2007, 7: 83 (Abstract)
104. Murray AB, Morrison BJ. The effect of cigarette smoke from the mother on bronchial responsiveness and severity of symptoms in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986, 77: 575-581
105. The health consequences of smoking. Cancer: a report of the Surgeon General. Rockville, MD. U.S. Department of Health and Human Services. DHS (PHS) 82-50179, 1982
106. Benowitz NL, Gourlay SG. Cardiovascular toxicity of nicotine: implications for nicotine replacement therapy. *J Am Coll Cardiol* 1997, 29: 1422-1431
107. Benowitz NL. Systemic absorption and effects of nicotine from smokeless tobacco. *Adv Dent Res* 1997, 11: 336-341
108. Macklin KD, Maus AD, Pereira EF, Albuquerque EX, Conti-Fine BM. Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1998, 287: 435-439
109. Maus AD et al. Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacology* 1998, 54: 779-788
110. Zevin S, Gourlay SG, Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Clin Dermatol* 1998, 16: 557-564
112. Katzung BG. Basic and clinical pharmacology. New York, McGraw-Hill/Appleton and Lange, 1998
113. Mabley JG, Pacher P, Southan GJ, Salzman AL, Szabo C. Nicotine reduces the incidence of type I diabetes in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 300: 876-881



- 114.** Sandborn WJ. Nicotine therapy for ulcerative colitis: a review of rationale, mechanisms, pharmacology, and clinical results. *Am J Gastroenterol* 1999, 94: 1161-1171
- 115.** Georig M, Ullrich V, Schettler G, Foltis C, Habenicht A. A new role for nicotine: selective inhibition of thromboxane formation by direct interaction with thromboxane synthase in human promyelocytic leukaemia cells differentiating into macrophages. *Clin Investig* 1992, 70: 239-243
- 116.** Kalra S, Singh SP, Savage SM, Finch GL, Sopori ML. Effects of cigarette smoke on immune response: chronic exposure to cigarette smoke impairs antigen-mediated signalling in T cells and depletes IP3-sensitive Ca(2+) stores. *J Pharmacol Exp Ther* 2000, 293: 166-171
- 117.** Savage SM et al. Effects of cigarette smoke on the immune response. II. Chronic exposure to cigarette smoke inhibits surface immunoglobulin-mediated responses in B cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991, 111: 523-529
- 118.** Blanchet MR, Israel-Assayag E, Cormier Y. Inhibitory effect of nicotine on experimental hypersensitivity pneumonitis in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 169: 903-909
- 119.** Luppi F et al. Effects of cigarette smoke condensate on proliferation and wound closure of bronchial epithelial cells in vitro: role of glutathione. *Respiratory Research* 2005, 6: 140
- 120.** Kim HJ et al. Glutathione prevents inhibition of fibroblast-mediated collagen gel contraction by cigarette smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, 283(2): 409-417
- 121.** Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, Yang SY, Reiner SL. Role of T-bet in commitment of TH1-cells before IL-12-dependent selection. *Science* 2001, 292: 1907-1910
- 122.** Finotto S et al. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 2002, 295: 336-338
- 123.** Good, N.E. et al. (1966): Hydrogen ion buffers for biological research. In: *Biochemistry*. Bd. 5, S. 467-77
- 124.** Dandurand, R. J., C. G. Wang, N. C. Phillips, D. H. Eidelmann (1993): Responsiveness of individual airway to metacholine in adult lung explants. *J. Appl. Physiol.*, 75, 364-372
- 125.** Martin, C., S. Uhlig, V. Ullrich (1996): Videomicroscopy of metacholin-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. *Europ. Respir. J.*, 9, 2479-2487

