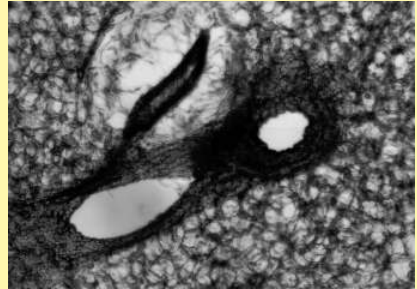
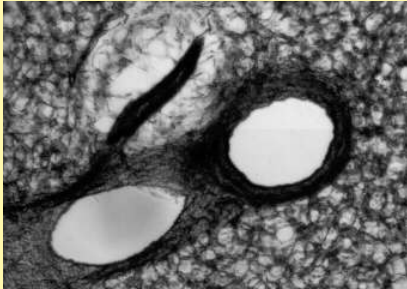


Akute nongenomische Effekte von Corticosteron auf die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion bei der Maus



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Daniela Jachens

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2011

© 2011 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH,**
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-023-6

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

**Akute nongenomische Effekte von Corticosteron auf
die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion bei
der Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Daniela Jachens

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Bergmann

und

dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

Anatomie I

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. W. Kummer

Akute nongenomische Effekte von Corticosteron auf die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion bei der Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Daniela Jachens

Tierärztin aus Celle

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Bergmann

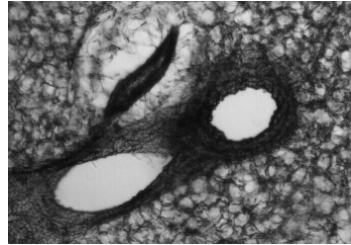
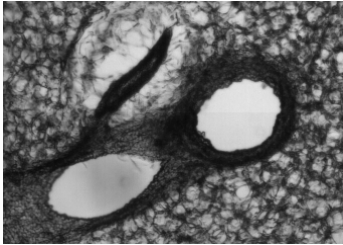
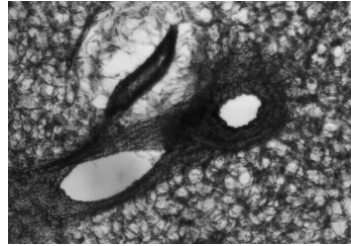
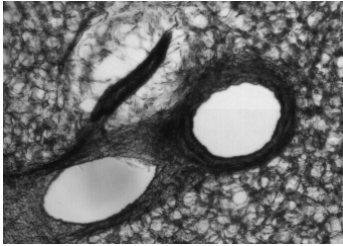
Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Tag der Disputation: 07.02.2011

Nach §10 (5) der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen:

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Daniela Jachens



Ich widme diese Arbeit meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Glucocorticoide	3
2.1.1	Vorkommen und Wirkung im Organismus	3
2.1.2	Pharmakologischer Einsatz von Glucocorticoiden	3
2.1.3	Glucocorticoide und ihr genomischer Wirkmechanismus	4
2.2	Organische Kationentransporter	5
2.2.1	OCT1 und OCT2	6
2.2.2	OCT3	7
2.3	Acetylcholin	8
2.3.1	Rezeptoren für Acetylcholin	9
2.3.2	OCTs und das nicht-neuronale cholinerge System	11
2.4	Katecholamine und Bronchodilatation	12
2.4.1	Wirkung und Rezeptoren	12
2.4.2	Uptake-1 und Uptake-2	13
2.5	Ziel der Arbeit	14
3	Material und Methoden	16
3.1	Material	16
3.1.1	Versuchstiere	16
3.1.2	Pharmaka	17
3.1.3	Lösungen	18

3.2	Methoden	20
3.2.1	Präparation der Mäuselunge	20
3.2.2	Anfertigung der Lungenpräzisionschnitte	21
3.2.3	Videomorphometrie	22
3.2.4	Auswertung	24
4	Ergebnisse	28
4.1	Überprüfung der Ausgangshypothese	28
4.1.1	Wiederholte Bronchokonstriktion mit Muskarin	28
4.1.2	Muskarin und Corticosteron	30
4.1.3	Muskarin und Ethanol	32
4.1.4	Muskarin und Cyclodextrin	34
4.2	Untersuchung zur Konzentrationsabhängigkeit	35
4.2.1	Muskarin und HBC-Komplex 10^{-7} M	35
4.2.2	Muskarin und HBC-Komplex 10^{-6} M	37
4.2.3	Muskarin und HBC-Komplex 10^{-5} M	38
4.2.4	Muskarin und HBC-Komplex 10^{-4} M	40
4.2.5	Analyse der Konzentrationsabhängigkeit	41
4.3	Antagonisierung der Corticosteronwirkung	43
4.3.1	Muskarin, HBC-Komplex 10^{-4} M, Propranolol 10^{-6} M	43
4.3.2	Analyse des Propranololeffekts	45
5	Diskussion	47
5.1	Validierung der Methode	47
5.2	Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion	48
5.3	Der Einfluss von Corticosteron	50
5.4	Inhibitorischer Effekt von Propranolol	52
5.5	Schlussfolgerung	53
6	Zusammenfassung	55
7	Summary	57

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung der Ausgangshypothese	15
3.1	Zeitlicher Verlauf einer typischen Versuchsreihe	23
3.2	Videomorphometriaufnahmen	25
4.1	Wiederholte Bronchokonstriktion: Mittelwerte im Versuchsverlauf	29
4.2	Wiederholte Bronchokonstriktion: Boxplots	29
4.3	Median der Bronchusflächen in den Entspannungsphasen	30
4.4	Corticosteron: Mittelwerte im Versuchsverlauf	31
4.5	Corticosteron: Boxplots	31
4.6	Ethanol: Mittelwerte im Versuchsverlauf	33
4.7	Ethanol: Boxplots	33
4.8	Cyclodextrin: Mittelwerte im Versuchsverlauf	34
4.9	Cyclodextrin: Boxplots	35
4.10	HBC 10^{-7} M: Mittelwerte im Versuchsverlauf	36
4.11	HBC 10^{-7} M: Boxplots	36
4.12	HBC 10^{-6} M: Mittelwerte im Versuchsverlauf	37
4.13	HBC 10^{-6} M : Boxplots	38
4.14	HBC 10^{-5} M: Mittelwerte im Versuchsverlauf	39
4.15	HBC 10^{-5} M: Boxplots	39
4.16	HBC 10^{-4} M: Mittelwerte im Versuchsverlauf	40
4.17	HBC 10^{-4} M: Boxplots	41
4.18	HBC-Konzentrationsreihe: Vergleich der Dynamik	42

4.19 HBC-Konzentrationsreihe: normierte Kontraktionen der Maxima	42
4.20 Propranolol: Mittelwerte im Versuchsverlauf	44
4.21 Propranolol: Boxplots	44
4.22 Analyse des Propranololeffekts: Verlauf der Dynamik	46
4.23 Analyse des Propranololeffekts: Normierte Kontraktionen der Maxima . .	46

Tabellenverzeichnis

3.1	Übersicht: Versuchstiere	17
3.2	Übersicht: Pharmaka	18
3.4	Übersicht: Versuchsreihen	24
4.1	HBC-Konzentrationsreihe: Ergebnisse Mann-Whitney-U-Test	43
4.2	Analyse des Propranololeffekts: Ergebnisse Mann-Whitney-U-Test	45

Abkürzungsverzeichnis

- ACh** Acetylcholin
- ACh** Acetylcholin
- AChE** Acetylcholinesterase
- AChR** Acetylcholinrezeptor
- a.i.** ad injectabilia (lat.): zu Injektionszwecken
- ATP** Adenosintriphosphat
- Cd** Cyclodextrin
- ChAT** Cholinacetyltransferase
- CHT1** Cholintransporter 1
- Cl⁻** Chlorid-Anion
- COPD** chronic obstructive pulmonary disease
- Cs** Corticosteron
- Da** Dalton
- EMT** Extraneuronaler Monoamintransporter
- et al.** et alii (lat.): und andere
- Eth** Ethanol

GDP Guanosindiphosphat

GTP Guanosintriphosphat

GR Glucocorticoidrezeptor

GRE glucocorticoid responsive elements

H⁺ Wasserstoff-Kation

HBC HBC-Komplex

hOCT human OCT

IL Interleukin

mAChR muskarinerge Acetylcholinrezeptoren

M, M1, M2 Muskarin, die Ziffer kennzeichnet die Applikationsphase

mRNA messenger Ribonucleinsäure

Na⁺ Natrium-Kation

nAChR nikotinerge Acetylcholinrezeptoren

NaOH Natronlauge

NMN N1-Methylnicotinamid

OCT Organische Kationentransporter

PCLS Precision-Cut Lung Slices

Pr Propranolol

rOCT rat OCT

RT-PCR reverse Transkriptase PCR

SLC solute carrier

TEA Tetraethylammonium

TNF Tumor-Nekrose-Faktor

VAcHT vesikulärer Acetylcholintransporter

ZNS Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Corticosteron gehört in die Gruppe der Glucocorticoide, die ebenso wie die Mineralcorticoide und Androgene in der Nebennierenrinde des Körpers gebildet werden. Neben der Wirkung von Glucocorticoiden auf den Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißstoffwechsel sowie einer zentralen Rolle bei Stress hat Corticosteron zusammen mit weiteren synthetisch erzeugten Corticoiden ein breites Einsatzspektrum in der Therapie. Hierbei wird vor allem die entzündungshemmende Wirkung durch die immunsuppressiven Eigenschaften der Glucocorticoide genutzt. Da bei vielen chronischen Lungenerkrankungen (Asthma bronchiale, COPD) Entzündungsreaktionen eine zentrale Rolle spielen, gehören hier Glucocorticoide zu den Mitteln der Wahl. Bislang war bekannt, dass Glucocorticoide über die Steuerung der Gentranskription ihre Wirkung im Körper entfalten, dies ist jedoch ein Wirkmechanismus, der einen Zeitraum von Minuten in Anspruch nimmt. In der Arbeit von Kummer et al. [38] wurde aufgezeigt, dass Corticosteron akut zu einer Verminderung der durch Serotonin hervorgerufenen Bronchokonstriktion bei der Maus führt. Außerdem konnte belegt werden, dass hierbei der Organische Kationentransporter Typ 3 (OCT3) essenziell für die Wirkung des Corticosterons ist. Dieser Effekt ist jedoch durch das bisherige Verständnis der genomischen Wirkung nicht zu erklären. Da bei obstruktiven Lungenerkrankungen eine abnorme Reaktivität der Atemwege auf Bronchokonstriktoren zu beobachten ist und Acetylcholin (ACh) der wichtigste neurogene Bronchokonstriktor ist, besteht ein großes Interesse herauszufinden, ob Corticosteron ebenfalls die cholinerge Bronchokonstriktion beeinflusst. Insgesamt sind fünf verschiedene Subtypen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren (mAChR1-5) in den peripheren Atemwegen nachweisbar, von denen allerdings nur zwei Subtypen (mAChR2 und mAChR3) für die Bronchokonstriktion verantwortlich sind [61]. Die Arbeitsgruppe

um Horvath [25] stellte zudem fest, dass die Applikation von Corticosteron bei humanen Bronchialarterien nach einer sympathischen Stimulation der glatten Muskelzellen zu einer vermehrten Vasokonstriktion führte, die durch eine Erhöhung des extrazellulären Noradrenalinpiegels und der damit verbundenen α 1-Adrenozeptor-Aktivierung zustande kam. Auch hier konnte gezeigt werden, dass der OCT3 eine zentrale Rolle spielte. Es wurde belegt, dass der OCT3 identisch mit dem Extraneuronalen Monoamintransporter (EMT) ist, der für die Beseitigung von Catecholaminen aus dem Extrazellularraum zuständig ist. Corticosteron bindet an den OCT3 und blockiert diesen, ohne selbst transportiert zu werden [33].

Abgeleitet aus diesen Erkenntnissen ist die Grundlage der vorliegenden Arbeit die Frage, welchen Einfluss Corticosteron auf die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion bei der Maus hat, und falls ja, ob der gleiche Wirkmechanismus wie bei den Bronchialarterien zugrunde liegt.

2 Literaturübersicht

2.1 Glucocorticoide

2.1.1 Vorkommen und Wirkung im Organismus

Glucocorticoide gehören zur Gruppe der Steroidhormone. Zusammen mit den Mineralcorticoiden und den Androgenen werden sie in der Nebennierenrinde gebildet. Cortisol (Hydrocortison), Cortison und Corticosteron gehören zu den wichtigsten natürlichen Glucocorticoiden. Die Synthese und die Sekretion unterliegen dem hypothalamisch-hypophysären Regelkreis. Im Organismus erfüllen sie vielfältige physiologische Aufgaben, wie beispielsweise die Regulation des Stoffwechsels von Kohlenhydraten, Eiweißen und Fetten [48]. Sie führen durch den Abbau von Proteinen zur Glukoneogenese und durch eine vermehrte Aufnahme von Glukose in die Leber zur Erhöhung der Glykogensynthese. Glukokortikoide werden auch als „Stresshormone“ bezeichnet [48]. In Stresssituationen wird vermehrt körpereigenes Cortisol ausgeschüttet, das zu einer vermehrten Energiebereitstellung führt. Sie beeinflussen den Wasser- und Elektrolythaushalt, das Herz-Kreislaufsystem und das Nervensystem [48]. Eine weitere physiologische Wirkung, die man sich in besonderem Maße bei der Therapie zunutze macht, ist die entzündungshemmende und immunsuppressive Wirkung der Corticoide [10].

2.1.2 Pharmakologischer Einsatz von Glucocorticoiden

Corticosteroide stellen mit Abstand die derzeit effektivste Behandlungsmöglichkeit gegen Asthma bronchiale und andere entzündliche bzw. immunvermittelte Erkrankungen dar [4]. Hierfür werden synthetisch hergestellte Corticoide verwendet, deren angemessene

Dosierung zu einem Wirkspiegel, der um ein Vielfaches über den physiologischen Werten liegt, führt. Die ersten künstlichen Glucocorticoide waren Prednisolon und Prednison, die sich vom Cortisol bzw. Cortison ableiten. Die meisten der synthetischen Corticoide leiten sich wiederum vom Prednisolon ab. Die Ausnahme bildet Flucortolon, das sich vom Corticosteron ableitet [16]. Betrachtet man speziell den Einsatz von Glucocorticoiden in der Therapie von Atemwegserkrankungen, werden hauptsächlich Aerosole eingesetzt, die direkt in den Atemwegen ihre Wirkung entfalten [4]. Es werden im Allgemeinen die Wirkstoffe Budesonid, Beclometason und Fluticason eingesetzt, die je nach Schweregrad des Asthmas mit β 2-Sympathomimetika (Theophyllin, Salmoterol oder Formoterol [31]) kombiniert werden [4]. Bei schwerem Asthma werden sowohl inhalativ als auch systemisch Glucocorticoide (Prednisolon) eingesetzt. Die Corticosteroide sollen durch ihre entzündungshemmende Wirkung Asthmaanfälle im Vorfeld verhindern. Bei einem akuten Anfall ist der Wirkungseintritt nach Glucocorticoidapplikation erst nach ca. 30 Minuten zu erwarten [8], da die Wirkung über einen genomischen Vorgang vermittelt wird.

2.1.3 Glucocorticoide und ihr genomischer Wirkmechanismus

Es ist bekannt, dass Glucocorticoide ihre Wirkung über eine Bindung an einem im Zytoplasma der Zelle befindlichen Rezeptor, dem sogenannten Glucocorticoid-Rezeptor (GR) entfalten [8]. Da Corticosteroide lipophile Substanzen sind, können sie die Zellmembran problemlos durchqueren. Die GRs kommen in zwei Isoformen im Organismus vor, $GR\alpha$ und $GR\beta$, wobei Corticosteroide nur von $GR\alpha$ gebunden werden können [4]. Die Rezeptoren sind normalerweise an ein Protein gebunden, das sogenannte Chaperon, das den Rezeptor schützt und verhindert, dass dieser in den Zellkern transportiert wird [70]. Bindet ein Corticosteroid an den Rezeptor, verändert dieser seine Struktur. Das Chaperon wird abgespalten und der aktivierte Rezeptor wird als Rezeptor-Ligand-Komplex in den Zellkern transportiert [4]. Im Zellkern findet eine Bindung an spezifischen Sequenzen nahe der Promotorregion bestimmter Gene, sogenannten GREs (glucocorticoid responsive elements) statt [51]. Dadurch wird die Transkription der Gene und somit die Synthese verschiedener Proteine eingeleitet [8]. Diese Steigerung der Transkriptionsrate

nennt man „trans-Aktivierung“. Es werden vor allem anti-inflammatorische Proteine vermehrt gebildet. Hierzu zählen beispielsweise Annexin 1, Endonucleasen, neutrale Endopeptidasen und vor allem Lipocortin 1. Lipocortin 1 inhibiert Phospholipase A2 [19] und greift somit maßgeblich in den Arachidonsäurezyklus ein, wodurch die Synthese von Entzündungsmediatoren gestoppt wird.

Es kann jedoch nicht nur die Synthese bestimmter Gene durch Glucocorticoide stimuliert, sondern auch inhibiert werden. Dies nennt sich „trans-Inhibition“ [11]. Über diesen Weg wird die Synthese von verschiedenen Zytokinen, wie beispielsweise dem Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), Interleukin-2 (IL-2) und Interleukin-6 (IL-6) und zahlreichen anderen pro-inflammatorischen Mediatoren gehemmt [7].

Zusätzlich zu der Beeinflussung der Transkription durch Glucocorticoide gibt es Hinweise auf post-transkriptionelle Effekte. Diese betreffen die Stabilität der Messenger-RNA (mRNA), die Translation und die Sekretion [12, 13, 55].

2.2 Organische Kationentransporter

Zur solute carrier Superfamilie gehört die Gruppe der solute carrier (SLC) 22. Zu diesen SLC 22 gehören zusammen mit 11 anderen Transportergruppen die organischen Kationentransporter (OCT) [35]. Diese Transporter sind ATP-unabhängig und in der Lage, eine große Bandbreite an Substraten zu transportieren, aufgrund dessen sie als polyspezifisch bezeichnet werden [28]. Die OCTs umfassen die Subtypen OCT1, 2 und 3, die im Allgemeinen den bidirektionalen Transport von kleinen (60 bis 350 Da), meist hydrophilen, aber auch einigen hydrophoben organischen Kationen bei einem physiologischen pH-Wert vermitteln. Dieser Transport durch die Plasmamembran erfolgt elektrogen unabhängig vom H^+ - und Na^+ -Gradienten. Als organische Kationen werden organische Moleküle bezeichnet, die temporär oder permanent eine positive Ladung besitzen und eine oder mehrere primäre, sekundäre, tertiäre oder quartäre Aminogruppen aufweisen [28, 35]. Zu dieser Gruppe zählen sowohl endogene organische Kationen wie Cholin, N1-Methylnicotinamid (NMN) und die biogenen Amine (Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin, Histamin, Serotonin), als auch Xenobiotika, Vitamine und Pharmaka (Anti-

histaminika, Skelettmuskelrelaxanzien, Antiarrhythmika, Antidiabetika etc.) [33].

Die OCTs sind in der Plasmamembran lokalisiert. Strukturell bestehen sie aus einer Peptidkette, die die Membran zwölfmal durchquert, wobei sich sowohl das C- als auch das N-terminale Ende im Zellinneren befinden [28, 35].

Die Aufgaben der OCTs ergeben sich aus ihrer jeweiligen Verteilung im Gewebe. Ihr Vorkommen in den wichtigsten exkretorischen Organen (Leber, Niere) führt zu der Annahme, dass die OCTs eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung kationischer Toxine und körpereigener Abfallprodukte spielen [29].

In der vorliegenden Arbeit liegt das besondere Augenmerk auf dem OCT3. Anzumerken ist, dass wie Lips et al. [39] nachgewiesen haben, alle Subtypen der OCTs im Atemwegsepithel der Ratte und des Menschen zu finden sind.

