

Aus dem
Zentrum für Zahnmedizin
Abteilung für Oralchirurgie und zahnärztliche Röntgenologie
Humboldt-Universität zu Berlin
Charité, Campus Virchow-Klinikum
Direktor: Univ. Prof. Dr. P. A. Reichart

**Experimentelle Untersuchungen zur Pathogenese und Therapie
der oralen Candidiasis bei Immundefizienz**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia legendi

für das Fach
Oralchirurgie und Oralmedizin

vorgelegt von

Dr. med. dent. Andrea Maria Schmidt-Westhausen

Berlin 2000

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1 EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT..... | 4 |
| 1.1 KOLONISATION UND INFEKTION DER MUNDHÖHLE MIT CANDIDA SPEZIES | 4 |
| 1.2 BEGRIFFSBESTIMMUNG CANDIDIASIS (CANDIDOSE) | 5 |
| 1.3 DIE ORALE MUKOSA UND IMMUNABWEHR VON INFEKTIONEN MIT C. ALBICANS | 6 |
| 1.4 KLASSIFIKATION DER ORALEN CANDIDIASIS | 8 |
| 1.5 PRÄDISPONIERENDE FAKTOREN | 9 |
| 1.5.1 Lokale Faktoren | 9 |
| 1.5.2 Systemische Faktoren..... | 10 |
| 1.5.3 Die orale Candidiasis bei HIV-Infektion | 11 |
| 1.6 THERAPIE | 12 |
| 1.7 TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR OROPHARYNGEALEN CANDIDIASIS..... | 14 |
| 1.7.1 Untersuchungen zu Schleimhautveränderungen hervorgerufen durch C. albicans | 14 |
| 1.7.2 Untersuchungen der oralen Candidiasis bei Beeinträchtigung des Immunsystems | 16 |
| 1.7.3 Untersuchungen bei systemischen Erkrankungen | 18 |
| 1.7.4 Untersuchungen der oralen Mukosa bei Veränderungen des Mundhöhlenmilieus..... | 19 |
| 1.7.5 Studien zur antimykotischen Chemotherapie | 21 |
| 1.8 DIE ROLLE DER ADHÄRENZ IM PATHOGENITÄTSPROZEß | 21 |
| 1.8.1 Die Adhärenz beeinflussende Faktoren..... | 23 |
| 1.8.2 Die Hemmung der Adhärenz durch Muzin..... | 25 |
| 1.9 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG..... | 25 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN..... | 28 |
| 2.1 VORVERSUCH: BESTIMMUNG VON OLIGOSACCHARID-LEKTIN-VERMITTELTEN ADHÄSIONSMECHANISMEN AN ACHT VERSCHIEDENEN C. ALBICANS STÄMMEN..... | 28 |
| 2.1.1 Verwendetes Muzin..... | 29 |
| 2.1.2 Herstellung der Glykopeptide aus Muzin | 29 |
| 2.2 TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN..... | 30 |
| 2.2.1 Tierversuchsgenehmigung..... | 30 |
| 2.2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung | 31 |
| 2.2.3 Verwendeter C. albicans Stamm | 32 |
| 2.2.4 Versuchsplanung | 32 |
| 2.3 HISTOLOGISCHE TECHNIK | 35 |
| 2.3.1 Periodic-Acid-Schiff Reaktion (PAS)..... | 35 |
| 2.3.2 Kryostatschnitte..... | 36 |
| 2.3.3 Die Immunperoxidase-Methode Testprinzip | 36 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3 | ERGEBNISSE | 41 |
| 3.1 | KLINISCHE BEFUNDE | 41 |
| 3.2 | ERGEBNISSE DER PAS-REAKTION | 42 |
| 3.2.1 | <i>Ergebnisse Teil A: Bestimmung der minimalen Infektionsdosis</i> | 42 |
| 3.2.2 | <i>Ergebnisse Teil B: Inokulation der in Teil A bestimmten Keimzahl und Glykopeptiden</i> | 48 |
| 3.3 | ERGNISANALYSE DER INFektionSEXPERIMENTE | 49 |
| 3.3.1 | <i>Balb/c Mäuse</i> | 50 |
| 3.3.2 | <i>SCID Mäuse</i> | 51 |
| 3.4 | ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN UNTERSUCHUNGEN | 53 |
| 3.4.1 | <i>Verteilung der exprimierten Antigene in Abhängigkeit zur Inokulationsdosis innerhalb der Zell-Lagen zusammengefaßt nach Antigenen</i> | 53 |
| 3.4.2 | <i>Verteilung der markierten Antigene in Abhängigkeit zur Inokulationsdosis innerhalb der Zell-Lagen zusammengefaßt nach Inokulationsmenge</i> | 75 |
| 4 | DISKUSSION | 82 |
| 4.1 | OLIGOSACCHARID-LEKTIN-VERMITTELTE ADHÄSIONSMCHANISMEN BEI ACHT C. ALBICANS STÄMMEN | 82 |
| 4.1.1 | <i>Höhe des Bindungspotentials</i> | 82 |
| 4.1.2 | <i>Temperaturabhängigkeit</i> | 83 |
| 4.1.3 | <i>Zeitabhängigkeit</i> | 83 |
| 4.2 | TIERMODELL | 84 |
| 4.3 | AUSWAHL DES C. ALBICANS STAMMES | 85 |
| 4.3.1 | <i>Keimzahl</i> | 86 |
| 4.4 | HISTOLOGISCHE TECHNIKEN | 86 |
| 4.4.1 | <i>PAS-Technik</i> | 86 |
| 4.4.2 | <i>Immunperoxidase-Methode</i> | 87 |
| 4.5 | DISKUSSION DER ERGEBNISSE | 87 |
| 4.5.1 | <i>Klinische Befunde</i> | 87 |
| 4.5.2 | <i>Histopathologie PAS</i> | 89 |
| 4.5.3 | <i>Immunhistologie</i> | 94 |
| 4.6 | KRITISCHE ASPEKTE UND PERSPEKTIVEN | 105 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 107 |
| 6 | SUMMARY | 110 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 113 |
| 8 | ANHANG | 137 |
| 8.1 | ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN CHEMIKALIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN | 137 |
| 8.2 | TABELLEN | 139 |

1 Einleitung und Literaturübersicht

1.1 Kolonisation und Infektion der Mundhöhle mit *Candida* Spezies

In der Mundhöhle können eine Reihe von Hefen isoliert werden, wobei es sich in der Mehrzahl um *Candida* spp. (Familie: *Cryptococcaceae*; Klasse: *Blastomycetes*; Unterabteilung: *Fungi imperfecti*) handelt (244) (Tab. 1). Die häufigste Spezies hierbei ist *C. albicans*. Hefen wie *Rhodotorula glutinis* und *Saccharomyces cerevisiae* werden nur selten in der Mundhöhle nachgewiesen, hierdurch hervorgerufene Infektionen und Erkrankungen sind nicht bekannt. Sproßpilze im allgemeinen und *C. albicans* im Besonderen werden als Kommensalen des Verdauungstrakts von gesunden Individuen gefunden (168). Sie sind Teil der normalen mikrobiellen Flora des Menschen und können als klinisch symptomloses Reservoir für spätere Infektionen dienen (100, 225). Bei Störung des Gleichgewichts zwischen Wirtsabwehr und Virulenzfaktoren des Keims kann es zum Übergang von Kommensalismus zur Infektion kommen.

Tab. 1: Übersicht über *Candida* spp. und weitere Hefen, die in der Mundhöhle nachgewiesen werden und deren Häufigkeit (nach Odds 1988 (181))

| Hefen | Isolate in % |
|---------------------------------|--------------|
| <i>Candida albicans</i> | 47-75 % |
| <i>Candida tropicalis</i> | 7 |
| <i>Candida glabrata</i> | 7 |
| <i>Candida krusei</i> | < 5 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | < 5 |
| <i>Candida guilliermondii</i> | < 5 |
| <i>Rhodotorula</i> spp. | < 4 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | < 2 |

Die Angaben über die Häufigkeit des Auftretens von *Candida* spp. ohne klinische Zeichen oder Symptome von Schleimhauterkrankungen (Kolonisation) sind unterschiedlich und liegen zwischen 32 % und 60 % (89, 174) bzw. 20 % - 50 % (83, 180, 234).

Die Übersicht spiegelt die Summe von 17 Studien, in die verschiedene Personengruppen (u.a. auch gesunde Probanden) einbezogen wurden, wider. Daten über eine reine Besiedlung der Mundhöhle mit *Candida* spp. bei Gesunden können erst dann als gesichert gelten, wenn mikrobiologische Befunde mit klinischen Angaben korre-

liert werden. Die Mehrzahl vorliegender Studien jedoch stützt sich auf unvollständige Angaben über Allgemeinzustand, mögliche Grunderkrankungen und intraoralen Befund. Die große Variationsbreite der der Literatur entnommenen Daten ist bedingt durch fehlende Informationen über den Gesundheitszustand der Probanden/Patienten (153), so daß allein aufgrund deren Rekrutierung aus Kliniken und Krankenhäusern prädisponierende Erkrankungen vorliegen konnten.

Epidemiologischen Studien zufolge liegt die Prävalenzrate für das Auftreten mehrerer *Candida spp.* gleichzeitig bei ca. 10 % (153). Es ist anzunehmen, daß die tatsächliche Zahl größer ist, da Differenzierungsmöglichkeiten von dem verwendeten Medium und der bei der mikrobiologischen Aufbereitung verwendeten Sorgfalt abhängen. Mit Hilfe der Mundspülmethode können Kombinationen von *C. albicans* mit einer oder mehrerer der folgenden Spezies nachgewiesen werden: *C. glabrata*, *C. tropicalis* und *C. krusei* (235).

Die Anzahl von *Candida*-Zellen pro Milliliter Speichel liegt bei klinisch unauffälligen Personen bei 200 - 500 CFU (colony forming units = koloniebildende Einheiten)/ml (84). Wird die Mundspültechnik verwendet, können ca. 600 CFU/ml nachgewiesen werden (163, 164).

1.2 Begriffsbestimmung Candidiasis (Candidose)

Candidiasis und Candidosis sind beides Begriffe, die für die Beschreibung von Infektionen mit Hefen der Gattung *Candida* verwendet werden. Während der Rat der Internationalen Organisationen der Medizinischen Wissenschaften 1982 die Bezeichnung (orale) Candidiasis vorschlug (64), wird in Europa überwiegend der Begriff „Candidose“ verwendet. Gemäß der „International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) werden die Begriffe „Candidose“ oder „Candidosis“ sowie „Candidiasis“ als gleichwertig angesehen (184). In vorliegender Arbeit wird die Bezeichnung (orale) Candidiasis verwendet.

Die mit den englischen Begriffen „yeast“ und „yeast-like fungi“ bezeichneten Pilze werden im deutschen Sprachgebrauch als Hefen, echte Hefen, hefeähnliche und hefeartige Pilze, Hefe- und Sproßpilze benannt.

Der Begriff Candidiasis steht für eine Erkrankung mit klinischen Zeichen und Symptomen, die vorwiegend durch *C. albicans*, jedoch auch *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* u.a. hervorgerufen wird. Kennzeichnend sind makroskopisch sichtbare Veränderungen der Mukosa (erythematöse oder pseudomembranöse Areale), der histologische Nachweis PAS-positiver Strukturen (Pseudohyphen und/oder Hyphen) sowie histopathologische Veränderungen der infizierten Mukosa, die je nach Erschei-

nungsform entweder eine Atrophie bzw. Hyperparakeratose, Akanthose und Entzündungsreaktion mit Mikroabszessen in der oberen Anteilen der Stachelzellschicht sowie ein mononukleäres Band im darunterliegenden Bindegewebe aufweisen.

Davon abgegrenzt werden muß der Begriff (*Candida*-) Infektion, der *per se* bedeutet, daß der Mikroorganismus sich im Körper festgesetzt hat. Hierbei kommt es zu keiner makroskopisch sichtbaren Veränderung der Mukosa (subklinische Infektion), histopathologisch jedoch finden sich PAS-positive Strukturen in den oberen Anteilen des Epithels sowie mäßige entzündliche Reaktionen. Der Wirt ist somit Keimträger.

Die Anwesenheit bzw. der Nachweis von Sproßpilzen allein bedeutet weder, daß eine (klinisch apparente) Candidiasis noch eine (subklinisch verlaufende) Infektion mit *Candida spp.* vorliegt, sondern ist Zeichen einer Kolonisation (168).

In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, daß sich aus der Keimmenge (gewonnen mittels Abstrich- oder Mundspülmethode) nicht das Vorhandensein einer mukosalen Infektion mit *Candida spp.* ableiten läßt. Es besteht keine unmittelbare Assoziation zwischen dem mikrobiologischen Nachweis hoher Keimzahlen und dem Auftreten einer Schleimhautveränderung (23, 149, 240, 274). Bei immungesunden Personen ohne klinische Manifestationen können mittels Abstrichtechnik gewonnene Proben 10^3 CFU/ml aufweisen (180, 234), während bei Patienten mit HIV-Infektion in einigen Fällen nur 50 CFU/ml nachweisbar waren und dennoch klinische Veränderungen beobachtet wurden (23).

1.3 Die orale Mukosa und Immunabwehr von Infektionen mit *C. albicans*

Im oralen Epithel findet sich eine konstante Population nicht-epithelialer immunkompetenter Zellen, die Lymphozyten und Langerhans-Zellen (LHZ). Letztere sind spezialisierte Zellen mit dendritischer Oberfläche, die von Knochenmarksvorläufern abstammen und zytoplasmatische Organellen (Birbeck-Granula) enthalten. LHZ sind mit den dendritischen Zellen der Milz und der Lymphknoten verwandt und gehören zu der Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen (APZ). LHZ binden zunächst ein Antigen an ihre Oberfläche, verarbeiten es und wandern, das Antigen tragend, von der Mukosa durch die Lymphe in die regionalen Lymphknoten, wo sie sich zu dendritischen Zellen differenzieren, die eine starke kostimulierende Aktivität besitzen. Im Lymphknoten wird das Antigen von interdigitierenden dendritischen Zellen naiven $CD4^+$ -T-Zellen präsentiert. Während der Erkennungsphase der primären Immunantwort gegen Proteinantigen sind dendritische Zellen der wichtigste Zelltyp, um naive T-Zellen zu stimulieren.

Das orale Epithel der Maus beherbergt 8-11 nicht-epitheliale Zellen pro 1000 Basalzellen, das humane Epithel ca. 100 pro 1000 Basalzellen. 41 % dieser Zellen beim Menschen sind LHZ, bei der Maus 57 % (47). LHZ finden sich in der humanen oralen Mukosa mehrheitlich im *Stratum spinosum* (61 %), während bei der Maus eine nahezu gleiche Verteilung im *Stratum basale*, suprabasal und im *Stratum spinosum* vorliegt. Die kleinen Populationen von intraepithelialen Lymphozyten beim Menschen sind mehrheitlich CD8⁺-T-Zellen. Bei Mäusen exprimieren dagegen 50 % der intraepithelialen Lymphozyten die $\gamma\delta$ -Form des T-Zell-Rezeptors. Bei den meisten anderen Tierarten einschließlich des Menschen, sind nur ca. 10 % der intraepithelialen Lymphozyten $\gamma\delta$ -Zellen (198).

Zu einer Infektion mit *C. albicans* kommt es, wenn der Mikroorganismus in die Oberfläche der Epithelien eindringen kann, wie z.B. bei gestörter Schleimsekretion. Die Infektion mit *C. albicans* ist gekennzeichnet durch eine Vermehrung des Mikroorganismus im Extrazellulärraum auf Epitheloberflächen. Um den Wirt zu schützen sind bei einer Candida-Infektion zwei verschiedene Arten der Immunantwort, d.h. die unspezifische zelluläre sowie eine erworbene zellvermittelte Immunität notwendig. Dies geschieht in erster Linie durch Phagozytose, Zytokinsekretion der Phagozyten (TNF- α , IL 1, IL6, IL 8, IL12) und die hierdurch ausgelöste Aktivierung von Lymphozyten. Bei einer Candida-Infektion sind maßgeblich CD4⁺-T-Zellen involviert, denen Antigenpeptide durch antigenpräsentierende Zellen (APZ) auf MHC-Klasse II Molekülen angeboten werden.

Verglichen mit der Häufigkeit und Intensität der Mundschleimhaut-Infektion ist die systemische Komplikation einer invasiven, disseminierten *Candida*-Infektion bei Patienten mit HIV-Infektion selten. Das Ausmaß der mukokutanen Läsion ist in den meisten Fällen limitiert, die Infektion erreicht nicht das subepitheliale Bindegewebe. Dieser Verlauf wird dadurch bedingt, daß HIV-seropositiven Patienten zwar eine Verminderung der Anzahl der CD4⁺-Lymphozyten und damit der T-Zell-Hilfe eintritt, die nichtadaptive angeborene unspezifische Immunität jedoch primär keine Defekte aufweist. Letztere, basierend auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen sowie Langerhans-Zellen (LHZ) ist für die Abwehr von Pilzen entscheidend.

Die Interaktion zwischen *Candida spp.* und polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten und Makrophagen bezüglich ihrer Abwehrfunktion wurde in einer Reihe von Studien untersucht (Review bei *Fromtling et al.* 1986 (91), *Greenfield* 1992 (98), *Challacombe* 1994 (58)). Analysen zu immunkompetenten Zellen in der Mukosa HIV-seropositiver und -negativer Patienten mit oraler Candidiasis wurden besonders in

den letzten Jahren veröffentlicht (215, 222, 287). *In vitro* Untersuchungen wiesen auf die wichtige Rolle humaner LHZ für die antigenspezifische T-Zellantwort bei Kontakt mit *C. albicans* hin (266).

1.4 Klassifikation der oralen Candidiasis

Die Infektion mit *C. albicans* hat vielfältigste Erscheinungsformen. Das klinische Spektrum umfaßt oberflächliche, relativ lokalisierte Erkrankungen der Haut und des Epithels des Orogastrointestinaltrakts (83) und schwere, lebensbedrohliche Infektionen der inneren Organe. Dazwischen existieren vielfältige Mischformen, die durch unterschiedliche Einflüsse moduliert werden (58, 216).

Verschiedene Klassifikationen der oralen Candidiasis sind bekannt, wobei die von *Lehner* am häufigsten verwendet wurde (142). Als Nachteil dieser Klassifikation erwies sich, daß diese nicht differenziert zwischen ausschließlich intraoral lokalisierten Formen und oralen Manifestationen in Zusammenhang mit der mukokutanen Candidiasis. Daher wurde vorgeschlagen die orale Candidiasis in eine primäre und eine sekundäre Form zu unterteilen. Die primäre Form ist demnach auf orale und periorale Bereiche begrenzt, während die sekundäre Form eine orale Candidiasis als Folge einer systemischen mukokutanen Erkrankung, die auf Haut und Schleimhaut ausgeht, kennzeichnet (236).

Weiterhin wurde in der Klassifikation von *Lehner* nicht zwischen morphologischen und klinischen Kriterien unterschieden, was Mißverständnissen bei der Einteilung der Manifestationen zur Folge hatte. Daher wurde der Begriff „atrophische Candidiasis“ durch den rein deskriptiven Terminus „erythematöse Candidiasis“ ersetzt.

1997 erschien eine Reklassifikation der oralen Candidiasis (16), die die Nachteile der vorherigen Klassifikationen aufhob und neue klinische Varianten, die zusammen mit der HIV-Infektion auftreten, integrierte (Tab. 2).

Ein weiterer Vorteil dieser Klassifikation ist die Berücksichtigung von *Candida*-Superinfektionen keratinisierter primärer Veränderungen der oralen Mukosa. So ist die Leukoplakie in 10 % der Fälle superinfiziert, Lichen planus in 40 % und Lupus erythematodes in 50 % (14).

Tab. 2: Reklassifikation der oralen Candidiasis (nach Axéll *et al.* 1997 (16))

| primäre orale Candidiasis | Sekundäre orale Candidiasis |
|--|---|
| akute Formen | Orale Manifestationen systemischer mukokutaner Candidiasis |
| pseudomembranös, erythematös | - als Folge von Erkrankungen wie der |
| chron. Formen | - Thymus-Aplasie und dem |
| - hyperplastisch | - Candida-Endokrinopathie-Syndrom |
| nodulär | |
| plaqueförmig | |
| - erythematös | |
| - pseudomembranös | |
| Candida-assoziierte Veränderungen | |
| - Prothesenstomatitis | |
| - Cheilitis angularis | |
| - Glossitis rhombica mediana | |
| Candida Superinfektion von keratinisierten Läsionen | |
| - Leukoplakie | |
| - Lichen planus | |
| - Lupus erythematoses | |

1.5 Prädisponierende Faktoren

1.5.1 Lokale Faktoren

Verschiedene Faktoren begünstigen die Entstehung einer oralen Candidiasis. Lokale Ursachen hierfür können Xerostomie, erhöhter Glukosegehalt des Speichels, Tragen von Prothesen (44, 232) (Review bei *Budtz-Jørgensen* 1990 (41)) sowie Faktoren sein, die direkt oder indirekt die protektive Wirkung der epithelialen Barriere schwächen. In zytologischen Ausstrichen bei Rauchern wurde eine signifikant höhere Anzahl von Hyphen- oder Pseudohyphen als bei Nichtrauchern nachgewiesen (219), bei der quantitativen Auswertung von *Candida spp.* im Speichel wurde dagegen kein Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern gefunden (26, 188). Untersuchungen konnten weiterhin nachweisen, daß eine orale Candidiasis bei Rauchern häufiger als bei Nichtrauchern auftritt (13, 264), wobei sich bei Rauchern mit erythe-

matöser Candidiasis erheblich höhere Keimzahlen nachweisen ließen als bei Patienten mit erythematöser Candidiasis, die nicht rauchten (88 % versus 66 %) (33).

Der Zusammenhang zwischen Prothesenstomatitis und Lebensgewohnheiten wurde von einer finnischen Arbeitsgruppe untersucht (232). Die Ergebnisse zeigten, daß Alkoholkonsum, Zigarettenrauchen und wenig sportliche Aktivität signifikant häufiger mit der Entstehung einer Prothesenstomatitis verbunden ist. Zwar beeinflussten biologische Faktoren wie Speichelflußrate, Mundhygiene und Geschlecht den quantitativen Nachweis von *Candida spp.*, doch bei der Entstehung einer oralen Candidiasis im Sinne einer Prothesenstomatitis war die Lebensführung ausschlaggebend.

In einer Untersuchung homosexueller Männer konnte nachgewiesen werden, daß eine Korrelation zwischen Rauchen und dem Auftreten einer oralen Candidiasis unabhängig von der HIV-Serologie besteht (264). Lokale Faktoren scheinen bei der Pathogenese einer oralen Candidiasis eine größere Rolle zu spielen als die zugrundeliegende Immunsuppression.

Bei HIV-positiven Rauchern treten neben der oropharyngealen Candidiasis auch weitere HIV-spezifische Veränderungen wie orale/genitale Condylomata acuminata und die Haarleukoplakie signifikant häufiger auf (86, 195, 274), die Rauchgewohnheiten haben jedoch keinen Einfluß auf die Progression der HIV-Infektion (94).

1.5.2 Systemische Faktoren

Neben lokalen Kofaktoren liegt der Infektion in den meisten Fällen ein zusätzlicher systemischer Immundefekt des Wirts zugrunde, was eine opportunistische Infektion kennzeichnet (132).

Zu den allgemein prädisponierenden Faktoren zählen endokrine Störungen, Malabsorption, Kachexie, Hämoblastosen, schwere Allgemeinerkrankungen, Radiatio (209). Patienten mit Diabetes mellitus (138) oder einer konsumierenden schweren Systemerkrankung entwickeln häufig eine Candidiasis. Bei Neugeborenen ist vermutlich die Unreife des Immunsystems und der Mangel an ausgebildeter Standortflora die Ursache für das Entstehen einer oralen Candidiasis.

Mit der Zunahme vor allem der erworbenen Immundefekte aufgrund von Langzeitintensivmedizin (93, 286), Therapien mit Immunsuppressiva und Zytostatika (45, 208), Einnahme von Kortikosteroiden und Antibiotika (152) sowie der Erhöhung des durchschnittlichen Lebensalters (252) stieg in den letzten Jahren die Zahl immunkompromittierter Patienten und damit die Inzidenz einer oropharyngealen Candidiasis.

Nach Organtransplantation immunsupprimierte Patienten sind empfänglicher für Pilzinfektionen, die Candidiasis ist bei diesen Individuen die häufigste Pilzerkrankung,

wobei als Erreger meistens *C. albicans* nachgewiesen wird. Bei Herztransplantierten kommt es unmittelbar postoperativ zum Auftreten von klinischen Veränderungen im Rachenraum und Ösophagus. Im Gegensatz zur Aspergillose ist der Erkrankungsverlauf jedoch selten tödlich (108). Eine Studie zeigte, daß 10 % der Nierentransplantierten eine Form der oralen Candidiasis aufwies (123), das Auftreten scheint abhängig von der verabreichten Medikation zu sein (99). Patienten mit einer Kombinationstherapie bestehend aus Cyclosporin, Azathioprin und Prednisolon weisen eine signifikant höhere Inzidenz auf als Patienten mit der Zweierkombination bestehend aus Azathioprin und Prednisolon bzw. Cyclosporin und Prednisolon. Patienten nach Knochenmarktransplantation (KMT) mit Neutropenie erkranken häufiger an einer oralen Candidiasis als Patienten nach Organtransplantation (81, 161).

1.5.3 Die orale Candidiasis bei HIV-Infektion

Abgesehen von den o.g. erworbenen Immundefekten hat die oropharyngeale Candidiasis besonders durch die HIV-Infektion neue Bedeutung erlangt. In den ersten Beschreibungen von AIDS-Erkrankten wurde 1981 auf einen Zusammenhang zwischen dem gleichzeitigen Auftreten einer *Pneumocystis carinii* Pneumonie (PCP) und einer oralen Candidiasis hingewiesen (97).

Die orale Candidiasis ist bei HIV/AIDS-Patienten weit verbreitet. Es zeigte sich, daß eine Candidiasis unklarer Genese eines der ersten Zeichen einer HIV-Infektion oder AIDS sein kann. Sie gilt als die häufigste mukosale Manifestation der HIV-Infektion (63) und Zeichen einer symptomatischen HIV-Infektion (Stadium B nach CDC-Klassifikation 1993 (56)). Schon seit den ersten Meldungen über HIV/AIDS wurden zahlreiche Berichte publiziert, die einen engen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer oropharyngealen Candidiasis und der Progression zur Krankheit AIDS beschrieben (124, 268). Die orale Candidiasis (und die Haarleukoplakie) stellen einen prognostischen Marker der Erkrankung AIDS dar (59, 120). Gemäß der EC-Klassifikation von 1993 zählt sie zu den oralen Läsionen, die eng mit der HIV-Infektion assoziiert sind (79)

Es ist davon auszugehen, daß jeder HIV-Patient im Verlauf seiner Erkrankung mindestens eine Episode einer Form der oralen Candidiasis aufweist, wobei das Auftreten mit der CD4⁺-Lymphozytenzahl assoziiert ist. So ist die Wahrscheinlichkeit an einer oralen Candidiasis zu erkranken für solche, deren CD4⁺-Zell-Zahl > 200/ml beträgt, geringer als für Patienten, deren CD4⁺-Zell Werte < 200/ml liegen (23, 28, 159, 199, 231, 254). Bei gleicher CD4⁺-Zell-Zahl ist das Risiko eine orale Candidiasis

zu entwickeln bei Personen, die durch i.v. Drogengebrauch infiziert wurden, höher als bei homosexuellen Patienten (199).

Bei HIV-Infektion wird unterschieden zwischen der pseudomembranösen und der erythematösen Form. Gleichzeitiges Auftreten verschiedener Typen der Candidiasis ist möglich. In zwei Longitudinalstudien wurde anhand statistischer Analysen gezeigt, daß die erythematöse sowie pseudomembranöse Candidiasis die selbe Bedeutung als Vorzeichen in Hinblick auf eine Progression der Erkrankung haben (75, 176). Dagegen wurde in einer Querschnittsuntersuchung neueren Datums nachgewiesen, daß die pseudomembranöse eher mit dem Fortschreiten der Erkrankung korreliert zu sein scheint als die erythematöse Form (220).