126. Wohlsen, A., C. Martin, E. Vollmer, D. Branscheid, H. Magnussen, W. -M. Becker, S. Uhlig (2003): The early allergic response in small airways of human precision-cut lung slices. *Eur. Respir. J.*, 21, 1024-1032
127. Benowitz NL, Jacob P III. Nicotine renal excretion rate influences nicotine intake during cigarette smoking. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 234 : 153-5.
128. Zhang S, Petro TM. The effect of nicotine on murine CD4 T cell responses. *Int J Immunopharmacol.* 1996 Aug-Sep;18(8-9):467-78.
129. Oltmanns U, Chung KF, Walters M, John M, Mitchell JA. Cigarette smoke induces IL-8, but inhibits eotaxin and RANTES release from airway smooth muscle. *Respir Res.* 2005 Jul 19;6:74.
131. Wang Y, Pereira EF, Maus AD, Ostlie NS, Navaneetham D, Lei S, Albuquerque EX, Conti-Fine BM. Human bronchial epithelial and endothelial cells express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 2001 Dec;60(6):1201-9
132. Schuller HM, Orloff M. Tobacco-specific carcinogenic nitrosamines. Ligands for nicotinic acetylcholine receptors in human lung cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 1998 May 1;55(9):1377-84.
133. Schuller HM, Jull BA, Sheppard BJ, Plummer HK. Interaction of tobacco-specific toxicants with the neuronal alpha(7) nicotinic acetylcholine receptor and its associated mitogenic signal transduction pathway: potential role in lung carcinogenesis and pediatric lung disorders. *Eur J Pharmacol.* 2000 Mar 30;393(1-3):265-77.
134. Plummer HK 3rd, Sheppard BJ, Schuller HM. Interaction of tobacco-specific toxicants with nicotinic cholinergic regulation of fetal pulmonary neuroendocrine cells: implications for pediatric lung disease. *Exp Lung Res.* 2000 Mar; 26(2):121-35.
135. West KA, Brognard J, Clark AS, Linnoila IR, Yang X, Swain SM, Harris C, Belinsky S, Dennis PA. Rapid Act activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest* 2003; 111:81-90

### **DANKSAGUNG**

Mein Dank gilt zunächst meinen Eltern für die seelische und finanzielle Unterstützung. Ohne ihre Hilfe wäre weder mein Medizinstudium in München noch die Durchführung dieser Dissertation möglich gewesen.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn OA Prof. Dr. R.M. Huber, Leiter der Pneumologie der Medizinischen Klinik, Klinikum Innenstadt der LMU, für die freundliche Aufnahme als Doktorand in die Abteilung und die verständnisvolle und großzügige Unterstützung der Arbeit.

Herrn PD Dr. med. Albrecht Bergner sei für die Unterstützung meiner Arbeit als Betreuer herzlich gedankt. Er stand mir sowohl bei der Planung und Durchführung der Versuche, als auch bei der Auswertung der Versuchsergebnisse stets helfend zur Seite. Auch die Schriftform dieser Arbeit verdankt ihm viel. Herr PD Dr. med. Albrecht Bergner hat mir seine große Begeisterung für die Wissenschaft vermittelt.

Herr PD Dr. rer. nat. R.A. Jörres, Leiter der AG „Experimentelle Umweltmedizin“, Klinikum Innenstadt der LMU, unterstützte die Arbeit durch die großzügige Bereitstellung von Zigarettenrauchextrakt, wofür ihm mein besonderer Dank gilt.

Ich bedanke mich ganz herzlich auch bei Herrn Hamza Oelmez , dem ehemaligen wissenschaftlichen Mitarbeiter der Abteilung Pneumologie. Er arbeitete mich in die Laborarbeit im Allgemeinen sowie in die Grundzüge der speziellen Techniken ein.

Frau Anita Kemp da Silva und Frau Julia Kellner leisteten mir Hilfe bei wissenschaftlichen Recherchen. Bei ihnen und allen anderen Mitarbeitern des Labors und der Pneumologie bedanke ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit.

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Vorname, Name                    **Eugen Streck**

Geburtsdatum, -ort            29.07.1981, Dzhetygara/Kasachstan

### Schulbildung

1987 - 1998                    Grundschule und Gymnasium in Kasachstan  
Abschluss: Kasachisches Abitur

12/1998                        Einreise nach Deutschland

04/1999 – 08/1999            Intensivsprachkurs für Deutsch, Otto-Benecke-Stiftung, Murnau

10/1999 – 07/2001            Math.-nat. und Musisches Gymnasium, Sonderlehrgang,  
Marktoberdorf  
Abschluss: Deutsches Abitur

### Bundeswehrdienst

11/2001 - 07/2002            3./Gebirgsjägerbataillon 231, Bad Reichenhall  
Dienstgrad: Obergefreiter

### Studium

10/2002 – 11/2008            Fakultät Humanmedizin  
Ludwig-Maximilians-Universität, München

### Doktorarbeit

2005 - 2009                    Durchführung der vorliegenden Dissertationsarbeit bei Herrn OA  
Prof. Dr. R.M. Huber, Pneumologie, Med. Klinik Innenstadt, LMU  
München

### Berufliche Tätigkeit

seit Januar 2009              Assistenzarzt im Bundeswehrkrankenhaus Ulm,  
Abteilung Anästhesiologie  
Dienstgrad: Stabsarzt