2.2.1 OCT1 und OCT2

Der OCT1 wurde als erstes Mitglied der OCT-Familie 1994 durch Gründemann et al. [21] in der Niere der Ratte entdeckt. Dieser rOCT1 (rat OCT1) zeigte ähnliche funktionelle Eigenschaften wie ein zuvor beschriebener Transportprozess für organische Kationen. Dieser Transportprozess fand über die basolaterale Membran proximaler Nierentubuli und in Hepatozyten statt [28]. Weitere Klonierungen des OCT1 erfolgten aus Mäusen [58], Menschen [17] und Kaninchen [62].

Zu finden ist der OCT1 beim Menschen vor allem in der Leber, in geringerem Maße aber auch in Herz, Skelettmuskulatur, Niere, Plazenta und Dünndarm. Bei Nagern ist der OCT1 hingegen vornehmlich in Leber, Niere und Dünndarm zu finden. Er ist aber auch in Dickdarm, Haut, Milz, Plexus choroideus und Neuronen nachweisbar [33].

Der OCT2 wurde 1996 von Okuda et al. [49] ebenfalls in der Rattenniere nachgewiesen. Er konnte weiterhin für den Menschen [17], Schweine [20], Mäuse [47] und Kaninchen [72] nachgewiesen werden.

Beim Nager und beim Menschen ist der OCT2 primär in der Niere zu finden. Er ist aber auch in Plazenta, Thymus, Nebenniere, Plexus choroideus und Neuronen nachweisbar. Bezüglich des Vorkommens von OCT2 in der Niere von Nagern gibt es eine

Besonderheit. Die Arbeitsgruppen um Urakami [63, 64] und Slitt [59] konnten hier eine sowohl alters- als auch geschlechtsabhängige Expression des OCT2 feststellen. Dies führt zu geschlechtsbedingten Unterschieden in der renalen Ausscheidung organischer Kationen. Männliche Ratten exprimieren in ihrer Niere signifikant mehr OCT2-mRNA als weibliche Tiere [63]. Slitt et al. wiesen nach, dass bis zu einem Alter von 30 Tagen beide Geschlechter sich auf einem vergleichbaren Level befanden. Danach zeigten die männlichen Versuchstiere einen signifikanten Anstieg von OCT2-mRNA. Durch die Applikation des männlichen Hormons Testosteron wurde bei beiden Geschlechtern ein Anstieg der OCT2-mRNA provoziert. Die Gabe des weiblichen Hormons Estradiol bewirkte nur bei den männlichen Tieren eine Reduktion des OCT2-mRNA-Spiegels [59]. Der OCT2 weist eine Homologie von 67% gegenüber dem OCT1 auf.

2.2.2 OCT3

Der OCT3 wurde 1998 erstmals beschrieben. Zwei Forschergruppen [22, 30, 71] identifizierten unabhängig von einander den OCT3 als extraneuronalen Monoamintransporter (EMT) bei der Ratte und beim Menschen. Verhaagh et al. beschrieb ihn 1999 bei der Maus. Bislang konnte der OCT3 aus folgenden Geweben und Organen erfolgreich kloniert werden: Skelettmuskulatur und glatte Muskulatur, Leber, Plazenta, Niere, Herz, Darm, Milz, Lunge, Gehirnneuronen, sympathische Ganglien, Gliazellen und Plexus choroideus [28, 34, 35].

Laut Koepsell et al. [35] gehört Corticosteron zusammen mit Deoxycorticosteron und β -Estradiol zu der großen Gruppe von Substraten, die die OCTs blockieren können, selbst aber nicht transportiert werden. Corticosteron besitzt eine deutlich höhere Affinität zu OCT3 als zu den beiden anderen OCTs [35]. Für die halbmaximale Inhibition genügt beim Menschen eine Konzentration von ca. $0,1 \mu\text{M}$ für OCT3, wohingegen OCT1 eine Konzentration von ca. $10 \mu\text{M}$ und OCT2 sogar $30 \mu\text{M}$ benötigt [33]. Bei der Ratte benötigt man für die halbmaximale Hemmung des OCT3 eine Konzentration von ca. $5 \mu\text{M}$ Corticosteron [71].

Wie die Arbeitsgruppe um Kummer [38] feststellte, hemmt Corticosteron die Serotonin-

induzierte Bronchokonstriktion bei der Maus. Durch den Einsatz von speziellen OCT-Knockout-Mäusen [29, 73] konnte gezeigt werden, dass nur in Anwesenheit des OCT3 die Bronchokonstriktion durch Corticosteron reduziert wurde. Die Anwesenheit von OCT1 und OCT2 war für den beobachteten Effekt nicht relevant [38].

2.3 Acetylcholin

Acetylcholin (ACh) ist der klassische parasympathische Neurotransmitter in den Atemwegen. Zu seinen Aufgaben gehören das Auslösen der Bronchokonstriktion und die Stimulation der Sekretion. Parasympathische Nervenfasern innervieren die glatte Bronchialmuskulatur und setzen dort das in den axonalen Vesikeln gespeicherte ACh frei [67]. Die Synthese des ACh erfolgt im Zytoplasma der Nervenendigungen mit Hilfe des Enzyms Cholinacetyltransferase (ChAT) aus Cholin und Acetyl-Coenzym A. Der vesikuläre Acetylcholintransporter (VAcHT) transportiert das ACh innerhalb der Neurone in Speichervesikel. Zur Freisetzung des gespeicherten ACh kommt es in Folge eines Aktionspotenzials, das durch den nachgeschalteten Einstrom von Kalziumionen zur Exozytose führt. Das freigesetzte ACh wirkt über nikotinische (nAChR) und muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) auf der prä- und postsynaptischen Membran des Neurons und der nachgeschalteten Zellen. Nach der Freisetzung muss das ACh wieder inaktiviert werden. Dies geschieht mit Hilfe der Cholinesterase, die das ACh wieder in Cholin und Acetat aufspaltet. Der hochaffine Cholintransporter-1 (CHT1) nimmt dieses Cholin wieder in die Nervenendigungen auf und der Kreislauf kann von Neuem beginnen [50, 52].

In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch viele nicht-neuronale Zellen das Enzym ChAT besitzen und zur ACh-Synthese fähig sind [32]. Nach der Arbeit von Wessler & Kirkpatrick [67] stellt das Enzym ChAT somit keinen spezifischen Marker für cholinerge Nervenzellen dar. Dieses nicht-neuronale ACh dient als auto- und parakriner Mediator, das heißt es wirkt auf die Zelle, die es synthetisiert hat, oder auf dessen benachbarte Zellen. Somit kann das weit verbreitete Vorkommen von nAChR und mAChR in Zellen, die nicht neuronal innerviert sind, mit der Existenz von nicht-neuronalem

ACh erklärt werden [68]. Nicht-neuronales ACh findet sich auch im Atemwegsepithel [32, 38, 54], wo es die Zellproliferation, Differenzierung und den Erhalt der Zell-zu-Zell-Kontakte reguliert [45]. In Bezug auf die begleitenden Pathomechanismen der COPD soll ACh an strukturellen Veränderungen des Wandaufbaus wie beispielsweise dem „airway-remodeling“ beteiligt sein [18]. Im respiratorischen Epithel führt nicht-neuronales ACh zu einer erhöhten Zilienschlagfrequenz [69].

2.3.1 Rezeptoren für Acetylcholin

Die Acetylcholinrezeptoren (AChR) sind als Proteorezeptoren aus Aminosäuren aufgebaut. Man unterscheidet prinzipiell zwei Arten von AChR anhand ihrer Affinität zum Agonisten: nikotinische (nach dem Alkaloid der Tabakpflanze) und muskarinische (nach dem Alkaloid des Fliegenpilzes) AChR.

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren

Bei diesen Rezeptoren (nAChR) handelt es sich um ligandengesteuerte Kationenkanäle, der Rezeptor ist demnach gleichzeitig ein Ionenkanal. Er besteht aus fünf Untereinheiten, die ringförmig um eine Pore angeordnet sind. Diese Pore ist in Ruhe geschlossen. Bindet ein Ligand an den Rezeptor, wird innerhalb von Millisekunden die Pore geöffnet und es erfolgt ein Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} sowie ein Ausstrom von K^+ -Ionen [60]. Die nAChR sind klassische Rezeptoren des ZNS, der neuromuskulären Endplatte und der postganglionären autonomen Neuronen. Je nach Vorkommen in der Zellmembran von Skelettmuskel- und Nervenzellen bezeichnet man sie als Muskeltyp bzw. Neuronentyp.

Der klassische Agonist ist Nikotin, zu den Antagonisten gehören Curare und α -Bungarotoxin für den Muskeltyp.

In Zusammenhang mit nicht-neuronalem ACh finden sich nAChR auch auf Alveolarmakrophagen. Ihre Aktivierung hat einen dämpfenden Effekt auf die Alveolarmakrophagen und somit einen insgesamt anti-inflammatorischen Einfluss [6, 44, 46].

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die ihre Wirkung über eine intrazelluläre Wirkkaskade entfalten. Das ruhende G-Protein besteht aus drei Untereinheiten (α -, β - und γ -Untereinheit), wobei an die α -Untereinheit ein Guanosindiphosphat (GDP) gebunden ist. Bindet ein Agonist am Rezeptor, wird das GDP durch Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht, das α -GTP dissoziiert vom $\beta\gamma$ -Komplex und kann somit mit diversen Enzymsystemen interagieren. Die Inaktivierung erfolgt durch eine Hydrolyse des GTP zu GDP, wobei die α -Untereinheit als GTP-ase wirkt. Es folgt die Reassoziierung mit dem $\beta\gamma$ -Komplex.

Auf der genetischen Ebene sind laut Caulfield et al. [9] fünf Subtypen unterscheidbar (mAChR1 bis mAChR5). In den Atemwegen von Mensch, Ratte, Maus und Schwein wurden die Subtypen mAChR1, mAChR2 und mAChR3 nachgewiesen [14, 15, 24, 41]. Die Arbeitsgruppe um Struckmann et al. [61] wies anhand von Untersuchungen an Knockout-Mäusen, denen jeweils ein Muskarinrezeptor (mAChR1, mAChR2 oder mAChR3) oder sogar zwei (mAChR2 und mAChR3) fehlten, nach, dass in den peripheren Atemwegen mAChR2 und mAChR3 gemeinsam für die Bronchokonstriktion verantwortlich sind. Für den mAChR1 konnte hingegen gezeigt werden, dass dieser eine hemmende Wirkung auf die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion hat. Es wird vermutet, dass über den mAChR1 ein relaxierender Faktor in den peripheren Atemwegen freigesetzt wird [61].

Für den mAChR2 gibt es außerdem Hinweise, dass er über eine Hemmung der Adenylatzyklase fähig ist, über den β_2 -Adrenozeptor vermittelte Effekte zu blockieren [43]. Für Alveolarmakrophagen konnte belegt werden, dass sie mAChR3 exprimieren und ihre Aktivierung am Beispiel boviner Alveolarmakrophagen zu einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt [56]. Aufgrund ihrer Verteilung im Gewebe stellen die Alveolarmakrophagen ein mögliches Ziel für das nicht-neuronale ACh dar [37].

2.3.2 OCTs und das nicht-neuronale cholinerge System

Bezüglich der Freisetzung von nicht-neuronalem ACh bestehen noch einige Unklarheiten. Die Arbeitsgruppe um Wessler [66] konnte durch ihre Studie an menschlichen Plazentazotten nachweisen, dass OCTs an der Freisetzung von nicht-neuronalem ACh beteiligt sind. Da die Plazenta nicht innerviert ist, ist sie ein geeignetes Studienobjekt. Es wurde eine kontinuierliche Freisetzung von ACh beobachtet, die sich durch die Anwesenheit von OCT-Inhibitoren (Quinin, Noradrenalin oder Corticosteron) hemmen ließ. Laut ihrer Studie sind in der Plazenta die Subtypen OCT1 und OCT3 für den Transport von nicht-neuronalem ACh verantwortlich [66].

In einer Studie von Lips et al. [39] konnte 2005 mittels RT-PCR gezeigt werden, dass im Bronchialepithel von Ratten und Menschen OCT1, 2 und 3 vorhanden sind. Durch Studien an transfizierten Oocyten von *Xenopus laevis* konnte belegt werden, dass auch hier OCTs an der Freisetzung von nicht-neuronalem ACh beteiligt sind. Allerdings konnte die Arbeitsgruppe um Lips [39] nur für OCT1 und OCT2 sowohl einen nach extrazellulär als auch einen nach intrazelluläre gerichteten Transport von ACh nachweisen. OCT3 war nach ihren Beobachtungen nicht am Transport beteiligt. Ausserdem konnte für den hOCT2 gezeigt werden, dass dieser durch Glucocorticoide, wie sie als Inhalate in der Asthmatherapie verwendet werden (Budesonid, Beclomethason), in seiner Fähigkeit ACh freizusetzen, blockiert werden konnte. Für die Maus konnte kein OCT2 im Bronchialepithel nachgewiesen werden [38]. In der selben Arbeit wurde ausserdem gezeigt, dass sich OCT3 hauptsächlich im Bereich der glatten Muskulatur der Bronchi befindet. OCT1 fand sich im apikalen Bereich der zilienträgenden Zellen [38].

Zusammengefasst würde dies bedeuten, dass bei der Maus lediglich OCT1 den Transport von nicht-neuronalem ACh im respiratorischen Epithel vermitteln könnte.

2.4 Katecholamine und Bronchodilatation

2.4.1 Wirkung und Rezeptoren

Für die glatte Muskulatur der Atemwege des Menschen und auch anderer Spezies konnte das Vorhandensein von vereinzelt noradrenergen Nervenfasern nachgewiesen werden [2]. Nach einem Stimulus kann aus diesen Nervenendigungen das in Vesikeln gespeicherte Noradrenalin in den Extrazellularraum freigesetzt werden. Noradrenalin gehört zusammen mit Adrenalin und Dopamin zu den Katecholaminen und erfüllt im Organismus sowohl eine Rolle als Hormon, als auch als Neurotransmitter. Adrenalin und Noradrenalin binden an Adrenozeptoren, die sich wie folgt unterteilen: α 1- und α 2-Adrenozeptoren und β 1-, β 2- und β 3-Adrenozeptoren [27]. Es handelt sich hierbei um eine Klasse G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Dopamin wirkt über eine eigene Rezeptorklasse, die hier nicht weiter erwähnt wird.

Für die β -Adrenozeptoren konnte gezeigt werden, dass im Lungengewebe sowohl β 1- als auch β 2-Rezeptoren vorhanden sind, wobei es Unterschiede im Verteilungsverhältnis je nach Spezies gibt [2]. Es wird vermutet, dass β 1-Rezeptoren über sympathische Nerven aktiviert werden („neuronale“ β -Rezeptoren), hingegen β 2-Rezeptoren über zirkulierendes Adrenalin („hormonelle“ β -Rezeptoren) angesteuert werden [2]. Noradrenalin führt über die Aktivierung von β -Adrenozeptoren zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und dadurch zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels. Dies bewirkt eine Bronchodilatation [2].

Für die α -Rezeptoren ist aus autoradiografischen Studien bekannt, dass sie in sehr unterschiedlichen Verteilungsmustern in den Atemwegen vorliegen [5].

Die Arbeitsgruppe um Horvath et al. [25] hat gezeigt, dass aus adrenergen Nervenendigungen freigesetztes Noradrenalin über die Aktivierung von α 1-Adrenozeptoren zu einer Vasokonstriktion der Bronchialarterien führt.

Für die jeweils beschriebenen Reaktionen des Noradrenalins gilt das Konzept: Die Konzentration des Neurotransmitters und die Zeitspanne, über die er am Rezeptor binden kann, bestimmen das Ausmaß der Reaktion. Da die Katecholamine im Extrazellular-

raum stabil sind und nicht frei durch die Zellmembran diffundieren können, wird ein Transportsystem benötigt, um sie in die Zelle zu transportieren, damit sie dort entweder abgebaut oder recycled werden können [25]. Für diesen Rücktransport stehen dem Organismus zwei unterschiedliche Aufnahmesysteme, Uptake-1 und Uptake-2, zur Verfügung [28, 73].

2.4.2 Uptake-1 und Uptake-2

Das neuronale Transportsystem, auch bekannt als Uptake-1, findet sich vor allem in präsynaptischen Nervenendigungen und vermittelt hier die Wiederaufnahme freigesetzter Monoamine aus dem synaptischen Spalt. Uptake-1 ist ein Na^+ - und Cl^- -abhängiges System, das sich aus dem Noradrenalin-, Dopamin- und Serotonin-Transporterproteinen zusammensetzt [73].

Der extraneuronale Monoamintransporter (EMT), auch bekannt als Uptake-2, wurde ursprünglich in Myokardzellen von Ratten entdeckt [26]. Der EMT zeichnet sich durch seine Unabhängigkeit vom Na^+ - Cl^- -Gradienten aus. Ausserdem gehören eine Vielzahl von organischen Kationen zu seinen Substraten, die er abhängig vom Membranpotential transportiert. Steroide inhibieren den EMT, der in vielen Geweben zu finden ist (Plazenta, glatte Muskulatur von Gefäßen, ZNS etc.) [71]. Der 1998 erstmals durch zwei voneinander unabhängige Gruppen klonierte OCT3 zeigt die gleiche Sensitivität gegenüber einigen Inhibitoren (β -Estradiol, Corticosteron etc.) wie der EMT und wurde deshalb mit diesem gleichgesetzt [22, 33, 71].

Neben dem OCT3 sind aber auch OCT1 und 2 in der Lage Monoamine zu transportieren, allerdings werden diese nicht wie der OCT3 durch alle Inhibitoren des EMT blockiert [73].

Die Arbeitsgruppe um Horvath [25] konnte nachweisen, dass in Bronchi eine Blockade des OCT3 durch inhalierte Glucocorticoide zu einem erhöhten Noradrenalin Spiegel im Extrazellularraum führte. Die Folge war eine akute α 1-Adrenozeptor-vermittelte Vasokonstriktion der Bronchialarterien. Die Glucocorticoide führten somit zu einem akuten non-genomischen Effekt, indem sie den Transport des Noradrenalins durch den OCT3 verhinderten, ohne hierbei selbst transportiert zu werden. Das Noradrenalin verblieb

über einen längeren Zeitraum im Extrazellularraum und führte an den glatten Muskelzellen der Bronchialarterien zu einer verstärkten Konstriktion.

2.5 Ziel der Arbeit

Die Arbeitsgruppe um Kummer [38] konnte nachweisen, dass Corticosteron in der Lage ist, die durch einen Serotoninstimulus hervorgerufene Bronchokonstriktion signifikant zu reduzieren. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass für den beobachteten Effekt der OCT3 verantwortlich ist. Dieser OCT3 wird weitestgehend mit dem extra-neuronalen Monoamintransporter gleichgesetzt. Die Arbeitsgruppe um Horvath [25] konnte nachweisen, dass Corticosteron zu einer erhöhten Vasokonstriktion von Bronchialarterien führt. Dies führte Horvath auf eine Erhöhung des Noradrenalinpiegels zurück, bedingt durch die Blockade des OCT3 durch das Corticosteron. Der erhöhte Noradrenalinpiegel führte zu einer gesteigerten Aktivierung der α 1-Adrenozeptoren und somit zu einer gesteigerten Vasokonstriktion.

Diese beiden Erkenntnisse zusammengefasst bilden die Grundlage der vorliegenden Arbeit. Als Ausgangshypothese soll untersucht werden, ob Corticosteron auch in der Lage ist, die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion zu beeinflussen. Ist dies der Fall, soll untersucht werden, ob auch im Bereich der kleinen luftleitenden Wege eine Blockade des OCT3 durch das Corticosteron als ursächlich anzusehen ist. Es stellt sich ebenfalls die Frage, ob auch hier, wie bei den Bronchialarterien, eine Erhöhung des Katecholaminpiegels dem beobachteten Effekt zugrunde liegt (Abb 2.1).