Assoziiert mit der oralen Candidiasis HIV-infizierter Personen ist die Cheilitis exfoliativa. Es handelt sich hierbei um eine chronisch oberflächliche Entzündung des Lippenrots mit anhaltender Schuppung (200). Obwohl sie nicht Bestandteil der EC-Klassifikation der HIV-assoziierten oralen Läsionen von 1993 ist, konnte in einer prospektiven Studie gezeigt werden, daß bei 24/47 (57,4 %) HIV-Patienten mit Cheilitis exfoliativa *C. albicans* allein und in Kombination mit *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. krusei* aus Lippenabstrichen isoliert werden konnte. 27/47 Patienten wiesen gleichzeitig eine Form der oralen Candidiasis auf (217).

1.6 Therapie

Die Behandlung der mukosalen Candidiasis kann zunächst mit topisch anwendbaren Präparationen erfolgen. Zur lokalen medikamentösen Therapie werden neben der als wirksam belegten Chlorhexidin-Lösung und Polyvidonjod-Lösung die nicht resorbierbaren Antimykotika-Suspensionen vom Polyen-Typ (Amphotericin B und Nystatin) oder die lokal applizierbaren Azol-Derivate wie Clotrimazol-Lutschtabletten und Miconazol-Gel empfohlen. Die Lokalbehandlung, die sich über mehrere Wochen erstrecken muß, erfordert eine gute Compliance, teilweise treten Geschmacksbeeinträchtigungen und gastrointestinales Beschwerden auf.

Durch die Zunahme von Pilzinfektionen bei HIV-Infizierten wurde in den letzten Jahren verstärkt nach neuen Therapiemöglichkeiten zur systemischen Behandlung gesucht. Dabei zeigte Amphotericin B als Standardmedikament in der Langzeitanwendung schwere Nebenwirkungen wie Nierenschädigung und Blutbildveränderungen. Mit Ketoconazol, einem Antimykotikum der Azolreihe, war ein oral verfügbares und systemisch wirksames Breitspektrumantimykotikum im Handel, das weitaus weniger Nebenwirkungen aufwies als die Polyene. Ketoconazol wurde bei Patienten mit HIV-

Infektion als intermittierende Therapie bei Bedarf eingesetzt. Doch die breite Anwendung von Ketoconazol, die wachsende Zahl systemischer Mykosen und Resistenzbildung machte weitere therapeutische Alternativen notwendig. Vor knapp zehn Jahren wurde eine neue Generation der Azole, die Triazole, entwickelt. Besonders Fluconazol wurde zur Behandlung der oralen und oropharyngealen Candidiasis bei diesem Patientenkontinuum und bei Patienten mit Leukämie und Karzinomen für die Therapie und Prophylaxe eingesetzt und intensiv untersucht (38, 39, 61, 70, 78, 118, 128, 170, 202, 206, 270). Die Wirksamkeit von Fluconazol bei einmaliger Gabe, die gute orale Bioverfügbarkeit sowie die geringe Toxizität haben zu einem weit verbreiteten Einsatz für die Behandlung der mukosalen Candidiasis geführt. Im Vergleich zu Ketoconazol ist Fluconazol wirksamer sowohl bei der Behandlung einer oropharyngealen und ösophagealen (135) als auch einer disseminierten Candidiasis (221). Die Vorteile von Fluconazol sind geringe unerwünschte Wirkungen im Vergleich zu anderen Triazolen, die gute Resorption bei besserer Stabilität im sauren Milieu des Magens sowie die Verfügbarkeit von oraler (Kapseln/Suspension) und intravenös zu applizierenden Formulierung (38, 136, 221). Darüber hinaus führt Fluconazol nicht zu einer Veränderung der oralen bakteriellen Standortflora (147). Fluconazol wurde anfänglich als Primärprophylaxe bei HIV-seropositiven Patienten mit einer CD4⁺-Zellzahl unter 200/µl und bei rezidivierender oropharyngealer Candidiasis eingesetzt (141). Folge davon war eine Resistenzentwicklung von *Candida spp.* wie *C. glabrata* und *C. krusei* (2, 158, 261, 284, 291). In einer eigenen Untersuchung wurden bei 57 HIV-infizierten Patienten unter Sekundärprophylaxe (2 x 100 mg/w Fluconazol) Abstriche der oralen Mukosa genommen und mikrobiologisch quantifiziert und subkultiviert. In 34/57 (59,6 %) wurden *Candida spp.* isoliert. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen waren *C. glabrata* und *C. krusei* häufiger nachzuweisen (240, 241). Diese Ergebnisse können Hinweis auf einen therapiebedingten Spezies-Shift geben.

Neben der Resistenzentwicklung gegenüber *C. glabrata* und *C. krusei* wurde über das Auftreten Fluconazol-resistenter *C. albicans* Stämme berichtet, der Nachweis einer Änderung im Biotyp oder Serotyp war jedoch nicht ursächlich für die Resistenzentwicklung (226, 227, 256, 271). Resistenzen gegenüber Fluconazol sind im allgemeinen assoziiert mit einer vorausgegangenen Anwendung in Form einer intermittierenden Therapie oder kontinuierlicher prophylaktischer Medikation bei rezidivierender Candidiasis (Review bei *Vanden Bosche et al.* 1998 (277)), so daß eine Prophylaxe und Therapie mit Fluconazol bei klinisch wenig ausgeprägter Candidiasis nicht empfohlen wird (271). Die Gefahr einer Resistenzbildung ist größer bei Anwendung von Fluconazol als bei Ketoconazol-Gabe, Ketoconazol-Resistenzen sind wie-

derum häufiger als Resistenzen gegen Itraconazol (Review bei Odds 1993 (183)). Die Therapie einer rezidivierenden Candidiasis bei immunkompromittierten Patienten wird durch Resistenzbildungen gegenüber weiteren Azol-Derivaten sowie Kreuzresistenzen innerhalb der Azolgruppen erschwert (96, 112, 196, 207). Selbst Resistenzen gegenüber Polyenen wurden beschrieben (60, 74, 288).

1.7 Tierexperimentelle Untersuchungen zur oropharyngealen Candidiasis

Die orale Candidiasis wurde experimentell anhand verschiedener Tiermodelle untersucht, da sich auf diese Weise die Erkrankung beeinflussende Parameter wie Ernährung, Speichelfluß, Einnahme von Antibiotika, orale Flora, immunologischer Status und Vorhandensein von Stoffwechselstörungen individuell und systematisch evaluieren lassen.

Verschiedene Ansätze wurden gewählt, um die orale Candidiasis am Tiermodell zu untersuchen. Diese lassen sich grob in fünf Bereiche unterteilen:

1. Untersuchungen zu Schleimhautveränderungen hervorgerufen durch den Mikroorganismus *C. albicans*
2. Untersuchungen der oralen Candidiasis bei Immunsuppression oder Veränderungen des Immunsystems
3. Untersuchungen bei systemischen Veränderungen
4. Untersuchungen der oralen Mukosa bei Veränderungen des Mundhöhlenmilieus
5. Studien zur antimykotischen Therapie

1.7.1 Untersuchungen zu Schleimhautveränderungen hervorgerufen durch *C. albicans*

Die Pathogenese der oralen Candidiasis wurde anhand von Tiermodellen, hauptsächlich Wistar und Sprague-Dawley Ratten (1, 8, 87, 88, 105, 114, 229) und Mäusen untersucht (18, 52, 62, 106, 134). Es zeigte sich, daß *C. albicans* schon im frühen Infektionsstadium zu klinisch sichtbaren Veränderungen der Gingiva, des Platum buccale und der Zunge im dorsalen Anteil führt; letztere scheint eine Prädilektionsstelle der persistierenden oralen Candidiasis zu sein.

Um die Ursachen für epitheliale Veränderungen bei einer Candidiasis zu eruieren, wurde *C. albicans* in die linke bukkale Schleimhaut von Ratten injiziert (213). Es zeigte sich, daß durch diesen Eingriff eine erhöhte Mitoserate im Epithel oberhalb der Injektionsstelle im Vergleich zur Gegenseite induziert wurde. Diese Ergebnisse deu-

ten darauf hin, daß *C. albicans* Substanzen produziert, die epitheliale Veränderungen hervorrufen. Durch diesen Versuch wurde eine frühere Untersuchung bestätigt, die nachweisen konnte, daß Tiere, denen eine palatinale Kunststoffplatte eingesetzt wurde, eine oberflächliche Infektion mit erhöhter Mitoseaktivität aufwiesen (250). Ob gleichzeitig klinische Veränderungen der Rattenmukosa vorhanden waren, wurde in diesen Arbeiten nicht angegeben.

Auch anhand eines Hamstermodells wurden Reaktionen der Mukosa auf *C. albicans* untersucht, wobei eine Suspension des Mikroorganismus in die Wangentasche der Tiere injiziert wurde (166), in Folge entstanden Mikroabszesse und eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten. Diese Methode scheint ebenfalls für Untersuchungen zur experimentellen Candidiasis geeignet zu sein. Anhand dieses Modells wurden in einer Langzeitstudie Auswirkungen einer chronischen Inokulation mit *C. albicans* in Hinblick auf die Entstehung von Dysplasien, Neoplasien und Candida-Leukoplakien untersucht (165). Nach zwei bis neun Monaten konnten nur bei einigen Tieren makroskopische Veränderungen, bei allen jedoch Mikroabszesse und Hyperparakeratose sowie eine deutliche Verbreiterung des Stratum corneum beobachtet werden. Der Untersuchungszeitraum schien jedoch nicht ausreichend, um eine Progression der Epithelveränderungen dokumentieren zu können. Wurde die Wangenmukosa der Tiere mit Terpentin zur Induktion einer Epithelhyperplasie vorbehandelt, führte diese Maßnahme nach vier Wochen zu einer klinisch und histologisch diagnostizierbaren Candida-Leukoplakie (90).

Um festzustellen, in welchem Maße Mikroorganismus-abhängige Faktoren die Entstehung einer Candidiasis beeinflussen, wurden *C. albicans*-Zellen einer Reihe von verschiedenen Verfahren unterzogen. In einer Studie sollte die Frage untersucht werden, welche morphologische Struktur von *C. albicans* (Hyphen- oder Hefeform) eher in der Lage ist eine orale Candidiasis zu induzieren (157). Hierzu wurden aus 2135 Hefestämmen zwei *C. albicans* Varianten identifiziert, wobei die eine ausschließlich Blastosporen und die andere nur Pseudohyphen, jedoch keine echten Hyphen oder Keimschläuche bildet. Diese Isolate und eine Keimschlauch-bildende Spezies wurden Ratten, denen zuvor eine palatinale Kunststoffplatte eingesetzt wurde, inokuliert. Beide Varianten waren nicht in der Lage eine Infektion oder klinische Veränderungen am Gaumen hervorzurufen. Anhand dieses Versuchs sollte gezeigt werden, daß eine orale Candidiasis nur von keimschlauchbildenden Stämmen induziert werden kann. Die kleine Zahl untersuchter Varianten läßt jedoch keine definitiven Aussagen zu.

Anhand von Rattenmodellen wurde veranschaulicht, daß stammbezogene Unterschiede in Hinblick auf die Pathogenität von *C. albicans* auf die orale Mukosa existieren. *C. albicans* Stämme aus vier verschiedenen Haut- und Schleimhautregionen wurden über einen Zeitraum von 25 Wochen einmal wöchentlich in die Mundhöhle der Tiere eingebracht. Zwei der inokulierten Stämme riefen keine klinischen und/oder histologischen Veränderungen der Zunge im Sinne einer Glossitis rhombica mediana hervor, die beiden weiteren jedoch waren dazu in der Lage (5). Ein Versuch mit 16 *C. albicans* Isolaten von Patienten, die vier klinische Formen einer oralen Candidiasis aufwiesen, zeigte, daß nur sechs dieser Stämme charakteristische Läsionen am Zungenrücken hervorriefen (4). Bei weiteren zehn Isolaten wurde lediglich eine Hyphenpenetration in die obersten Keratinschichten ohne klinische Veränderungen beobachtet. Anhand dieser Untersuchung wird deutlich, daß je nach verwendetem *C. albicans* Stamm ein unterschiedliches Spektrum an klinischen und histologischen Reaktionen am Zungenrücken der Ratte hervorgerufen werden kann. Tiere, die zusätzlich mit Cyclosporin A vorbehandelt wurden, erkrankten häufiger an einer Candidiasis als unbehandelte (10).

Spezies-abhängige Unterschiede wurden anhand eines Mausmodells (DBA/2J-Inzuchtmaus) nur an gastrointestinaler Schleimhaut untersucht. In keinem Falle wurde eine Organbeteiligung festgestellt. Wurden die Mäuse mit Zytostatika und Antibiotika vorbehandelt, so war *C. tropicalis* eher als *C. albicans* in der Lage, in die geschädigte Magenschleimhaut einzudringen. Diese Ergebnisse entsprechen klinischen Beobachtungen von Patienten nach Cytarabin-Therapie, die häufiger an einer disseminierten *C. tropicalis* Infektion als an *C. albicans* Infektionen erkrankten (289, 290).

1.7.2 Untersuchungen der oralen Candidiasis bei Beeinträchtigung des Immunsystems

Bekannt ist, daß die Kortikosteroid-Medikation eine orale Candidiasis induzieren kann. Dieses Phänomen wurde vor ca. 30 Jahren an Makakken untersucht, denen eine Akrylat-Vorrichtung zur Simulation einer Oberkiefer-Prothese eingegliedert wurde (42, 43). Nach Vorbehandlung dieser Tierspezies mit Kortikosteroiden aber auch bei längerer Beobachtungsdauer trat eine pseudomembranöse Candidiasis auf, pathologisch war eine Hyphen-Invasion in die Mukosa nachweisbar. Bei unbehandelten Tieren resultierte ein diffuses Erythem ohne Hyphen-Invasion, das sich innerhalb von drei Wochen zurückbildete. Wurden Ratten mit Kortikosteroiden und Antibiotika vorbehandelt, so entwickelten sie eine superfizielle Candida-Ösophagitis, bei Zugabe von Azathioprin zeigten sich größere und ausgedehntere Läsionen (71). In

einem Versuch wurde Mäusen *C. albicans* inokuliert und eine tägliche Keimzahlbestimmung vorgenommen. Zusätzlich erfolgte die Applikation eines Kortikosteroidgels (Fluocinonid, Topsy[®] Gel) auf die orale Mukosa der Maus. Nach 21 Tagen topischer Applikation resultierte ein durch Abstrichmethode ermittelter 400facher Anstieg der Keimzahl. Während der Dauer der Behandlung reduzierte sich die ortständige Population intraepithelialer CD4⁺-Zellen der oralen Mukosa und es kam zu einer Reduktion der T-Zellen im Lymphknoten (72). Ob der Anstieg der Keimmenge mit klinischen Veränderungen der Mukosa verbunden war, wurde in diesem Experiment nicht evaluiert.

Weitere pharmakologische Eingriffe in das Immunsystem wurden mit immunmodulierenden Präparaten, wie z.B. Cyclosporin A durchgeführt (130). Für dieses Modell erfolgte zunächst eine subkutane Luftinjektion in den Rücken von Mäusen. In diese künstlich pneumatisierten „Zysten“ wurde *C. albicans* injiziert, woraufhin sich bei den Tieren, die mit Cyclosporin A oder Kortison vorbehandelt wurden, auf der Zystenoberfläche Veränderungen ähnlich denen der pseudomembranösen Candidiasis entwickelten. Bei unbehandelten Mäusen fanden sich keine klinischen Veränderungen. Unter der Behandlung mit Cyclosporin A trat keine systemische Dissemination des Mikroorganismus auf. Anhand dieser Untersuchungen sollte gezeigt werden, daß durch eine Immunsuppression mit Cyclosporin A Abwehrmechanismen gegenüber der superfiziellen Form der Candidiasis beeinträchtigt werden, nicht jedoch die gegen die invasive Form, daher kann von zwei verschiedenen Abwehrmechanismen ausgegangen werden.

Untersuchungen an Mäusestämmen, die durch einen definierten angeborenen genetischen Defekt des Immunsystems charakterisiert waren, zeigten, daß der Verlust einer einzigen immunologischen Komponente (Neutrophilenfunktionsdefekt bei *bg/bg* Mäusen oder T-Lymphozytendefekt bei *nu/nu* Mäusen) lediglich eine schwache Empfänglichkeit gegenüber *C. albicans* zur Folge hatte. Die Kombination eines Defekts der zellvermittelten Immunität mit einem Phagozytendefekt (z. B. Neutrozytopenie) wie bei der *bg/bg nu/nu* Maus, führte zu plaqueähnlichen Läsionen sowohl an der Zunge als auch am harten Gaumen. Histopathologisch war eine deutliche Hyphen-Invasion in die Epithelschichten zu erkennen. Eine CD4⁺-Lymphozyten-Depletion bei Mäusen führte bei permanenter Inokulation von *C. albicans* durch das Trinkwasser zu einer intraoralen, nach zwei Wochen zusätzlich zu einer schweren ösophagealen Candidiasis, die auch noch vier Wochen nach Beendigung der Inokulation persistierte (52, 53). In weiteren Versuchen wurden keimfreie J(H)D Mäusen (B-Zell Knockout Mäuse) mit einer Reinkultur von *C. albicans* oral inokuliert. Es zeigte sich, daß diese

gegenüber einer oralen und disseminierten Candidiasis ebenso resistent sind wie immunkompetente Mäuse. Daraus kann geschlossen werden, daß die angeborene und erworbene T-Zell vermittelte Immunantwort ausreicht, um B-Zell Knockout Mäuse gegen mukosale und systemische Candidiasis zu schützen. Möglicherweise werden B-Zellen jedoch benötigt, um Mäuse vor einem primär intravenösen Eindringen von *C. albicans* zu schützen (282). Die zellvermittelte Immunität bei gnotobiotischen, mit *C. albicans* oral inokulierten Mäusen, wurde anhand von Korrelaten (Lymphozytenproliferation) untersucht (19). Keimfreie Mäuse ohne (*nu/nu*) und mit Thymus (*nu/+*) wiesen an der Cardia sowie an der dorsalen Zunge eine histologisch nachgewiesene Hyphen-Invasion auf. Die *nu/+* Mäusen reagierten auf Kolonisation und Infektion mit einer positiven Lymphozytenproliferation, die mit der Fähigkeit zu korrelieren schien, die Hyphen von Zunge und Magen zu entfernen. Bei den *nu/nu* Mäuse dagegen persistierte eine mukosale Candidiasis (Zunge/Magen) und eine Lymphozytenproliferation war nicht zu beobachten. Diese Studie zeigte, daß die T-Zell-vermittelte Immunität eine Rolle innerhalb der angeborenen Resistenz gegen eine mukosale Candidiasis spielen kann. Da jedoch weder *nu/nu* noch *nu/+* Mäuse eine progressive systemische Candidiasis entwickelten, scheinen T-Zellen keine maßgebliche Rolle bei der Resistenz der Mäuse gegenüber einer systemischen Candidiasis endogenen Ursprungs zu spielen (18, 19).

1.7.3 Untersuchungen bei systemischen Erkrankungen

Die orale Candidiasis ist charakteristischerweise assoziiert mit bestimmten systemischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Anämie. Um den Einfluß der endokrinen Störung auf die Entstehung einer Candidiasis zu evaluieren, wurden Wistar-Ratten mit dem diabetogenen Medikament Streptozotocin behandelt (77). Die Zunge wurde mit einer Einmaldosis von *C. albicans* inokuliert, als Folge trat eine chronische Mykose der Zungenschleimhaut mit klinischen Veränderungen der Zunge in Form des Verlustes der filiformen Papillen auf. Bei der Hälfte der untersuchten Tiere konnten noch bis zu 10 Monaten nach Inokulation Hyphen, jedoch keine klinischen Veränderungen, in den superfiziellen parakeratotischen Schichten beobachtet werden. Die Kontrollgruppe zeigte nach einmaliger Inokulation dagegen klinisch keine Zungenveränderungen.

Um den Einfluß der Eisenmangelanämie auf die Ausbildung der oralen Candidiasis zu beurteilen, wurden genetisch prädisponierte Mäuse (sex-linked anaemia Maus-Mutante) verwendet, die eine hypochrome, mikrozytäre Form der Anämie aufweisen (259). Dieser Status in Kombination mit einer Hydrokortison- und Tetracyclin-

Anreicherung des Trinkwassers der Tiere führte zur Etablierung einer oralen Candidiasis. Die Eisenmangelanämie an sich hatte hingegen keinen Einfluß auf die Empfänglichkeit der oralen Mukosa gegenüber *C. albicans*.

1.7.4 Untersuchungen der oralen Mukosa bei Veränderungen des Mundhöhlenmilieus

In einer Reihe von experimentellen Untersuchungen wurden Tieren im Oberkiefer Kunststoffplatten aus Acryl eingegliedert, um die Entstehung einer Candidiasis zu begünstigen. Diese Vorrichtung diente als Modell für den Einfluß einer Oberkieferprothese auf das Mundhöhlenmilieu des Menschen. In den ersten Studien, die sich mit dieser Fragestellung beschäftigten, dienten zunächst Affen als Versuchstiere (42, 192), aus tierschutzrechtlichen Gründen wurden in den folgenden Experimenten Ratten bevorzugt (137, 156, 178, 191, 247-250). Wurde zusätzlich eine Xerostomie induziert, z.B. mit dem Anticholinergikum Oxyphenzyklamin, erhöhte sich der klinische Ausprägungsgrad der Candidiasis (192). Bei Wistar-Ratten war die palatinale Candidiasis mit dem Vorhandensein einer Acrylvorrichtung assoziiert, ohne Platte entwickelte sich dagegen keine Candidiasis bzw. bildete sich diese nach Entfernung der Vorrichtung zurück (191, 247, 248). Anhand des selben Modells wurde die Wirkung verschiedener Hefen auf eine palatinale Infektion untersucht (156, 249). Ebenfalls unter Verwendung dieses Ansatzes wurden mögliche Therapien der Prothesenstomatitis getestet (137, 178).

Mit der Pathogenese der oralen Candidiasis wurde die Gabe von Antibiotika in Verbindung gebracht, da konkurrierende Bakterien vernichtet werden und das Hefenwachstum begünstigt wird. Im Tiermodell wurde hauptsächlich der Einfluß von Tetrazyklin untersucht, möglicherweise wegen seiner Breitspektrumaktivität und dem Zusammenhang mit der Entstehung einer Candidiasis beim Menschen. In einer Vielzahl von Protokollen wurden verschiedene Parameter, die mit einer Candidiasis unter Tetrazyklingabe verbunden sind, untersucht, einschließlich Dosis und Anwendungsschema (228, 230). Auf der Rattenzunge zeigte die kontinuierliche Behandlung mit Tetrazyklin bei gleichzeitiger Inokulation von *C. albicans* eine klinische Veränderung im Sinne einer sog. Glossitis rhombica mediana, was die Rolle von *C. albicans* bei der Entstehung dieser Läsion bestätigte (7, 228, 294). Dieses Rattenmodell zur Glossitis rhombica mediana wurde ebenso zur Untersuchung der Effektivität von Tetrazyklin bei der Etablierung einer Candidiasis bei keimfreien im Vergleich zu konventionellen Tieren eingesetzt (115) sowie bei Untersuchungen zum Einfluß einer kohlenhydratreichen Diät (102). Obwohl in vielen Studien gezeigt werden konnte, daß

Tetrazyklin die Entstehung einer oralen Candidiasis erleichtert, konnte zumindest eine Untersuchung nachweisen, daß auf eine Tetrazyklingabe verzichtet werden kann, wenn bei den Versuchen ein hochvirulenter Stamm von *C. albicans* eingesetzt wird (6).

Gnotobiotische Tiere wurden zur Untersuchung verschiedener infektiöser Mikroorganismen verwendet, da definierte Monoinfektionen ohne den Einfluß weiterer Bakterien oder Hefen möglich sind. So bietet diese Methode Vorteile, obwohl sie teuer und in der Durchführung problematisch sein kann. Frühere Studien zeigten, daß bei Verwendung keimfreier Liverpool Hooded Ratten die Etablierung einer oralen Candidiasis so effizient gelingt wie nach Tetrazyklingabe (115). Spätere Untersuchungen mit Sprague Dawley (275) und Inzucht-Ratten (Fischer 344 Albino) (276) zeigten, daß dieses Modell für Untersuchungen der oralen Candidiasis geeignet ist, obwohl bei beiden Tierspezies die Monoinfektion mit *C. albicans* innerhalb einiger Wochen abklang.

Da die Hyposalivation beim Menschen zu einer höheren Prävalenz einer oralen Candidiasis führt, wurden Tiermodelle zur Simulation einer humanen Xerostomie eingesetzt. Hierzu dienten Pharmaka bzw. die chirurgische Entfernung der Speicheldrüsen. In einer der ersten Studien zur Pathogenese der oralen Candidiasis im Tiermodell wurde Butylscopolaminiumbromid zur Induktion einer Xerostomie verabreicht. Man vermutete, auf diese Weise die Entstehung einer oralen Candidiasis bei Wistar Ratten unterstützen zu können (113). Es zeigte sich jedoch, daß Butylscopolaminiumbromid keinen entscheidenden Einfluß auf die Inzidenz einer Candidiasis im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen hatte. Neuere Studien, in denen die großen Speicheldrüsen der Ratten entfernt oder Ligaturen angelegt wurden, zeigten dagegen ein gehäuftes Auftreten von klinischen Veränderungen (Verlust der linguale Papillen) bei Tieren mit Xerostomie im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (117, 169). Nach Inokulation mit *C. albicans* konnte der Keim bei Tieren nach Sialadenektomie im Vergleich zu normalen Kontrollen über einen signifikant längeren Zeitraum in der Mundhöhle nachgewiesen werden (116). Nach Inokulation verschiedener *Candida spp.* bei sialadenektomierten Ratten wurde eine Kolonisation von *C. albicans* über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen nachgewiesen. *C. guilliermondii* und *C. krusei* hingegen konnten nach dem fünften Tag nicht mehr isoliert werden (269). In diesen Untersuchungen wurde nicht erfaßt, ob es neben einer Kolonisation auch zu klinischen Veränderungen der Mukosa kam.

Unter der Annahme, daß eine traumatisch geschädigte orale Mukosa empfänglicher für eine Infektion mit *Candida spp.* ist, wurde diese Hypothese am Rattenmodell untersucht (186). Histologisch konnte nachgewiesen werden, daß es im Bereich der

Zunge, die vor Inokulation einem Hitzetrauma ausgesetzt war, im Vergleich zu normalen Kontrollen sowohl zu einer schnelleren Hypheninvasion als auch zu einer größeren Anzahl von invadierenden Hyphen kam.

1.7.5 Studien zur antimykotischen Chemotherapie

Tierexperimentelle Untersuchungen der oralen Candidiasis sind für die Evaluation der Wirksamkeit von Antimykotika unabdingbar. Diese Studien wurden mit Hilfe des Kunststoffplatten-Tiermodells (137, 178) und des Glossitis-rhombica-mediana-Modells durchgeführt (9). Bei letzterer Untersuchung wurden die durch *C. albicans* induzierten chronischen Zungenläsionen mit einer systemischen Gabe von Ketocanazol behandelt. Innerhalb weniger Tage verschwanden die Läsionen, wobei das atrophierte Zungenepithel regenerierte und sich normale Zungenpapillen ausbildeten. Für weitere Untersuchungen wurde das Zystenmodell herangezogen (130). Es zeigte sich, daß Amphotericin B in hoher Dosierung, Fluconazol in geringerer Dosierung und Flucytosin mit einer geringeren Halbwertszeit effektiv gegen diese artifizielle Form einer pseudomembranösen Candidiasis ist (204, 205). Anhand des Zystenmodells konnte ebenfalls gezeigt werden, daß eine Kombination von Flucytosin und Amphotericin B wirksam ist gegen Flucytosin-resistente *C. albicans* Stämme, ebenso wurde eine signifikante Reduktion Flucytosin-resistenter Candida-Mutanten nach Behandlung mit dieser Kombination beobachtet (203). In weiteren Untersuchungen an immunsupprimierten Mäusen mit systemischer und lokalisierter oraler Candidiasis wurde gezeigt, daß liposomal verkapseltes Amphotericin B eine weitaus geringere antimykotische Aktivität aufweist als konventionelles Amphotericin B (194). Die Wirksamkeit von ER-30346, einem oralen Triazol, wurde am Rattenmodell untersucht. Es zeigte sich anhand der Abstrichmethode, daß ER 30346 die Zahl der mikrobiologisch nachweisbaren CFU/ml in der Mundhöhle reduzierte. Itraconazol war bei diesem Versuch weniger wirksam, Fluconazol ebenso wirksam wie ER-30346 (103). Durch den vermehrten Einsatz von Azolen stellt die Resistenzbildung ein zunehmendes Problem dar. Es zeigte sich, daß verschiedene *C. albicans* Stämme, die aus dem Oropharynx isoliert wurden, nicht mehr auf Azole ansprachen (140, 278). Dieser Effekt machte in den letzten Jahren die Entwicklung neuer Antimykotika notwendig, deren Effizienz am Maus-, Ratten- oder Kaninchenmodell untersucht wird (25, 155, 177, 201, 295).