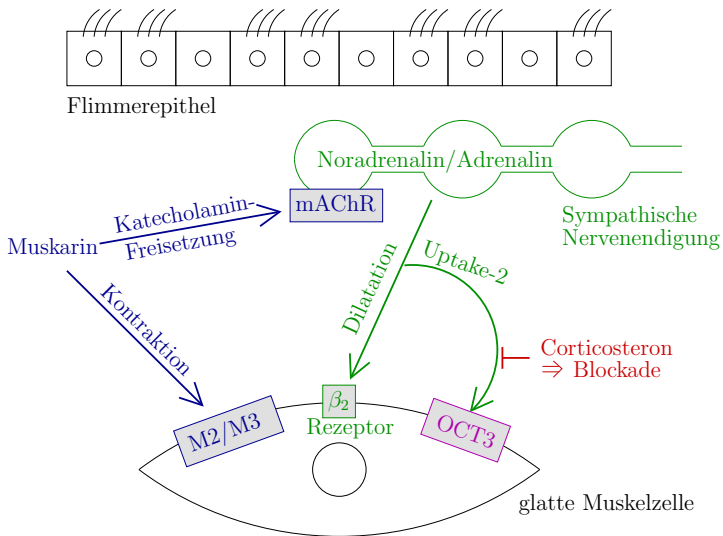


Abbildung 2.1: Das Schema zeigt den hypothetischen Wirkmechanismus von Corticosteron auf die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion. Als Grundlage dient die Annahme, dass Muskarin einerseits zu einer direkten Bronchokonstriktion führt und andererseits gleichzeitig aus den sympathischen Nervenendigungen ein Katecholamin freisetzt. Dieses Katecholamin bewirkt über eine Aktivierung der β_2 -Adrenozeptoren eine Bronchodilatation. Eine Blockade des OCT3 durch Corticosteron führt zu einer Erhöhung des Katecholaminspiegels und verstärkt somit dessen bronchodilatative Wirkung.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Die Studie wurde ausschließlich am FVB Mäusestamm durchgeführt. Die Mäuse wurden im Tierstall des Institutes für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Standardbedingungen in Makrolonkäfigen gezüchtet und gehalten.

Für die Versuchsreihe wurden zufällig Tiere beiderlei Geschlechts und unterschiedlichen Alters ausgewählt. Die Tiere hatten ein Alter von 6 bis 12 Wochen. In die Auswertung der Versuche gingen 43 Tiere ein (Tab. 3.1).

Nr	Geschlecht	Gewicht	Proben	Nr	Geschlecht	Gewicht	Proben
M1	w	22,3 g	1	M30	m	19,7 g	1
M3	w	21,0 g	2	M33	w	20,5 g	2
M4	w	18,1 g	4	M37	m	28,7 g	2
M5	w	19,4 g	2	M38	w	19,7 g	4
M6	w	26,4 g	3	M39	m	29,8 g	1
M7	w	25,3 g	2	M40	w	20,1 g	2
M8	m	26,6 g	3	M41	w	21,3 g	2
M9	m	26,3 g	4	M42	w	20,0 g	4
M10	m	28,7 g	2	M43	m	25,0 g	3
M11	m	27,1 g	4	M44	m	23,3 g	4
M12	w	22,3 g	2	M45	m	27,4 g	4
M13	m	21,2 g	3	M46	m	26,9 g	3

M14	w	21,7 g	2	M47	m	27,8 g	2
M15	m	28,8 g	2	M48	m	25,4 g	2
M16	w	22,9 g	2	M49	w	22,5 g	2
M17	w	18,6 g	3	M50	w	19,6 g	3
M18	w	17,1 g	3	M51	w	20,5 g	1
M19	w	17,7 g	2	M52	m	28,0 g	1
M21	m	28,4 g	3	M53	m	24,4 g	1
M22	w	20,0 g	1	M54	w	21,1 g	2
M23	w	17,0 g	2	M55	w	21,7 g	2
M24	m	22,7 g	2				

Tabelle 3.1: Die Tabelle zeigt die Übersicht aller verwendeten Versuchstiere. Angegeben sind das Geschlecht, das Gewicht und die Anzahl der Schnitte, die unter Berücksichtigung der Auswahlkriterien (Abschn. 3.2.4) in die Auswertung eingegangen sind.

3.1.2 Pharmaka

Die Substanzen, die für die Versuchsdurchführung verwendet wurden, finden sich in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3.2) wieder.

Pharmakon	Hersteller	Solvens	Konzentr.	Temp.
Corticosteron	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim	Ethanol absolut	10^{-6} M	-20 °C
HBC-Komplex	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim	Aqua a.i.	10^{-6} M	-20 °C
(2-Hydroxypropyl)- β -Cyclodextrin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim	Aqua a.i.	4×10^{-4} M	-20 °C

Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Stein- heim		0,01 %	+20 °C
Muskarin- Chlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Stein- heim	Aqua a.i.	10^{-6} M	-20 °C
Propranolol- Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Stein- heim	Ethanol absolut	10^{-6} M	-20 °C

Tabelle 3.2: Die Tabelle zeigt die Übersicht aller verwendeten Pharmaka. Angeben sind der Hersteller, das Lösungsmittel, die eingesetzte Endkonzentration und die Lagertemperatur.

3.1.3 Lösungen

- HEPES-Ringer-Puffer

Der HEPES-Ringer-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 wurde zum Ansetzen der Lungenspülflüssigkeit, der Agarose und als Inkubationsmedium in der Kammer der Videomorphometrieanlage eingesetzt. Für 5 l Puffer-Lösung wurden folgende Substanzen verwendet:

- Destilliertes Wasser 5 l
- Glucose (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) 9,90 g
- Hepes (Fa. Sigma-Aldrich Chemie) 11,90 g
- Kaliumchlorid (Fa. Merck, Darmstadt) 2,09 g
- Natriumchlorid (Fa. Roth, Karlsruhe) 39,85 g
- 1-molare Magnesiumchlorid-Lösung ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) 5 ml
- 1-molare Calciumchlorid-Lösung ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) 11 ml

Die Bestandteile wurden unter ständigem Rühren gelöst. Um den pH-Wert von 7,4 einzustellen, wurden 23 ml einer 1-molaren Natronlauge (NaOH, Fa. Merck)

zugegeben. Abschließend wurde der Puffer steril gefiltert und bei 4 °C gelagert.

- Agarose

Circa 30 min vor Versuchsbeginn wurde 1,6-prozentige Agarose angesetzt. Für eine Maus benötigte man 0,16 g Agarose-Trockensubstanz (Low Melt Preparative Grade Agarose, Fa. Biorad, München), die mit 10 ml HEPES-Ringer-Puffer mehrmals aufgeköcht wurde, bis keine Schwebeteilchen mehr sichtbar waren. Die Agarose wurde in eine 2 ml Einmalspritze aufgezogen und um ein Festwerden zu verhindern bei 37 °C im Inkubator aufbewahrt.

- Aqua ad injectabilia (Aqua a.i.)

Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa, Fa. Braun, Melsungen) wurde als Lösungsmittel verwendet.

- Nitroprussid-Natrium

26,37 mg Trockensubstanz Nitroprussid-Natrium (Nipruss, Fa. Schwarz-Pharma, Zwickau) wurden in 10 ml Aqua a.i. gelöst. Es wurden Aliquots von 150 μ l hergestellt und bei -20 °C aufbewahrt. Es wurde für die Lungenspüllflüssigkeit benötigt.

- Lungenspüllösung

Vor der Präparation wurde eine Lösung zum Spülen der Lungengefäße erstellt. Hierzu wurden folgende Substanzen miteinander vermischt:

- HEPES-Ringer-Puffer (pH 7,4) 20 ml
- Natrium-Heparin (Liquemin, Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach- Wyhlen, $2,5 \times 10^4$ I.E./ml) 200 μ l
- Penicillin (10^4 U/l)-Streptomycin (10 mg/ml)-Lösung (PAA Laboratories, Linz) 100 μ l

Direkt vor dem Einsatz der Lösung wurden noch 149 μ l Nitroprussid-Natrium zugegeben.

- Inkubationsmedium

Um die Agarose wieder aus den Atemwegen und Alveolen herauszuwaschen, wurden die Lungenschnitte in 100 ml Earle's Minimal Essential Medium (MEM, Fa.

PAA Laboratories, Linz) inkubiert.

Dem Medium wurde zuvor 1 ml der bereits bei der Lungenspüllösung erwähnten Penicillin-Streptomycin-Lösung hinzugefügt.

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation der Mäuselunge

Die Maus wurde durch Genickbruch getötet, gewogen und anschließend in Rückenlage auf einem Styroporbrett fixiert. Als Präparationsbesteck dienten eine kleine anatomische Pinzette mit gebogener Spitze und eine feine Schere, ebenfalls mit gebogener Spitze.

Die Bauchhöhle wurde durch einen Hautschnitt eröffnet, das Darmkonvolut beiseite geschoben und die Aorta abdominalis durchtrennt, um das Tier auszubluten. Dann erweiterte man den Hautschnitt, so dass er in der Medianen verlaufend vom Kinn bis zur Leiste reicht. Vorsichtig wurde das Zwerchfell perforiert, um den Unterdruck in der Brusthöhle aufzuheben. Die Lunge kollabierte und durch das Durchtrennen der Rippen und des Schultergürtels konnten nun ohne Verletzung der Lungenlappen, die Lunge und das Herz freigelegt werden. Die Trachea wurde ebenfalls freipräpariert und locker mit einem Faden umschlungen. Für die Spülung der Lungengefäße wurde eine feine Kanüle in die rechte Herzkammer eingeführt und mit Hilfe einer Pumpe (Fa. Gilson, Abimed, Miniplus 2) und einem daran angeschlossenen Schlauchsystem ca. 20 ml Spülflüssigkeit durch den Lungenkreislauf gepumpt. Die Spülflüssigkeit lief durch den linken Ventrikel ab, der zuvor inzidiert worden war. Die Lunge wurde solange gespült, bis sie nur noch zartrosa war. Dann erfolgte eine Inzision parallel zu den Knorpelspangen der Trachea einige Millimeter oberhalb der vorbereiteten Ligaturstelle. Die in einer Spritze bereitgestellte flüssige Agarose wurde nun mit Hilfe eines aufgesetzten Venenverweilkatheters (Vasocan Brauntüle, Fa. Braun, Melsungen; Größe 41,2 mm × 33 mm) über das Loch in der Trachea in die luftführenden Wege der Lunge eingebracht, bis sich die Lunge voll entfaltet hatte. Um ein Abfließen der Agarose zu verhindern, wurde die Ligatur zugezogen. Abschließend wurde das Herzlungen-Paket samt Trachea vorsichtig aus dem Brustkorb

herauspräpariert und sofort in ein Becherglas, das mit gekühlter HEPES-Puffer-Lösung gefüllt war, gelegt, um die Agarose aushärten zu lassen.

3.2.2 Anfertigung der Lungenpräzisionsschnitte

Durch das Befüllen der Lunge mit Agarose war diese nun schnittfest und konnte mittels eines Vibratoms (Vibrating Blade Tissue Slicer, VT 1000S, Fa. Leica, Wetzlar) in 200 μm dicke Scheiben geschnitten werden. Das Vibratom verfügte über eine kühlbare Pufferwanne, die mit HEPES-Ringer-Lösung gefüllt war. Die Kühlung wurde bereits zu Beginn der Präparation eingeschaltet, damit die erforderliche Schneidetemperatur von 4 °C bis zum Aushärten der Agarose erreicht worden war. Auf dem Schneideteller war eine 15 mm hohe Korkenhälfte permanent als Hilfsmittel aufgeklebt. Sie diente dazu, den auf dem Teller mit Sekundenkleber (Fa. UHU GmbH, Bühl) fixierten Lungenlappen in der gewünschten aufrechten Position zu halten.

Für die Präzisionsschnitte (PCLS) wurden nur der linke Lungenlappen und der rechte kraniale Lungenlappen verwendet. Sie wurden jeweils einzeln präpariert und dann mit Sekundenkleber so auf dem Schneideteller befestigt, daß die Facies diaphragmatica an der Korkfläche lehnte, der Margo dorsalis dem Schneideteller auflag und der Margo acutus nach oben zeigte. Dann wurden der Teller in der Pufferwanne arretiert und die Schnittparameter eingestellt (Schnittbreite 200 μm , Geschwindigkeit 0,5 mm/s, Frequenz 100 Hz). Die ersten Millimeter des Margo acutus wurden verworfen, dann erfolgte die Anfertigung der vitalen Lungenpräzisionsschnitte. Die Schnitte wurden in ein vorgewärmtes Becherglas, das mit 100 ml MEM (incl. 1 % Penicillin-Streptomycin) gefüllt war, überführt und für mindestens 2 Stunden einer kontinuierlicher Begasung (Normoxiegemisch: 73,7 % Stickstoff, 21,0 % Sauerstoff und 5,3 % Kohlendioxid) im Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C unterzogen. Dadurch wurde die Agarose wieder aus den Atemwegen und Alveolen herausgewaschen, um eine Kontraktion der Bronchi zu ermöglichen.

3.2.3 Videomorphometrie

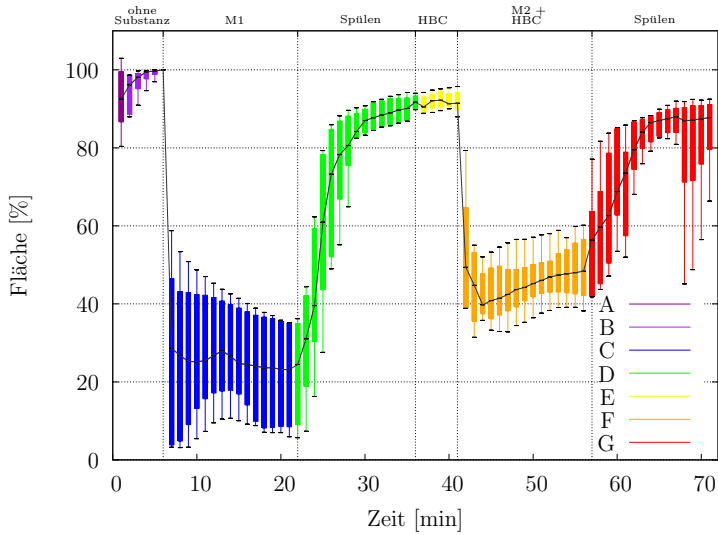
Versuchsaufbau der Videomorphometrie

Für die Betrachtung der noch lebenden PCLS wurde eine spezielle Inkubationskammer benötigt. Diese war auf dem Objektisch eines inversen Mikroskops (Fa. Leica, Wetzlar) montiert. Die Kammer bestand aus zwei Inkubationszellen mit einem Durchmesser von ca. 15 mm, von denen während der Versuche immer nur eine Zelle genutzt wurde. Mittels einer Pumpe (Fa. Gilson, Miniplus 3, Abimed) mit Schlauchsystem wurde ein kontinuierlicher Zu- und Abfluss von Flüssigkeit in der Zelle gewährleistet. Die Zelle beinhaltete eine konstante Flüssigkeitsmenge von 2 ml. Ein Wasserbad ermöglichte das Beheizen der Kammer auf konstant 37 °C während des Versuchsablaufs. Als Spülmedium diente HEPES-Ringer-Puffer (pH 7,4, 37 °C).

Versuchsablauf

Für einen Versuchsdurchgang wurde ein Lungenschnitt in die Inkubationszelle eingelegt und mittels eines passgenauen Gitternetzes am Boden fixiert, um ein Abdriften während der Spülvorgänge zu verhindern. Während der Feinjustierung wurde der Lungenschnitt bereits langsam gespült, um eine Adaptation an die Kammer zu ermöglichen. Danach wurde bei 10-facher Vergrößerung der Schnitt nach einem geeigneten Bronchus durchgemustert, der bestimmte Voraussetzungen, die als primäre Auswahlkriterien bezeichnet werden, erfüllen musste. Der Bronchus musste quer angeschnitten sein und einen Durchmesser von 150 - 250 μm haben. Das Epithel und die Tunica muscularis durften keine Defekte aufweisen und das Lumen musste frei von Fremdkörpern (Blut, Agarose, etc.) sein.

Zur Datenerfassung war eine Digitalkamera (Fa. Stemmer, Puchheim) an das Mikroskop angeschlossen, die eine Bildübertragung auf den Computer ermöglichte. Mit der Speicherung des ersten Bildes begann der Versuch. Alle 60 Sekunden wurde automatisch das aktuelle Bild gespeichert. Unter Zuhilfenahme einer Pipette wurden die zu untersu-



Phase	Bildnr.	Zeitintervall	Versuchsvorgang
A	1	1 min	Grundeinstellung
B	2-6	5 min	Adaptationsphase mit langsamem Spülen
C	7-21	15 min	1. Kontraktionsphase mit Muskarin
D	22-36	15 min	Schnelles Spülen
E	37-41	5 min	Vorinkubation mit Testsubstanz (Glucocorticoid/Vehikel/Glucocorticoid und Propranolol)
F	42-56	15 min	2. Kontraktionsphase mit Muskarin und Testsubstanz (Glucocorticoid/Vehikel/Glucocorticoid und Propranolol)
G	57-71	15 min	Schnelles Spülen

Abbildung 3.1: Die Abbildung zeigt am Beispiel der Versuchsreihe „Muskarin und HBC $10^{-4}M$ “ den zeitlichen Verlauf der Versuche. Dargestellt sind der Median und die Quartile der Bronchusflächen. Die einzelnen Versuchsphasen sind farblich markiert und die Phasen in der Tabelle im Detail erläutert.

chenden Substanzen direkt in die Inkubationszelle eingebracht und durch das Ab- und Anstellen der Pumpe in der Inkubationszelle belassen oder ausgewaschen (Abb. 3.1). Die Reaktion des Bronchus war direkt auf dem Monitor sichtbar. Die Spüloption ermöglichte es, den Bronchus nach einem reversiblen Reiz wieder in einen Zustand zu versetzen, der annähernd dem Ausgangszustand entsprach (Abb. 3.2), wodurch es möglich war, unterschiedliche Substanzen am selben Bronchus zu testen und die Reaktionen zu vergleichen.

Insgesamt wurden 9 verschiedene Versuchsreihen durchgeführt (Tab. 3.4), die bis auf die Zugabe der unterschiedlichen Substanzen immer nach dem gleichen Schema abgelaufen sind. Als konstriktorischer Stimulus wurde allein Muskarin in einer Konzentration von 10^{-6} M eingesetzt.

Versuchsnr.	1. Kontraktion	2. Kontraktion mit Testsubstanz
01	Muskarin 10^{-6} M	Muskarin 10^{-6} M
02	Muskarin 10^{-6} M	Muskarin 10^{-6} M mit Corticosteron 10^{-6} M
03	Muskarin 10^{-6} M	Muskarin 10^{-6} M mit Ethanol 0,01 %
04	Muskarin 10^{-6} M	Muskarin 10^{-6} M mit Cyclodextrin 4×10^{-4} M
05	Muskarin 10^{-6} M	Muskarin 10^{-6} M mit HBC-Komplex 10^{-7} M
06	Muskarin 10^{-6} M	Muskarin 10^{-6} M mit HBC-Komplex 10^{-6} M
07	Muskarin 10^{-6} M	Muskarin 10^{-6} M mit HBC-Komplex 10^{-5} M
08	Muskarin 10^{-6} M	Muskarin 10^{-6} M mit HBC-Komplex 10^{-4} M
09	Muskarin 10^{-6} M	Muskarin 10^{-6} M mit HBC-Komplex 10^{-4} M und Propranolol 10^{-6} M

Tabelle 3.4: Die Tabelle zeigt die Stimuli der 1. und 2. Kontraktionsphase für jede Versuchsreihe.

3.2.4 Auswertung

Die Auswertung der Bildsequenzen gliederte sich in zwei Teile. Der erste befasste sich mit der Vermessung der einzelnen Bilder unter Verwendung eines speziellen Messprogrammes und der zweite Teil mit der statistischen Auswertung der gewonnenen Daten,

erst innerhalb einer Versuchsreihe und anschließend der Versuchsreihen untereinander.

Auswertung der Bildsequenzen

Die vom Computer erfassten Bilder der Messserien wurden mit Hilfe des Analyseprogrammes Optimas 6.5 (Fa. Stemmer Imaging, Puchheim) ausgewertet. Nachdem die Software auf die verwendete Vergrößerung des Mikroskops eingestellt war, erkannte die Software alle zusammenhängenden Flächen, aus denen per Mausklick der zu untersuchende Bronchus ausgewählt wurde. Dessen Fläche wurde anschließend automatisch vom Programm errechnet und in einer Excel-Tabelle erfasst.

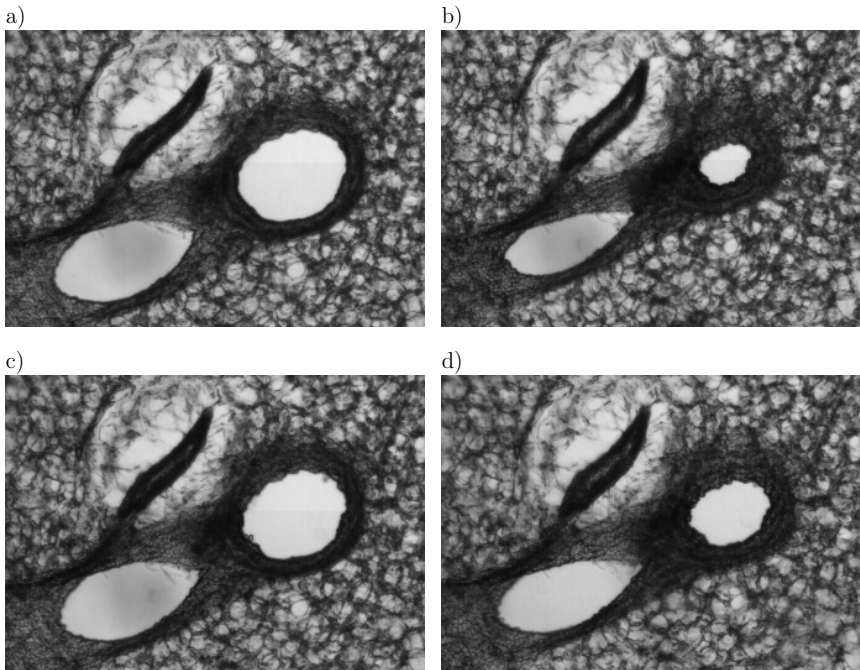


Abbildung 3.2: a) Phase **B**: Adaptation, b) Phase **C**: 1. Kontraktion mit Muskarin 10^{-6} M, c) Phase **D**: Relaxation, d) Phase **E**: 2. Kontraktion mit Muskarin 10^{-6} M und HBC-Komplex 10^{-4} M.

Um Messungen verschiedener Bronchi vergleichen zu können, war es notwendig, die ermittelten Flächen geeignet zu normieren. In der Annahme, dass zu Beginn des Versuchs während der Phase **B** noch eine Adaptation des Präparates an seine Umgebung nach dem mechanischen Stimulus des Einbringens in die Inkubationskammer erfolgte, wurde die letzte Messung dieser Phase (Bildnr. 6) als Referenz gewählt und alle folgenden Flächen in Relation zu diesem Wert in Prozent angegeben.

Das Ausmaß der Reaktion war Teil der sekundären Auswahlkriterien. Hierzu zählten erstens, dass sich die Fläche nach den ersten drei Minuten des ersten Muskarinstimulus (Phase **C** Bildnr. 7–9) um mindestens 30 % gegenüber dem Referenzwert verringert haben musste, und zweitens, dass sich nach dem darauffolgenden Spülvorgang (Phase **D**) die Fläche wieder auf mindestens 90 % und höchstens 130 % der Ausgangsfläche vergrößert haben musste. Durch diese zusätzlichen Kriterien sollte die Vitalität des Bronchus belegt werden. Werte über 100 % bedeuteten, dass der Bronchus (z.B. durch das Einbringen in die Kammer) vorkontrahiert war und sich diese Kontraktion nach dem Spülen löste.

Statistik

Als erstes wurden für jede Versuchsreihe die Mittelwerte und deren Standardabweichungen, sowie der Median und die Quartile berechnet (Abb. 3.1).

Exemplarisch wurden drei Messpunkte jeder Versuchsreihe in der statistischen Analyse weitergehend untersucht:

- a) Die maximalen Kontraktionen in der Phase **C** und Phase **F** geben Aufschluss darüber, wie stark die Reaktion des Bronchus auf die zugegebenen Substanzen ausfällt.
- b) Die Kontraktionen zu den Zeitpunkten 1 min und 5 min in der Phase **C** und Phase **F** geben Aufschluss über die Kinetik der Reaktion des Bronchus auf die zugegebenen Substanzen.

Anschließend wurde die erste Kontraktionsphase (Phase **C**) mit der zweiten (Phase **F**) innerhalb eines Versuches in Beziehung gesetzt. Da es sich hier um verbundenen Stich-

proben (selber Bronchus) handelte, aber keine Normalverteilung angenommen werden konnte, wurde für den Vergleich ein nicht-parametrischer Test für gepaarte Stichproben, der sogenannte Wilcoxon-Test verwendet.

Außerdem wurden die Kontraktionen mehrerer Versuchsreihen miteinander verglichen. Um dies tun zu können, wurden für jeden Versuch zu den Zeitpunkten 1-Minute, 5-Minuten und maximale Kontraktion die Quotienten aus der 2. und 1. Kontraktionsphase gebildet. Die 1. Kontraktionsphase diente hierbei der Normierung, da hier für alle Versuchsreihen die gleichen Bedingungen (alleinige Applikation von Muskarin) vorlagen. Da es sich hier um unverbundene Stichproben handelte (verschiedene Bronchi) kam an dieser Stelle der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz. Ergab sich hier ein signifikanter Unterschied wurden die Versuchsreihen paarweise mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen, um herauszufinden, welche Gruppen sich voneinander unterschieden.

Für alle Tests galt: Als signifikant wurden Unterschiede betrachtet, die eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $\leq 0,05$ aufwiesen.

4 Ergebnisse

4.1 Überprüfung der Ausgangshypothese

Die Ausgangshypothese der vorliegenden Arbeit lautet, dass Corticosteron die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion signifikant beeinflusst.

4.1.1 Wiederholte Bronchokonstriktion mit Muskarin 10^{-6} M

Um zu überprüfen, ob ein Bronchus in der Lage war, nach dem ersten konstriktorischen Stimulus und der anschließenden Waschphase erneut auf diesen Reiz zu reagieren, ohne Ermüdungserscheinungen zu zeigen, wurde in dieser Versuchsreihe ausschließlich Muskarin 10^{-6} M in der 1. und 2. Kontraktionsphase appliziert. Dadurch entfiel Phase **E** (Abb. 3.1), dies wurde durch eine 5-minütige Verlängerung des 1. Spülvorganges (Phase **D**) ausgeglichen, damit alle Versuchsreihen den gleichen zeitlichen Verlauf aufwiesen.

Es wurden 9 PCLS von insgesamt 9 Mäusen ausgewertet (Abb. 4.1). Nach der ersten Muskarinzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der maximalen Kontraktion eine durchschnittliche Reduktion auf $27\% \pm 13\%$ der Ausgangsfläche. Nach der zweiten Muskarinapplikation verringerte sich die Fläche auf $25\% \pm 15\%$. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden maximalen Kontraktionen messbar (Abb. 4.2).

Es zeigte sich jedoch zum Zeitpunkt „5-Minuten nach Wirkstoffapplikation“ (Abb. 4.2) ein signifikanter Unterschied ($p = 0,039$). Die Bronchi kontrahierten sich zu diesem Zeitpunkt auf $41\% \pm 34\%$ der Fläche bei der 1. Kontraktion und auf $34\% \pm 17\%$ Fläche bei der 2. Kontraktion. Die zweite Kontraktionsphase zeigte demnach eine um 7% stärkere Reaktion.

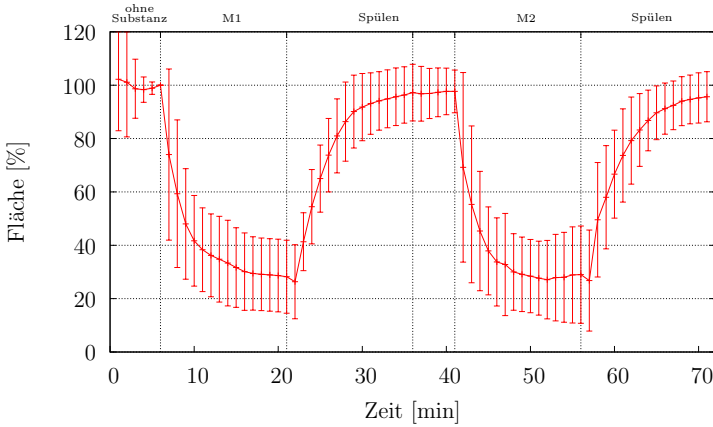


Abbildung 4.1: Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der Bronchusflächen für die Versuchsreihe der wiederholten Bronchokonstriktion mittels Muskarin (M) 10^{-6} M im zeitlichen Verlauf ($n = 9/9$; entspricht der Anzahl der Bronchi/Anzahl der Lungen).

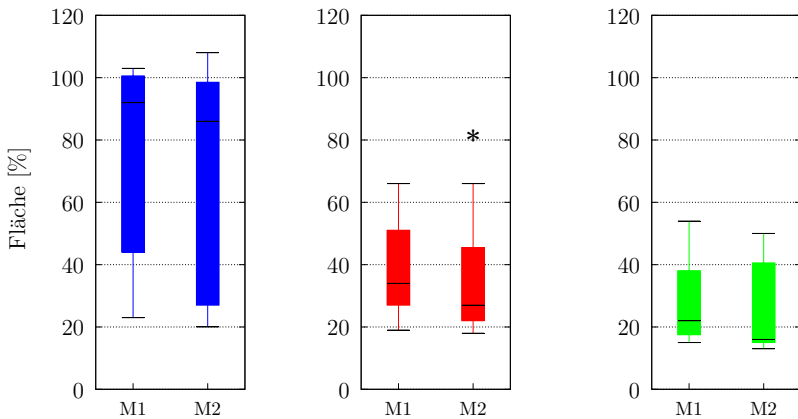


Abbildung 4.2: Die Grafik zeigt eine Gegenüberstellung des Medians und Quartilen der Bronchusflächen nach der ersten (M1) und zweiten Muskarinapplikation (M2). Dargestellt sind die Zeitpunkte 1 min (blau) und 5 min (rot) nach Muskarinapplikation, sowie die maximalen Kontraktion (grün) nach Muskarinapplikation. Signifikante Unterschiede gegenüber M1 sind mit * gekennzeichnet ($* \hat{=} p \leq 0,05$).

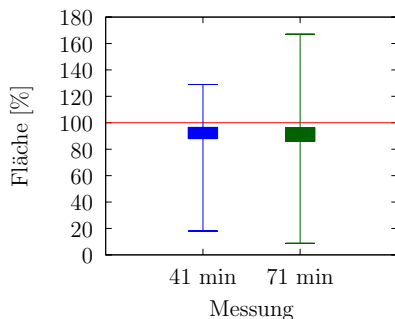


Abbildung 4.3: Dargestellt sind der als 100 %-Fläche gesetzte Normwert am Ende der vorbereitenden Adaptationsphase (rote Linie) und die Bronchusflächen der 1.(blau) und 2.(grün) Spülphase in der jeweils letzten Minute als Median und Quartile ($n = 77/43$; entspricht der Anzahl der Bronchi/Anzahl der Lungen). Es besteht kein signifikanter Unterschied.

Im Rahmen der Validierung der Methode wurde zusätzlich für alle Versuchsreihen überprüft, ob die Bronchi in den Erholungsphasen wieder relaxieren, also ob die Reaktion auf das Muskarin reversibel ist. In dieser Untersuchung wurden 77 Schnitte von 43 Mäusen ausgewertet. Im Durchschnitt dilatierten die Bronchi in der Waschphase nach dem 1. Muskarinstimulus auf 94 % ihrer Ausgangsfläche. In der Waschphase nach dem 2. Stimulus dilatierten die Bronchi auf 92 % der Ausgangsfläche. Diese Abweichung wurde als vertretbar eingestuft und der Vorgang somit als reversibel bezeichnet (Abb. 4.3).

4.1.2 Muskarin 10^{-6} M und Corticosteron 10^{-6} M

Um die Frage zu klären, ob Corticosteron Einfluss auf die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion nimmt, wurden in dieser Versuchsreihe die PCLS nach der 1. Kontraktionsphase und der sich daran anschließenden Spülphase mit Corticosteron in einer Konzentration von 10^{-6} M für 5 min vorinkubiert und anschließend Muskarin und nochmals Corticosteron in die Inkubationskammer pipettiert.

In die Auswertung dieser Versuchsreihe gingen 16 Schnitte von acht Mäusen ein (Abb. 4.4).

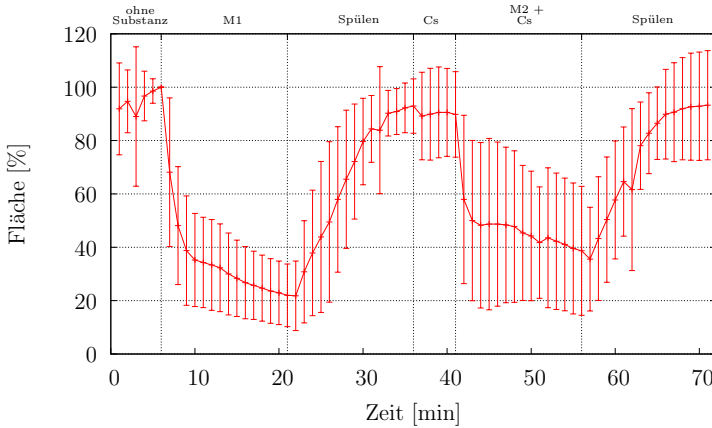


Abbildung 4.4: Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der Bronchusflächen für die Versuchsreihe mit Muskarin (M) und Corticosteron (Cs) 10^{-6} M im zeitlichen Verlauf ($n = 16/8$; entspricht der Anzahl der Bronchi/Anzahl der Lungen).

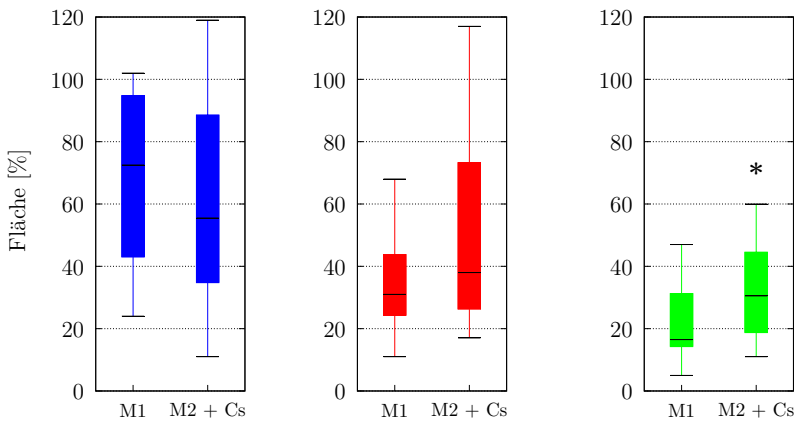


Abbildung 4.5: Die Grafik zeigt eine Gegenüberstellung des Medians und Quartilen der Bronchusflächen nach der Muskarinapplikation (M1) und der Applikation von Muskarin und Corticosteron (M2 + Cs). Dargestellt sind die Zeitpunkte 1 min (blau) und 5 min (rot) nach Applikation, sowie die maximalen Kontraktion (grün) nach Applikation. Signifikante Unterschiede gegenüber M1 sind mit * gekennzeichnet (* $\hat{=}$ $p \leq 0,05$).

Der erste Muskarinstimulus führte zu einer durchschnittlichen maximalen Verminderung auf $22\% \pm 12\%$ der Ausgangsfläche. Im anschließenden Spülvorgang erreichen die Bronchi im Mittel wieder $93\% \pm 10\%$ ihrer Ausgangsfläche.

Nach der Zugabe von Corticosteron (10^{-6} M) und Muskarin (10^{-6} M) ließ sich eine durchschnittliche maximale Verringerung auf $32\% \pm 16\%$ der luminalen Fläche beobachten. Demnach fällt die zweite Kontraktion signifikant ($p = 0,008$) um 10% geringer aus (Abb. 4.5). In der zweiten Spülphase erholen sich die Bronchi auf $94\% \pm 21\%$ ihrer initialen Fläche.

Für die beiden anderen Zeitpunkte ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Der p-Werte für den Vergleich der 1-Minuten-Zeitpunkte lag bei $p = 0,11$ und für die 5-Minuten-Zeitpunkte bei $p = 0,075$.

4.1.3 Muskarin 10^{-6} M und Ethanol 0,01 %

Diese Versuchsreihe diente der Überprüfung, ob das Lösungsmittel Ethanol Einfluss auf die Reaktion nimmt. Der Versuchsablauf entspricht dem bisherigen Vorgehen (Tab. 3.4 Versuchsnr. 03). In dieser Versuchsreihe wurden 9 PCLS von 9 verschiedenen Mäusen ausgewertet (Abb. 4.6).

Die alleinige Muskarinapplikation bewirkte im Mittel eine maximale Verringerung der Fläche auf $27\% \pm 17\%$. Bei der zweiten Kontraktionsphase wurde durch die Muskarinzugabe in Kombination mit Ethanol im Mittel eine maximale Verringerung auf $30\% \pm 25\%$ der Ausgangsfläche erreicht. Es war kein signifikanter Unterschied messbar ($p = 0,124$).

Die Bronchusflächen zeigten zum Zeitpunkt „5-Minuten nach Wirkstoffapplikation“ jedoch bei der zweiten Kontraktion ($52\% \pm 24\%$) eine um 9% signifikant schwächere Reaktion ($p = 0,012$) gegenüber der ersten Kontraktion ($43\% \pm 19\%$) (Abb. 4.7).

Das Auftreten einer Signifikanz legte die Vermutung nahe, dass Ethanol die Bronchokonstriktion ebenfalls beeinflussen könnte.

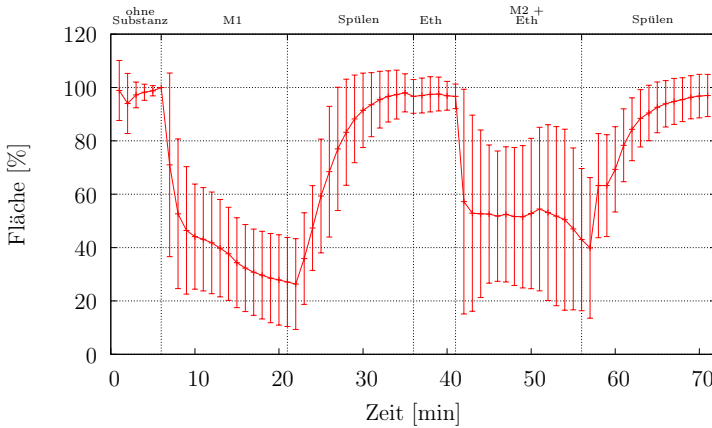


Abbildung 4.6: Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der Bronchusflächen für die Versuchsreihe mit Muskarin (M) und Ethanol (Eth) 0,01 % im zeitlichen Verlauf ($n = 9/9$; entspricht der Anzahl der Bronchi/Anzahl der Lungen).