1.8 Die Rolle der Adhärenz im Pathogenitätsprozeß

Voraussetzung für eine Infektion ist die Adhärenz des Mikroorganismus an Gewebe oder einzelne Zellen (197), sie gilt als initialer Abschnitt auf dem Weg zur Infektion (17, 32, 48, 55, 57, 67, 95, 224, 257). Eine Vielzahl von Untersuchungen zeigt, daß

die Adhärenzfähigkeit eines Keims zu dessen Virulenzfaktoren zählt. Zusammenfassend ergeben sich hieraus nachstehende Schlußfolgerungen

1. Die Pathogenität/Infektiosität verschiedener *Candida spp.* ist assoziiert mit deren Adhärenzfähigkeit. So adhäreren *C. albicans* und *C. tropicalis* stärker als die sog. apathogenen Spezies *C. krusei*, *C. kefyr* und *C. guilliermondi* (29, 48, 49, 83, 126, 173, 189, 211, 223). Entscheidend bei der Adhärenz dieser Keime ist weiterhin deren Lokalisation im Gewebe (225). *C. tropicalis* z. B. persistiert selten, ist jedoch nach Invasion ebenso pathogen wie *C. albicans*.
2. Spezies und Stämme mit geringer Adhärenzfähigkeit sind sowohl im Tiermodell als auch *in vitro* weniger virulent (17, 49, 67, 211).
3. Diese Beobachtungen konnten anhand von Spontanmutationen (50) bzw. durch selektives Herauszüchten wenig adhärenter Stämmen bestätigt werden (92, 121, 167).
4. Stämme, die aus klinisch manifesten Infektionen isoliert werden, adhäreren besser als Stämme, die als Kommensalen vorliegen (239, 246).
5. Ist man bei Studien zur *C. albicans*-Adhärenz zunächst von einem ubiquitären Adhäsion ausgegangen, das sich mit einem spezifischen Rezeptor verbindet (180), lassen aktuellere Untersuchungen darauf schließen, daß es sich sowohl bei dem Adhäsion um verschiedene Strukturen auf der Zellmembran des Mikroorganismus als auch um verschiedene humane Rezeptoren handelt (189). Ein wichtiger Mechanismus einer Adhäsion ist die Oligosaccharid-Lektin-Interaktion. Dabei binden Lektine der Pathogenoberfläche spezifisch an den Oligosaccharidanteil von Glykokonjugaten der Epithelzellen. Unter dem Begriff Lektin werden Oligosaccharid-bindende Proteine nicht-immunologischer Herkunft zusammengefaßt, die spezifische Bindungseigenschaften für Kohlenhydrate aufweisen und nach erfolgter Bindung keine enzymatische Aktivität entwickeln (127). Diese Bindung findet nur dann statt, wenn geeignete Oligosaccharide auf der Oberfläche der Mukosazellen exprimiert werden.

Die molekularen Mechanismen der Adhärenz lassen sich als sequentielle Verbindung mehrerer Faktoren auffassen, die in zwei Phasen abläuft (210, 211):

Zunächst erfolgt eine erste schwache und potentiell reversible Phase, bei der hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen („fibrillar layer“) und monovalente und daher niedrig-affine Lektin-Interaktionen eine Rolle spielen. Der Wechsel der Oberflächenladung von hydrophil nach hydrophob vollzieht sich, ausgelöst durch multiple externe

Stimuli unter anderem während der Ausbildung der Keimschläuche, d.h. der Initiation des pseudomyzelären Wachstums des Erregers (104). In der Folge findet eine dynamische Umstrukturierung der *Candida*-Oberfläche statt, wobei hier die sekretorische Protease beteiligt ist. Diese Umstrukturierung führt zur Demaskierung zusätzlicher adhäsiver Moleküle, die eine hohe Spezifität zur Zielzelle besitzen, wodurch letztlich der hochaffine Kontakt zwischen *C. albicans* und der Wirtszelle ermöglicht wird. Bei diesem zweiten Schritt spielen neben multivalenten Lektininteraktionen auch Peptid-Peptid-Interaktionen eine wesentliche Rolle (189). Hieraus wird ersichtlich, daß Vorgänge, die das Gleichgewicht zwischen Kommensalismus und Infektion beeinflussen, erst nach Adhäsion erfolgen.

Als zusätzliche Adhäsine wirken Faktoren wie die kontaktinduzierte Expression von Antigenen nach oder während der Adhärenz, welche einen Thigmotropismuseffekt vermitteln (17, 253) oder Signalkaskaden initiieren (107); weiterhin ein durch Kontakt gesetzter Stimulus zur Ausbildung von Keimschläuchen und die Sekretion zytolytischer Stoffwechselprodukte (189, 211). Gleichzeitig kann es sich bei den Oberflächenmolekülen des Keims, die der Adhärenz an den Wirt dienen, um Rezeptoren der zellulären Immunabwehr handeln. Besonders die Mannoproteine der Candidaoberfläche sind Zielproteine der zellvermittelten Immunabwehr (267).

1.8.1 Die Adhärenz beeinflussende Faktoren

Die Variabilität von *C. albicans* führte zu der Annahme, daß verschiedenen morphologischen Formen unterschiedliche pathogene Relevanz zukommt. So wurde z.B. der Nachweis der Hyphenform in klinischen Isolaten als Indikator für eine Infektion gedeutet und die Hefeform als die typische Struktur des Kommensalismus angesehen (180).

Die Untersuchungsergebnisse von Studien zum Einfluß verschiedener morphologischer Formen von *C. albicans* auf die Adhärenz sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Aus diesen Studien geht hervor, daß die Fähigkeit zur Ausbildung von Keimschläuchen die Adhärenz erhöht. Durch kompetitive Versuche an Zellen mit und ohne Keimschlauchbildung konnte ein selektives Attachment der gekeimten Formen nachgewiesen werden. Mit einer partiellen Inhibition der Keimung wurde dementsprechend eine geringere Adhärenz erreicht (122). Diese Korrelation scheint jedoch nur bei niedrigen Zellzahlen pro Milliliter eine Rolle zu spielen, bei höheren Zellzahlen (ab ca. 10^8) ist die Adhärenz von Zellen mit und ohne Keimschlauchbildung vergleichbar. Ursache hierfür scheint die gesteigerte Koadhäsion der Zellen zu sein (237).

Tab. 3: Untersuchungen zum Einfluß morphologischer Varianten von *C. albicans* auf die Adhärenz

| Untersuchungsergebnisse | Referenz |
|--|----------------------------------|
| Candida adhärert eher an humane Epithelzellen unter Bedingungen, die eine Keimschlauchbildung ermöglichen. | <i>Kimura et al.</i> 1978 |
| Der Prozentsatz der adhärerten Keime liegt bei gekeimten Zellen höher als bei ungekeimten Formen. | <i>Sandin et al.</i> 1982 |
| Candida-Zellen, die Keimschläuche entwickeln, adhäreren besser. | <i>Antley et al.</i> 1988 |
| Bei Raumtemperatur inkubierte Candida-Zellen bilden eher Keimschläuche aus und adhäreren besser. | <i>Antley et al.</i> 1988 |
| Nur 40 % der Blastosporen adhäreren an speichelüberzogenen Flächen, Keimschläuche adhäreren vollständig. | <i>Vasilas et al.</i> 1992 (279) |
| Die Adhärenz ist schwächer bei Blastosporen, die keine Keimschläuche ausbilden. | <i>Casanova et al.</i> 1989 |
| Keimung der Candida-Zellen steigerte die Adhärenz um 34 % gegenüber Zellen ohne Keimschlauchbildung. | <i>Rotrosen et al.</i> 1985 |
| Keimschlauch-bildende Zellen adhäreren besser als Hefezellen. | <i>Kimura et al.</i> 1980 |
| Die Hyphenform adhärert am stärksten, gefolgt von Keimschläuchen und Hefeformen. | <i>Anderson et al.</i> 1985 |
| Die Candida Variante, die in der Lage war Hyphen auszubilden, adhärert besser an vaginale Epithelzellen. | <i>Sobel et al.</i> 1981 |
| Die Myzelform vermittelt verstärkte Adhäsion. | <i>De Bernardis et al.</i> 1994 |

Untersuchungen von *Kimura et al.* konnten zeigen, daß die Anzahl adhäsionsfähiger Zellen mit der Anzahl gekeimter Zellen ansteigt (122), doch scheint darüber hinaus auch die Temperatur von Bedeutung. Keime, die bei 25°C inkubiert wurden, zeigten durch Zugabe von Cystein, welches die Keimschlauchbildung verhindert, einen höheren Adhärenzverlust als Keime, die bei 37°C gezüchtet wurden.

Trotz der Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Morphologie und Adhärenzverhalten fehlen bislang eindeutige Untersuchungsergebnisse. So könnten auch verschiedene Adhäsine, d.h. rezeptorähnliche Strukturen auf der Keimoberfläche mit denen das Pathogen spezifisch an den Wirt bindet, das Adhärenzverhalten beeinflussen (223). Für die unterschiedliche Adhärenzfähigkeit der jeweiligen morphologischen Form könnten auch qualitative Unterschiede im Adhäsinaufbau sowie die Expression keimschlauchspezifischer Adhäsine infrage kommen (223).

1.8.2 Die Hemmung der Adhärenz durch Muzin

Wie oben erwähnt, basiert ein molekularer Mechanismus der Adhärenz von *C. albicans* auf einer Oligosaccharid-Lektin-Interaktion (251), deren Spezifität als Lactosylceramid (Gal β 1-4Glc β 1-1Cer) (111) oder terminale Fuc α 1-2Gal β -Reste (40) beschrieben wurde. Diese Bindung findet jedoch nur dann statt, wenn geeignete Oligosaccharide auf der Oberfläche der Mukosazellen exprimiert werden.

Schon vor 20 Jahren konnte am Beispiel einer durch *E. coli* induzierten Cystitis der Maus gezeigt werden, daß lösliche Lektin-Rezeptoren (Glykokonjugate) spezifisch die Adhäsion und damit die Infektion inhibieren konnten (15, 263). Bekannt ist weiterhin, daß der Speichel eine inhibitorische Aktivität auf die Adhäsion von *C. albicans* aufweist (190). Obwohl die spezifischen Komponenten des Speichels, welche die Adhäsion von *C. albicans* vermitteln, noch nicht bekannt sind (51), wurde nachgewiesen, daß hoch- und niedrigmolekulare Muzine als Rezeptoren am Adhärenzprozeß beteiligt sind (80). Muzine sind Glykoproteine, die im Speichel in flüssiger Phase vorliegen, aber auch als feste Phase die Oberflächen benetzen können und nach Anlagerung weiterer Speichelbestandteile das sogenannte Pellicle bilden.

Die Muzine unterscheiden sich in ihrer adhäsionsvermittelnden Struktur. Das hochmolekulare (über 10^3 kD) enthält höhere Anteile an O-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden als das niedrigmolekulare (200-250 kD). Das niedrigmolekulare Muzin enthält zusätzlich einige N-glykosidisch verknüpfte Glykoproteine (145). Beide Muzine sind an der Interaktion mit Keimen beteiligt. Diese Reaktionen können an festen Oberflächen oder in der Flüssigphase des Speichels stattfinden. Die Anhaftung der Keime an muzinbenetzte Oberflächen führt meist zur Kolonisation der Oberflächen, die Adhäsion an die Flüssigphase zur Desorption aus dem Organismus. Zusammenfassend können Muzine also als ein Regulativ der Adhärenz angesehen werden, welches von der immunvermittelten Abwehr unabhängig ist.

1.9 Fragestellung und Zielsetzung

Aus der Literaturübersicht wird deutlich, daß

1. in Tiermodellen zur oralen Candidiasis verwendete *C. albicans* Stämme überwiegend nicht frei verfügbar, die Aufbereitungsmethoden der Mikroorganismen heterogen und somit die Ergebnisse nicht eindeutig reproduzierbar waren. Zur Gewährleistung der Reliabilität der Versuche ist daher für ein weiteres Candidiasismodell die Verwendung eines international verfügbaren Stammes sowie die Standardisierung der Keimaufbereitung im Labor erforderlich. Eine Empfehlung der Festlegung von

Parametern wie Inkubationstemperatur und -dauer wäre Grundlage für die Vergleichbarkeit von Forschungsergebnisse mit *C. albicans*.

2. die Bedeutung der Keimmenge für die Wahrscheinlichkeit einer oralen Candidiasis in Abhängigkeit vom Immunstatus nach wie vor nicht geklärt ist. Keine Form der Candidiasis ist mit Keimzahlen in Rachenspülungen bzw. Abstrichen korreliert. Lediglich die Besiedlung der Mundhöhle und der Wirt als Keimträger kann hierdurch nachgewiesen werden. Bei einem fakultativ pathogenen Erreger wie *C. albicans* ist es - trotz spezifischer phänotypischer Charakteristika des Keims – schließlich abhängig von der Suszeptibilität des Wirtes, ob eine Kolonisation, Infektion oder Infektions-erkrankung mit klinischer Symptomatik entsteht.

3. die derzeitige antimikrobielle Therapie einer oropharyngealen Candidiasis primär auf einer fungiziden oder fungistatischen Wirkung der verwendeten Substanzen beruht, wobei die Behandlung vorrangig mit der systemischen Gabe des Azolderivates Fluconazol erfolgt. Ein alternativer Therapieansatz wäre, die der Infektion vorangehende Adhäsion der Erreger zu blockieren. In Analogie zu den Ergebnissen bei *E. coli* Infektionen des Urogenitaltrakts könnte die Applikation von Muzin (oder dessen Spaltprodukten) bei oraler Candidiasis einen protektiven bzw. therapeutischen Effekt haben.

4. eine Adhäsion von Mikroorganismen an lösliches Muzin zu einer Desorption aus dem Organismus führt. Eine spezifische Bindung von *C. albicans* an Muzin und mögliche Unterschiede in der Bindungskapazität verschiedener Stämme wurde bisher nicht untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es anhand eines Candidiasismodells bei immundefizienten und immunkompetenten Mäusen folgende Fragen zu klären:

1. Gibt es eine Abhängigkeit zwischen inokulierter Keimmenge und der Entstehung einer *C. albicans* –Infektion (Dosis-Wirkungsbeziehung). Lässt sich ein Unterschied bezüglich der für eine Infektion notwendigen minimalen Infektionsdosis zwischen immundefizienten und immunkompetenten Tieren zeigen.

2. Welche zelluläre Immunantwort findet in der oralen Mukosa als Reaktion auf eine Inokulation mit definierten Keimmengen statt.

Hierzu sollen insbesondere die bei einer Candida-Infektion relevanten Funktionen immunkompetenter Zellen charakterisiert sowie deren Anzahl bei immunkompetenten und immundefizienten Mäusen untersucht werden. Weiterhin soll die Reaktion des subepithelialen Endothels auf die Adhärenz von *C. albicans* dargestellt werden.

3. Ist durch Inhibition der Adhärenz von *C. albicans* an murine Epithelzellen mittels gleichzeitiger lokaler Applikation von Muzinen bzw. dessen Spaltprodukten auf die intakte orale Wirtsschleimhaut eine protektive Wirkung auf die Ausprägung der Infektion möglich. *In vitro* Untersuchungen sollten vorab zeigen, ob eine Standardisierung temperaturabhängiger Prozesse im Labor notwendig ist, um eine bessere Reproduzierbarkeit von Studien mit *C. albicans* zu gewährleisten. Weiterhin sollte gezeigt werden, ob unter standardisierten Bedingungen verschiedene *C. albicans* Stämme unterschiedliche spezifische Bindungen an Muzin aufweisen.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeiten werden Informationen über die mögliche Existenz einer unterschiedlichen Infektionsschwelle als auch ein neuer pathobiochemischer Ansatz im Sinne einer Adhärenzinhibition überprüft. Aus Unterschieden in der lokalen Reaktivität bei einer unterschiedlichen Infektionsschwelle könnten Rückschlüsse auf Veränderungen der lokalen Immunmechanismen gezogen werden.

Die Untersuchungen wurden unterstützt von der Universitären Forschungsförderung der Charité (Projekt-Nr. 98-176) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK). Die Firma Medac stellte das Muzinprodukt (Saliva medac[®]) bereit.

2 Material und Methoden

2.1 Vorversuch: Bestimmung von Oligosaccharid-Lektin-vermittelten Adhäsionsmechanismen an acht verschiedenen *C. albicans* Stämmen

In folgendem wird eine Untersuchung zusammenfassend dargestellt, die in Zusammenarbeit mit dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie (Charité) durchgeführt wurde. Zunächst sollte die spezifische Bindung acht verschiedener *C. albicans* Stämme an Muzin und dessen enzymatischen Aufspaltungprodukte, den Glykopeptiden, untersucht werden. Gleichzeitig sollte festgestellt werden, ob Laborparameter wie Inkubationstemperatur und die Inkubationsdauer einen Einfluß auf die Expression von Muzinrezeptoren haben, um diese für den nachfolgenden Tierversuch standardisiert anwenden zu können.

Die Untersuchung der spezifischen Bindungskapazität wurde bei vorheriger Thermoinkubation der *C. albicans*-Zellen in einem Temperaturintervall von 23 bis 39°C vorgenommen. Dabei sollen Temperatur/Zeitkinetiken aufgestellt und bei verschiedenen *C. albicans* Stämmen vergleichend untersucht werden.

Tab. 4: Untersuchte *C. albicans* Stämme

| Stammbezeichnung | Entnahmeort |
|-----------------------|---------------|
| DSM 1386 (ATCC 10231) | Bronchomykose |
| DSM 1577 | Keine Angabe |
| DSM 1665 (ATCC 2091) | Keine Angabe |
| DSM 3454 (ATCC 32032) | Vagina |
| DSM 5817 (ATCC 10259) | Onychomykose |
| DSM 6569 (ATCC 14053) | Blut |
| DSM 6659 | Keine Angabe |
| DSM 70014 | Sputum |

Die in Klammern hinter den Stammbezeichnungen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM, Braunschweig) aufgeführten Nummern kennzeichnen die Hinterlegung bei der American Type Culture Collection; ATCC, Rockville, USA.

Es wurden acht *C. albicans* Stämme aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) ausgewählt und die mögliche Veränderung der Adhärenz durch lösliche Muzine und deren durch enzymatische Hydrolyse gewonnenen Spaltprodukte (Glykopeptide), untersucht (Tab. 4).

Die Oberfläche der Zellen wurde dafür mit Biotin markiert und diese später auf muzinbeschichteten Mikrotiterplatten mit oder ohne der Zugabe von löslichem Muzin inkubiert.

2.1.1 Verwendetes Muzin

Das verwendete Muzin ist unter dem Namen Saliva medac[®] kommerziell verfügbar. 1ml enthält als arzneilich wirksamen Bestandteil 35mg Muzin aus dem Magen des Schweins, sonstige Bestandteile sind Methyl-4-hydroxybenzoat 1mg, Benzalkoniumchlorid, Natrium-EDTA, Wasserstoffperoxid, Xylitol, Pfefferminzöl und gereinigtes Wasser. Vor dem Einsatz werden die niedermolekularen Bestandteile durch Ultrafiltration entfernt, die Ausschlußgröße betrug 10 kD.

Die spezifische Bindung wurde aus der Differenz der Extinktionen beider Gruppen ermittelt. Die Färbung wurde mit Streptavidin-Peroxidase und Tetramethylbenzidine vorgenommen.

2.1.2 Herstellung der Glykopeptide aus Muzin

2g Muzin wurden in 100 ml Trispuffer gelöst und dreimal mit diesem Puffer über eine Ultrafiltrationsmembran mit einer Ausschlußgröße von 10 kD gewaschen. 20mg Proteinase K (Boehringer, Mannheim) wurde dem Muzin zugegeben, die Inkubation fand bei 4°C über Nacht statt. Zur Abtrennung der Glykopeptide von der Protease sowie dem nicht hydrolysierten Muzin wurde dieses Gemisch erneut über eine 10 kD Membran ultrafiltriert. Das Volumen wurde mit Trispuffer auf die Ausgangsmenge aufgefüllt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Die Ergebnisse des Vorversuchs zeigten, daß eine spezifische Bindung an Muzin für alle untersuchten Stämme vorliegt. Die mittlere relative spezifische Bindung lag bei 38 % der gemessenen Gesamtbindung, alle acht untersuchten Stämme zeigten jedoch zusätzlich eine individuelle Bindungsfähigkeit (34-42 %). Diese Bindung ist temperaturabhängig, mit Maxima in höheren Temperaturbereichen. Für alle Stämme setzte die Temperatur einen Stimulus zur Ausbildung von Adhäsinen unabhängig von der Makromorphologie des Keims. Die Antwort auf den Temperaturreiz war zeitabhängig. Die Ausbildung der Adhäsine nach Thermoinkubation zeigte eine zweigipfelige Verteilung, deren Maxima bei 20 und 40 Minuten lagen.

Glykopeptide wiesen im Vergleich zu Muzin eine höhere spezifische Bindung an *C. albicans* (DSM 5817) auf, was anhand einer Kurve, die die Verdünnungsschritte in

bezug auf den Median der relativen spezifischen Bindung (RSB) darstellt, gezeigt werden konnte (Abb. 1). Die Ausgangskonzentration von Muzin betrug dabei 35 mg/ml, die der Glykopeptidlösung 20 mg/ml.

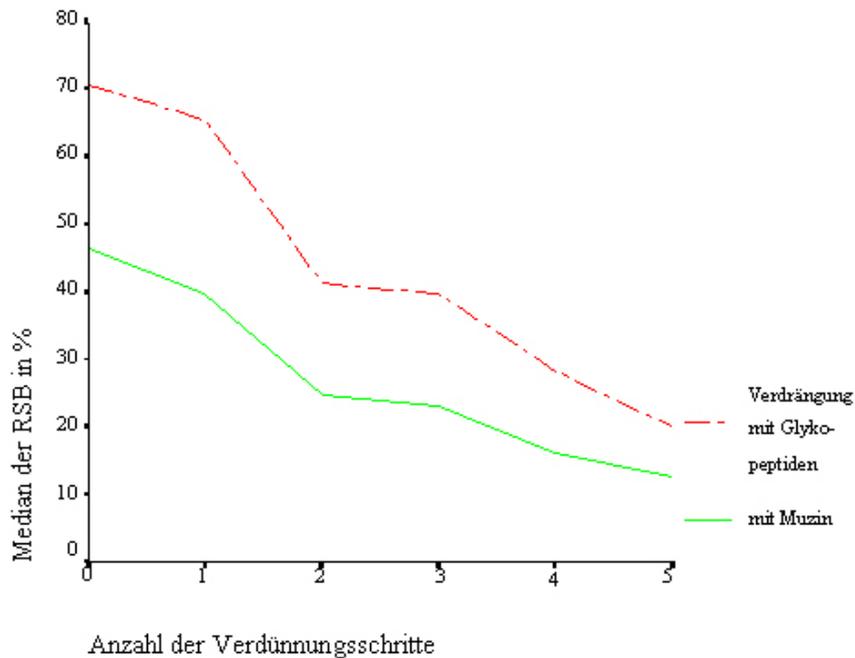


Abb. 1: Spezifische Muzin- und Glykopeptidbindung an *C. albicans* (Stamm: DSM 5817)

Der Wert 0 auf der Abszisse zeigt an, daß lösliches Muzin in der Ausgangskonzentration vorlag, die in den Versuchen eingesetzt wurden. Pro Schritt wurde im Verhältnis 1:2 verdünnt.

2.2 Tierexperimentelle Untersuchungen

2.2.1 Tierversuchsgenehmigung

Die folgenden Tierversuche wurden entsprechend dem Tierschutzgesetz (Fassung vom 17.2.1993) vorgenommen, durch den Tierschutzbeauftragten der Charité genehmigt und über die Senatsverwaltung für Gesundheit unter dem Zeichen 0342/97 vom 6.11.97 bewilligt.

2.2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für die Versuchsreihen wurden folgende Mäusestämme verwendet

1. männliche, homozygote Inzuchtmäuse (Balb/cAnCCrIBR) Haplotyp: H-2^d, Farbe: Albino (n=27)
2. männliche SCID Mäuse (**s**evere **c**ombined immunodeficiency) (n=30).

Diese Tiere zeichnen sich durch einen schweren kombinierten B- und T-Zelldefekt aus. Sie sind homozygot für das SCID-Gen (C. B-17/lcr scid/scid) sowie coisogen mit dem normalen C. B-17/lcr +/+ Stamm. Die Zucht dieses Stammes erfolgt im Isolator.

Beide Stämme wurden von der Firma Charles River, Deutschland, bezogen. Ihr Alter betrug zum Zeitpunkt der Lieferung 6 - 8 Wochen bei einem Gewicht von 18-20 g.

Die Tiere wurden ab dem Zeitpunkt der Lieferung in Gruppen von jeweils 3 Tieren in einem Standardkäfig Typ 2 (Kunststoffwanne mit Drahtdeckel, Grundfläche 350 cm²) gehalten. Die Fütterung erfolgte in Form von Alleinfutter in pelletierter Form bestehend aus 7-12 % Rohprotein, 2 % Rohfett, 6-8 % Rohfaser und 5-8 % Rohasche. Die Futter- und Wasseraufnahme erfolgte *ad libitum*.

Die Einstreu der Tiere (Weichholzgranulat und Holzwolle, staubfrei, autoklavierbar) wurde einmal wöchentlich, die Tränkflaschen wurden dreimal wöchentlich erneuert. Käfige und Trinkflaschen wurden mit einem Spülmittel gereinigt, desinfiziert (Inzidin extra[®] N) und anschließend autoklaviert.

Der Tag und Nachtrhythmus betrug je 12 Stunden.

Vor Beginn der experimentellen Untersuchungen erfolgte zunächst eine 7tägige Akklimatisierungsphase.

Die Haltung der SCID Mäuse

Aufgrund der hochgradigen Immundefizienz wurden die Käfige der SCID Mäuse in einem Isolator untergebracht, die Umweltbedingungen waren bei einer Temperatur von 20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65 % konstant.

Die Tiere erhielten Futter und Wasser in sterilisierter Form, ebenso war die Sterilisation von Einstreu und Käfigkomponenten gewährleistet.

Das Wasser der Versuchstiere wurde vom 1. – 7. Tag mit 0,1 % Tetracyclinhydrochlorid, vom 8. - 14. Tag mit 0,01 % Lösung versetzt.

2.2.3 Verwendeter *C. albicans* Stamm

Der Stamm (Stammbezeichnung DSM 3454, Herkunft: Vagina) wurde als gefriergetrocknete Kultur von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Bei der American Type Culture Collection, Rockville, USA ist ein identischer Stamm unter der Bezeichnung ATCC 32032 hinterlegt. Innerhalb kurzer Zeit nach Erhalt der Stämme von der DSMZ wurde eine Stammsuspension mit definierter Zellzahl angelegt, sofort schockgefroren und tiefgekühlt gelagert.

Der Stamm wurde nach Empfehlung des Herstellers auf Agarplatten (Sabouraud-Glukose Agar mit Zusatz von 5mg Penicillin/Streptomycin/500ml Agarmedium) übernommen, vier Tage bei Raumtemperatur inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Spätestens alle vier Wochen wurde der Stamm überimpft, d.h. mit sterilen Schlaufen aufgenommen und auf frischen Agarplatten ausgestrichen.

Um von standardisierten Zellzahlen ausgehen zu können, wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen in Flüssigmedium (RPMI 1640) aufgenommen und mit Hilfe eines automatischen Cytometer auf eine Zellzahl von ca. 1×10^6 bis 1×10^{10} pro ml - je nach benötigter Dosierung - eingestellt.