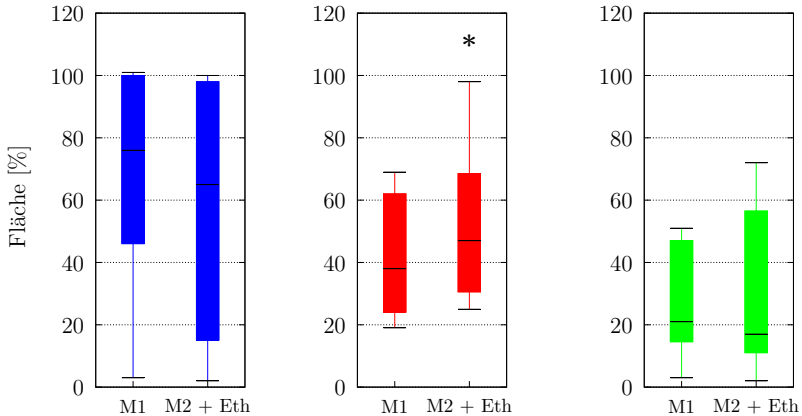


Abbildung 4.7: Die Grafik zeigt eine Gegenüberstellung des Medians und Quartilen der Bronchusflächen nach der Muskarinapplikation (M1) und der Applikation von Muskarin und Ethanol (M2 + Eth). Dargestellt sind die Zeitpunkte 1 min (blau) und 5 min (rot) nach Applikation, sowie die maximalen Kontraktion (grün) nach Applikation. Signifikante Unterschiede gegenüber M1 sind mit * gekennzeichnet (* $\hat{=}$ $p \leq 0,05$).

4.1.4 Muskarin 10^{-6} M und Cyclodextrin 4×10^{-4} M

Da eine Reaktion der Bronchi auf das Ethanol nicht ausgeschlossen werden konnte (Abs. 4.1.3), musste ein alternativer Lösungsvermittler für Corticosteron gefunden werden. Der HBC-Komplex bot durch die Kombination mit Cyclodextrin die Möglichkeit, Corticosteron direkt in Wasser zu lösen. Die Unbedenklichkeitsprüfung des Cyclodextrins wurde in einer Konzentration von 4×10^{-4} M durchgeführt. Dies entspricht der höchsten Konzentration, die bei weiteren Versuchen eingesetzt wurde.

Den Ergebnissen liegen 13 PCLS von 6 Mäusen zugrunde (Abb. 4.8). Die durchschnittliche maximale Verminderung der Ausgangsfläche lag nach der ersten Muskarinzugabe bei $14 \% \pm 8 \%$ und nach der Zugabe von Muskarin und Cyclodextrin bei $15 \% \pm 6 \%$. In der statistischen Auswertung war zu keinem der drei untersuchten Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied messbar (maximale Kontraktion $p = 0,70$) (Abb. 4.9).

Cyclodextrin schien demzufolge keinen Einfluss auf die Reaktion zu nehmen. Der HBC-Komplex konnte folglich als Ersatz für das zuvor verwendete in Ethanol gelöste Corticosteron genutzt werden.

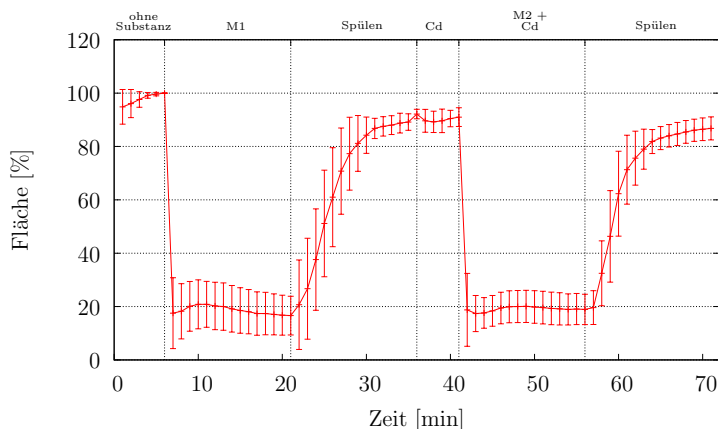


Abbildung 4.8: Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der Bronchusflächen für die Versuchsreihe mit Muskarin (M) und Cyclodextrin (Cd) 4×10^{-4} M im zeitlichen Verlauf ($n = 13/6$; entspricht der Anzahl der Bronchi/Anzahl der Lungen).

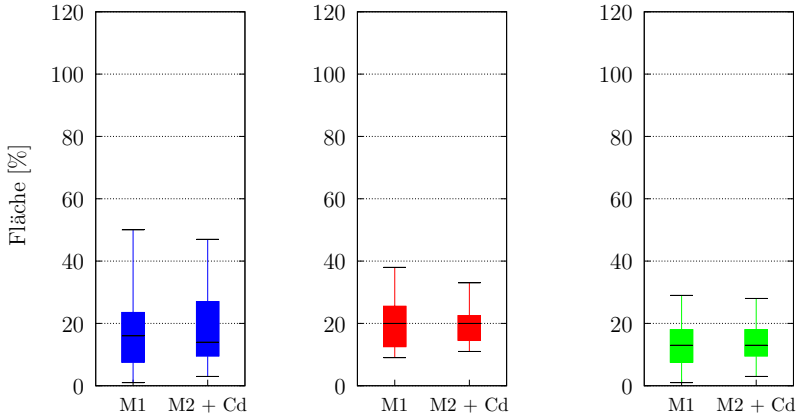


Abbildung 4.9: Die Grafik zeigt eine Gegenüberstellung des Medians und Quartilen der Bronchusflächen nach der Muskarinapplikation (M1) und der Applikation von Muskarin und Cyclodextrin (M2 + Cd). Dargestellt sind die Zeitpunkte 1 min (blau) und 5 min (rot) nach Applikation, sowie die maximalen Kontraktion (grün) nach Applikation. Signifikante Unterschiede gegenüber M1 sind mit * gekennzeichnet (* $\hat{=}$ $p \leq 0,05$).

4.2 Untersuchung zur Konzentrationsabhängigkeit

Um die Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Reaktion (Abs. 4.1.2) zu untersuchen, wurden in den folgenden Abschnitten verschiedene HBC-Komplexkonzentrationen von 10^{-7} M bis 10^{-4} M eingesetzt.

4.2.1 Muskarin 10^{-6} M und HBC-Komplex 10^{-7} M

Ausgewertet wurden 5 PCLS von 5 Mäusen (Abb. 4.10). Nach der ersten Muskarinapplikation wurde eine maximale Verminderung der Fläche auf $32 \% \pm 19 \%$ ihrer Ausgangsmaße gemessen, nach der Applikation von Muskarin und HBC-Komplex ein Wert von $36 \% \pm 22 \%$ der Ausgangsfläche. Der Wilcoxon-Test wies zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kontraktionsphasen nach (max. Kontraktion: $p = 0,063$) (Abb. 4.11).

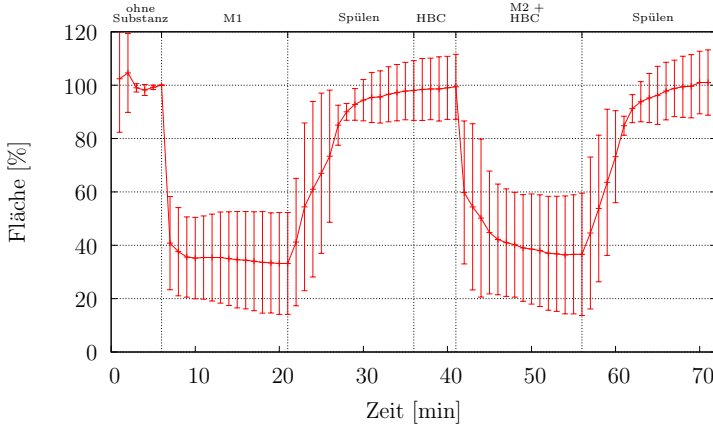


Abbildung 4.10: Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der Bronchusflächen für die Versuchsreihe mit Muskarin (M) und HBC-Komplex (HBC) 10^{-7} M im zeitlichen Verlauf ($n = 5/5$; entspricht der Anzahl der Bronchi/Anzahl der Lungen).

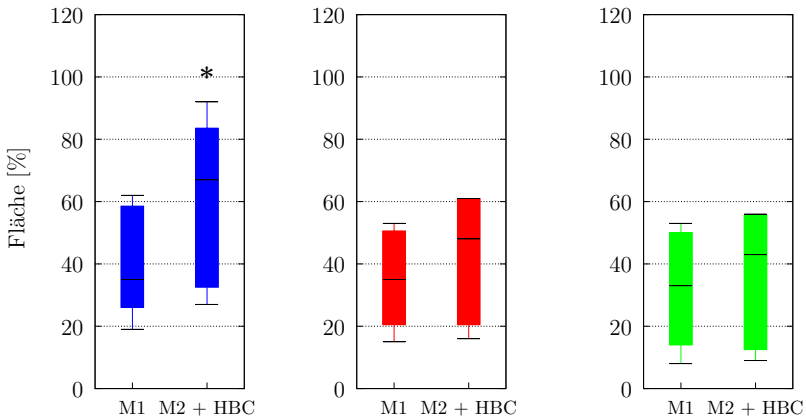


Abbildung 4.11: Die Grafik zeigt eine Gegenüberstellung des Medians und Quartilen der Bronchusflächen nach der Muskarinapplikation (M1) und der Applikation von Muskarin und HBC 10^{-7} M (M2 + HBC). Dargestellt sind die Zeitpunkte 1 min (blau) und 5 min (rot) nach Applikation, sowie die maximalen Kontraktion (grün) nach Applikation. Signifikante Unterschiede gegenüber M1 sind mit * gekennzeichnet ($* \hat{=} p \leq 0,05$).

4.2.2 Muskarin 10^{-6} M und HBC-Komplex 10^{-6} M

Ausgewertet wurden 5 PCLS von 5 Mäusen (Abb. 4.12). Nach der ersten Muskariapplikation wurde im Durchschnitt eine maximale Kontraktion auf $14\% \pm 12\%$ der Ausgangsfläche gemessen, nach der Zugabe von Muskarin zusammen mit dem HBC-Komplex ein maximaler Wert von $16\% \pm 11\%$. Der Wilcoxon-Test zeigte bei keinem der drei Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied (max. Kontraktion: $p = 0,188$) (Abb. 4.13).

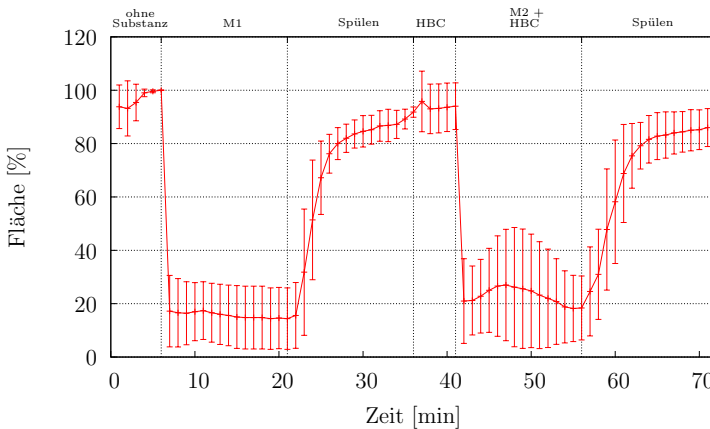


Abbildung 4.12: Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der Bronchusflächen für die Versuchsreihe mit Muskarin (M) und HBC-Komplex (HBC) 10^{-6} M im zeitlichen Verlauf ($n = 5/5$; entspricht der Anzahl der Bronchi/Anzahl der Lungen).

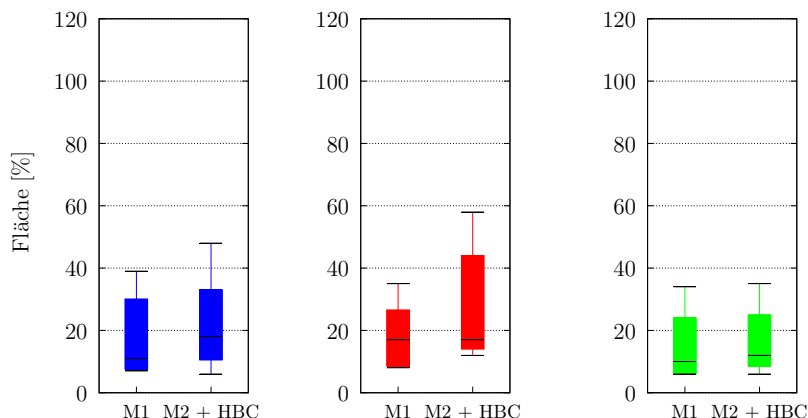


Abbildung 4.13: Die Grafik zeigt eine Gegenüberstellung des Medians und Quartilen der Bronchusflächen nach der Muskarinapplikation (M1) und der Applikation von Muskarin und HBC 10^{-6} M (M2 + HBC). Dargestellt sind die Zeitpunkte 1 min (blau) und 5 min (rot) nach Applikation, sowie die maximalen Kontraktion (grün) nach Applikation. Signifikante Unterschiede gegenüber M1 sind mit * gekennzeichnet ($* \hat{=} p \leq 0,05$).

4.2.3 Muskarin 10^{-6} M und HBC-Komplex 10^{-5} M

Bei dieser Versuchsreihe wurden 6 PCLS von 6 Mäusen ausgewertet (Abb. 4.14). Die mittlere maximale Kontraktion der Bronchi betrug in der ersten Kontraktionsphase $24\% \pm 14\%$ der Ausgangsfläche und in der zweiten Kontraktionsphase in Verbindung mit HBC-Komplex $26\% \pm 14\%$. Bei keinem der drei untersuchten Zeitpunkte zeigte sich eine Signifikanz (max. Kontraktion: $p = 0,341$) (Abb. 4.15).

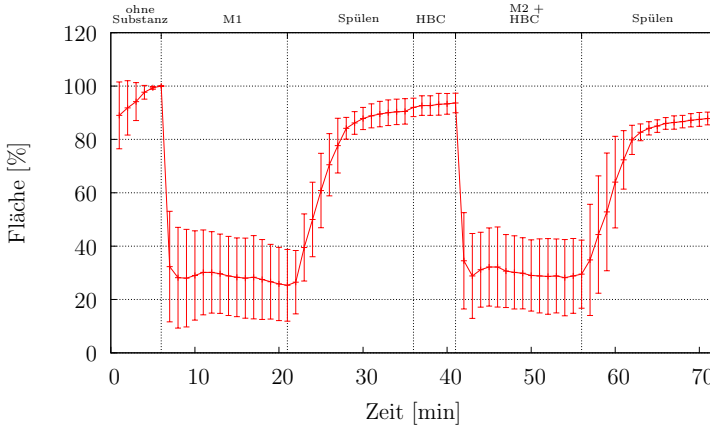


Abbildung 4.14: Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der Bronchusflächen für die Versuchsreihe mit Muskarin (M) und HBC-Komplex (HBC) 10^{-5} M im zeitlichen Verlauf ($n = 6/6$; entspricht der Anzahl der Bronchi/Anzahl der Lungen).

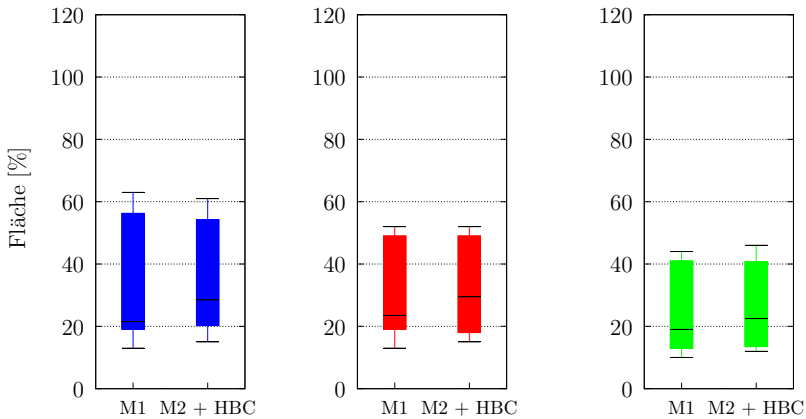


Abbildung 4.15: Die Grafik zeigt eine Gegenüberstellung des Medians und Quartilen der Bronchusflächen nach der Muskarinapplikation (M1) und der Applikation von Muskarin und HBC 10^{-5} M (M2 + HBC). Dargestellt sind die Zeitpunkte 1 min (blau) und 5 min (rot) nach Applikation, sowie die maximalen Kontraktion (grün) nach Applikation. Signifikante Unterschiede gegenüber M1 sind mit * gekennzeichnet (* $\hat{=}$ $p \leq 0,05$).

4.2.4 Muskarin 10^{-6} M und HBC-Komplex 10^{-4} M

Es wurden 6 PCLS von insgesamt 6 Mäusen ausgewertet (Abb. 4.16). Die mittlere maximale Kontraktion der Bronchi betrug in der 1. Kontraktionsphase $20\% \pm 14\%$ der Ausgangsfläche und in der 2. Kontraktionsphase mit HBC-Komplex $40\% \pm 8\%$. Die maximale Bronchokonstriktion wird demnach durch HBC-Komplex im Durchschnitt signifikant um 20% reduziert ($p = 0,046$). Auch zu den beiden anderen Zeitpunkte wiesen die Differenzen Signifikanz auf. Der p-Wert lag beim 1-Minutenwert bei $p = 0,028$ und beim 5-Minutenwert bei $p = 0,043$. Die Bronchusflächen zeigten beim 1-Minutenwert eine um 25% schwächere Kontraktion (1. Kontraktionsphase $28\% \pm 22\%$; 2. Kontraktionsphase $53\% \pm 16\%$) und beim 5-Minutenwert eine um 17% schwächere Reaktion (1. Kontraktion $27\% \pm 15\%$; 2. Kontraktion $44\% \pm 8\%$) (Abb. 4.17).

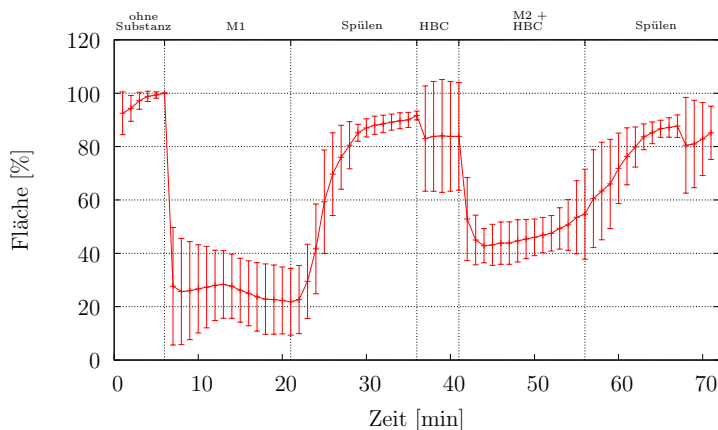


Abbildung 4.16: Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der Bronchusflächen für die Versuchsreihe mit Muskarin (M) und HBC-Komplex (HBC) 10^{-4} M im zeitlichen Verlauf ($n = 6/6$; entspricht der Anzahl der Bronchi/Anzahl der Lungen).