Der Stamm wurde danach ohne Flüssigmedium mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Durch Zugabe von frischem RPMI und Lagerung bei 4°C über einen Zeitraum von ca. einer halben Stunde wurden der Stamm jeweils direkt vor Beginn des Experiments aufgetaut.

Die jeweils benötigte Keimzahl wurde für die Inokulation der Tiere in sterilem PBS gelöst.

2.2.4 Versuchsplanung

Die Tierversuche lassen sich, thematisch gesehen, in zwei Abschnitte unterteilen:

Versuchsreihe A:

Basisversuch zur Bestimmung der minimalen Infektionsdosis

Versuchsreihe B:

Untersuchung zur Inhibition der Adhärenz von *C. albicans* an murine Epithelzellen mittels lokaler Applikation der in Versuchsreihe A ermittelten minimalen Infektionsdosis und Glykopeptiden.

Versuchsreihe A diente zur Bestimmung der minimalen Infektionsdosis dar. Hierzu wurde ein dichotomes Verfahren verwendet. Es handelt sich bei dieser Methode um eine etablierte Vorgehensweise zur Ermittlung von Inokulationsdosen im Sinne einer Schrittopтимierung:

Jeweils eine Gruppe von 3 Balb/c Mäusen und eine Gruppe von 3 SCID Mäusen wurde mit einer definierten einmaligen Dosis von *C. albicans* inokuliert (Abb. 2). Begonnen wurde mit einer Inokulationsdosis von 10^6 *C. albicans*-Zellen/10 μ l, die den Tieren oral mittels Eppendorf-Pipette verabreicht wurde.

∅ keine *C. albicans* Infektion

⊕ *C. albicans* Infektion

| | | | | | | | | | |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|----------------------------|
| 1x10 ⁶ Keime | wenn 8 2/3 ⊕ ⇒ | 1x10 ⁵ Keime | wenn 8 2/3 ⊕ ⇒ | 1x10 ⁴ Keime | wenn 8 2/3 ⊕ ⇒ | 1x10 ³ Keime | | | |
| 3 Mäuse | | 3 Mäuse | wenn < 2/3 ⊕ ↓ | 3 Mäuse | wenn < 2/3 ⊕ ↓ | 3 Mäuse | | | |
| | wenn < 2/3 ⊕ ↓ | | 1x10 ⁶ Keime | | 1x10 ⁷ Keime | | | | |
| | 1x10 ⁷ Keime | wenn 7 2/3 ⊕ ⇒ | 1x10 ⁸ Keime | wenn 7 2/3 ⊕ ⇒ | 3x10 ⁶ Keime | wenn 7 2/3 ⊕ ⇒ | 3x10 ⁷ Keime | wenn 7 2/3 ⊕ ⇒ | 3x10 ⁸ Keime |
| 3 Mäuse | wenn > 2/3 ⊕ ↓ | 3 Mäuse | wenn > 2/3 ⊕ ↓ |
| | 1x10 ⁷ Keime | | 1x10 ⁸ Keime | | 3x10 ⁶ Keime | | 3x10 ⁷ Keime | | 3x10 ⁸ Keime |

Abb. 2: Verfahren zur Bestimmung der minimalen Infektionsdosis

Bei der Inokulation der Substanzen bedurfte es keiner Sedierung der Versuchstiere, da diese die ihnen angebotene Substanz bereitwillig und vollständig aufnahmen.

Eine Woche *post inoculationem* wurden die Tiere mit einem Gemisch aus CO₂/O₂ getötet. Es folgte die Entnahme der Zunge.

Eine Hälfte der Zunge (Längsschnitt) wurde in 10 %, gepuffertem, wässrigem Formalin fixiert. Die formalinfixierten Zungenhälften wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und für die Paraffineinbettung in das Duplex-Gerät (Fa. Shandon, England) zur Paraffindurchtränkung eingebracht. Am darauffolgenden Tag wurden die Präparate ausgebettet, in Blöcke gegossen und am Schlittenmikrotom (Fa. Leitz,

Deutschland) 5 µm dicke Serienschnitte in einem Abstand von 10-30 µm hergestellt. Anschließend erfolgte die Periodic-Acid-Schiff (PAS) -Färbung.

Die andere Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -75°C bis zur weiteren Verarbeitung asserviert.

Die Serienschnitte (PAS-Methode) wurden pro Präparat nach folgenden Kriterien beurteilt: Eine Infektion lag dann vor, wenn mindestens ein Schnitt eine Candida-Struktur im Stratum corneum der Papillae filiformes aufwies. Damit galt das Tier als positiv. Wurden 2/3 Mäusen, denen dieselbe Dosis verabreicht wurde, als positiv bewertet, so erfolgte eine Dosisreduktion um eine log Stufe und Inokulation bei wiederum 3 Mäusen, bis weniger als zwei Mäuse infiziert waren (Abb. 2). Diese „Schwelle“, d. h. die Keimmenge, die gerade noch in der Lage war, die Zunge von 2/3 Mäusen zu infizieren, wurde durch einen weiteren Inokulationsversuch mit derselben Keimmenge wiederholt. Wurde die Dosis bestätigt, diente diese als Grundlage für die Versuchsreihe B „Adhärenzinhibition durch Glykopeptide“.

Tabelle 5 zeigt die in Versuchsreihe A verwendete Anzahl von Tieren pro Inokulationsdosis

Tab. 5: Übersicht über die Anzahl der Versuchstiere, die für die Versuchsreihe A (Bestimmung der minimalen Infektionsdosis) verwendet wurden

| Tierstamm | Keime/10 µl | Anzahl der Tiere |
|-----------|------------------|------------------|
| Balb/c | 10^5 | n=3 |
| | 10^6 | n=3 |
| | 10^7 | n=6 |
| | 10^8 | n=6 |
| | ohne (Kontrolle) | n=1 |
| | | gesamt: n=19 |
| SCID | 10^4 | n=2 |
| | 10^5 | n=6 |
| | 10^6 | n=3 |
| | 10^7 | n=6 |
| | ohne (Kontrolle) | n=4 |
| | | gesamt: n=21 |

Für Versuchsreihe B wurden 8 Balb/c Mäuse und 8 SCID Mäuse mit einer Suspension inokuliert, die aus der in Versuchsreihe A ermittelten Keimmenge und 10µl Glykopeptidlösung bestand. Eine SCID Maus wurde nur mit Glykopeptiden inokuliert.

2.3 Histologische Technik

2.3.1 Periodic-Acid-Schiff Reaktion (PAS)

Die Paraffinschnitte (5 µm) wurden wie folgt behandelt:

1. Schnitte in Xylol entparaffinieren
2. In absteigender Alkoholreihe (abs. Alkohol, 96 % Äthanol, 70 % Äthanol, Aqua dest.) wässern
3. 5 min. in 0,5 % Perjodsäure vorbehandeln
4. 1-2 min. in *aqua dest.* spülen
5. 15 min. in *Schiff*'schem Reagenz einbringen
6. dreimaliges Waschen in *aqua dest.*
7. 3-5 min. Kernfärbung mit Hämalaun
8. Bläuen der Kerne unter fließendem Leitungswasser
9. Spülen in *aqua dest.*
10. Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 % Äthanol, 96 % Äthanol, abs. Alkohol, Xylol) entwässern und mit Eukitt[®] eindeckeln.

2.3.1.1 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Serienschnitte erfolgte von einem Untersucher standardisiert an einem Labolux 12 Mikroskop bei 400facher Vergrößerung. Ließen sich in einem Schnitt PAS-positive Strukturen (Hyphen) nachweisen, wurde der Schnitt als positiv bewertet. Zusätzlich wurde das Vorhandensein eines subepithelialen Leukozyteninfiltrats in diesem Bereich dokumentiert.

Dieses wurde wie folgt semiquantitativ eingestuft:

| | | |
|----------------------|---|-----|
| keine Leukozyten | = | 0 |
| wenige Leukozyten | = | (+) |
| deutliches Infiltrat | = | + |

2.3.2 Kryostatschnitte

Für die Untersuchungen zur Bestimmung der Immunreaktion in Abhängigkeit von der Inokulationsdosis wurden von den in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Gewebeproben 5 - 7 µm dicke konsekutive Gefrierschnitte (Kryostat 1720 Leitz, Wetzlar, Deutschland), die auf fortlaufend nummerierte Objektträger aufgebracht wurden, angefertigt. Nach einstündiger Lufttrocknung bei Raumtemperatur und 10 min. Fixierung in Azeton (Aceton ZA. Merck, Darmstadt, Deutschland) erfolgte die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung in Kühltruhen bei 75°C.

2.3.3 Die Immunperoxidase-Methode Testprinzip

Die Aceton-fixierten Gefrierschnitte der zweiten Zungenhälfte wurden aufgetaut und getrocknet. Danach folgte die Immunperoxidase Reaktion.

Bei dem Immunperoxidase- Verfahren handelt es sich um ein immunhistochemisches Nachweisverfahren, dessen Prinzip auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruht, die durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht wird. Neben den Antikörpern selbst wird das Enzym Peroxidase, das mit Chromogenen ein Farbprodukt bildet, verwendet. Vier Methoden stehen hierbei zur Verfügung: 1. die direkte, 2. die indirekte, 3. Die Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) und 4. Die (Strept-) Avidin-Biotin-Methode. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde die PAP-Methode sowie die Streptavidin-Biotin-Methode eingesetzt.

2.3.3.1 Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) -Methode (Abb. 3)

Bei dieser Methode werden drei Reagenzien benötigt: Primärantikörper, Sekundärantikörper und der PAP-Komplex bestehend aus dem Enzym Peroxidase und einem Antikörper gegen Peroxidase. Der Primärantikörper ist spezifisch gegen das Antigen gerichtet. Der Sekundär- oder Brückenantikörper (link antibody) kann sowohl an den Primärantikörper als auch an den PAP-Komplex binden, da beide in derselben Tierart hergestellt wurden. Der Brückenantikörper wird im Überschuss zugefügt; dadurch bindet nur eine Hälfte seines *Fab* Fragments an den Primärantikörper, die andere Hälfte bleibt frei zur Bindung an den Antikörper des PAP-Komplexes. Das Enzym Peroxidase wird durch eine Substrat-Chromogenreaktion sichtbar gemacht.

2.3.3.2 (Strept-) Avidin-Biotin-Methode (Abb. 3)

Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Avidins, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Wie bei der PAP-Methode werden drei Reagenzien benötigt: 1. Primärantikörper 2. Sekundärantikörper konjugiert mit Biotin 3. Peroxidase

konjugierter (Strept-) Avidin-Biotin-Komplex. Die freien Stellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase - und damit das gesuchte Antigen - wird mit einem geeigneten Chromogen sichtbar gemacht.

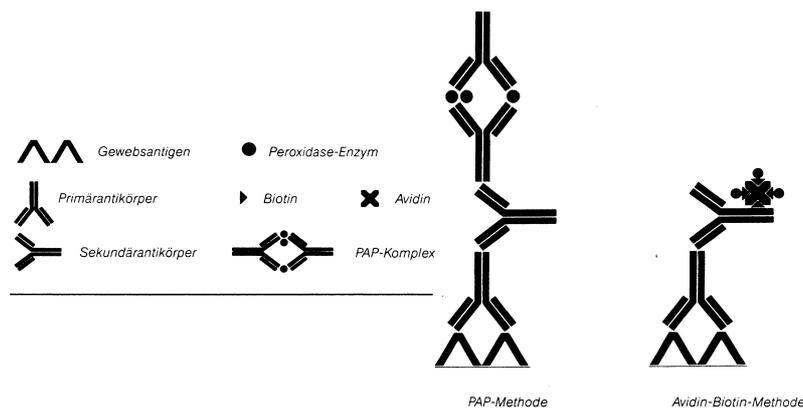


Abb. 3: Prinzip der Peroxidase-Antiperoxidase- sowie der Avidin-Biotin-Methode (modifiziert nach einer Produktbeschreibung der Firma DAKO Diagnostika GmbH Hamburg, Deutschland)

2.3.3.3 Arbeitsablauf der Immunperoxidase-Technik

Die Kryostatschnitte (5-7 μm) wurden wie folgt behandelt:

| | |
|--|-------------|
| Auftauen und Lufttrocknung der Präparate | 20 min |
| Fixierung in Azeton | 15 min |
| Präinkubation (Albumin oder Normalserum) | 15 min |
| Abspülen mit PBS | |
| Inkubation mit Primärantikörper | 60 min |
| Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit H_2O_2 | 10 min |
| Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| Inkubation mit Sekundär Antikörper | 40 – 60 min |
| Waschen in PBS | 3 x 05 min |
| Farbentwicklung mit AEC auf dem Schüttler | 15 – 20 min |
| Reaktion in H_2O stoppen | |
| Gegenfärbung (Kernfärbung) mit saurem Hämalaun | 2 min |
| Abspülen in H_2O (Bläuen) | |
| Wäßriges Eindeckeln mit Kaiser´s Glycerin-Gelatine | |

2.3.3.4 Verwendete Antikörper

Primärantikörper

Für die immunhistochemischen Untersuchungen mit Hilfe der Immunperoxidase-Methode wurden gereinigte Antikörper gegen Maus-Zell-Oberflächenmoleküle eingesetzt (Hersteller: Pharmingen, Hamburg, Deutschland), die in Tabelle 6 dargestellt sind.

Es wurden Antikörper ausgewählt, die mit Differenzierungsantigenen reagieren,

1. die auf Zellen exprimiert werden, die bei der Antigenverarbeitung von *C. albicans* eine Rolle spielen (antigenpräsentierende Zellen mit Expression von Klasse II MHC-Molekülen)
2. deren Expression am Endothel durch Stimulation mittels inflammatorischer Mediatoren (Zytokine) hochreguliert wird.

Tab. 6: Primärantikörper und deren Spezifität sowie Arbeitshinweise zur Darstellung der Antigenverarbeitung von *C. albicans*

| Spezifität | Clone | Arbeits- verdünnung | markierte Zellen und Moleküle |
|--|---------|------------------------|---|
| CD4 | RM4-5 | 1:45 | Helfer-T-Zellen |
| CD13 | R3-242 | 1:50 | Aminopeptidase N auf DZ, (BZ), Makrophagen |
| CD54 (ICAM-1) | 3E2 | 1:200 | akt. Endothel (ICAM-1), DZ, (akt.) Lymphozyten, Makrophagen |
| CD 62E (E-Selectin, E-LAM-1) | 10E9.6 | 1:50 | akt. Endothel (E-Selectin) |
| CD74 | In-1 | 1:100 | MHC-Klasse II-assoziierte invariante Kette (Ii) (involviert in intrazellulären Transport von MHC-Klasse II Molekülen und Antigenpräsentation) |
| CD80 | 16-10A1 | 1:90 | (akt.) Makrophagen, DZ, (akt.) BZ |
| CD86 (B7-2) | GL1 | 1:50 | (akt.) Makrophagen, DZ, (akt.) BZ |
| CD103 (Integrin α_{IEL} chain) | 2E7 | 1:200 | CD8 ⁺ -Zellen in Lamina propria |

Sekundärantikörper für CD 4, CD 13, CD 62E, CD 74, CD 86

Horseradish peroxidase (HRP) –conjugated goat anti-rat immunoglobulin-specific polyclonal antibody (multiple absorption) 1:110

(Fa. Pharmingen, Hamburg, Catalog Nr. 12117E)

Sekundärantikörper für CD 54, CD 80, CD 103

1. Biotin-conjugated mouse anti-rat and hamster Ig, light chain 1:200

(Fa. Pharmingen, Hamburg, Catalog Nr. 10132D) und

2. Streptavidin-horseradish peroxidase (Sav-HRP) conjugate 1:600

(Fa. Pharmingen, Hamburg, Catalog Nr. 13047E)

2.3.3.5 Testreihe zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen bei der Immunperoxidase Technik beim Nachweis von Leukozytenantigenen

Um unspezifische Reaktionen (Schlierenbildung auf dem gesamten Präparat), die sich bei dem Einsatz von monoklonalen Antikörpern ergeben können, zu verhindern, wurden die Präparate einer Vorbehandlung unterzogen. Dazu erfolgte eine Präinkubation mit Hamster bzw. Ratte Normalserum (Fa. Dianova, Hamburg).

2.3.3.6 Kontrollen

Um unspezifische Reaktionen durch Wechselwirkungen des PAP-Komplexes oder Brückenantikörper mit dem Gewebe auszuschließen, wurden bei jedem Reaktionsansatz Negativkontrollen mitgeführt. Hierzu wurden die Schnitte nur mit dem Brückenantikörper und dem PAP-Komplex inkubiert und ebenfalls die Wiederholungsreaktionen durchlaufen.

2.3.3.7 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Präparate erfolgte standardisiert an einem Labolux 12 Mikroskop bei 400facher Vergrößerung.

Die Auszählung markierter Zellen innerhalb des Zungenrückenepithels und der *Lamina propria* erfolgte anhand eines Meßokulars ($0,33 \times 0,33 \text{ mm}^2$). Der subepitheliale Bereich, der auf diese Weise ausgewertet werden konnte, betrug ca. $170 \mu\text{m}$. Die Schnitte wurden so ausgewählt, daß 10 konsekutive Felder ($3,3 \times 3,3 \text{ mm}^2$) in die Analyse gingen, entsprechend einer Anzahl von ca. 840 Basalzellen. Präparate, die diesen Anforderungen nicht entsprachen, wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Positive Reaktionen wurden von einem Untersucher semiquantitativ eingeteilt in:

- = keine positive Reaktion
- (+) = 1-2 positive Zellen
- + = 3-15 positive Zellen
- ++ = 16-50 positive Zellen
- +++ = > 50 positive Zellen

Die Aktivierung des Endothels wurde eingeteilt in:

- = keine Expression
- + = geringe Expression
- ++ = mittlere Expression
- +++ = starke Expression

Die Auswertung berücksichtigte sowohl die Menge der markierten Zellen als auch deren Verteilung innerhalb der Epithelstraten.

Die fotografische Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Orthoplan Photomikroskops auf Kodak-Ectachrome 64T Filmen.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Befunde

Balb/c Mäuse: Bei den immunkompetenten Mäusen (n=27) lagen keine Veränderungen der Zungenschleimhaut vor (Abb. 4).



Abb. 4: Zungenpräparat Balb/c Maus (x 10)

SCID Mäuse: Auch bei keinem der immundefizienten Tiere (n=30) konnten klinische Veränderungen der Zunge beobachtet werden (Abb. 5).

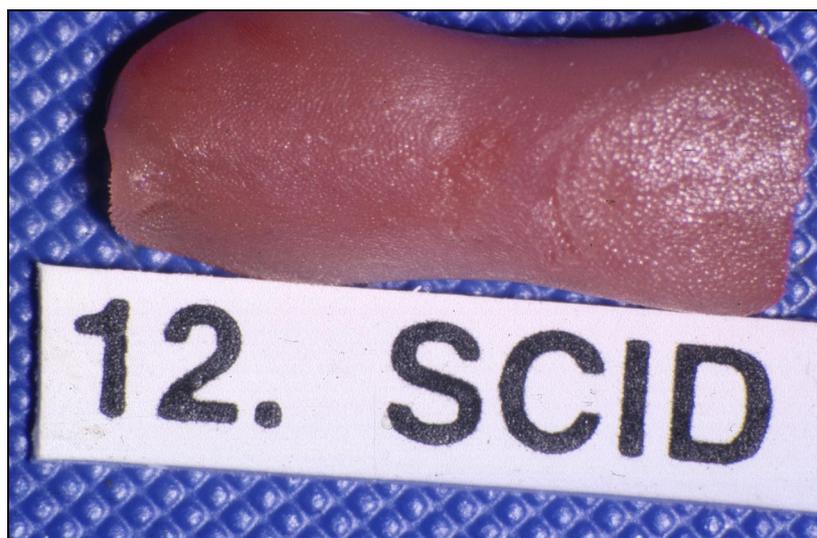


Abb. 5: Zungenpräparat SCID Maus (x 10)

3.2 Ergebnisse der PAS-Reaktion

Die Rohdaten der Ergebnisse der Auswertung nach PAS sind in den Tabellen 17 und 18 (7. Kapitel Anhang) dargestellt. Neben der Invasion von Hyphen wurde auch das reaktive Phagozyteninfiltrat dokumentiert.

3.2.1 Ergebnisse Teil A: Bestimmung der minimalen Infektionsdosis

Balb/c Mäuse (Tab. 7)

Tab. 7: Übersicht über die inokulierten Keimmengen und die Ergebnisse der Auswertung der Serienschnitte (PAS-Reaktion) bei Balb/c Mäusen

| Tier Nr. ¹⁾ | Keime/10 μ l ²⁾ | Anzahl der Schnitte ³⁾ | PAS-Befunde ⁴⁾ | Entzündungszellen ⁵⁾ | Gesamtbeurteilung ⁶⁾ |
|------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| B0 | Ø Tetracyclin Ø <i>C. albicans</i> | n=9 | neg. | keine | negativ |
| B1 | 10 ⁷ | n=20 | neg. | keine | negativ |
| B2 | 10 ⁷ | n=11 | neg. | keine | |
| B3 | 10 ⁷ | n=6 | 6/6 pos. | keine | |
| B4 | 10 ⁸ | n=5 | 3/5 pos. | Infiltrat bei 5/5 | positiv |
| B5 | 10 ⁸ | n=5 | 4/5 pos. | keine | |
| B6 | 10 ⁸ | n=5 | 5/5 pos. | Infiltrat bei 5/5 | |
| B7 | 10 ⁶ | n=36 | neg. | keine | negativ |
| B8 | 10 ⁶ | n=36 | 4/36 pos. | keine | |
| B9 | 10 ⁶ | n=36 | neg. | keine | |
| B10 | 10 ⁷ | n=24 | neg. | keine | negativ |
| B11 | 10 ⁷ | n=24 | 12/24 pos. | Infiltrat bei 3/12 | |
| B12 | 10 ⁷ | n=24 | neg. | keine | |
| B13 | 10 ⁵ | n=24 | neg. | keine | negativ |
| B14 | 10 ⁵ | n=24 | neg. | keine | |
| B15 | 10 ⁵ | n=24 | neg. | keine | |
| B16 | 10 ⁸ | n=12 | 8/12 pos. | Infiltrat bei 3/8 | positiv |
| B17 | 10 ⁸ | n=12 | neg. | keine | |
| B18 | 10 ⁸ | n=12 | 6/12 pos. | Infiltrat bei 3/6 | |

Legende zu Tabelle 7:

- 1) Bezeichnung des inokulierten Tieres
- 2) Anzahl der inokulierten Candida-Zellen/10 μ l
- 3) Anzahl der pro Zungenhälfte angefertigten Schnitte
- 4) Anzahl der Schnitte, die PAS-positive Strukturen (Blastosporen, Hyphen) in den obersten Epithelschichten aufwiesen zur Anzahl der angefertigten Schnitten
- 5) Anzahl der Schnitte, bei denen ein entzündliches Infiltrat nachgewiesen wurde, zu der in Spalte 4 aufgeführten PAS-positiven Schnitten
- 6) Die Gesamtbeurteilung bewertet, ob die jeweilige Inokulationsmenge mindestens 2/3 Mäusen infiziert hat.

Bei 2/3 Mäusen, denen eine Dosis von 10^7 Keimen verabreicht wurde (B1, B2, B3), konnten keine Hyphen oder Blastosporen im Epithel nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigte sich bei einer weiteren Gruppe, die mit 10^7 *C. albicans*-Zellen inokuliert wurde (B10, B11, B12). Insgesamt wiesen bei dieser Keimmenge 18/108 Schnitten (16,6 %) PAS-positive Strukturen auf.

Die Keimmenge wurde erneut um eine log Stufe erhöht. Bei der mit 10^8 *C. albicans*-Zellen inokulierten Gruppe (B4, B5, B6) wiesen 3/3 Mäusen PAS-positive Strukturen auf. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde darüber hinaus eine weitere Gruppe mit 10^8 inokuliert (B13, B14, B15), hier waren 2/3 Mäusen als positiv anzusehen (Abb. 6 und 7). Insgesamt wiesen bei dieser Keimmenge 26/51 Schnitten (51 %) PAS-positive Strukturen auf.

Wurde die Inokulationsdosis auf $10^6/10$ μ l (B7, B8, B9) reduziert, waren 2/3 Mäusezungen PAS-negativ. Insgesamt wiesen bei dieser Keimmenge 6/108 Schnitten (5,6%) PAS-positive Strukturen auf. Bei weiterer Reduktion auf $10^5/10\mu$ l (B13, B14, B15) wurden keine Hyphen oder Blastosporen im Epithel beobachtet (0/72 Schnitte). Die Balb/c Maus Nr. B0 diente der Kontrolle und wies keine Candidastrukturen auf.

Δ Die minimale Infektionsdosis bei Balb/c Mäusen betrug 10^8 *C. albicans*-Zellen/10 μ l.



Abb. 6: Balb/c Maus: Eindringen von Candida-Hyphen in das Stratum corneum des Zungenrückenepithels eine Woche *post inoculationem* mit 10^8 *C. albicans*-Zellen (PAS-Reaktion x 45)

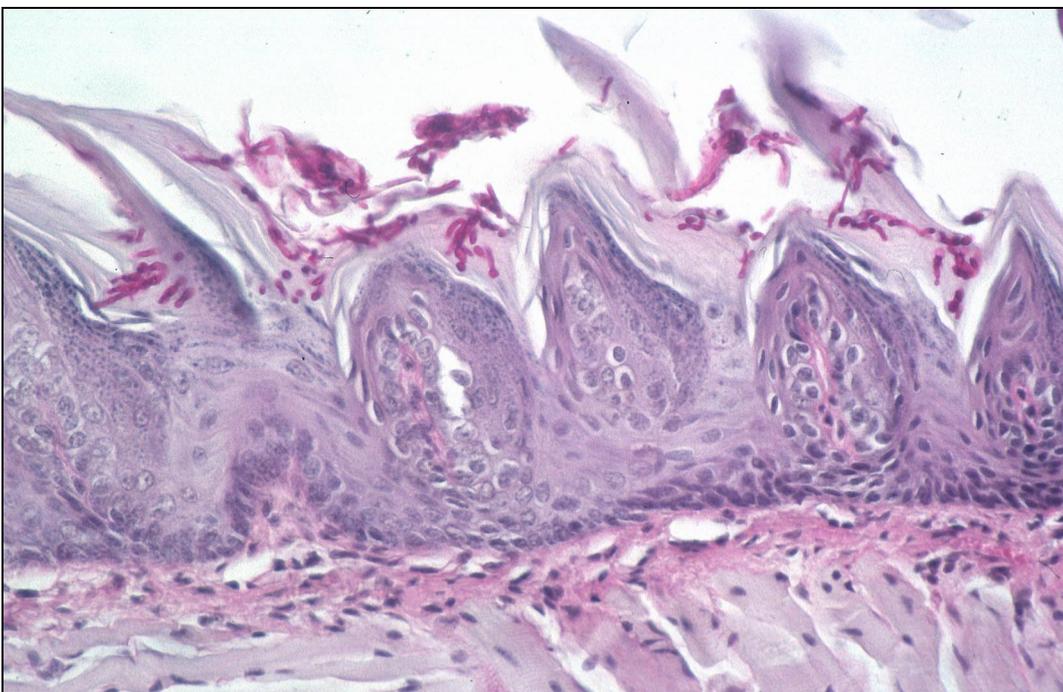


Abb. 7: Balb/c Maus: Zungenrückenepithel eine Woche *post inoculationem* mit 10^7 *C. albicans*-Zellen: Candida-Hyphen penetrieren nicht über die keratinisierte Epithelschicht hinaus in das Stratum spinosum (PAS-Reaktion x 100)

Waren Candidaelemente in den Epithelschichten nachweisbar, so fand sich in 19/48 PAS positiven Schnitten ein entzündliches Infiltrat, d.h. das Eindringen der Mikroorganismen führte in 39,6 % der Fälle zu einer Reaktion.