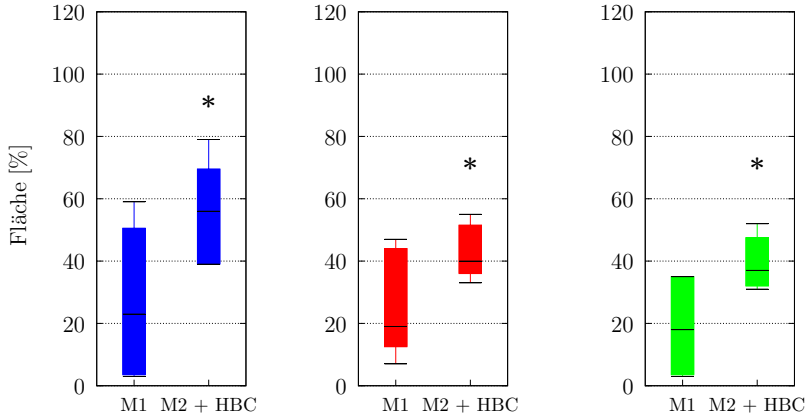


Abbildung 4.17: Die Grafik zeigt eine Gegenüberstellung des Medians und Quartilen der Bronchusflächen nach der Muskarinapplikation (M1) und der Applikation von Muskarin und HBC 10^{-4} M (M2 + HBC). Dargestellt sind die Zeitpunkte 1 min (blau) und 5 min (rot) nach Applikation, sowie die maximalen Kontraktion (grün) nach Applikation. Signifikante Unterschiede gegenüber M1 sind mit * gekennzeichnet ($* \hat{=} p \leq 0,05$).

4.2.5 Analyse der Konzentrationsabhängigkeit

Verglich man die vier Versuchsreihen der HBC-Konzentrationsreihe mit der wiederholten Bronchokonstriktion mittels Muskarin (Abb. 4.18,) ergaben sich im Kruskal-Wallis-Test für alle drei Zeitpunkte Signifikanzen (max. Kontraktion: $p = 0,0011$). Der Mann-Whitney-U-Test zeigte, dass sich nur HBC 10^{-4} M zu allen Zeitpunkten von der wiederholten Bronchokonstriktion und den anderen HBC-Komplex-Konzentrationen unterschied (Tab 4.1). Auffällig ist zudem, dass sich alle HBC-Konzentrationen im 5-Minutenwert von der wiederholten Muskarinapplikation unterschieden.

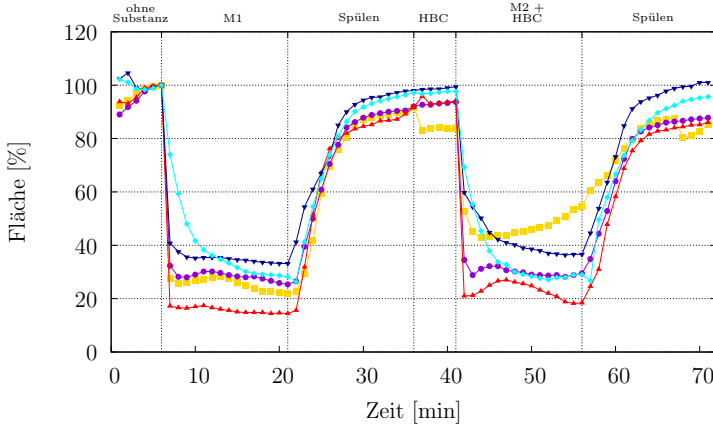


Abbildung 4.18: Dargestellt sind die Mittelwerte der Bronchusflächen der folgenden Versuchsreihen über den gesamten Beobachtungszeitraum: \blacklozenge Wiederholte Bronchokonstriktion mittels Muskarin 10^{-6} M; \blacktriangledown Muskarin + HBC 10^{-7} M; \blacktriangle Muskarin + HBC 10^{-6} M; \bullet Muskarin + HBC 10^{-5} M; \blacksquare Muskarin + HBC 10^{-4} M.

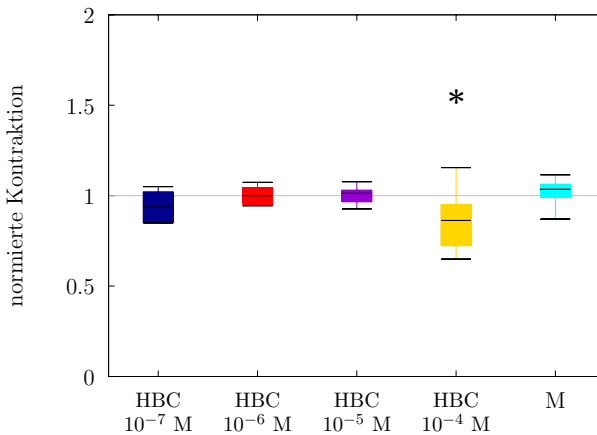


Abbildung 4.19: Die Boxplots illustrieren die normierten maximalen Kontraktionen für die Versuchsreihen HBC 10^{-7} M bis 10^{-4} M und der wiederholten Bronchokonstriktion mittels Muskarin (M). Für die Normierung wurde der Quotient aus der 2. zur 1. Kontraktion gebildet (Abschn. 3.2.4). Signifikante Unterschiede gegenüber Muskarin sind mit * gekennzeichnet (* $\hat{=}$ $p \leq 0,05$).

Muskarin	1-Minutenwert	5-Minutenwert	max. Kontraktion
HBC 10^{-4} M	0,023	0,002	≈ 0
HBC 10^{-5} M	0,174	0,028	0,067
HBC 10^{-6} M	0,082	0,009	0,053
HBC 10^{-7} M	0,062	0,016	0,463

Tabelle 4.1: Dargestellt sind die mittels Mann-Whitney-U-Tests erzielten p-Werte für die HBC-Konzentrationsreihe. Es wurde jeweils die Versuchsreihe mit der wiederholten Bronchokonstriktion mittels Muskarin mit einer Versuchsreihe aus der Konzentrationsreihe verglichen.

4.3 Antagonisierung der Corticosteronwirkung

Durch die Zugabe eines β -2-Adrenozeptor-Antagonisten wurde in dieser Versuchsreihe untersucht, ob der beobachtete dilatative Effekt des Corticosterons auf eine Katecholaminwirkung, beispielsweise durch eine Erhöhung des extrazellulären Katecholaminspiegels, zurückzuführen sein könnte.

4.3.1 Muskarin 10^{-6} M, HBC-Komplex 10^{-4} M und Propranolol 10^{-6} M

In dieser Versuchsreihe wurden 8 PCLS von 5 Mäusen ausgewertet (Abb. 4.20). Nach dem ersten Muskarinstimulus lag die minimale Restfläche bei $32\% \pm 12\%$. Zusammen mit dem HBC-Komplex und Propranolol verringerte sie sich im Durchschnitt auf $47\% \pm 13\%$ der Ausgangsfläche. In der zweiten Kontraktionsphase wurde trotz der Anwesenheit des Propranolols die maximale Kontraktion immer noch signifikant um 15% reduziert ($p = 0,0078$).

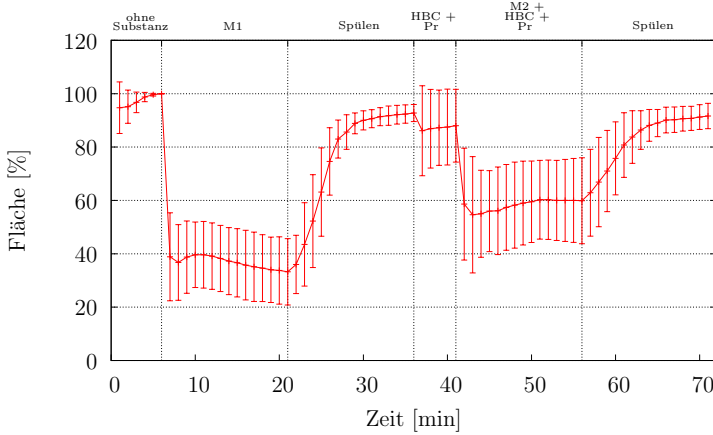


Abbildung 4.20: Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der Bronchusflächen für die Versuchsreihe mit Muskarin (M), HBC-Komplex (HBC) 10^{-4} M und Propranolol (Pr) im zeitlichen Verlauf ($n = 8/5$; entspricht der Anzahl der Bronchi/Anzahl der Lungen).

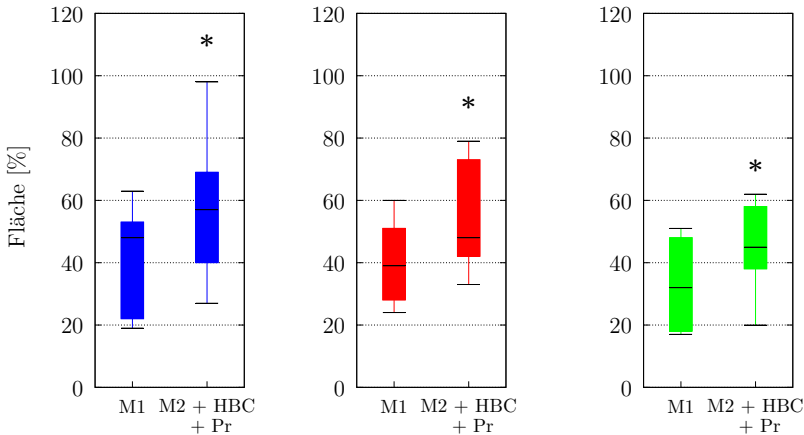


Abbildung 4.21: Die Grafik zeigt eine Gegenüberstellung des Medians und Quartilen der Bronchusflächen nach der Muskarinapplikation (M1) und der Applikation von Muskarin, HBC 10^{-4} M und Propranolol (M2 + HBC + Pr). Dargestellt sind die Zeitpunkte 1 min (blau) und 5 min (rot) nach Applikation, sowie die maximale Kontraktion (grün) nach Applikation. Signifikante Unterschiede gegenüber M1 sind mit * gekennzeichnet (* $\hat{=} p \leq 0,05$).

Die Bronchusflächen zeigten beim 1-Minutenwert eine um 20 % signifikant ($p = 0,023$) schwächere Reaktion (1. Kontraktion $39 \% \pm 15 \%$; 2. Kontraktion $59 \% \pm 20 \%$) und beim 5-Minutenwert eine um 16 % signifikant ($p = 0,0078$) reduzierte Kontraktion (1. Kontraktion $40 \% \pm 12 \%$; 2. Kontraktion $56 \% \pm 15 \%$) (Abb. 4.21).

4.3.2 Analyse des Propranololeffekts

Der Kruskal-Wallis-Test ergibt für den Vergleich der drei Versuchsreihen Wiederholte Bronchokonstriktion mittels Muskarin, Muskarin und HBC 10^{-4} M sowie Muskarin mit HBC 10^{-4} M und Propranolol (Abb. 4.22) zu allen drei Zeitpunkten Signifikanzen (maximale Kontraktion: $p = 0,0008$).

Betrachtet man die Ergebnisse des sich anschließenden Mann-Whitney-U-Tests, ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Versuchsreihe Muskarin mit HBC 10^{-4} M und Propranolol gegenüber der alleinigen HBC-Wirkung ($p \approx 1$ für den Zeitpunkt der maximalen Kontraktion) (Tab. 4.2). Beide Versuchsreihen unterschieden sich aber zu allen drei Zeitpunkten signifikant von der wiederholten Bronchokonstriktion (maximale Kontraktion: $p = 0,0003$ für HBC 10^{-4} M und Propranolol; $p = 0,0008$ für HBC 10^{-4} M (Tab. 4.2)). Das Propranolol scheint somit keinen Einfluss auf die Wirkung des Corticosterons zu haben (Abb. 4.23).

	+			+			+	
	HBC	Pr	HBC	HBC	Pr	HBC	HBC	Pr
Ms	0,014	0,034	Ms	0,001	0,003	Ms	≈ 0	0,001
HBC	0,950		HBC	0,332		HBC	≈ 1	
	1-Minutenwert			5-Minutenwert			maximale Kontraktion	

Tabelle 4.2: Übersicht der mittels Mann-Whitney-U-Tests erzielten p-Werte zur Überprüfung der Auswirkungen des Propranolols mit HBC-Komplex 10^{-4} M auf die Bronchokonstriktion in Verbindung mit den Versuchsreihen der wiederholten alleinigen Muskarinapplikation und HBC-Komplex 10^{-4} M. Signifikante Werte sind grün unterlegt.

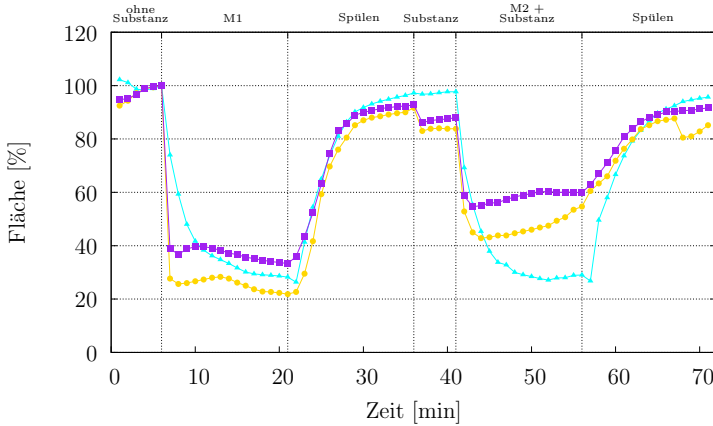


Abbildung 4.22: Dargestellt sind die Mittelwerte der Bronchusflächen der folgenden Versuchsreihen: \blacklozenge Wiederholte Bronchokonstriktion mittels Muskarin 10^{-6} M; \blacksquare Muskarin + HBC 10^{-4} M; \blacktriangle Muskarin + HBC 10^{-4} M + Propranolol 10^{-6} M.

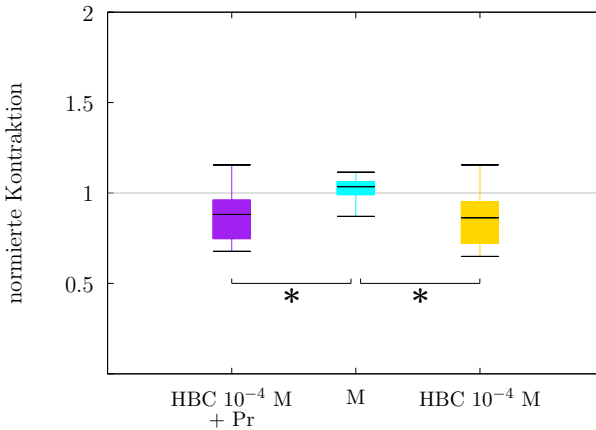


Abbildung 4.23: Die Boxplots illustrieren die normierten maximalen Kontraktionen für die drei Versuchsreihen HBC + Propranolol 10^{-6} M, wiederholte Bronchokonstriktion mittels Muskarin 10^{-6} M und HBC 10^{-4} M. Für die Normierung wurde der Quotient aus der 2. zur 1. Kontraktion gebildet (Abschn. 3.2.4). Signifikante Unterschiede gegenüber Muskarin sind mit * gekennzeichnet (* $\hat{=}$ $p \leq 0,05$).

5 Diskussion

5.1 Validierung der Methode

Bei der Videomorphometrie handelt es sich um eine ex-vivo-Technik, die es ermöglicht, über einen längeren Zeitraum Untersuchungen in einem organnahen Modell durchzuführen. Erstmals wurde die Technik von Krumdiek und Ho beschrieben [36]. Diese Methode hat den Vorteil, dass an homogenen Schnittpräparaten der Lunge morphometrische Studien vom Gefäß- und Atemwegssystem durchgeführt werden können. Dies geschieht im intakten Gewebeverband, so dass Wechselwirkungen zwischen den einzelnen zellulären Bestandteilen möglich sind. Held et al. [23] bestätigte durch vergleichende Untersuchungen von isoliert perfundierten und ventilierten Mäuselungen und Schnittpräparaten der Lunge die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Schnittpräparat auf das vitale Organ. Mit dieser Methode können demnach unter weitgehend standardisierten Bedingungen gut vergleichbare Messungen durchgeführt werden.

Die Verwendung eines dynamischen Systems mit Begasung der Lungenschnitte mit Normoxie in einem Inkubationsschrank bei 37 °C stellt eine erhebliche Verbesserung der ursprünglichen Methode dar [42]. Die Begasung ermöglicht es, dass die Lungenschnitte über einen längeren Zeitraum (ca. 3 Tage) vital bleiben, die Agarose schneller ausgewaschen wird und somit die Schnitte schneller (nach ca. 2 h) genutzt werden können. Die in dieser Arbeit verwendeten Schnitte waren maximal 12 h alt.

Betrachtet man die Vergleichbarkeit der anatomischen Strukturen in der Mäuselunge mit denen des Menschen, so sind definitionsgemäß die Bronchioli des Menschen die knorpelfreien Anteile des luftleitenden Systems mit einem Durchmesser von weniger als zwei Millimeter [40]. Bei der Maus sind hingegen alle Abschnitte der intrapulmonalen

luftleitenden Wege knorpelfrei, mit Ausnahme des linken Stammbronchus, der aber nur einen Durchmesser von ca. einem Millimeter aufweist [65]. In der vorliegenden Arbeit wurden zudem nur Anteile der rechten Lungenlappen verwendet. Auch die zelluläre Zusammensetzung der Atemwegswand bei der Maus ist vergleichbar mit den Verhältnissen in den Bronchioli des Menschen [53].

In der vorliegenden Arbeit wurden Lungenschnitte verwendet, die Bronchi mit einem Durchmesser von 150-250 μm und einem intakten Gewebeverband aufwiesen. Das Lumen des betreffenden Bronchus musste zudem frei von Zelldetritus und Agarose sein. Die Vitalität wurde unter dem Mikroskop durch eine deutlich sichtbare Reaktion auf eine direkte Muskarinapplikation überprüft. Die Muskarinzugabe bewirkte eine starke und schnelle Kontraktion des Bronchus und blieb unter Anwesenheit des Agonisten bestehen. Wurde das System gespült, dilatierter Bronchus wieder, bis er zu seiner Ursprungsfläche zurückgekehrt war. Eine Auswertung aller Versuchsreihen zeigte, dass die Bronchi im Verlauf des Beobachtungszeitraumes in ihrer Fähigkeit nachließen, wieder zu ihrer Ursprungsgröße zu dilatieren. Nach jeder Kontraktion war eine leicht verminderte Dilatation zurück zur Ausgangsfläche zu beobachten. Im Vergleich zum Grad der gemessenen Kontraktionen war dieser Effekt jedoch so gering, dass er als nicht weiter relevant eingestuft wurde. Somit waren die Bronchi in der Lage, wiederholt in vergleichbarer Art und Weise auf pharmakologische Reize zu reagieren.

5.2 Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion

Muskarin bewirkt in den luftleitenden Wegen durch die Bindung an muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) eine Bronchokonstriktion. Bei der Maus sind fünf Subtypen dieser mACh-Rezeptoren bekannt, und wie Struckmann et al. [61] in ihrer Studie feststellten, sind in den peripheren Atemwegen der Maus die Subtypen mAChR1, mAChR2 und mAChR3 an der Bronchokonstriktion beteiligt, maßgeblich für eine Kontraktion sind die Subtypen 2 und 3. Diese finden sich aber nicht nur in den luftleitenden Wegen von Mäusen, sondern auch in denen von Schweinen und Menschen [14, 15, 24, 41]. Das Muskarin bindet an die selben Rezeptoren wie Acetylcholin. Dieses ACh kann in der Lunge entweder neuronalen oder nicht-neuronalen Ursprungs sein und ist der wich-

tigste Bronchokonstriktor. Neuronales ACh wird durch Exozytose aus Speichervesikeln freigesetzt, nachdem ein Aktionspotential seinen Schwellenwert erreicht hat. Für nicht-neuronales ACh wurde von Lips et al. [39] nachgewiesen, dass dieses im respiratorischen Epithel nicht in Vesikeln gespeichert vorliegt. Die Prozesse, die hierbei zur Freisetzung führen, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Wie Lips et al. zeigen konnten, spielen hierbei die OCT1 und OCT2 eine wesentliche Rolle. Sie konnten anhand von in *Xenopus laevis* Oocyten exprimierten OCTs von Ratten und Menschen nachweisen, dass sowohl OCT1 als auch OCT2 in der Lage sind, intra- und extrazelluläres ACh zu transportieren. Im Gegensatz zur Arbeitsgruppe um Wessler [66], die nachwies, dass in humanen Plazentazotten maßgeblich OCT1 und OCT3 für den Acetylcholintransport verantwortlich sind, transportiert OCT3 nach den Erkenntnissen von Lips et al. [39] kein ACh. Lips et al. zeigten weiterhin, dass Corticosteron und Glucocorticoide, die als Inhalate bei Asthmapatienten eingesetzt werden (Budesonide, Fluticasone), in der Lage sind, die Aufnahme von TEA (Tetraethylammonium) durch hOCT1 und hOCT2 zu inhibieren („cis-Inhibition“), und für den hOCT2 konnte ebenfalls belegt werden, dass der durch ihn vermittelte Ausstrom von ACh durch die eben genannten Substanzen gehemmt wird („trans-Inhibition“) [39].

Muskarin wurde in dieser Arbeit anstatt Acetylcholin gewählt, da dieses durch die Acetylcholin-Esterase (AChE) zu schnell abgebaut werden würde und somit für Studien der vorliegenden Art untauglich ist. Acetylcholin besitzt zudem die Fähigkeit, sowohl an muskarinischen (mAChR) als auch an nikotinischen (nAChR) Acetylcholinrezeptoren zu binden. In der vorliegenden Arbeit lag das Augenmerk auf der selektiven Stimulation der mAChR, weshalb es vorteilhaft war, eine zusätzliche Aktivierung der nAChR zu vermeiden.

Es wurde beobachtet, dass das Muskarin (10^{-6} M) zu einer Bronchokonstriktion mit einer Reduzierung der Ausgangsfläche um durchschnittlich 70 % führte. Dies stimmt mit den Erfahrungen der Arbeitsgruppen von Kummer und Struckmann überein, die bei der gleichen Muskarinkonzentration eine Verringerung der Bronchusflächen um ca. 61 % [38] bzw. um ca. 60 % [61] gemessen haben. Die Muskarinzugabe führte zu einer starken und schnellen Kontraktion, die sich in drei Phasen gliederte. Zuerst erfolgte eine

initiale starke Kontraktion, gefolgt von einer kurzen Relaxationsphase, die wiederum in eine anhaltende Bronchokonstriktion überging. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Struckmann [61] überein.

5.3 Der Einfluss von Corticosteron auf die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion

Dieser Arbeit lag die Frage zugrunde, ob und auf welche Art und Weise sich Corticosteron auf die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion auswirkt. In der vorangegangenen Studie [38] war festgestellt worden, dass Corticosteron die Serotonin-induzierte Bronchokonstriktion signifikant reduziert. Durch Untersuchungen an Knockout-Mäusen wurde in der Arbeitsgruppe um Kummer [38] gezeigt, dass der Subtyp OCT3 essenziell für die Wirksamkeit von Corticosteron in Bezug auf die Serotonin-induzierte Bronchokonstriktion ist, da bei fehlendem OCT3 keine Wirkung festzustellen war.

In anderen Studien [33] wurde belegt, dass der OCT3 die größte Affinität für Corticosteron aufweist und dass Corticosteron die Aktivität der OCT inhibiert, ohne selbst transportiert zu werden [33, 35]. Corticosteron kann sowohl von der intra- als auch von der extrazellulären Seite den OCT-vermittelten Transport anderer Substrate blockieren. Durch Studien mit Oocyten von *Xenopus laevis*, die alle drei OCTs von Ratten und humanen OCT2 exprimierten, konnte Koepsell [33] nachweisen, dass die Affinität der OCTs für Corticosteron im Zellinneren höher ist als außen. Für den Inhibitor Tetraethylammonium (TEA), der ebenfalls nicht transportiert wird, konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass hier die Affinität extrazellulär stärker ausgeprägt war als intrazellulär. Auf der Grundlage mehrerer Studien [22, 33, 71] wurde der OCT3 mit dem extraneuronalen Monoamintransporter (EMT) gleichgesetzt, da der OCT3 eine gleiche Sensitivität gegenüber einigen Inhibitoren des EMT zeigte. Dieses auch als Uptake-2 bezeichnete System dient dazu, im peripheren nicht-neuronalen Gewebe Katecholamine aus dem Extrazellularraum in die Zelle zu transportieren [57, 73]. Identifiziert wurde der EMT durch Iversen [26] am isolierten Rattenherz. Eine Blockade des OCT3 durch Corticoste-

ron würde demzufolge bedeuten, dass Katecholamine, insbesondere Noradrenalin, nicht mehr in die Zelle transportiert werden und somit länger an den entsprechenden Rezeptoren wirken können. Horvath et al. bestätigten diesen Mechanismus für die Blutgefäße in der Bronchialwand [25]. Hier bewirkte Noradrenalin über α 1-Adrenozeptoren eine verstärkte Vasokonstriktion in Anwesenheit von Corticosteron.

Aus diesen Erkenntnissen wurde die Frage abgeleitet, ob Corticosteron in den luftleitenden Wegen ebenfalls eine Erhöhung des extrazellulären Katecholaminspiegels und somit eine verlängerte Aktivierung der β -2-Adrenozeptoren bewirkt und dadurch ein bronchodilatativer Effekt zu beobachten sei.

Zur Klärung der Frage wurden PCLS von FVB-Mäusen zweimal einem Muskarinstimulus ausgesetzt, einmal in Abwesenheit und einmal in Anwesenheit von Corticosteron, getrennt durch eine Spülphase. Ohne Corticosteron reagierten die Bronchi mit einer starken Bronchokonstriktion, die bei der Wiederholung mit Corticosteron (10^{-4} M) um 20 % verringert wurde. Die Reaktion auf das Corticosteron war dosisabhängig, da nur die untersuchte Corticosteronkonzentration von 10^{-4} M einen deutlichen Effekt bewirkte. Die Arbeitsgruppe um Koepsell gibt die notwendige Corticosteronkonzentrationen für die halb-maximale Hemmung des humanen OCT1, OCT2 und OCT3 mit ca. 10 μ M, 30 μ M und 0,1 μ M an. Bei Ratten wird für die halb-maximale Hemmung des OCT3 hingegen eine Corticosteronkonzentration von ca. 5 μ M benötigt [35]. Die Arbeitsgruppe um Kummer [38] verwendete bei ihren Versuchen mit PCLS von Mäusen eine Konzentration von 1 μ M. Diese Corticosteronkonzentration war ausreichend, um die Serotonin-induzierte Bronchokonstriktion signifikant zu reduzieren. Auffällig ist, dass in der vorliegenden Arbeit eine deutlich höhere Konzentration des Corticosterons erforderlich ist, um einen deutlichen Einfluss auf die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion erkennen zu können. Da wie bereits oben erwähnt, OCT3 die höchste Affinität gegenüber Corticosteron aufweist, könnte die relativ hohe Konzentration ein Hinweis darauf sein, dass entweder OCT1 oder OCT2 eine maßgebliche Rolle bei der Reaktion auf Muskarin spielen. Der relaxierende Einfluss des Corticosterons war bereits initial, direkt nach der Applikation von Muskarin und dem Glucocorticoid zu beobachten. Dies ist, entgegen der bisherigen Auffassung der Wirkungsweise von Glucocorticoiden, ein akuter non-

genomischer Effekt. Der klassische Reaktionsweg von Steroiden, dass diese an eigene Rezeptoren binden, in den Zellkern transportiert werden und dort zu Veränderungen in der Transkription, entweder durch Steigerung oder Reduzierung der Transkriptionsrate, führen [1, 3], ist hingegen ein Vorgang, der über die Dauer von Minuten seine Wirkung entfaltet.

5.4 Inhibitorischer Effekt von Propranolol

Die Arbeitsgruppe um Horvath [25] fand heraus, dass der OCT3 nach einer sympathischen Stimulation der glatten Muskelzellen von menschlichen Bronchialarterien Noradrenalin aus dem Extrazellulärraum abtransportiert. Durch die Zugabe von Corticosteron konnte dieser Transport unterbunden werden. Daraus resultierte eine über α 1-Adrenozeptoren vermittelte Vasokonstriktion aufgrund eines erhöhten extrazellulären Katecholaminspiegels. Den Erkenntnissen von Horvath et al. [25] folgend, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob auch in den kleinen luftleitenden Wegen Corticosteron mittels einer Erhöhung des extrazellulären Katecholaminspiegels zur beobachteten Bronchodilatation führt. Hierzu wurde der β 2-Adrenozeptorantagonist Propranolol dem Versuchsaufbau hinzugefügt.

Propranolol hemmt sowohl β 1 als auch β 2-Adrenozeptoren, ohne diese zu aktivieren. In Anwesenheit von Propranolol würde demnach ein erhöhter extrazellulärer Katecholaminspiegel nicht mehr zu einer vermehrten Stimulation der β 2-Rezeptoren und somit nicht zu einer Bronchodilatation führen, falls der Corticostereoneffekt auf einer Hemmung der Katecholaminaufnahme beruht. Diese Annahme konnte jedoch durch die unternommenen Versuche nicht bestätigt werden. Auch in Anwesenheit von Propranolol war weiterhin ein signifikanter konstriktionshemmender Einfluss des Corticosterons gegenüber der alleinigen Muskarinapplikation erkennbar. Werden nur die Kontraktionen in Anwesenheit von Corticosteron (10^{-4} M) ohne Propranolol und Corticosteron mit Propranolol (10^{-6} M) betrachtet, so war kein signifikanter Unterschied messbar. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich im Falle der kleinen luftleitenden Wege die These,

dass Katecholamine für den beobachteten bronchodilatativen Effekt des Corticosterons verantwortlich sind, nicht bestätigt hat.

Welcher Mechanismus tatsächlich der Wirkung des Corticosterons zugrunde liegt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Völlig ausgeschlossen werden sollte eine Erhöhung des Monoaminspiegels jedoch nicht als Ursache für den Corticosteroneffekt. Neben dem direkten Einfluss der Monoamine als Bronchodilatoren könnte auch eine indirekte Beeinflussung über α -Adrenozeptoren zur Bronchodilatation führen [2]. Dies könnte beispielsweise durch eine Hemmung der ACh-Freisetzung aus cholinergen Nervenendigungen geschehen oder durch die Freisetzung eines relaxierenden Faktors aus dem Epithel [2]. In Erwägung zu ziehen ist aber auch, dass ein anderer OCT durch das Corticosteron gehemmt wird. Nachweislich sind OCT1 und OCT2 in der Lage, ACh zu transportieren und somit zur Freisetzung von nicht-neuronalem ACh beizutragen [39]. Da aber nur OCT1 in den Atemwegen der Maus exprimiert ist [38], wäre es denkbar, dass das Corticosteron den OCT1 inhibiert. Dies würde die relativ hohe Konzentration von 10^{-4} M Corticosteron erklären, die nötig war, um einen durchweg signifikanten Effekt zu erzielen, da OCT1 deutlich unempfindlicher als OCT3 gegenüber Glucocorticoiden reagiert.

5.5 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie ist deutlich ein hemmender Effekt von Corticosteron auf die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion zu erkennen. Die Beobachtung, dass durch die Anwesenheit von Corticosteron 20 % mehr Fläche für den Luftstrom nach der Applikation von Muskarin zur Verfügung stehen, lässt vermuten, dass dieser Umstand auch unter klinischen Bedingungen als positiver Effekt zu beobachten sein sollte. Da sich auf Grund der vorliegenden Ergebnisse die These, dass Corticosteron durch die Blockade des OCT3 zu eine Erhöhung des extrazellulären Katecholaminspiegels und somit zu einer Bronchodilatation führt, nicht bestätigen lässt, bleibt der Mechanismus, wie das Glucocorticoid tatsächlich den beobachteten akuten non-genomischen Effekt auf die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion hervorruft, ungeklärt.

Eine alternative Erklärung zum beobachteten inhibitorischen Effekt von Corticosteron auf die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion könnte demnach entweder eine vermehrte Freisetzung eines epithelialen relaxierenden Faktors durch den erhöhten Katecholaminspiegel oder die Blockade des OCT1 und der daraus resultierenden Inhibition der nicht-neuronalen ACh-Freisetzung sein.

6 Zusammenfassung

Bei der Maus reagieren die kleinen luftleitenden Atemwege auf Muskarin mit einer Kontraktion. Muskarin bindet an muskarinische Acetylcholinrezeptoren, die unter physiologischen Bedingungen auf den Bronchokonstriktor Acetylcholin (ACh) reagieren. Sie finden sich auf glatten Muskelzellen und Epithelzellen.

Ebenfalls auf Epithelzellen und an der glatten Muskulatur lokalisiert sind die Organischen Kationentransporter (OCTs), die nachweislich in der Lage sind Acetylcholin über die Zellmembran zu transportieren. OCTs lassen sich durch Corticosteron hemmen, wobei das Corticosteron an den OCT bindet, aber nicht transportiert wird. Ein besonderes Augenmerk liegt auf dem OCT3, für den gezeigt werden konnte, dass durch die Blockade des OCT3 mittels Corticosteron die Serotonin-induzierte Bronchokonstriktion signifikant reduziert werden konnte. OCT3 wird zudem auch als Extraneuronaler Monoamintransporter (EMT) bezeichnet, da er für die Beseitigung der Katecholamine aus dem Extrazellularraum mit zuständig ist.

Weil der Atemwegswiderstand in den peripheren Atemwegen für die Pathogenese von obstruktiven Lungenerkrankungen von großer Bedeutung ist, wurde in dieser Arbeit näher untersucht, ob, und falls ja, durch welchen Mechanismus, sich die durch Muskarin induzierte Bronchokonstriktion durch Corticosteron beeinflussen lässt.

Die Hypothese, dass der Einfluss des Corticosterons auf die Muskarin-induzierte Bronchokonstriktion auf die Blockade des OCT3 und einer damit verbundenen Erhöhung des Katecholaminspiegels zurückzuführen ist, da Katecholamine am β -2-Adrenozeptoren zu einer Bronchodilatation führen, wurde über die Zugabe des Adrenozeptorantagonisten Propranolol überprüft.

Zur Messung der Bronchokonstriktion kam die Methode der Videomorphometrie am

Modell der vitalen Lungenschnittpräparationen (Precision-Cut Lung Slices, PCLS) zur Anwendung. An FVB-Mäusen wurde untersucht, ob Muskarin zu einer Bronchokonstriktion führt, ob diese Konstriktion durch die Zugabe von Corticosteron reduziert werden kann und ob dieser Effekt durch den β -2-Adrenozeptorantagonisten Propranolol beeinflussbar ist.

Es konnte gezeigt werden, dass Muskarin in einer Konzentration von 10^{-6} M zuverlässig eine schnelle und starke initiale Kontraktion hervorrief, die über die Zeitspanne der Anwesenheit des Agonisten bestehen blieb. Das Auswaschen des Agonisten führte zu einer Dilatation der kontrahierten Bronchien, der Vorgang war demnach reversibel. Anfänglich wurde in den Versuchen ein Corticosteronpräparat verwendet, das in Ethanol gelöst vorlag. Nachdem eine eigenständige Versuchsreihe mit Ethanol einen Einfluss dieses Lösungsmittels auf die Reaktion nicht vollständig ausräumen konnte, wurde als Ersatz HBC-Komplex getestet. Hierbei wird Cyclodextrin als Lösungsvermittler für Corticosteron eingesetzt. Für Cyclodextrin konnte nachgewiesen werden, dass es keinen Einfluss auf die Reaktion nimmt. HBC-Komplex wurde somit für alle weiteren Versuche an Stelle des in Ethanol gelösten Corticosterons verwendet. Die durch Muskarin hervorgerufene Bronchokonstriktion ließ sich durch die Zugabe von Corticosteron im HBC-Komplex in einer Konzentration von 10^{-4} M signifikant um 20 % reduzieren. Die Applikation von Propranolol in einer Konzentration von 10^{-6} M zusätzlich zu Muskarin und Corticosteron (10^{-4} M) führte zu keinem signifikanten Unterschied gegenüber der alleinigen Applikation von Muskarin und Corticosteron (10^{-4} M).

Die Ergebnisse zeigen, dass der akute inhibitorische Effekt von Corticosteron nicht auf die durch Serotonin hervorgerufene Bronchokonstriktion beschränkt ist, sondern sich auch auf die muskarinische Bronchokonstriktion erstreckt.

Die Applikation von Propranolol führte jedoch nicht zu einer signifikanten Reduzierung des Corticostereoneffekts. Eine verlängerte Wirkphase der Katecholamine scheint demnach nicht die Ursache für den inhibitorischen Effekt des Corticosterons zu sein. Es bleibt zu prüfen, ob Corticosteron einen der beiden anderen OCTs (OCT1 und/oder OCT2) blockiert und dort eine Freisetzung von nicht-neuronalem ACh verhindert und sich daraus eine Abschwächung der Kontraktion herleitet.

7 Summary

The peripheral airways of the mouse respond to muscarine with a constriction. Muscarine binds to muscarinic acetylcholine receptors (mAChR), whose physiological ligand is the neuronally and non-neuronally released bronchoconstrictor acetylcholine. The mAChR are localized on smooth muscle cells and epithelial cells.

Organic cation transporters (OCTs) are also localized on smooth muscle cells and epithelial cells. The OCTs transport acetylcholine and they are known to be inhibited by corticosterone. Corticosterone binds to the OCT, but is not transported across the plasma membrane. Special attention is given to the isoform OCT3 since an earlier study demonstrated, that its blockade by corticosterone significantly attenuated serotonin-induced bronchoconstriction. OCT3 is also known as extra-neuronal monoamine transporter (EMT), contributing to the elimination of catecholamines from the extracellular space.

Since the resistance of small peripheral airways is particularly relevant to the pathogenesis of obstructive pulmonary disease, the present study sets out to determine whether muscarinic bronchoconstriction is also influenced by corticosterone, and if so, by which mechanism. The hypothesis that corticosterone exerts its effects via blockade of OCT3 with resulting elevation of extracellular catecholamine levels and subsequent β -2-adrenoceptor mediated bronchodilatation was tested by use of the β -2-adrenoceptor agonist, propranolol.

Bronchoconstriction was measured by videomorphometric analysis of precision cut lung slices (PCLS) from FVB mice. In this model, it was analysed whether muscarine leads to a bronchoconstriction and whether this could be reduced by the application of corticosterone. To clarify if catecholamines are involved in a dilatatory corticosterone effect,

the β -2-adrenoceptor antagonist propranolol was employed. The experiments showed a rapid and strong initial bronchoconstriction in response to muscarine in a concentration of 10^{-6} M, persisting as long as the agonist was present. Washing out the agonist led to a dilatation of the constricted bronchi, indicating the reversibility of the process.

Initially, a corticosterone preparation was used that contained ethanol as solvent. In a control series of experiments, however, an effect of ethanol per se on bronchial diameter could not be excluded. Therefore, HBC-complex was tested as an alternative. This corticosterone preparation uses cyclodextrin as solvent, which did not affect the reaction in a separate series of control experiments and, therefore, was hereupon used for all further experiments.

The muscarine-induced contraction was significantly reduced by 20 % by corticosterone at a concentration of 10^{-4} M.

The application of propranolol in a concentration of 10^{-6} M in addition to muscarine and corticosterone 10^{-4} M, however, had no impact on the responses of muscarine and corticosterone. The data demonstrate that the inhibitory effect of corticosterone is not restricted to serotonin-induced bronchoconstriction but also extends to muscarinic bronchoconstriction. Application of propranolol, however, did not significantly ameliorate the corticosterone effect, clearly indicating that it is not caused by prolonged catecholamine action.