SCID Mäuse (Tab. 8)

Tab. 8: Übersicht über die inokulierten Keimmengen und die Ergebnisse der Auswertung der Serienschritte (PAS-Reaktion) bei SCID Mäusen

| Tier Nr. | Keime/10 μ l | Anzahl der Schnitte | PAS-Befunde | Entzündungszellen | Gesamtbeurteilung |
|----------|--------------------------------|---------------------|-------------|---------------------|-------------------|
| S1 | 10 ⁷ | n=11 | neg. | keine | positiv |
| S2 | 10 ⁷ | n=5 | 5/5 pos. | Infiltrat bei 5/5 | |
| S3 | 10 ⁷ | n=5 | 5/5 pos. | keine | |
| S4 | 10 ⁵ | n=12 | 12/12 pos. | keine | positiv |
| S5 | 10 ⁵ | n=21 | neg. | keine | |
| S6 | 10 ⁵ | n=21 | 6/21 pos | keine | |
| S7 | 10 ⁶ | n=42 | 17/42 pos. | Infiltrat bei 3/17 | positiv |
| S8 | 10 ⁶ | n=21 | 19/21 pos. | Infiltrat bei 19/21 | |
| S9 | 10 ⁶ | n=28 | neg. | keine | |
| S10 | 10 ⁷ | n=42 | 11/42 pos. | keine | positiv |
| S11 | 10 ⁷ | n=21 | 13/21 pos. | keine | |
| S12 | 10 ⁷ | n=42 | 21/42 pos. | Infiltrat bei 21/21 | |
| S13 | Ø C. albicans | n=12 | neg. | keine | negativ |
| S14 | Ø C. albicans | n=9 | neg. | keine | |
| S15 | Ø C. albicans | n=9 | neg. | keine | |
| S16 | Ø Tetracyclin Ø C. albicans | n=9 | neg. | keine | |
| S17 | 10 ⁴ | n=12 | neg. | keine | negativ |
| S18 | 10 ⁴ | n=12 | neg. | keine | |
| S22 | 10 ⁵ | n=21 | neg. | keine | positiv |
| S23 | 10 ⁵ | n=12 | 12/12 pos. | keine | |
| S24 | 10 ⁵ | n=21 | 3/21 pos. | keine | |

Bei 2/3 Mäusen, denen eine Dosis von 10^7 Keimen verabreicht wurde (S1, S2, S3), wurden Hyphen im Epithel gefunden (Abb. 8). Dieses Ergebnis war reproduzierbar (S10, S11, S12). Insgesamt wiesen bei dieser Keimmenge 55/126 Schnitten (43,7 %) PAS-positive Strukturen auf. Die Keimmenge wurde um eine log Stufe verringert. Bei $10^6/10 \mu\text{l}$ konnten in 2/3 Mäusezungen und in 40 % (36/91) der Schnitte Hyphen im Stratum corneum der Papillae filiformes nachgewiesen werden (Abb. 9). Bei der mit 10^5 *C. albicans*-Zellen inokulierten Gruppe (S4, S5, S6) wiesen 2/3 Mäusen PAS-positive Strukturen auf. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde darüber hinaus eine weitere Gruppe mit 10^5 inokuliert (S22, S23, S24), hier waren wiederum 2/3 Mäusen als positiv anzusehen. Insgesamt wiesen bei dieser Keimmenge 33/108 Schnitten (30,6 %) PAS-positive Strukturen auf.

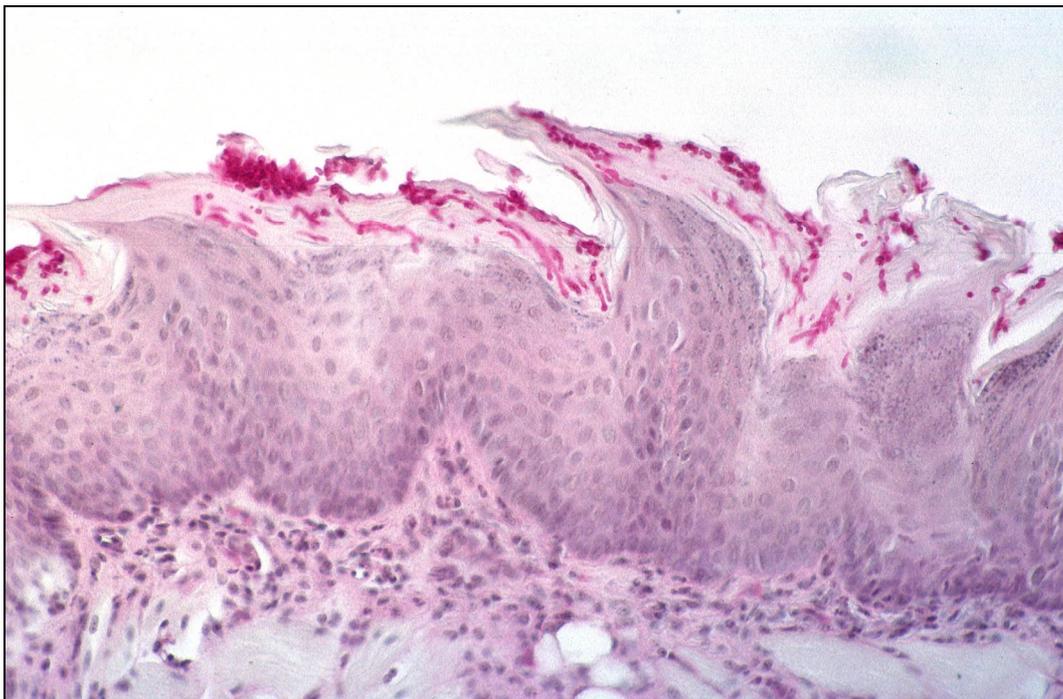


Abb. 8: SCID Maus: Zungenrücken eine Woche *post inoculationem* mit 10^7 *C. albicans*-Zellen: Invasion von Candida-Hyphen in die keratinisierte Epithelschicht (PAS-Reaktion x 80)

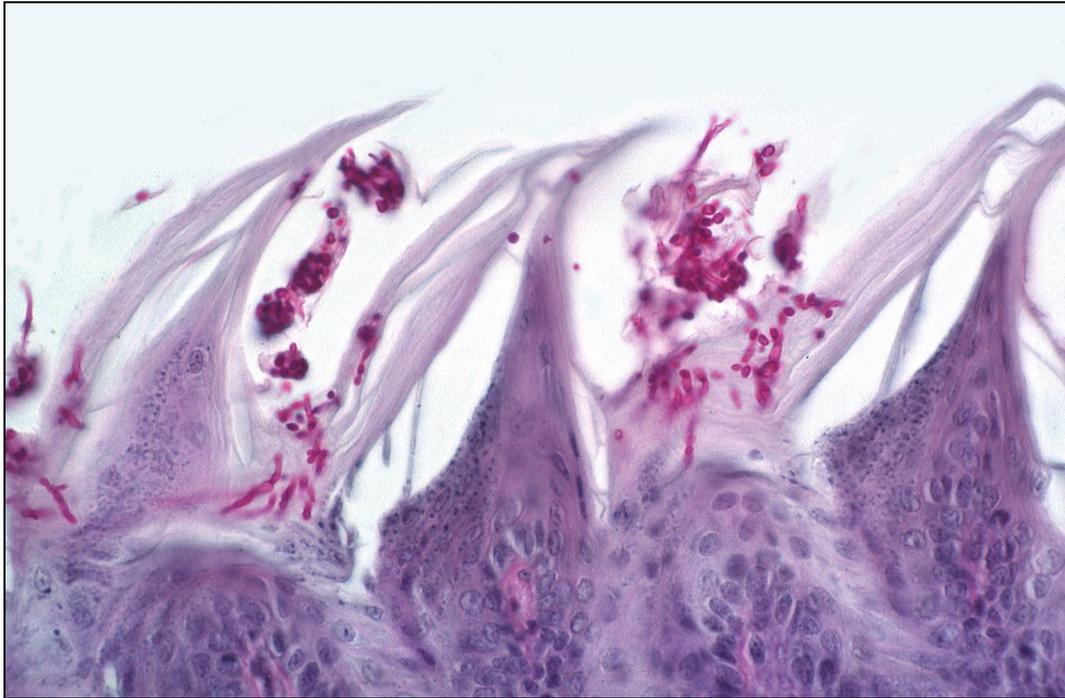


Abb. 9: SCID Maus: Papillae filiformes eine Woche *post inoculationem* mit 10^5 *C. albicans*-Zellen: Candida-Hyphen und Blastosporen im Stratum corneum (PAS-Reaktion x 200)

Erst bei einer Inokulationsmenge von 10^4 *C. albicans*-Zellen waren zwei Mäusezungen PAS negativ (S17 und S18). Keiner der 24 Schnitte zeigte eine Hypheninvasion. SCID Mäuse S13, S14, S15, S16 dienten der Kontrolle, es fanden sich keine Candi-dastrukturen im Zungenepithel.

ΔDie minimale Infektionsdosis bei SCID Mäusen betrug 10^5 *C. albicans*-Zellen/10 μ l.

Wurden Hyphen oder Blastosporen in den Epithelschichten gefunden, so war ein entzündliches Infiltrat in 48/124 PAS positiven Schnitten vorhanden, d.h. das Eindringen der Mikroorganismen führte nur in 38,7 % der Fälle zu einer Reaktion.

3.2.2 Ergebnisse Teil B: Inokulation der in Teil A bestimmten Keimzahl und Glykopeptiden

Balb/c Mäuse (Tab. 9)

Tab. 9: Übersicht über die inokulierten Keimmengen in Verbindung mit Glykopeptiden und die Ergebnisse der Auswertung der Serienschnitte (PAS-Reaktion) bei Balb/c Mäusen

| Tier Nr. | Keime/10 μ l | Anzahl der Schnitte | PAS-Auswertung | Entzündungszellen |
|----------|---------------------|---------------------|----------------|-------------------|
| B19 | 10 ⁸ +GP | n=12 | neg. | keine |
| B20 | 10 ⁸ +GP | n=12 | neg. | keine |
| B21 | 10 ⁸ +GP | n=12 | neg. | keine |
| B22 | 10 ⁸ +GP | n=12 | 11/12 pos. | keine |
| B23 | 10 ⁸ +GP | n=12 | neg. | keine |
| B24 | 10 ⁸ +GP | n=12 | neg. | vereinzelt |
| B25 | 10 ⁸ +GP | n=12 | 8/12 pos. | Infiltrat bei 6/8 |
| B26 | 10 ⁸ +GP | n=12 | neg. | keine |

Zwei der acht Balb/c Mäuse, die mit der minimalen Infektionsdosis von 10⁸ *C. albicans*-Zellen und derselben Menge Glykopeptide inokuliert wurden, wiesen Hyphen im Stratum corneum der Papillae filiformes auf. Bei einem Tier (B25) fand sich neben Candidastrukturen im Stratum corneum ein subepitheliales entzündliches Infiltrat.

SCID Mäuse (Tab. 10)

Keines der acht Tiere, die mit der minimalen Infektionsdosis von 10⁵ Keimen vermischt mit Glykopeptiden inokuliert wurden, wies Hyphen im Stratum corneum der Papillae filiformes auf.

Das Tier S25 diente der Kontrolle, es wurden nur Glykopeptide inokuliert. Auch hier konnten keine PAS-positiven Strukturen in den Schnitten nachgewiesen werden.

Tab. 10: Übersicht über die inokulierten Keimmengen in Verbindung mit Glykopeptiden und die Ergebnisse der Auswertung der Serienschnitte (PAS-Reaktion) bei SCID Mäusen

| Tier Nr. | Zellzahl/10 μ l | Anzahl der Schnitte | PAS-Auswertung | Entzündungszellen |
|----------|---------------------|---------------------|----------------|-------------------|
| S19 | 10 ⁵ +GP | n=12 | neg. | keine |
| S20 | 10 ⁵ +GP | n=12 | neg. | keine |
| S21 | 10 ⁵ +GP | n=12 | neg. | keine |
| S26 | 10 ⁵ +GP | n=12 | neg. | keine |
| S27 | 10 ⁵ +GP | n=12 | neg. | keine |
| S28 | 10 ⁵ +GP | n=12 | neg. | keine |
| S29 | 10 ⁵ +GP | n=12 | neg. | keine |
| S30 | 10 ⁵ +GP | n=12 | neg. | vereinzelt |
| S25 | GP | n=12 | neg. | keine |

3.3 Ergebnisanalyse der Infektionsexperimente

Nachstehend sollte geprüft werden, welchen Effekt

1. die inokulierten Keimmengen und
2. die inokulierten Keime in Verbindung mit Glykopeptiden auf die Entstehung einer Infektion haben.

Hierzu wurden die Ergebnisse der Infektionsexperimente (Versuchsreihen A und B) analysiert. Da mit den Serienschnitten jedoch festgelegt wurde, ob das einzelne Tier als infiziert oder nicht infiziert galt, mußte hierzu nicht die Anzahl der Schnitte, sondern die Anzahl der Tiere pro Inokulationsmenge herangezogen werden. Hieraus ergab sich, daß die Anzahl der Tiere pro Inokulationsmenge für eine exakte statistische Analyse nicht ausreichte.

Die Ergebnisse sind in Vierfeldertafeln dargestellt, für eine statistische Auswertung wären pro Feld ≥ 4 Tiere notwendig. Die nachstehende Auswertung mittels χ^2 -Test ist daher nur im Sinne einer Orientierungshilfe zu werten.

3.3.1 Balb/c Mäuse

3.3.1.1 Prüfung der Inokulationsdosis von 10^5 versus 10^6 *C. albicans*-Zellen auf die Entstehung einer Infektion

| Beschreibung | Balb/c: Inokulation mit 10^5 vs. 10^6 <i>C. albicans</i> | | | |
|--------------|---|-----------------|--------|--------|
| Situation A | Keimmenge 10^5 | | 10^5 | 10^6 |
| Situation B | Keimmenge 10^6 | Infektion | 0 | 1 |
| Reaktion A | Infektion | keine Infektion | 3 | 2 |
| Reaktion B | keine Infektion | | | |

Da kein Tier bei einer Inokulationsmenge von 10^5 *C. albicans*-Zellen infiziert wurde, ergab sich aus dem χ^2 -Vierfeldertest kein Effekt.

3.3.1.2 Prüfung der Inokulationsdosis von 10^6 versus 10^7 *C. albicans*-Zellen auf die Entstehung einer Infektion

| Beschreibung | Balb/c: Inokulation mit 10^6 vs. 10^7 <i>C. albicans</i> | | | |
|--------------|---|-----------------|--------|--------|
| Situation A | Keimmenge 10^6 | | 10^6 | 10^7 |
| Situation B | Keimmenge 10^7 | Infektion | 1 | 2 |
| Reaktion A | Infektion | keine Infektion | 2 | 4 |
| Reaktion B | keine Infektion | | | |

Vergleicht man die Inokulationsmengen von 10^6 und 10^7 , so ergäbe sich hieraus auch bei Verdopplung der Anzahl der Tiere pro Gruppe kein signifikanter Unterschied ($p < 1$).

3.3.1.3 Prüfung der Inokulationsdosis von 10^7 versus 10^8 *C. albicans*-Zellen auf die Entstehung einer Infektion

| Beschreibung | Balb/c: Inokulation mit 10^7 vs. 10^8 <i>C. albicans</i> | | | |
|--------------|---|-----------------|--------|--------|
| Situation A | Keimmenge 10^7 | | 10^7 | 10^8 |
| Situation B | Keimmenge 10^8 | Infektion | 2 | 5 |
| Reaktion A | Infektion | keine Infektion | 4 | 1 |
| Reaktion B | keine Infektion | | | |

Bei einer Analyse der Inokulationsmengen 10^7 und 10^8 hinsichtlich ihres Infektionspotentials ergab sich ein Effekt, der statistisch signifikant wäre, wenn die Anzahl der Tiere pro Feld doppelt so hoch wäre ($p < 0,01$).

3.3.1.4 Prüfung des Effekts der Inokulationsdosis von 10^8 Keimen + Glykopeptiden auf die Entstehung einer Infektion

| Beschreibung | Balb/c: Inokulation mit 10^8 <i>C. albicans</i> + GP | | | |
|--------------|--|-----------------|---------|--------|
| Situation A | ohne GP | | ohne GP | mit GP |
| Situation B | mit GP | Infektion | 5 | 2 |
| Reaktion A | Infektion | keine Infektion | 1 | 6 |
| Reaktion B | keine Infektion | | | |

Ein deutlicher Unterschied zeigte sich bei der Anzahl der infizierten Tiere nach Inokulation von *C. albicans* mit oder ohne Glykopeptidzusatz. Unter der Annahme, die Anzahl der Tiere pro Feld wäre doppelt so hoch angesetzt, ergäbe sich ein signifikanter Wert ($p < 0,0001$).

3.3.2 SCID Mäuse

3.3.2.1 Prüfung der Inokulationsdosis von 10^4 versus 10^5 *C. albicans*-Zellen auf die Entstehung einer Infektion

| Beschreibung | SCID: Inokulation mit 10^4 vs. 10^5 <i>C. albicans</i> | | | |
|--------------|---|-----------------|--------|--------|
| Situation A | Keimmenge 10^4 | | 10^4 | 10^5 |
| Situation B | Keimmenge 10^5 | Infektion | 0 | 2 |
| Reaktion A | Infektion | keine Infektion | 2 | 1 |
| Reaktion B | keine Infektion | | | |

Da kein Tier bei einer Inokulationsmenge von 10^4 *C. albicans*-Zellen infiziert wurde, ergab sich aus dem χ^2 -Vierfeldertest kein Effekt.

3.3.2.2 Prüfung der Inokulationsdosis von 10^5 versus 10^6 *C. albicans*-Zellen auf die Entstehung einer Infektion

| Beschreibung | SCID: Inokulation mit 10^5 vs. 10^6 <i>C. albicans</i> | | | |
|--------------|---|-----------------|--------|--------|
| Situation A | Keimmenge 10^5 | | 10^5 | 10^6 |
| Situation B | Keimmenge 10^6 | Infektion | 2 | 2 |
| Reaktion A | Infektion | keine Infektion | 1 | 1 |
| Reaktion B | keine Infektion | | | |

Kein Unterschied bestand zwischen den Inokulationsmengen von 10^5 und 10^6 Keimen hinsichtlich des Infektionspotentials.

3.3.2.3 Prüfung der Inokulationsdosis von 10^6 versus 10^7 *C. albicans*-Zellen auf die Entstehung einer Infektion

| Beschreibung | Inokulation mit 10^6 vs. 10^7 <i>C. albicans</i> | | | |
|--------------|---|-----------------|--------|--------|
| Situation A | Keimmenge 10^6 | | 10^6 | 10^7 |
| Situation B | Keimmenge 10^7 | Infektion | 2 | 5 |
| Reaktion A | Infektion | keine Infektion | 1 | 1 |
| Reaktion B | keine Infektion | | | |

Bei einem Vergleich der Inokulationsmengen von 10^6 und 10^7 ergäbe sich auch bei Verdopplung der Anzahl der Tiere pro Gruppe kein signifikanter Unterschied ($p < 1$).

3.3.2.4 Prüfung des Effekts von Inokulationsdosis von 10^5 Keimen + Glykopeptiden auf die Entstehung einer Infektion

| Beschreibung | SCID: Inokulation mit 10^5 <i>C. albicans</i> | | | |
|--------------|---|-----------------|---------|--------|
| Situation A | ohne GP | | ohne GP | mit GP |
| Situation B | mit GP | Infektion | 4 | 0 |
| Reaktion A | Infektion | keine Infektion | 2 | 8 |
| Reaktion B | keine Infektion | | | |

Ein erkennbarer Unterschied zeigte sich hinsichtlich der Anzahl der infizierten Tiere nach Inokulation von *C. albicans* mit oder ohne Glykopeptidzusatz. Wäre die Anzahl der Tiere pro Feld doppelt so hoch, ergäbe sich ein signifikanter Wert ($p < 0,0001$).

3.4 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

Die Rohdaten der Ergebnisse der Auswertung nach Differenzierungsantigenen sind in den Tabellen 19 - 34 (7. Kapitel Anhang) dargestellt.

3.4.1 Verteilung der exprimierten Antigene in Abhängigkeit zur Inokulationsdosis innerhalb der Zell-Lagen zusammengefaßt nach Antigenen

Tabellen 11 (Balb/c) und 12 (SCID) zeigen die Ergebnisse zusammengefaßt nach Antigenen. Die semiquantitative Auswertung positiver Markierungen der einzelnen Schnitte wurde summiert und durch die Anzahl der Schnitte geteilt. In diesen Tabellen ist die Mengewertung der exprimierten Antigene im jeweiligen Stratum dargestellt. Nicht getönte Kästchen zeigen an, daß in dieser Epithelschicht keine Markierung vorhanden war.

Tabelle 11 zeigt die Verteilung der markierten Antigene innerhalb der Zell-Lagen in Abhängigkeit von der Inokulationsmenge bei Balb/c Mäusen.

Tab. 11: Balb/c Mäuse: Semiquantitative Auswertung der Antigenmarkierung innerhalb der Epithelzell-Lagen in gegliedert nach Antigenen bei verschiedenen Inokulationsmengen

| Inok.-Menge | 10 ⁵ | 10 ⁶ | 10 ⁷ | 10 ⁸ | 10 ⁸ +Muzin | Keine Inok. |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|-------------|
| CD4 | | | | | | |
| Anzahl | n=3 | n=3 | n=6 | n=4 | n=3 | n=1 |
| Str. spin. oben | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | (+) | | |
| Basalzellen | (+) | (+) | + | (+) | + | (+) |
| subepithelial | (+) | + | + | ++ | (+) | |
| Lamina propria | | | | | | |
| CD13 | | | | | | |
| Anzahl | n=3 | n=3 | n=6 | n=3 | n=3 | n=1 |
| Str. spin. oben | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | | |
| Basalzellen | | | | | | |
| subepithelial | | + | +++ | +++ | ++ | + |
| Lamina propria | (+) | + | +++ | ++ | + | + |

| Inok.-Menge | 10⁵ | 10⁶ | 10⁷ | 10⁸ | 10⁸+Muzin | Keine Inok. |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------|
| CD54 | | | | | | |
| Anzahl | n=3 | n=3 | n=6 | n=4 | n=3 | n=1 |
| Str. spin. oben | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | | |
| Basalzellen | | | | | | |
| subepithelial | + | + | ++ | +++ | + | + |
| Lamina propria | | | | | | |
| Endothel | + | + | + | +++ | + | (+) |
| CD62E | | | | | | |
| Anzahl | n=3 | n=3 | n=6 | n=3 | n=3 | n=1 |
| Endothel | | | | | | |
| CD74 | | | | | | |
| Anzahl | n=3 | n=3 | n=6 | n=3 | n=3 | n=1 |
| Str. spin. oben | | | | | | |
| Str. spin. unten | + | + | + | +++ | (+) | + |
| Basalzellen | | | | | | |
| subepithelial | + | + | + | +++ | + | + |
| Lamina propria | | | (+) | (+) | (+) | |
| CD80 | | | | | | |
| Anzahl | n=3 | n=3 | n=6 | n=3 | n=3 | n=1 |
| Str. spin. oben | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | | |
| Basalzellen | | | | | | |
| subepithelial | | | | | | |
| Lamina propria | | + | + | + | | |
| CD86 | | | | | | |
| Anzahl | n=3 | n=3 | n=6 | n=3 | n=3 | n=1 |
| Str. spin. oben | | | | + | | |
| Str. spin. unten | | | | + | (+) | |
| Basalzellen | | | | + | | |
| subepithelial | | + | + | +++ | ++ | ++ |
| Lamina propria | | | | (+) | (+) | |
| CD103 | | | | | | |
| Anzahl | n=3 | n=3 | n=6 | n=3 | n=3 | n=1 |
| Str. spin. oben | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | (+) | + | | |
| Basalzellen | (+) | + | + | +++ | (+) | + |
| subepithelial | (+) | (+) | + | + | (+) | (+) |
| Lamina propria | | | | | | |

CD4

Die Expression von CD4⁺-Zellen war bei der geringsten Inokulationsmenge von 10⁵ auf die Basalzellschicht und den direkt darunter liegenden Bereich auf einzelne Zellen begrenzt. Mit Ansteigen der Keimmenge stieg auch die Anzahl der positiven Zellen in beiden Strata (Abb. 10-12). Bei der höchsten Inokulationsmenge von 10⁸ Keimen waren CD4⁺-Zellen außerdem im Stratum spinosum zu finden. Bei der Inokulationsmenge von 10⁸ Keimen und Glykopeptiden konnten wenig CD4-exprimierende Zellen in der Basalzellschicht nachgewiesen werden, subepithelial fanden sich vereinzelt positive Zellen. Erfolgte keine Inokulation waren ein bis zwei positive Zellen pro Schnitt in der Basalzellschicht zu finden.



Abb. 10: Balb/c Maus: Zungenrückenepithel und Lamina propria eine Woche post inoculationem mit 10⁸ *C. albicans*-Zellen: Monoklonaler Antikörper gegen CD4-Antigen (PAP-Methode, x 60)

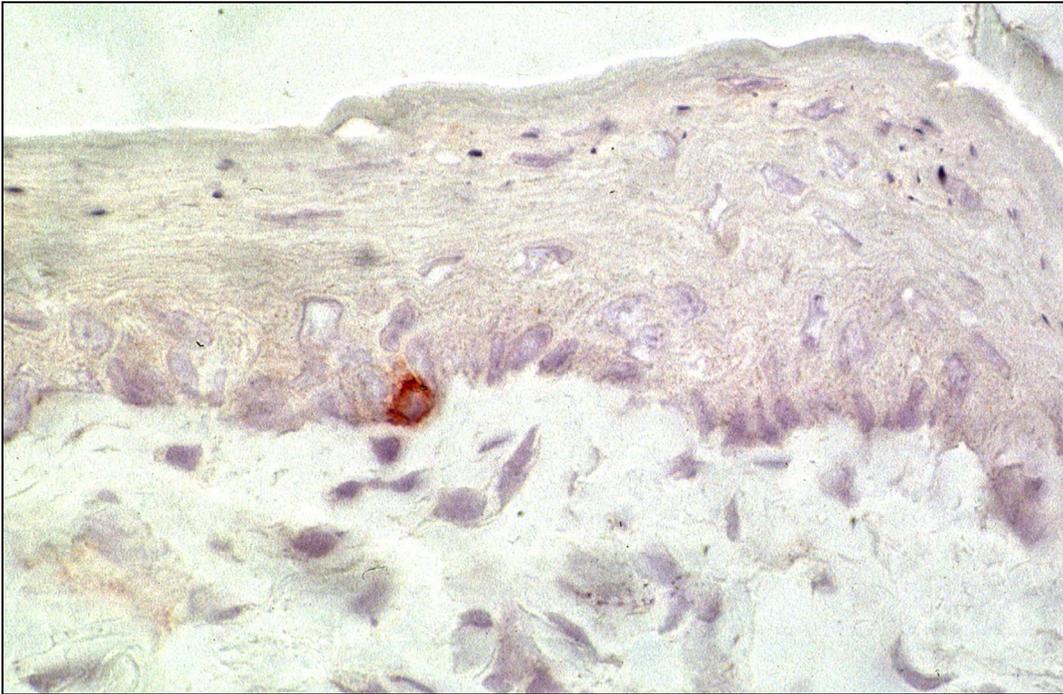


Abb. 11: Balb/c Maus: Zungenrückenepithel und Lamina propria eine Woche post inoculationem mit 10^7 *C. albicans*-Zellen: Monoklonaler Antikörper gegen CD4-Antigen (PAP-Methode, x 175)

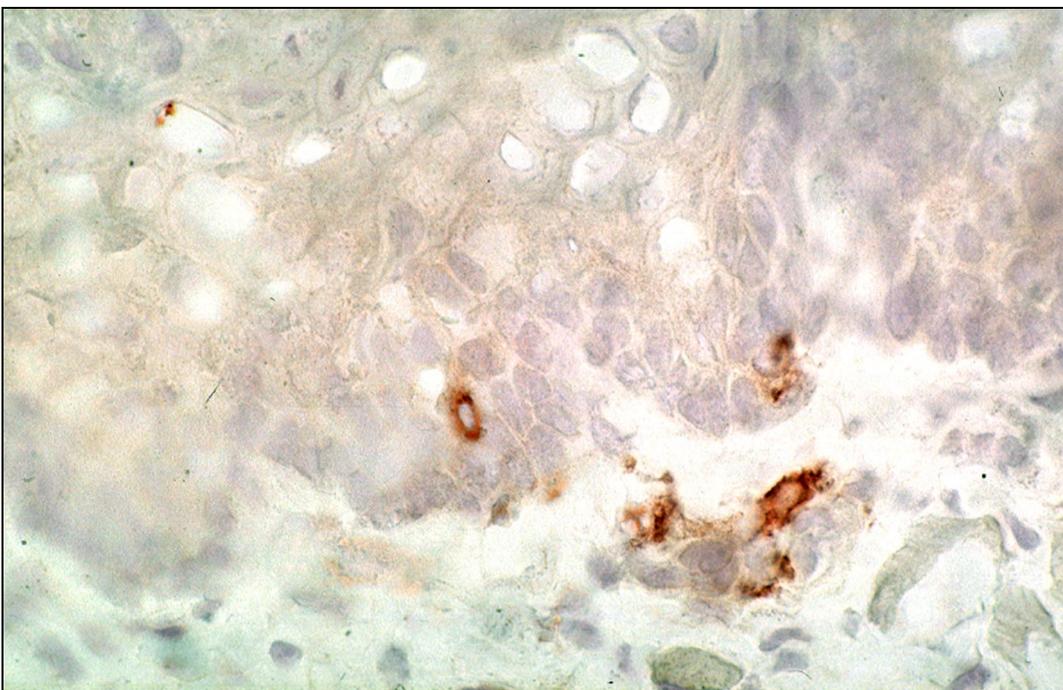


Abb. 12: Balb/c Maus: CD4-positive Zellen im Stratum basale und subepithelial eine Woche post inoculationem mit 10^7 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 175)

CD13

(Abb. 13 und 14)

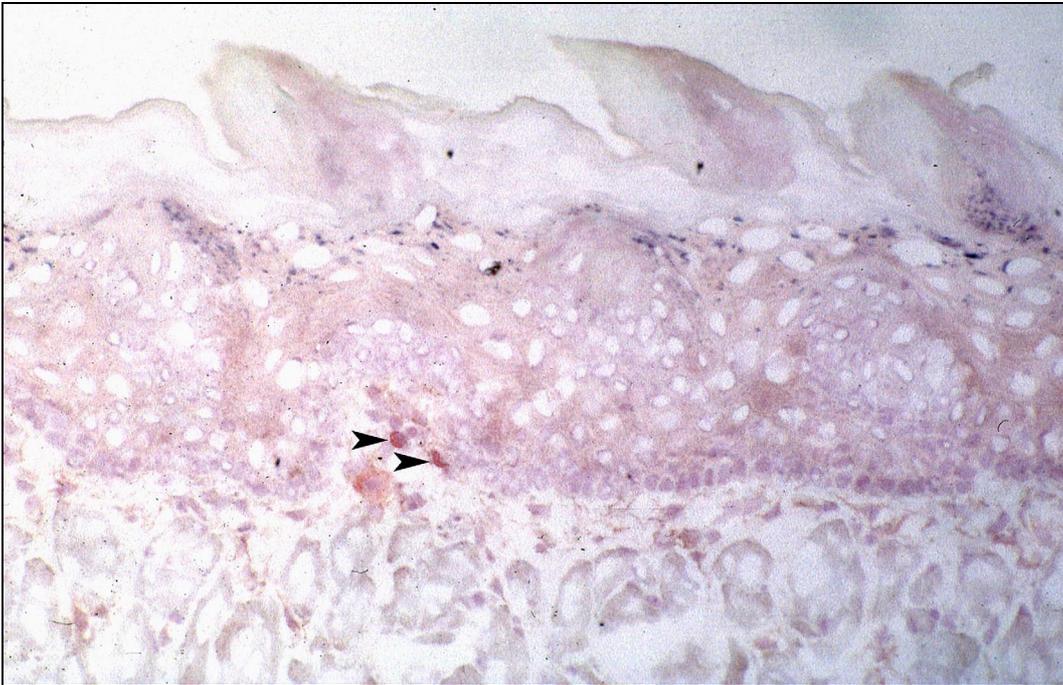


Abb. 13: Balb/c Maus: CD13-positive Zellen im Stratum basale (Pfeile) eine Woche *post inoculationem* mit 10^7 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 90)

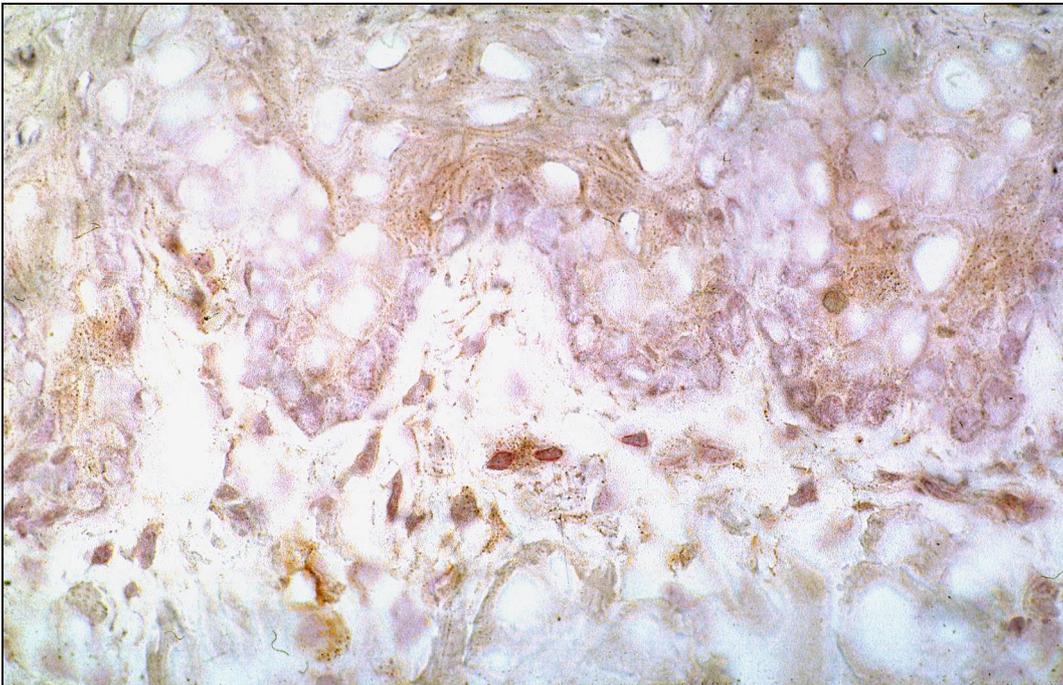


Abb. 14: Balb/c Maus: CD13-positive Zellen subepithelial eine Woche *post inoculationem* mit 10^7 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 200)

Die Antigen-Expression verlief auch bei CD13 nahezu linear zu der Inokulationsmenge, wobei bei einer Keimmenge von 10^5 nur vereinzelt Zellen in der Lamina propria, bei 10^7 und 10^8 jedoch eine erhebliche Anzahl positiver Zellen im subepithelialen Bereich und in der Lamina propria nachgewiesen werden konnten (Abb. 13 und 14). Wurden Keime zusammen mit Glykopeptiden verabreicht, sank die Zahl der exprimierenden Zellen, die sich subepithelial und der Lamina propria nachweisen ließen. Ohne Inokulation von *C. albicans*, ließen sich nur wenige CD13⁺-Zellen in der gesamten Lamina propria nachweisen.

CD54

Ein Zusammenhang zwischen Inokulationsdosis und Menge an exprimierenden Zellen ließ sich auch bei CD54 feststellen. Die Reaktionen fanden subepithelial und im Endothel statt, wobei bei der Inokulationsdosis von 10^5 wenige Zellen, bei der Menge von 10^8 eine große Anzahl von CD54⁺-Zellen zu finden war (Abb. 15 und 16). Mit der Reaktion auf die geringste Dosis vergleichbar ist die der Inokulation von Keimen, denen Glykopeptide zugesetzt wurden. Ohne Inokulation waren nur wenige CD54⁺-Zellen subepithelial nachweisbar, das Endothel war minimal aktiviert.

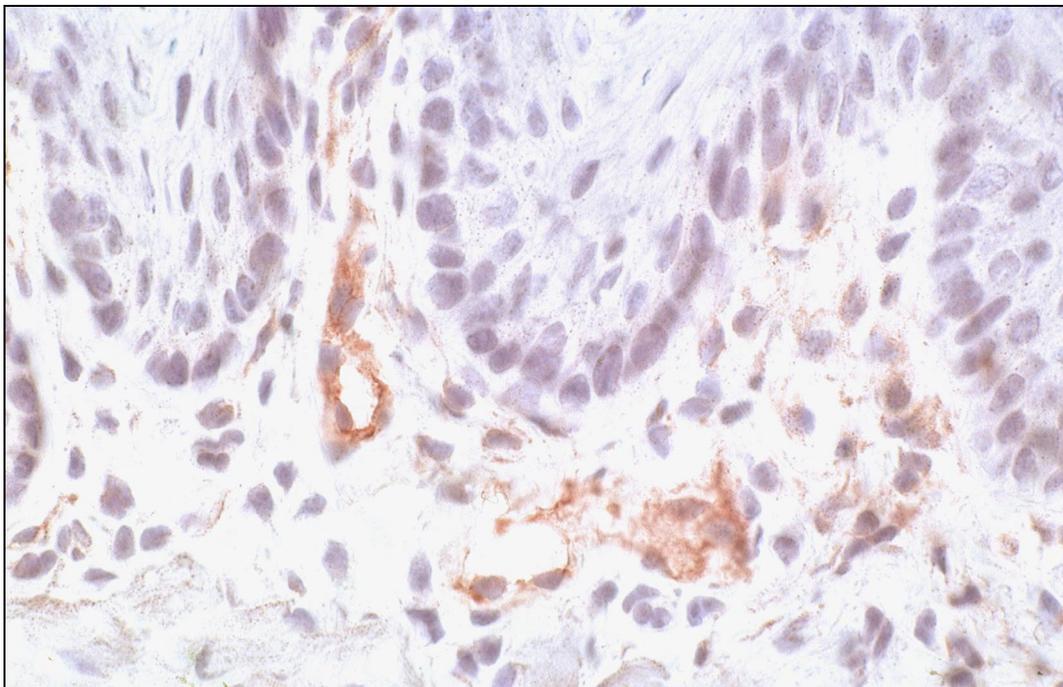


Abb. 15: Balb/c Maus: CD54-positive Zellen und aktiviertes Endothel eine Woche *post inoculationem* mit 10^8 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 130)

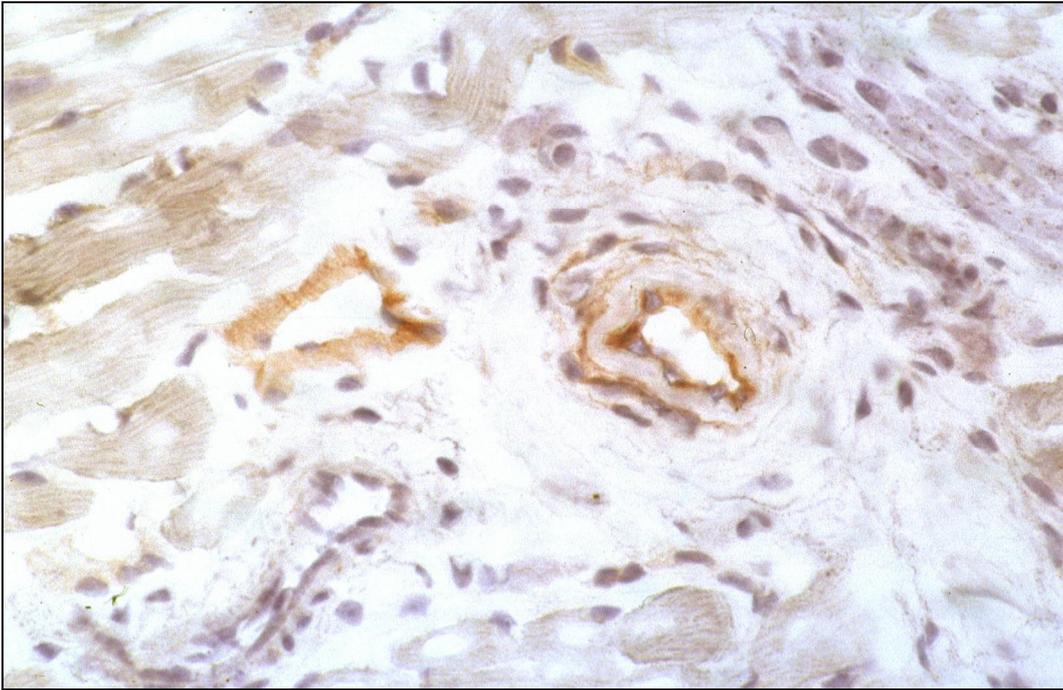


Abb. 16: Balb/c Maus: Aktiviertes Endothel (monoklonaler Antikörper gegen CD54) eine Woche *post inoculationem* mit 10^8 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 130)

CD62E

Bei keiner Inokulationsmenge konnte die Expression von E-Selectin im Endothel nachgewiesen werden (Abb. 17).

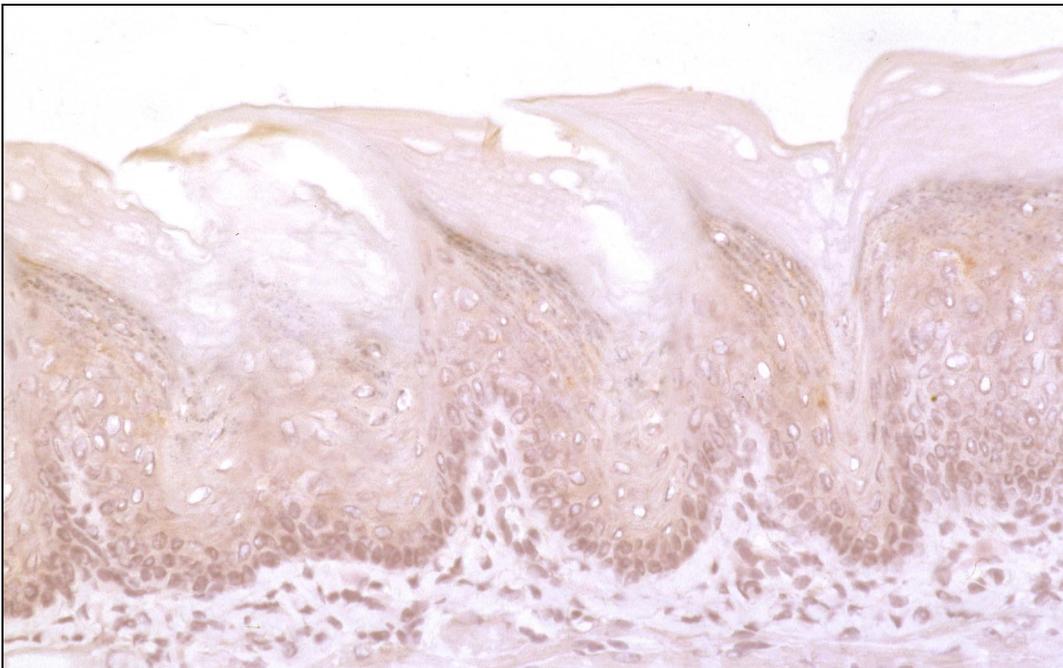


Abb. 17: Balb/c Maus: Das Endothel ist negativ für den monoklonalen Antikörper gegen CD62E (PAP-Methode, x 130)

CD74

Der Antikörper gegen CD74 reagierte mit Zellen im Stratum spinosum (untere Zellschicht) sowie subepithelialen Bereich. Bei steigender Inokulationsdosis (10^7 und 10^8) konnten auch vereinzelt zusätzlich Zellen in der Lamina propria nachgewiesen werden (Abb. 18–20). Eine große Anzahl CD74-exprimierender Zellen war bei einer Keimmenge von 10^8 sowohl im unteren Stratum spinosum als auch im subepithelialen Bereich zu finden.

Bei Inokulation von Keimen vermischt mit Glykopeptiden verteilten sich wenige positive Zellen im Stratum spinosum und in der Lamina propria. Wurden keine Keime inokuliert, fand eine vergleichbare Reaktion statt.

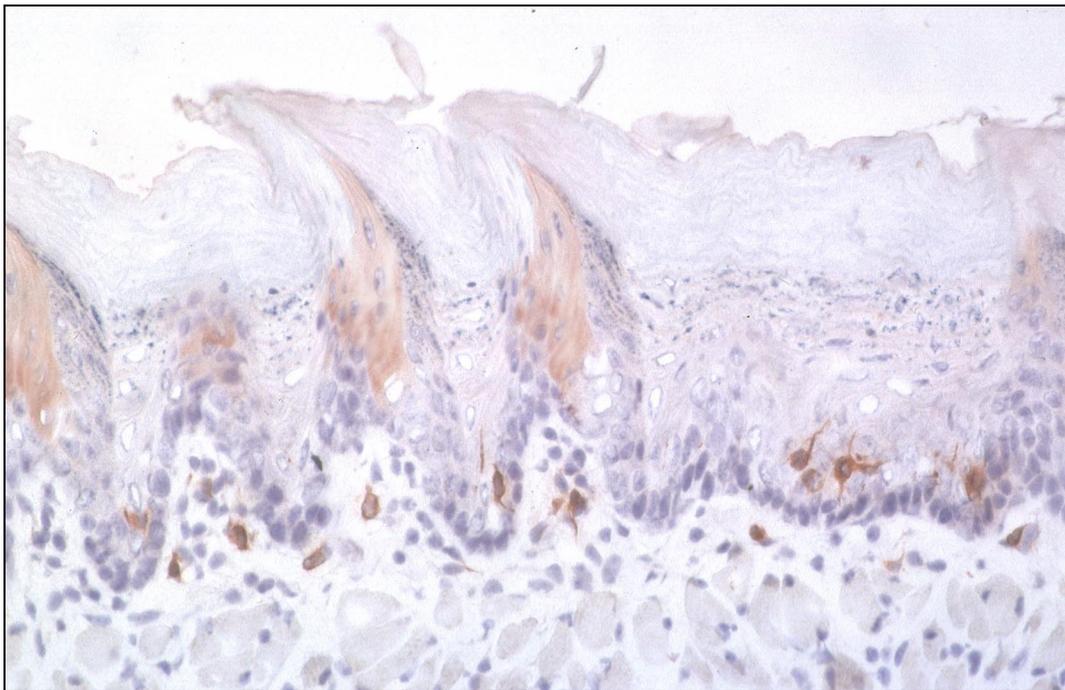


Abb. 18: Balb/c Maus: CD74-exprimierende dendritische Zellen im Stratum spinosum und subepithelial eine Woche *post inoculationem* mit 10^7 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 100)

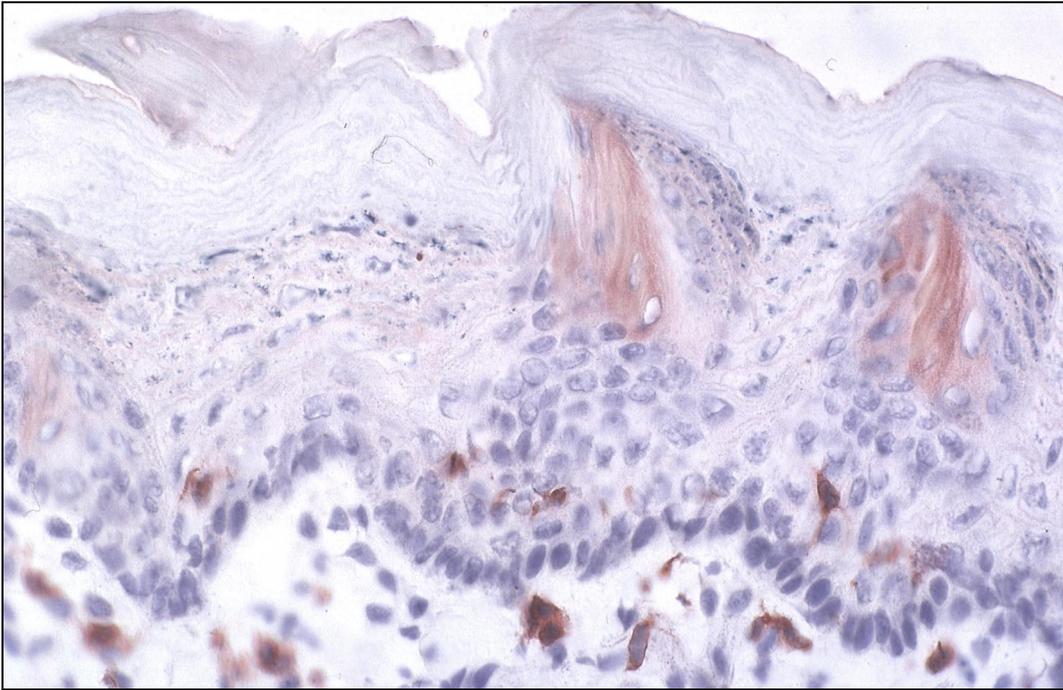


Abb. 19: Balb/c Maus: CD74-positive Zellen im Stratum spinosum und subepithelial eine Woche *post inoculationem* mit 10^7 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 150)

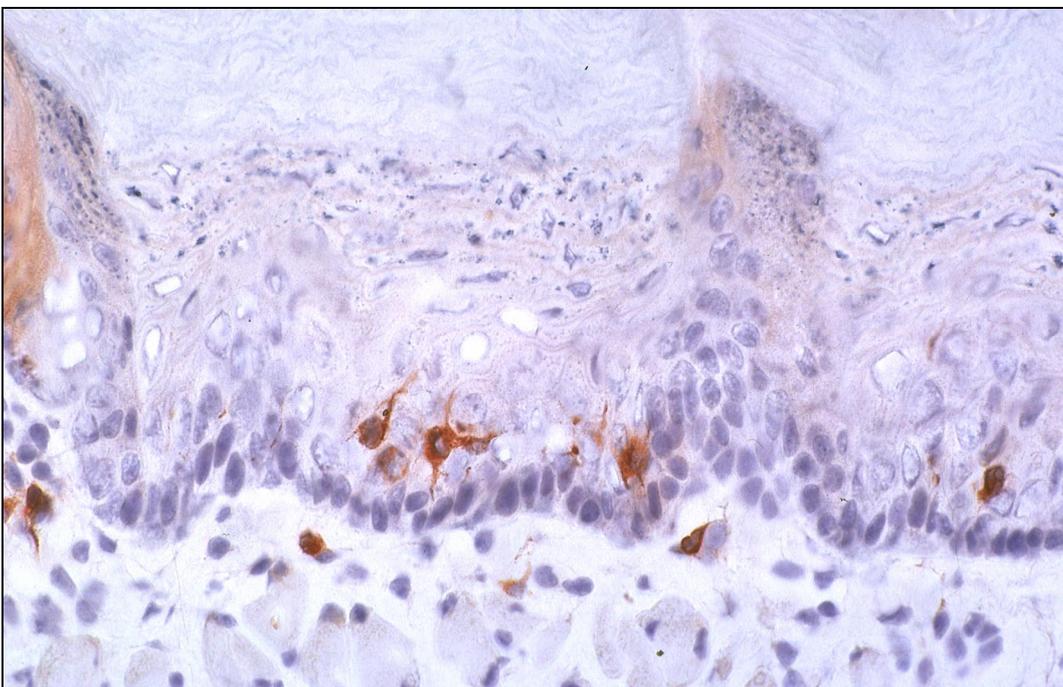


Abb. 20: Balb/c Maus: Eine Woche *post inoculationem* mit 10^7 *C. albicans*-Zellen markiert der monoklonale Antikörper gegen CD74 dendritische Zellen im Stratum spinosum und subepithelial (PAP-Methode, x 160)

CD80

In der Lamina propria fanden sich bei einer Inokulationsdosis von 10^6 , 10^7 und 10^8 Keimen wenige CD80⁺-Zellen (Abb. 21). Bei der niedrigsten Keimmenge von 10^5 , bei der Gabe von Keimen, denen Glykopeptide zugesetzt waren und bei fehlender Inokulation konnten keine CD80 exprimierenden Zellen nachgewiesen werden.

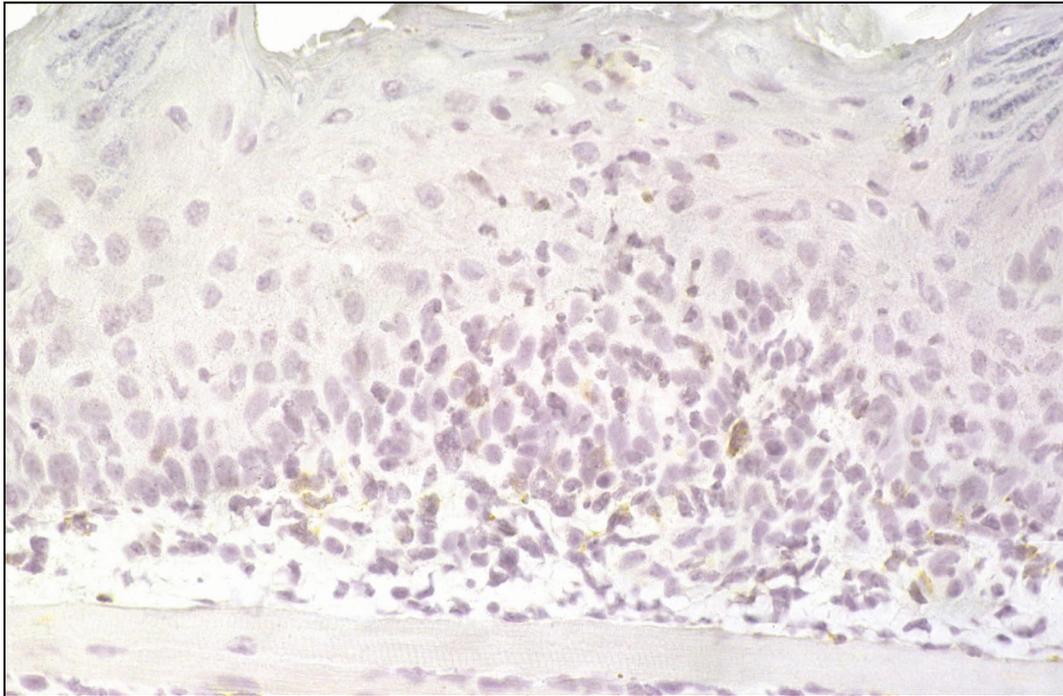


Abb. 21: Balb/c Maus: CD80-positive Zellen in der Lamina propria eine Woche *post inoculationem* mit 10^8 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 125)

CD86

Bei der geringsten Inokulationsmenge von 10^5 *C. albicans*-Zellen wurde keine Reaktion mit dem CD86 Antigen beobachtet. Mit Anstieg der Keimmenge jedoch erhöhte sich die Anzahl positiver Zellen, die zunächst im subepithelialen Bereich in geringem Ausmaß zu finden waren (Abb. 22). Bei der höchsten inokulierten Keimmenge von 10^8 wurden im gesamten Stratum spinosum, der Basalzellschicht und vor allem subepithelial CD86-exprimierende Zellen gefunden (Abb. 23). Bei Keiminokulation vermischt mit Glykopeptiden fanden sich positive Zellen im subepithelialen Bereich in mittlerem Ausmaß, ebenso bei fehlender Inokulation.