It remains to be elucidated whether corticosterone exerts this effect via interacting with one of the other two OCTs (OCT1 and/or OCT2), thus inhibiting release of non-neuronal acetylcholine with the consequence of a reduction of bronchoconstriction.

Literaturverzeichnis

- [1] ADCOCK, I. M., K. ITO und P. J. BARNES: *Glucocorticoid-Effects on Gene Transcription*. Proc Am Thorac Soc, 1(3):247–254, 2004.
- [2] BARNES, P. J.: *Airway receptors*. Postgraduate Med J, 65:532–542, 1989.
- [3] BARNES, P. J.: *Corticosteroid effects on cell signalling*. Eur Respir J, 27(2):413–426, 2006.
- [4] BARNES, P. J.: *Corticosteroids: The drugs to beat*. Europ J Pharmacol, 533(1-3):2–14, 2006.
- [5] BARNES, P. J., C. B. BASBAUM und J. A. NADEL: *Autoradiographic localization of autonomic receptors in airway smooth muscle. Marked differences between large and small airways*. Am Rev Respir Dis, 127(6):758–762, 1983.
- [6] BIALLAS, S., S. WILKER, K. S. LIPS, W. KUMMER, S. A. GRANDO, W. PADBERG und V. GRAU: *Immunohistochemical detection of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha9 and alpha10 in rat lung isografts and allografts*. Life Sci, 80(24-25):2286–2289, 2007.
- [7] BUTTGEREIT, F., I. BRINK, B. THIELE, G. R. BURMESTER, F. HIEPE und E. D. HALL: *Effects of methylprednisolone and 21-aminosteroids on mitogen-induced interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production in human peripheral blood mononuclear cells*. J Pharmacol Exp Ther, 275(2):850–853, 2005.

- [8] BUTTGEREIT, F., M. WEHLING und G. R. BURMESTER: *A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited*. Arthritis Rheum, 41(5):761–767, 1998.
- [9] CAULFIELD, M. P. und N. J. BIRDSALL: *International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors*. Pharmacol Rev, 50(2):279–290, 1998.
- [10] DEVILLIER, P.: *Pharmacology of glucocorticoids and ENT pathology*. Presse Med, 30(2):59–69, 2001.
- [11] DOSTERT, A. und T. HEINZEL: *Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action*. Curr Pharm Des, 10(23):2807–2816, 2004.
- [12] EKLUND, K. K., D. E. HUMPHRIES, Z. XIA, N. GHILDYAL, D. S. FRIEND, V. GROSS und R. L. STEVENS: *Glucocorticoids inhibit the cytokine-induced proliferation of mast cells, the high affinity IgE receptor-mediated expression of TNF-alpha, and the IL-10-induced expression of chymases*. J Immunol, 158(9):4373–4380, 1997.
- [13] FESSLER, B. J., F. PALIOGIANNI, N. HAMA, J. E. BALOW und D. T. BOUMPAS: *Glucocorticoids modulate CD28 mediated pathways for interleukin 2 production in human T cells: evidence for posttranscriptional regulation*. Transplantation, 62(8):1113–1118, 1996.
- [14] FRYER, A. D. und E. E. EL-FAKAHANY: *Identification of three muscarinic receptor subtypes in rat lung using binding studies with selective antagonists*. Life Sci, 47(7):611–618, 1990.
- [15] GARSSEN, J., H. VAN LOVEREN, C. M. GIERVELD, H. VAN DER VLIET und F. P. NIJKAMP: *Functional characterization of muscarinic receptors in murine airways*. Br J Pharmacol, 109(1):53–60, 1993.
- [16] GÄRTNER, R. und E. HAEN: *Endokrinpharmakologie. Pharmakologie and Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 8. Auflage:p705, 2001.

- [17] GORBOULEV, V., J. C. ULZHEIMER, A. AKHOUNDOVA, I. ULZHEIMER-TEUBER, U. KARBACH, S. QUESTER, C. BAUMANN, F. LANG, A. E. BUSCH und H. KOEPEL: *Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters*. DNA Cell Biol, 16(7):871–881, 1998.
- [18] GOSENS, R., J. ZAAGSMA, H. MEURS und A. J. HALAYKO: *Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD*. Respir Res, 7(1):73, 2006.
- [19] GOULDING, N. J. und P. M. GUYRE: *Glucocorticoids, lipocortins and the immune response*. Curr Opin Immunol, 5(1):108–113, 1993.
- [20] GRÜNDEMANN, D., J. BABIN-EBELL, F. MARTEL, N. ORDING, A. SCHMIDT und E. SCHÖMIG E.: *Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from kidney epithelial LLC-PK1 cells*. J Biol Chem, 272(16):10408–10413, 1997.
- [21] GRÜNDEMANN, D., V. GORBOULEV, S. GAMBARYAN, M. VEYHL und H. KOEPEL: *Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter*. Nature, 372(6505):549–552, 1994.
- [22] GRÜNDEMANN, D., B. SCHECHINGER, G. A. RAPPOLD und E. SCHÖMIG: *Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter*. Nat Neurosci, 1(5):349–351, 1998.
- [23] HELD, H. D., C. MARTIN und S. UHLIG: *Characterization of airway and vascular responses in murine lungs*. Br J Pharmacol, 126(5):1191–1199, 1999.
- [24] HISLOP, A. A., J. C. MAK, J. A. READER, P. J. BARNES und S. G. HAWORTH: *Muscarinic receptor subtypes in the porcine lung during postnatal development*. Eur J Pharmacol, 359(2-3):211–221, 1998.
- [25] HORVATH, G., Z. SUTTO, A. TORBATI, G. E. CONNER, M. SALATHE und A. WANNER: *Norepinephrine transport by the extraneuronal monoamine transporter in the human bronchial arterial smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 285(4):829–837, 2003.

- [26] IVERSEN, L. L.: *The uptake of catecholamines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: A novel catecholamine uptake process.* Br J Pharmacol Chemother, 25(1):18–33, 1965.
- [27] JOHNSON, M.: *The beta-adrenoceptor.* Am J Respir Crit Care Med, 158(3):146–153, 1998.
- [28] JONKER, J. W. und A. H. SCHINKEL: *Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2 and 3 (SLC22A1-3).* J Pharmacol Exp Ther, 308(1):2–9, 2004.
- [29] JONKER, J. W., E. WAGENAAR, S. VAN EIJL und A. H. SCHINKEL: *Deficiency in the organic cation transporters 1 and 2 (Oct1/Oct2 [Slc22a1/Slc22a2]) in mice abolishes renal secretion of organic cations.* Mol Cell Biol, 23(21):7902–7908, 2003.
- [30] KEKUDA, R., P. D. PRASAD, X. WU, H. WANG, Y. J. FEI, F. H. LEIBACH und V. GANAPATHY: *Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta.* J Biol Chem, 273(26):15971–15979, 1998.
- [31] KIM, D., M. GLAUM und R. LOCKEY: *Evaluation of combination long-acting beta-2 agonists and inhaled glucocorticosteroids for treatment of asthma.* Expert Opin Drug Metab Toxicol, 5(8):933–940, 2009.
- [32] KLAPPROTH, H., T. REINHEIMER, J. METZEN, M. MÜNCH, F. BITTINGER, C. J. KIRKPATRICK, K. D. HÖHLE, M. SCHEMANN, K. RACKÉ und I. WESSLER: *Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 355(4):515–523, 1997.
- [33] KOEPESELL, H.: *Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs.* Pharmacol Sci, 25(7):375–381, 2004.
- [34] KOEPESELL, H. und H. ENDOU: *The SLC22 drug transporter family.* Pflugers Arch, 447(5):666–676, 2004.

- [35] KOEPEL, H., B. M. SCHMITT und V. GORBOULEV: *Organic cation transporters*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 150:36–90, 2003.
- [36] KRUMDIEK, C. L., J. DOS SANTOS und K. J. HO: *A new instrument for the rapid preparation of tissue slices*. Biochem Biophys Res Commun, 104(1):118–123, 1980.
- [37] KUMMER, W., K. S. LIPS und U. PFEIL: *The epithelial cholinergic system of the airway*. Histochem Cell Biol, 130(2):219–234, 2008.
- [38] KUMMER, W., S. WIEGAND, S. AKINCI, I. WESSLER, A. H. SCHINKEL, J. WESS, H. KOEPEL, R. V. HABERBERGER und K. S. LIPS: *Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse*. Resp Res, 7(1):65, 2006.
- [39] LIPS, K. S., C. VOLK, B. M. SCHMITT, U. PFEIL, P. ARNDT, D. MISKA, L. ERMERT, W. KUMMER und H. KOEPEL: *Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 33(1):79–88, 2005.
- [40] MACKLEM, P. T.: *The physiology of small airways*. Am J Respir Crit Care Med, 157(2):181–183, 1998.
- [41] MAK, J. C., J. N. BARANIUK und P. J. BARNES: *Localization of muscarinic receptor subtype mRNAs in human lung*. Am J Resp Cell Mol Biol, 7(3):344–348, 1992.
- [42] MARTIN, C., S. UHLIG und V. ULLRICH: *Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices*. Eur Respir J, 9(12):2479–2487, 1996.
- [43] MATSUI, M., D. MOTOMURA, T. FUJIKAWA, J. JIANG, S. TAKAHASHI, T. MANABE und M. M. TAKETO: *Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable*. J Neurosci, 22(24):10627–10632, 2002.

- [44] MATSUNAGA, K., T. W. KLEIN, H. FRIEDMAN und Y. YAMAMOTO: *Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to Legionella pneumophila infection by nicotine*. J Immunol, 167(11):6518–6524, 2001.
- [45] METZEN, J., F. BITTINGER, C. J. KIRKPATRICK, H. KILBINGER und I. WESSLER: *Proliferative effect of acetylcholine on rat trachea epithelial cells is mediated by nicotinic receptors and muscarinic receptors of the M1-subtype*. Life Sci, 72(18-19):2075–2080, 2003.
- [46] MIKULSKI, Z., P. HARTMANN, K. S. LIPS, S. BIALLAS, U. PFEIL, S. A. GRANDO, V. GRAU und W. KUMMER: *Nicotinic receptors on rat alveolar macrophages dampen ATP-induced increase in cytosolic calcium concentration*. Am J Resp Crit Care Med, 175:A470, 2007.
- [47] MOOSLEHNER, K. A. und N. D. ALLEN: *Cloning of the mouse organic cation transporter 2 gene, Slc22a2, from an enhancer-trap transgene integration locus*. Mamm Genome, 10(3):218–224, 1999.
- [48] MUNCK, A. und P. M. GUYRE: *Glucocorticoid physiology, pharmacology and stress*. Adv Exp Med Biol, 196:81–96, 1986.
- [49] OKUDA, M., H. SAITO, Y. URAKAMI, M. TAKANO und K. INUI: *cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2*. Biochem Biophys Res Commun., 224(2):500– 507, 1996.
- [50] OKUDA, T., T. HAGA, Y. KANAI, H. ENDOU, T. ISHIHARA und I. KATSURA: *Identification and characterization of the high-affinity choline transporter*. Nat Neurosci, 3(2):120–125, 2000.
- [51] ONATE, S. A., S. Y. TSAI, M. J. TSAI und B. W. O'MALLEY: *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily*. Science, 270(5240):1354–1357, 1995.

- [52] PFEIL, U., K. S. LIPS, L. EBERLING, V. GRAU, R. V. HABERBERGER und W. KUMMER: *Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea*. Am J Respir Cell Mol Biol, 28(4):473–477, 2003.
- [53] PLOPPER, C. G., D. W. WILSON, J. L. ALLEY, S. J. NISHIO und P. NETTESHEIM: *Comparison of nonciliated tracheal epithel cells in six mammalian species: ultrastructure and population densities*. Exp Lung Res, 5(4):281–294, 1983.
- [54] PROSKOCIL, B. J., H. S. SEKHON, Y. JIA, V. SAVCHENKO, R. D. BLAKELY, J. LINDSTROM und E. R. SPINDEL: *Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells*. Endocrinology, 145(5):2498–2506, 2004.
- [55] RISTIMAKI, A., K. NARKO und T. HLA: *Down-regulation of cytokine-induced cyclo-oxygenase-2 transcript isoforms by dexamethasone: evidence for post-transcriptional regulation*. Biochem J, 318(1):325–331, 1996.
- [56] SATO, E., S. KOYAMA, Y. OKUBO, K. KUBO und M. SEKIGUCHI: *Acetylcholine stimulates alveolar macrophages to release inflammatory cell chemotactic activity*. Am J Physiol, 274(6 Pt 1):970–979, 1998.
- [57] SCHMITT, A., R. MÖSSNER, A. GOSSMANN, I. G. FISCHER, V. GORBOULEV, D. L. MURPHY, H. KOEPEL und K. P. LESCH: *Organic cation transporter capable of transporting serotonin is up-regulated in serotonin transporter-deficient mice*. J Neurosci Res, 71(5):701–709, 2003.
- [58] SCHWEIFER, N. und D. P. BARLOW.: *The *Lx1* gene maps to mouse chromosome 17 and codes for a protein that is homologous to glucose and polyspecific transmembrane transporters*. Mamm Genome, 7(10):735–740, 1996.
- [59] SLITT, A. L., N. J. CHERRINGTON, D. P. HARTLEY, T. M. LEAZER und C. D. KLAASSEN.: *Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels*. Drug Metab Dispos, 30(2):212–219, 2002.

- [60] STARKE, K.: *Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. Pharmakologie and Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 8. Auflage:p124, 2001.
- [61] STRUCKMANN, N., S. SCHWERING, S. WIEGAND, A. GSCHNELL, M. YAMADA, W. KUMMER, J. WESS und R. V. HABERBERGER: *Role of muscarinic receptor subtypes in the constriction of peripheral airways: studies on receptor-deficient mice*. *Mol Pharmacol*, 64(6):1444–1451, 2003.
- [62] TERASHITA, S., M. J. DRESSER, L. ZHANG, A. T. GRAY, S. C. YOST und K. M. GIACOMINI: *Molecular cloning and functional expression of a rabbit renal organic cation transporter*. *Biochim Biophys Acta*, 1369(1):1–6, 1998.
- [63] URAKAMI, Y., N. NAKAMURA, K. TAKAHASHI, M. OKUDA, H. SAITO, Y. HASHIMOTO und K. INUI: *Gender differences in expression of organic cation transporter OCT2 in rat kidney*. *FEBS Lett*, 461(3):339–342, 1999.
- [64] URAKAMI, Y., M. OKUDA, H. SAITO und K. INUI: *Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney*. *FEBS Lett*, 473(2):173–176, 2000.
- [65] VALERIUS, K. P.: *Size-dependant morphology of the conductive bronchial tree in four species of myomorph rodents*. *J Morphol*, 230(3):291–297, 1996.
- [66] WESSLER, I., E. ROTH, C. DEUTSCH, P. BROCKERHOFF, F. BITTINGER, C. J. KIRKPATRICK und H. KILBINGER: *Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters*. *Br J Pharmacol*, 134(5):951–956, 2001.
- [67] WESSLER, I. K. und C. J. KIRKPATRICK: *The non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways*. *Pulm Pharmacol Ther*, 14(6):423–434, 2001.
- [68] WESSLER, I. K., C. J. KIRKPATRICK und K. RACKÉ: *Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans*. *Pharmacol Ther*, 77(1):59–79, 1998.

- [69] WONG, I. F., I. F. MILLER und D. B. YEATES: *Stimulation of ciliary beat frequency by autonomic agonists: in vivo*. J Appl Physiol, 65(2):971–981, 1988.
- [70] WU, B., P. LI, Y. LIU, Z. LOU, Y. DING, C. SHU, S. YE, M. BARTLAM, B. SHEN und Z. RAO: *3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(22):8348–8353, 2005.
- [71] WU, X., R. KEKUDA, W. HUANG, Y. FEI, F. H. LEIBACH, J. CHEN, S. J. CONWAY und V. GANAPATHY: *Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamin transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain*. J Biol Chem, 273(49):32776–32786, 1998.
- [72] ZHANG, X., K. K. EVANS und S. H. WRIGHT: *Molecular cloning of rabbit organic cation transporter rbOCT2 and functional comparisons with rbOCT1*. Am J Physiol Renal Physiol, 283(1):F124–133, 2002.
- [73] ZWART, R., S. VERHAAGH, M. BUITELAAR, C. POPP-SNIJDERS und D. P. BARLOW: *Impaired activity of the extraneuronal monoamine transporter system known as uptake-2 in Orct3/Slc22a3-deficient mice*. Mol Cell Biol, 21(13):4188–4196, 2001.

Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung einer Vielzahl von Leuten wohl nie zu einem erfolgreichen Ende geführt worden und so danke ich all jenen, die mich stets daran erinnern haben, dass es da noch eine Doktorarbeit gibt, die geschrieben werden muss.

Ein paar Menschen möchte ich an dieser Stelle gesondert erwähnen:

Allen voran danke ich meinem Doktorvater Prof. Wolfgang Kummer für seine gute Betreuung während meiner aktiven Zeit am Institut und für seinen Langmut während meiner Schreibphase, die sich, dank meiner Tochter, durch viele Pausen auszeichnete.

Für die sehr nette Einarbeitung im Labor und die stete Bereitschaft, bei Problemen zu helfen, sei es bei der Versuchsdurchführung oder beim Kampf mit SPSS danke ich ganz herzlich Silke Wiegand.

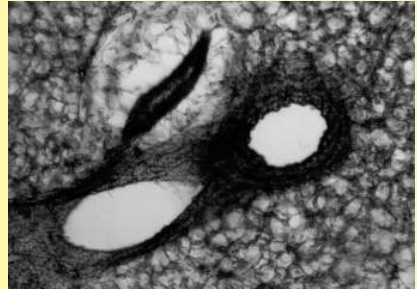
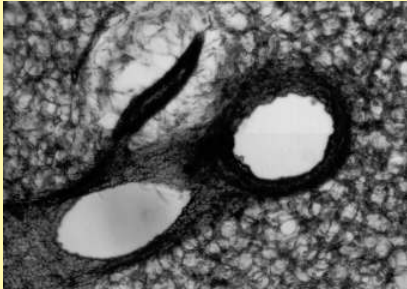
Martin Bodenbenner-Türich gebührt ein besonderer Dank, da er mir das Töten der Mäuse abgenommen hat, als ich es nicht mehr konnte. Ohne ihn hätte ich meine Versuche nicht weiterführen können.

Ein steter Quell der Aufmunterung war Patricia Berger, die mir immer Mut gemacht hat und mir sehr geholfen hat, indem sie mir die eine oder andere Literatur beschafft hat, sodass ich dafür nicht extra zur Uni fahren musste. Vielen Dank dafür.

Friederike Köpper-Giebner war so nett meine Summary erst Korrektur zu lesen, bevor ich sie abgegeben habe und ich danke ihr für die Zeit und die Sorgfalt, die sie darauf verwendet hat.

Abschließend danke ich meiner Familie: Meinen Eltern dafür, dass sie mich finanziell unterstützt und mir so diese Arbeit erst möglich gemacht haben. Ausserdem erinnerten sie mich gnadenlos daran, dass man Dinge, die man angefangen hat, auch zu Ende bringen muss.

Mein Mann Arne weiß sehr genau, was er in dieser Zeit alles mit mir ausgestanden hat und weiß am besten, wofür ich ihm von Herzen dankbar bin. Und meiner Tochter Maren Leonore bin ich sehr dankbar für die vielen Lichtblicke während meiner Schreibphase. Zu allerletzt denke ich an die Mäuse, die für meine Forschung ihr Leben gelassen haben – ohne sie gäbe es diese Arbeit nicht.



ISBN 978-3-86345-023-6



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: info@dvf.net · Homepage: <http://www.dvf.de>