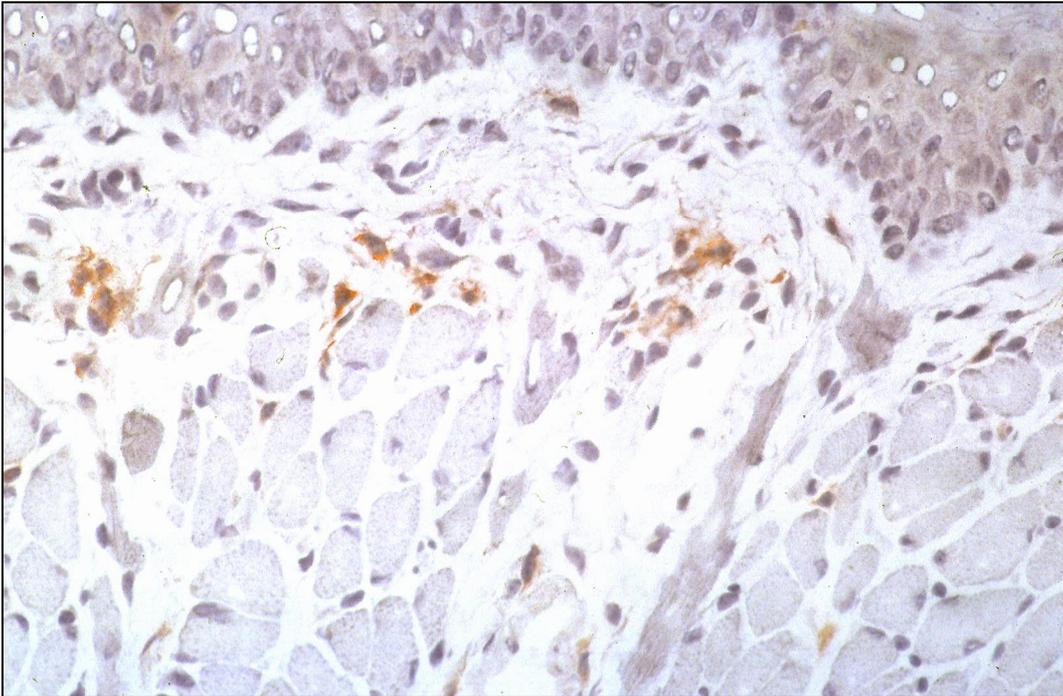


Abb. 22: Balb/c Maus: CD86-positive Zellen in der Lamina propria eine Woche *post inoculationem* mit 10^6 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 130)

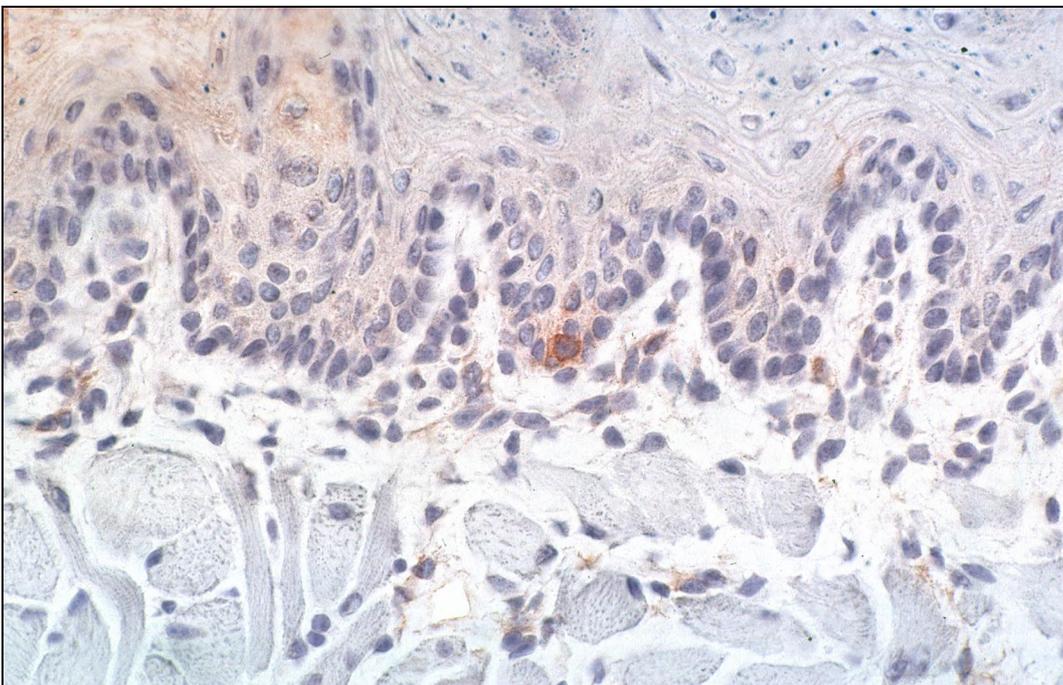


Abb. 23: Balb/c Maus: CD86-positive Zelle in der Basalzellschicht eine Woche *post inoculationem* mit 10^8 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 150)

CD103

Bei der Bewertung dieser Reaktion zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der CD103-Expression von der Inokulationsmenge. Bei niedrigen Keimmengen von 10^5 und 10^6 fanden sich minimale Reaktionen in der Basalzellschicht und subepithelial. Ein Anstieg der Anzahl von CD103⁺-Zellen sowie die Ausdehnung dieser Zellen auf das Stratum spinosum wurde bei einer Keimmenge von 10^7 erreicht. Bei weiterer Erhöhung der Inokulationsdosis fanden sich eine große Anzahl CD103 exprimierender Zellen im Stratum basale; subepithelial und im Stratum spinosum waren wenig Zellen lokalisiert (Abb. 24).

Wurden Keime zusammen mit Glykopeptiden inokuliert, sank die Zahl der positiven Zellen auf ein bis zwei pro ausgewertetem Schnitt, diese waren dann auf die Basalzellschicht und den subepithelialen Bereich beschränkt. Ein ähnliches Verteilungsmuster zeigte sich auch bei fehlender Inokulation.

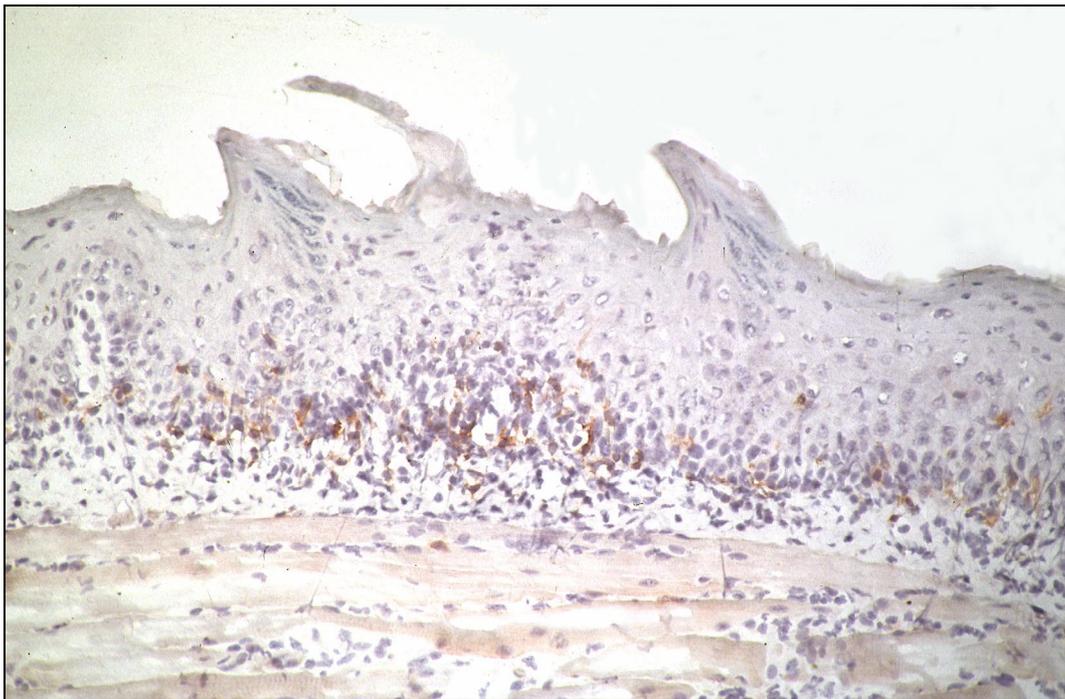


Abb. 24: Balb/c Maus: Eine Woche *post inoculationem* mit 10^8 *C. albicans*-Zellen finden sich im Stratum spinosum, in der Basalzellschicht und subepithelial CD103-positive Zellen (PAP-Methode, x 150)

Tabelle 12 zeigt die Verteilung der markierten Antigene in Abhängigkeit zur Inokulationsdosis innerhalb der Zell-Lagen gegliedert nach Antigenen bei SCID Mäusen.

Tab. 12: SCID Mäuse: Semiquantitative Auswertung der Antigenmarkierung innerhalb der Epithelzell-Lagen in gegliedert nach Antigenen bei verschiedenen Inokulationsmengen

| Inok.-Menge | 10 ⁴ | 10 ⁵ | 10 ⁶ | 10 ⁷ | 10 ⁵ +Muzin | Keine Inok. |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|-------------|
| CD4 | | | | | | |
| Anzahl | n=2 | n=6 | n=5 | n=9 | n=3 | n=3 |
| Str. spin. oben | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | | |
| Basalzellen | | | | (+) | | |
| subepithelial | (+) | (+) | | (+) | (+) | (+) |
| Lamina propria | | | | | | |
| CD13 | | | | | | |
| Anzahl | n=4 | n=7 | n=3 | n=11 | n=3 | n=5 |
| Str. spin. oben | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | | |
| Basalzellen | | | | | | |
| subepithelial | (+) | ++ | +++ | +++ | + | + |
| Lamina propria | | + | +++ | + | + | (+) |
| CD54 | | | | | | |
| Anzahl | n=2 | n=6 | n=3 | n=6 | n=3 | n=3 |
| Str. spin. oben | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | | |
| Basalzellen | | | | | | |
| subepithelial | + | +++ | +++ | +++ | + | + |
| Lamina propria | | | | | | |
| Endothel | + | +++ | +++ | +++ | + | ++ |
| CD62E | | | | | | |
| Anzahl | n=2 | n=6 | n=3 | n=7 | n=6 | n=3 |
| Endothel | | | | | | |
| CD74 | | | | | | |
| Anzahl | n=2 | n=6 | n=3 | n=6 | n=3 | n=3 |
| Str. spin. oben | | | | | | |
| Str. spin. unten | ++ | + | + | + | + | + |
| Basalzellen | | | | + | | + |
| subepithelial | +++ | + | +++ | + | + | + |
| Lamina propria | + | (+) | (+) | + | + | (+) |
| CD80 | | | | | | |
| Anzahl | n=2 | n=6 | n=3 | n=6 | n=3 | n=3 |
| Str. spin. oben | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | | |
| Basalzellen | | | | | | |
| subepithelial | (+) | | | (+) | | |
| Lamina propria | | | | | | |

| Inok.-Menge | 10 ⁴ | 10 ⁵ | 10 ⁶ | 10 ⁷ | 10 ⁵ +Muzin | Keine Inok. |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|-------------|
| CD86 | | | | | | |
| Anzahl | n=4 | n=6 | n=4 | n=9 | n=3 | n=5 |
| Str. spin. oben | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | | |
| Basalzellen | (+) | | | (+) | | (+) |
| subepithelial | + | + | + | + | + | |
| Lamina propria | | (+) | (+) | + | + | (+) |
| CD103 | | | | | | |
| Anzahl | n=2 | n=6 | n=4 | n=6 | n=3 | n=3 |
| Str. spin. oben | | | | | | |
| Str. spin. unten | | (+) | (+) | | | |
| Basalzellen | + | ++ | + | + | (+) | + |
| subepithelial | + | + | (+) | + | (+) | (+) |
| Lamina propria | | | | | | |

CD4

CD4 Antigen wurde nur in kleinsten Mengen exprimiert. Bei niedrigen Inokulationsmengen, ohne Inokulation und bei der zusätzlichen Gabe von Glykopeptiden waren diese im subepithelialen Bereich nachzuweisen (Abb. 25 und 26).

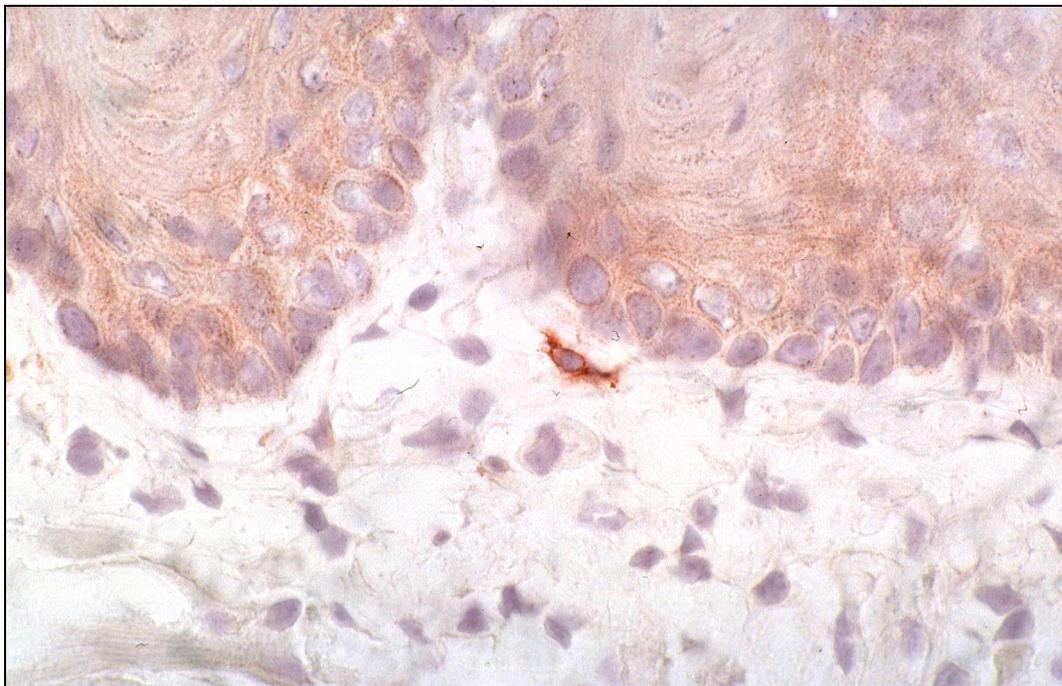


Abb. 25: SCID Maus; CD4-Antigen exprimierende Zelle im subepithelialen Bereich eine Woche *post inoculationem* mit 10⁷ *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 250)

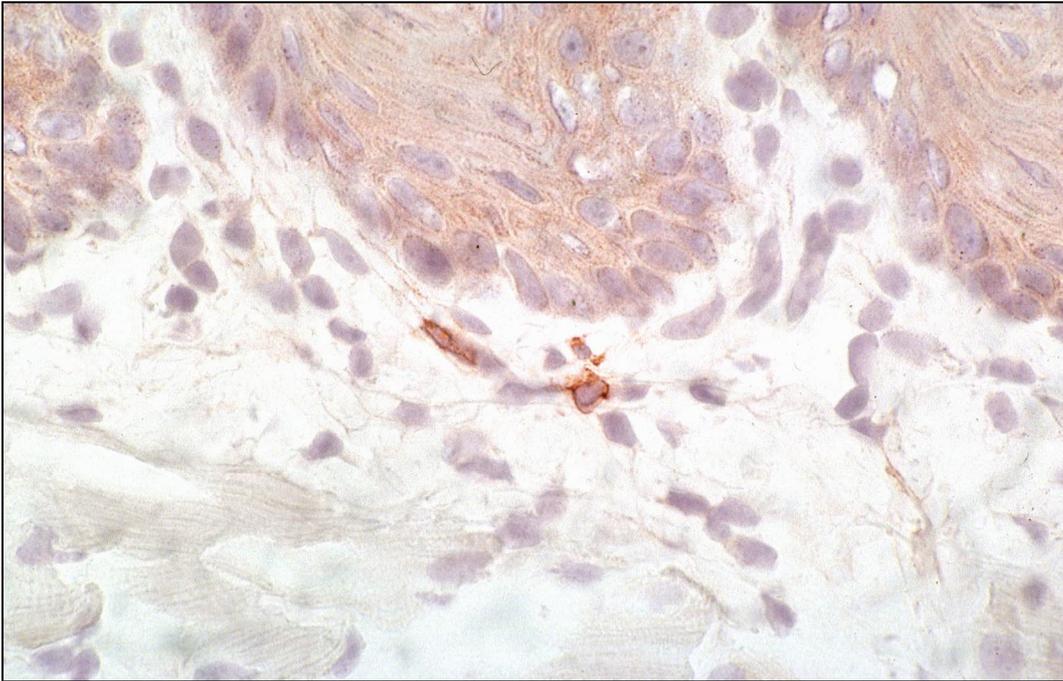


Abb. 26: SCID Maus: CD4-positive Zellen subepithelial eine Woche *post inoculationem* mit 10^7 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 250)

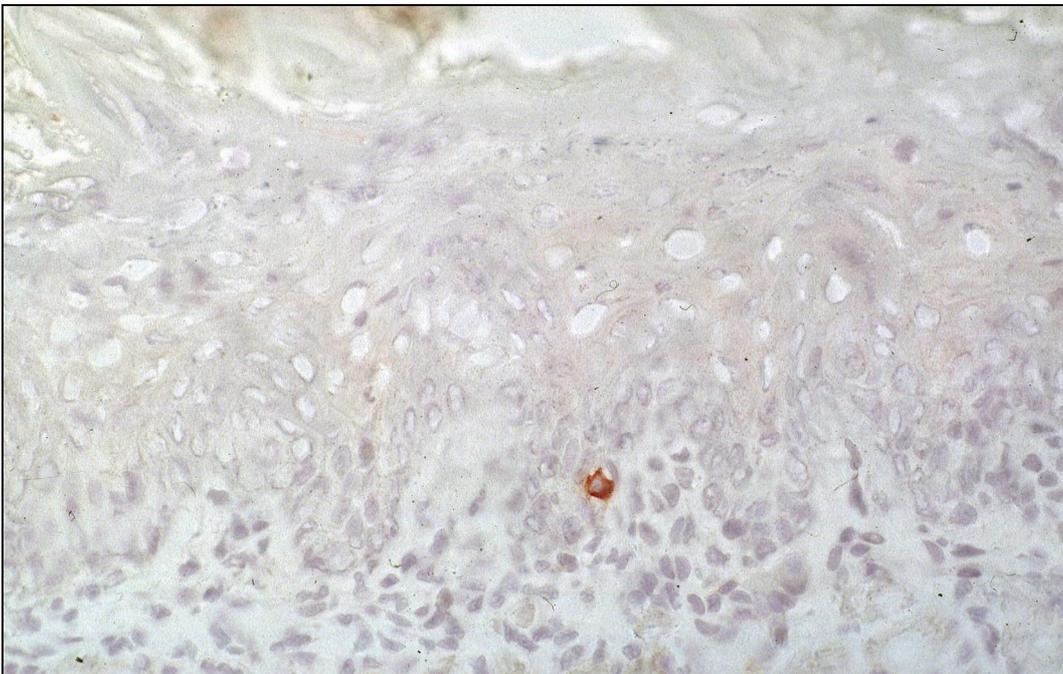


Abb. 27: SCID Maus: CD4-Antigen exprimierende Zelle im Stratum basale eine Woche *post inoculationem* mit 10^7 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 125)

Bei der höchsten Inokulationsmenge von 10^7 fanden sich außerdem vereinzelt $CD4^+$ -Zellen im Stratum basale (Abb. 27).

CD13

Bei CD13 dagegen ließ sich deutlich ein Anstieg der Anzahl exprimierender Zellen abhängig von der Inokulationsmenge nachweisen.

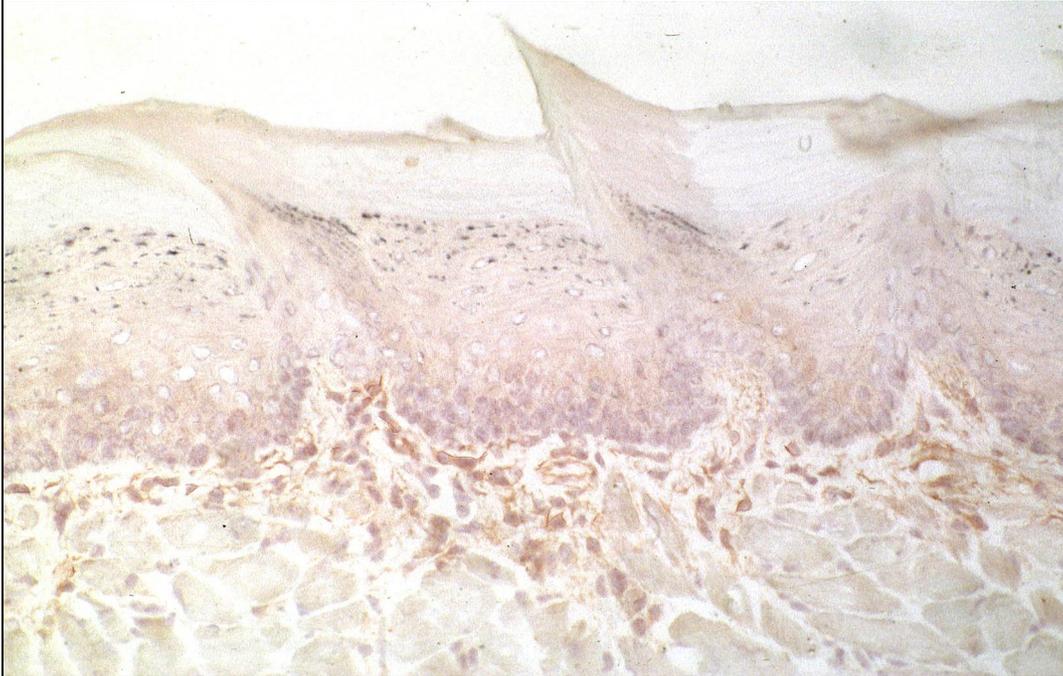


Abb. 28: SCID Maus: CD13-positive Zellen direkt subepithelial und in der Lamina propria eine Woche *post inoculationem* mit 10^7 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 90)

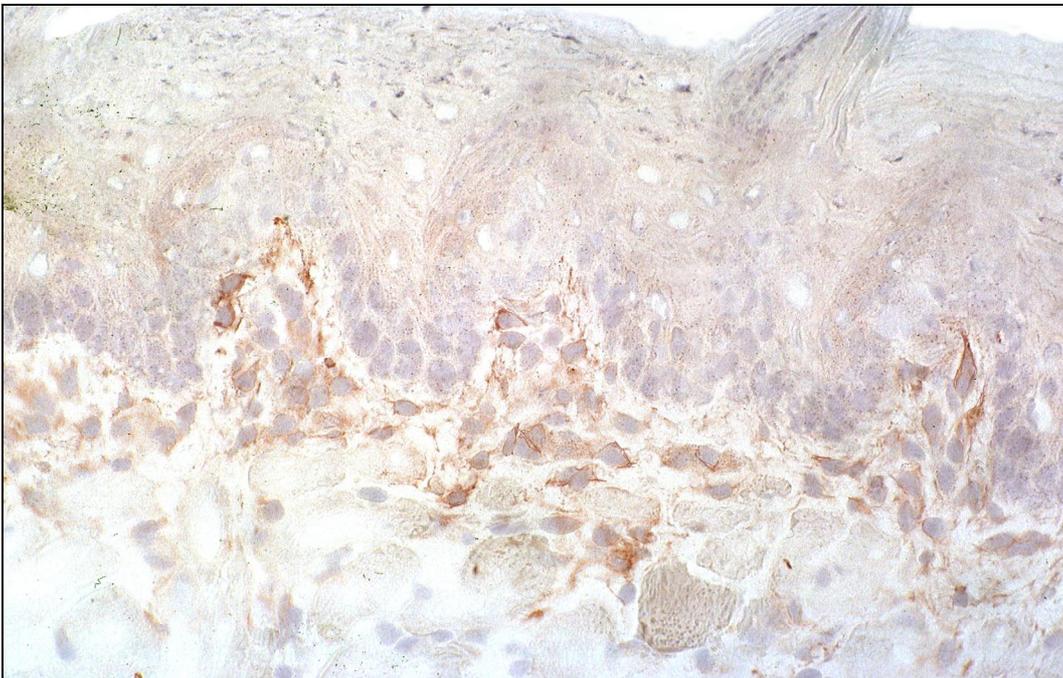


Abb. 29: SCID Maus: Deutliche Expression von CD13 Oberflächenantigen auf Zellen im subepithelialen Bereich und der Lamina propria eine Woche *post inoculationem* mit 10^7 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 140)

Bei einer Inokulationsmenge von 10^6 und 10^7 fanden sich nicht nur im subepithelialen Bereich sondern in der gesamten Lamina propria CD13⁺-Zellen (Abb. 28 und 29). Sowohl bei der Gabe von 10^5 Keimen und Glykopeptiden als auch bei fehlender Inokulation waren nur wenige CD13⁺-Zellen subepithelial und in der Lamina propria nachzuweisen.

CD54

Die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 fand bei jeder verabreichten Inokulationsmenge, aber auch ohne Inokulation lediglich subepithelial statt. Die Anzahl CD54 exprimierender Zellen war bei einer Inokulationsmenge von 10^4 gering, bei steigender Inokulationsdosis dagegen deutlich erhöht. Der selbe Verlauf ergab sich auch bei der Expression von ICAM-1 im Endothel. Bei zusätzlicher Gabe von Glykopeptiden wurde CD54 nur in geringem Maße sowohl subepithelial als auch im Endothel nachgewiesen. Fand keine Inokulation statt, war das Endothel dennoch aktiviert.

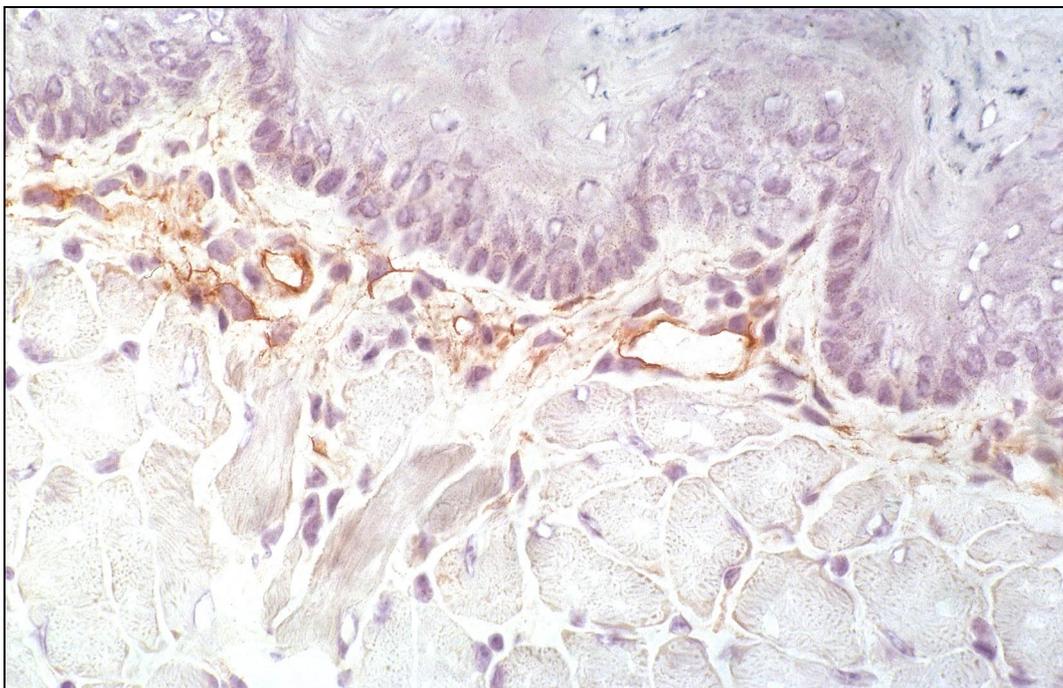


Abb. 30: SCID Maus: CD54-positive Zellen und aktiviertes Endothel im subepithelialen Bereich eine Woche *post inoculationem* mit 10^6 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 140)

CD62E

Bei keiner inokulierten Keimmenge konnte die Expression von E-Selectin im Endothel nachgewiesen werden.

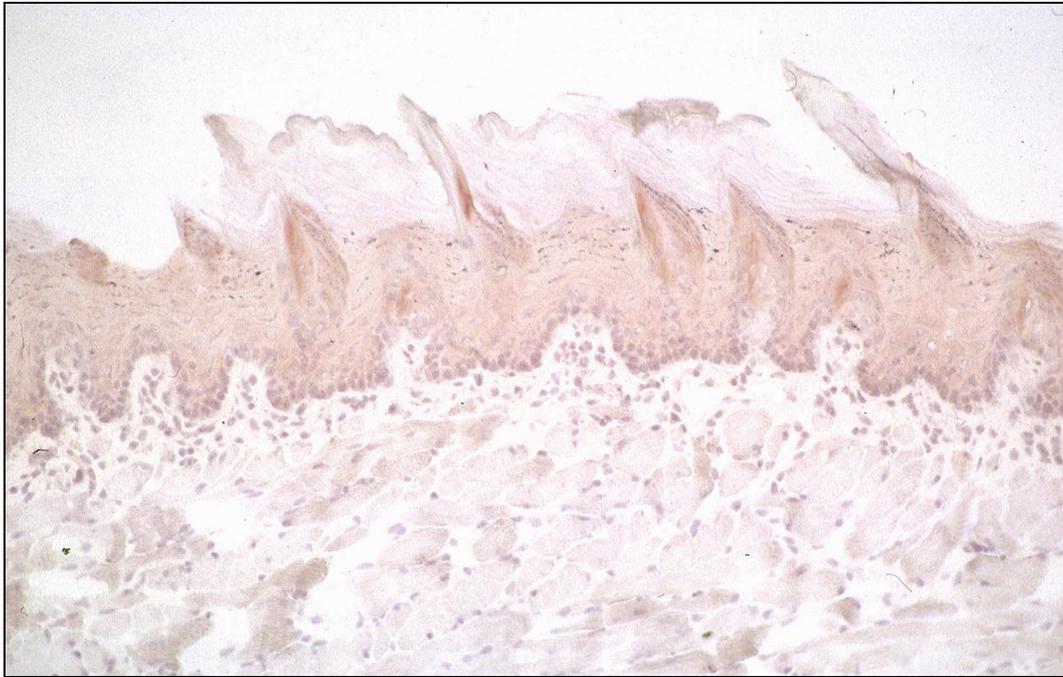


Abb. 31: SCID Maus: Das Endothel ist negativ für den monoklonalen Antikörper gegen CD62E (PAP-Methode, x 100)

CD74

Bei diesem Protein schien die Verteilung innerhalb der Strata annähernd konstant, die Expression fand in der Lamina propria, subepithelial und im unteren Stratum spinosum statt. Die Expression korrelierte nicht mit der Inokulationsdosis, so ließ sich bei geringen Keimmengen eine hohe Anzahl markierter Zellen nachweisen, ebenso bei 10^6 Keimen, wohingegen bei der höheren Keimmenge von 10^7 die Expression geringer ausfiel (Abb. 32 und 33). Bei Inokulation von 10^7 *C. albicans*-Zellen, bei Inokulation von Keimen und Glykopeptiden, sowie fehlender Inokulation waren $CD74^+$ -Zellen zusätzlich im Stratum basale zu beobachten.



Abb. 32: SCID Maus: Markierung einzelner dendritischer Zellen mit dem monoklonalen Antikörper gegen CD74 im subepithelialen Bereich eine Woche *post inoculationem* mit 10^5 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 112)

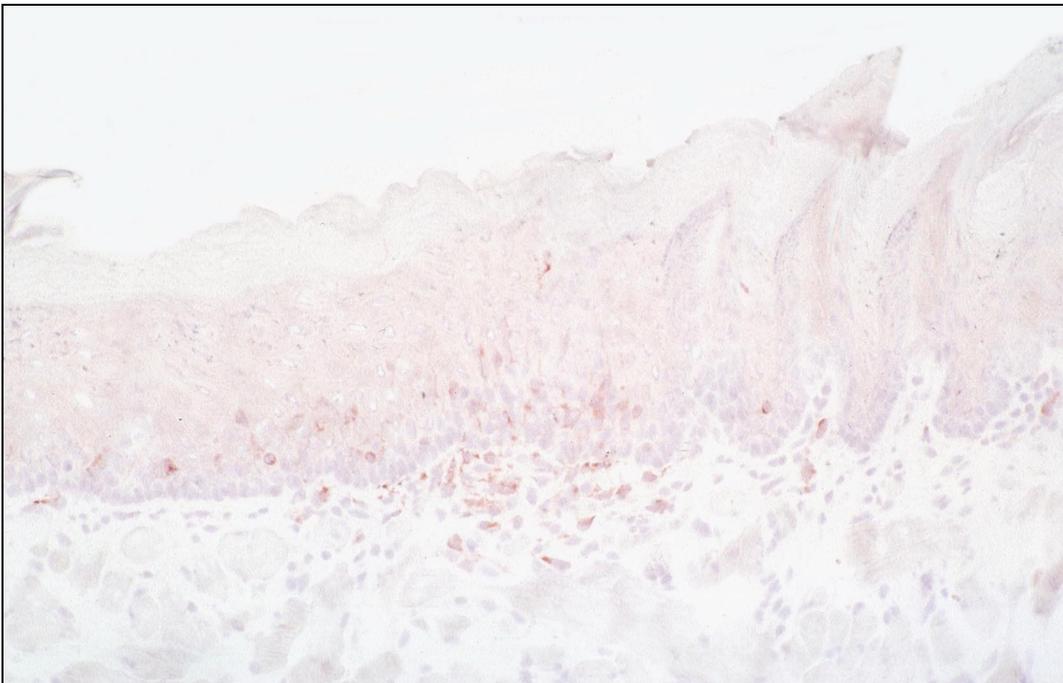


Abb. 33: SCID Maus: CD74-positive Zellen im Stratum spinosum und subepithelial eine Woche *post inoculationem* mit 10^6 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 90)

CD80

Die Expression von CD80⁺-Zellen war nur vereinzelt subepithelial nachweisbar bzw. fehlte vollständig.

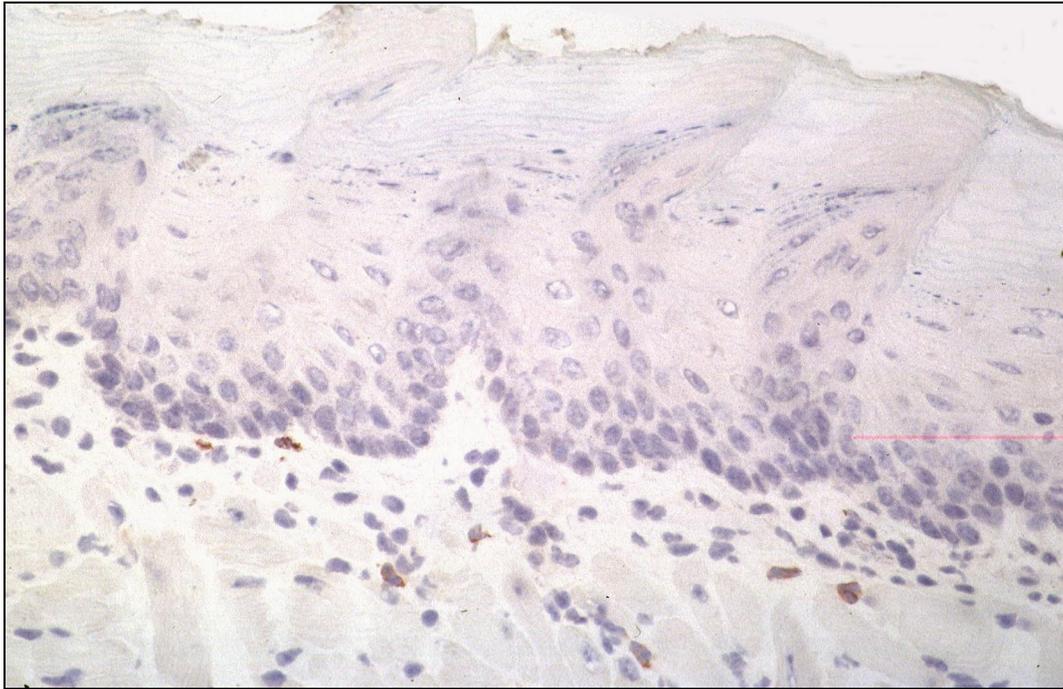


Abb. 34: SCID Maus: CD80-positive Zellen im subepithelialen Bereich eine Woche *post inoculationem* mit 10^7 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 100)

CD86

Die Expression von CD86⁺-Zellen war im subepithelialen Bereich bei jeder Inokulationsdosis wenig ausgeprägt, vereinzelt fanden sich positive Zellen in der Lamina propria und in der Basalzellschicht (Abb. 35). Wurden Keime mit Glykopeptiden inokuliert, ähnelte das Verteilungsmuster dem höherer Inokulationsdosen. Bei fehlender Inokulation waren in der Basalzellschicht und in der Lamina propria nur vereinzelt CD86⁺-Zellen nachweisbar.

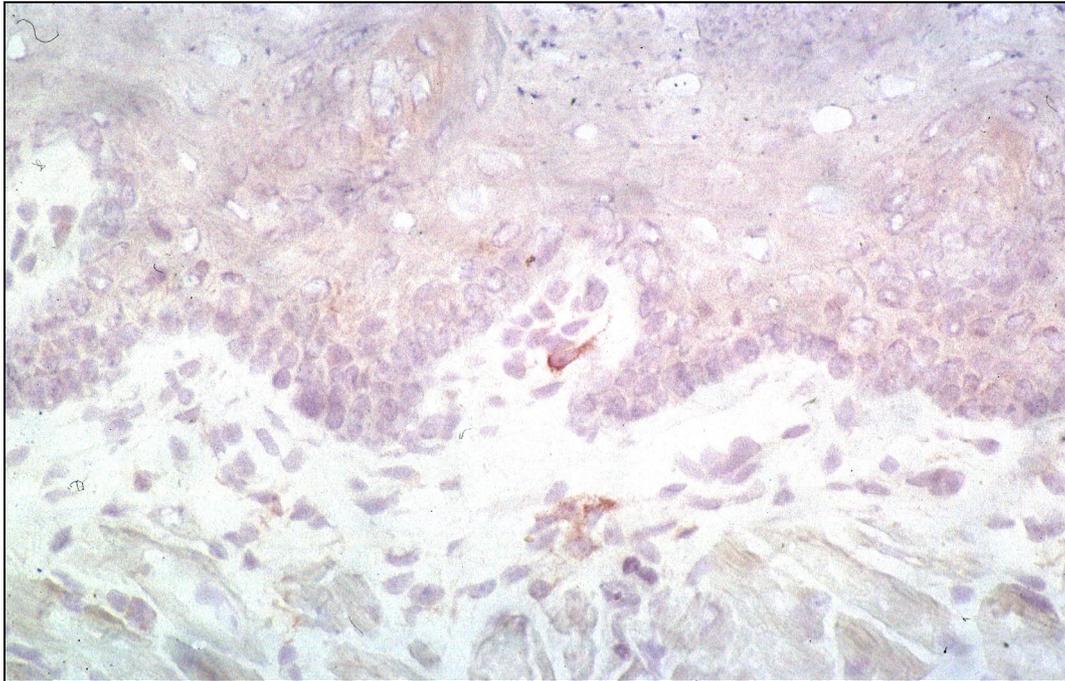


Abb. 35: SCID Maus: Markierung einzelner Zellen mit dem monoklonalen Antikörper gegen CD86 im subepithelialen Bereich eine Woche *post inoculationem* mit 10^4 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 135)

CD103

Bei der geringsten Inokulationsmenge waren CD103⁺-Zellen wenig in der Basalzellschicht und vereinzelt subepithelial lokalisiert (Abb. 36 und 37). Beim Ansteigen der Inokulationsdosis konnte eine deutliche Expression innerhalb des Stratum basale beobachtet werden. Wurden 10^6 Keime verabreicht, beschränkte sich die Expression nicht auf diese beiden Strata, sondern war zusätzlich in geringem Maße im Stratum spinosum vorzufinden. Bei der nächsthöheren Dosis waren in der Basalzellschicht und im subepithelialen Bereich CD103⁺-Zellen nachweisbar, die Menge exprimierender Zellen ging zurück. Wurden der Inokulationsdosis von 10^5 Keimen Glykopeptide zugesetzt, konnten nur ein bis zwei positive Zellen pro Schnitt nachgewiesen werden, sie waren im Stratum basale und subepithelial lokalisiert. Die Expression von CD103 war bei Tieren, die keine Keime erhielten, ebenso auf diese beiden Zelllagen und auf wenige CD103 exprimierende Zellen begrenzt.

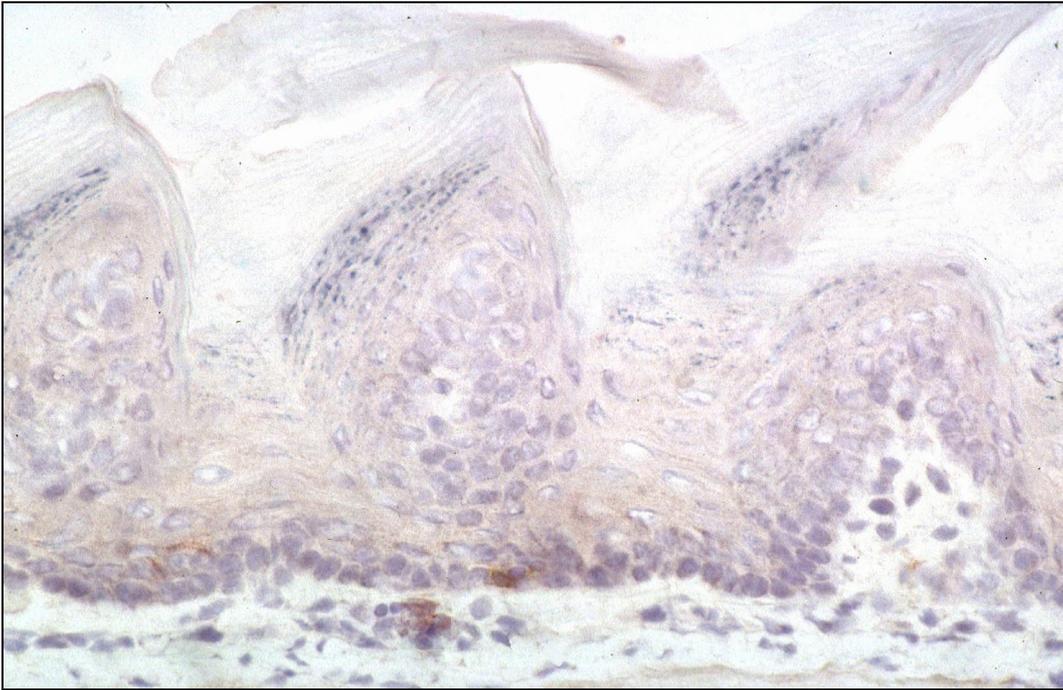


Abb. 36: SCID Maus: CD103-positive Zellen im Stratum basale und subepithelial eine Woche *post inoculationem* mit 10^5 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 130)

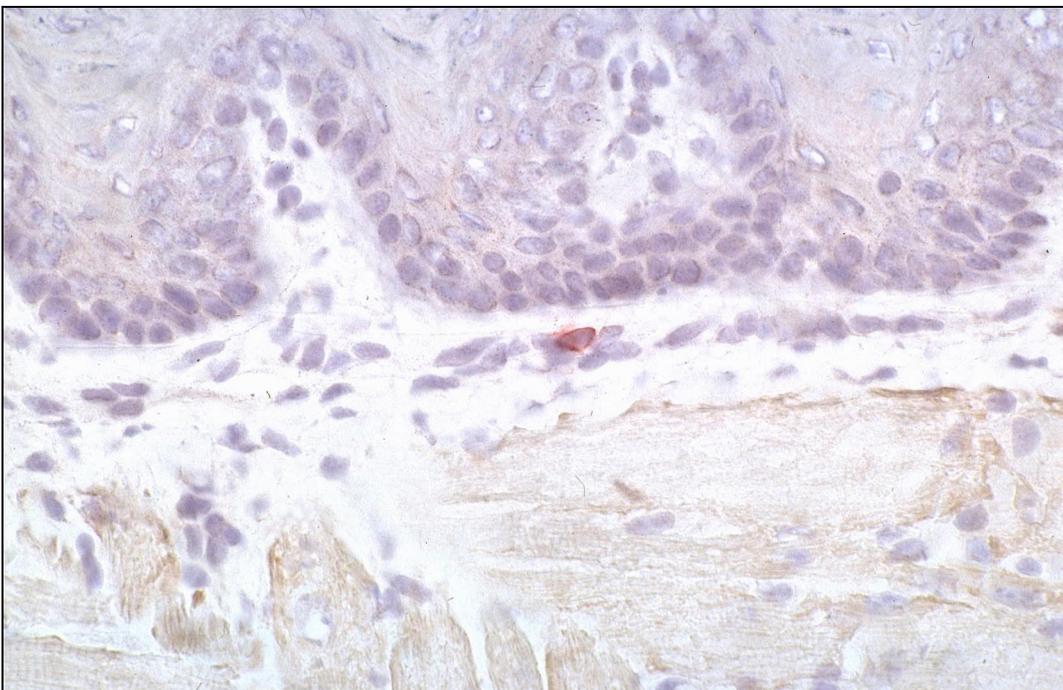


Abb. 37: SCID Maus: CD103-positive Zelle im subepithelialen eine Woche *post inoculationem* mit 10^5 *C. albicans*-Zellen (PAP-Methode, x 165)

3.4.2 Verteilung der markierten Antigene in Abhängigkeit zur Inokulationsdosis innerhalb der Zell-Lagen zusammengefaßt nach Inokulationsmenge

Tabelle 13 (Balb/c) und 14 (SCID) zeigen die Ergebnisse zusammengefaßt nach Inokulationsmenge. Die semiquantitative Auswertung positiver Markierungen der einzelnen Schnitte wurde summiert und durch die Anzahl der Schnitte geteilt.

Wie im vorigen Abschnitt ist die Mengenbewertung der exprimierten Antigene im jeweiligen Stratum dargestellt. Nicht getönte Kästchen zeigen an, daß in diesem Stratum keine Markierung vorhanden war.

Tabelle 15 zeigt die Verteilung der markierten Antigene in Abhängigkeit zur Inokulationsdosis innerhalb der Zell-Lagen gegliedert nach Inokulationsmenge bei Balb/c Mäusen.

Tab. 13: Balb/c Mäuse: Semiquantitative Auswertung der Antigenmarkierung innerhalb der Epithelzell-Lagen gegliedert nach Inokulationsmenge

| Antikörper gegen | CD4 | CD13 | CD54 | CD62E | CD74 | CD80 | CD86 | CD103 |
|---|-----|------|------|-------|------|------|------|-------|
| Inokulationsmenge 10⁵ | | | | | | | | |
| Anzahl | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 |
| Str. spin. oben | | | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | + | | | |
| Basalzellen | (+) | | | | | | | (+) |
| subepithelial | (+) | | + | | + | | | (+) |
| Lamina propria | | (+) | | | | | | |
| Endothel | | | + | | | | | |
| Inokulationsmenge 10⁶ | | | | | | | | |
| Anzahl | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 |
| Str. spin. oben | | | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | + | | | |
| Basalzellen | (+) | | | | | | | + |
| subepithelial | + | + | + | | + | | + | (+) |
| Lamina propria | | + | | | | + | | |
| Endothel | | | + | | | | | |
| Inokulationsmenge 10⁷ | | | | | | | | |
| Anzahl | n=6 | n=6 | n=6 | n=6 | n=6 | n=6 | n=6 | n=6 |
| Str. spin. oben | | | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | + | | | (+) |
| Basalzellen | + | | | | | | | + |
| subepithelial | + | +++ | ++ | | + | | + | + |
| Lamina propria | | +++ | | | (+) | + | | |
| Endothel | | | + | | | | | |

| Antikörper gegen | CD4 | CD13 | CD54 | CD62E | CD74 | CD80 | CD86 | CD103 |
|--|-----|------|------|-------|------|------|------|-------|
| Inokulationsmenge 10⁸ | | | | | | | | |
| Anzahl | n=4 | n=3 | n=4 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 |
| Str. spin. oben | | | | | | | + | |
| Str. spin. unten | (+) | | | | +++ | | + | + |
| Basalzellen | (+) | | | | | | + | +++ |
| subepithelial | ++ | +++ | +++ | | +++ | + | +++ | + |
| Lamina propria | | ++ | | | (+) | | (+) | |
| Endothel | | | +++ | | | | | |
| Inokulationsmenge 10⁸ + Glykopeptide | | | | | | | | |
| Anzahl | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 |
| Str. spin. oben | | | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | (+) | | (+) | |
| Basalzellen | + | | | | | | | (+) |
| subepithelial | (+) | ++ | + | | + | | ++ | (+) |
| Lamina propria | | + | | | (+) | | (+) | |
| Endothel | | | + | | | | | |
| Keine Inokulation | | | | | | | | |
| Anzahl | n=1 | n=1 | n=1 | n=1 | n=1 | n=1 | n=1 | n=1 |
| Str. spin. oben | | | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | + | | | |
| Basalzellen | (+) | | | | | | | + |
| subepithelial | | + | + | | + | | ++ | (+) |
| Lamina propria | | + | | | | | | |
| Endothel | | | (+) | | | | | |

Inokulationsmenge 10⁵

Das Ausmaß der Immunreaktion auf eine Inokulation mit 10⁵ Keimen war gering und spielte sich zum größten Teil subepithelial ab. Das Endothel war wenig aktiviert (CD54), CD62E Antigen wurde nicht exprimiert. CD80⁺- und CD86⁺-Zellen konnten nicht nachgewiesen werden. Im Stratum spinosum (untere Schicht) waren wenige CD74⁺-Zellen zu beobachten. CD4⁺- und CD103⁺-Zellen fanden sich vereinzelt in der Basalzellschicht und subepithelial.

Inokulationsmenge 10^6

Bei einer Inokulation um eine log Stufe höher fand die Expression von CD80 im subepithelialen Bereich und CD86 in der Lamina propria statt. Bei CD74 und CD54 waren keine Veränderungen gegenüber der niedrigeren Dosis zu verzeichnen, wohingegen die Expression von CD13 zunahm und sowohl subepithelial als auch im Bereich der Lamina propria zu finden war. In der Basalzellschicht und unterhalb des Stratum basale gelang der Nachweis von CD4⁺-Zellen.

Inokulationsmenge 10^7

Im Gegensatz der vorhergehenden Inokulationsdosis zeigte sich, daß ein deutlicher Anstieg an CD13-Antigen, das subepithelial und in der Lamina propria exprimiert wurde, zu verzeichnen war. Die Expression von CD54 nahm subepithelial zu, im Endothel jedoch konnte keine vermehrte Expression von ICAM-1 nachgewiesen werden. CD103 wurde in drei Zellschichten (Lamina propria, Basalzellschicht und unterem Bereich des Stratum spinosum) exprimiert. Keine Veränderungen gegenüber der vorherigen Inokulationsdosis ergaben sich bei CD74, CD80 und CD86. Der Zellmarker für CD62E (E-Selectin) war weiterhin negativ. Die Zahl CD4⁺-Zellen im Stratum basale und subepithelial stieg geringfügig an.

Inokulationsmenge 10^8

Ein deutlicher Anstieg war bei der Expression von CD54 (ICAM-1) im Endothel zu sehen. Ebenfalls wurde eine vermehrte Expression von CD74 im unteren Stratum spinosum und subepithelial beobachtet. CD4⁺- und CD86⁺-Zellen reichten von der subepithelialen Schicht, wo sie gehäuft auftraten, bis in die oberen Anteile des Stratum spinosum, hier jedoch nur in geringem Maße. CD103 blieb weiterhin auf den subepithelialen Bereich, die Basalzellschicht und unteren Anteile der Stachelzellschicht begrenzt, die Expression war jedoch deutlich erhöht. Keine Veränderung trat bei der Expression von CD80 ein, nach wie vor fanden sich nur einzelne positive Zellen direkt unter der Basalzellschicht, anti-CD62E zeigte keine Markierung.

Inokulationsmenge 10^8 +Glykopeptide

Im subepithelialen Bereich und der Lamina propria fanden sich eine geringe bis mäßige Anzahl CD13⁺-, CD54⁺-, CD74⁺- und CD86⁺-Zellen. Das Endothel war nur minimal aktiviert (ICAM-1), die Expression von CD62E fehlte ganz. Wenige CD4-exprimierende Zellen fanden sich in der Basalzellschicht, vereinzelt lagen CD4⁺-

Zellen direkt unterhalb des Stratum basale. In der Basalzellschicht sowie subepithelial waren ebenso vereinzelt CD103⁺-Zellen zu beobachten.

Keine Inokulation

Wurden keine Keime inokuliert, fand sich ein ähnliches Verteilungsmuster wie bei der Inokulationsmenge von 10⁵: CD13⁺-, CD54⁺-, CD74⁺- und CD103⁺-Zellen wurden in geringem Maße subepithelial nachgewiesen. Eine Expression von CD62E und CD80 fehlte vollständig. Allein CD86 zeigte eine deutlich ausgeprägte Expression im subepithelialen Bereich. Vereinzelt fanden sich CD4⁺-Zellen im Stratum basale, das Endothel zeigt eine minimale Aktivierung (ICAM-1).

Tabelle 14 zeigt die Verteilung der markierten Antigene in Abhängigkeit zur Inokulationsdosis innerhalb der Zell-Lagen gegliedert nach Inokulationsmenge bei SCID Mäusen.

Tab. 14: SCID Mäuse: Semiquantitative Auswertung der Antigenmarkierung innerhalb der Epithelzell-Lagen gegliedert nach Inokulationsmenge

| Antikörper gegen | CD4 | CD13 | CD54 | CD62E | CD74 | CD80 | CD86 | CD103 |
|---|-----|------|------|-------|------|------|------|-------|
| Inokulationsmenge 10⁴ | | | | | | | | |
| Anzahl | n=2 | n=4 | n=2 | n=2 | n=2 | n=2 | n=4 | n=2 |
| Str. spin. oben | | | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | ++ | | | |
| Basalzellen | | | | | | | (+) | + |
| subepithelial | (+) | ++ | + | | +++ | (+) | + | + |
| Lamina propria | | (+) | | | + | | | |
| Endothel | | | + | | | | | |
| Inokulationsmenge 10⁵ | | | | | | | | |
| Anzahl | n=6 | n=7 | n=6 | n=6 | n=6 | n=6 | n=6 | n=6 |
| Str. spin. oben | | | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | + | | | (+) |
| Basalzellen | | | | | | | | ++ |
| subepithelial | (+) | ++ | +++ | | + | | + | + |
| Lamina propria | | + | | | (+) | | (+) | |
| Endothel | | | +++ | | | | | |
| Inokulationsmenge 10⁶ | | | | | | | | |
| Anzahl | n=5 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=4 | n=4 |
| Str. spin. oben | | | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | + | | | (+) |
| Basalzellen | | | | | | | | + |
| subepithelial | | +++ | +++ | | +++ | | + | (+) |
| Lamina propria | | +++ | | | (+) | | (+) | |
| Endothel | | | +++ | | | | | |

| Antikörper gegen | CD4 | CD13 | CD54 | CD62E | CD74 | CD80 | CD86 | CD103 |
|--|-----|------|------|-------|------|------|------|-------|
| Inokulationsmenge 10⁷ | | | | | | | | |
| Anzahl | n=9 | n=11 | n=6 | n=7 | n=6 | n=6 | n=9 | n=6 |
| Str. spin. oben | | | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | + | | | |
| Basalzellen | (+) | | | | + | | (+) | + |
| subepithelial | (+) | +++ | +++ | | + | (+) | + | + |
| Lamina propria | | + | | | + | | + | |
| Endothel | | | +++ | | | | | |
| Inokulationsmenge 10⁵ + Glykopeptide | | | | | | | | |
| Anzahl | n=3 | n=3 | n=3 | n=6 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 |
| Str. spin. oben | | | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | + | | | |
| Basalzellen | | | | | | | | (+) |
| subepithelial | (+) | + | + | | + | | + | (+) |
| Lamina propria | | + | | | + | | + | |
| Endothel | | | + | | | | | |
| Keine Inokulation | | | | | | | | |
| Anzahl | n=3 | n=5 | n=3 | n=3 | n=3 | n=3 | n=5 | n=3 |
| Str. spin. oben | | | | | | | | |
| Str. spin. unten | | | | | + | | | |
| Basalzellen | | | | | + | | (+) | + |
| subepithelial | (+) | + | + | | + | | | (+) |
| Lamina propria | | (+) | | | (+) | | (+) | |
| Endothel | | | ++ | | | | | |

Inokulationsmenge 10⁴

Bei dieser Inokulationsmenge zeigte sich, daß vor allem subepithelial positive Immunreaktionen zu finden waren. In der Basalzellschicht konnten lediglich CD86⁺- und CD103⁺-Zellen beobachtet werden. CD62E, das auf stimulierten vaskulären Endothelzellen exprimiert wird, wurde nicht nachgewiesen, wohingegen eine Expression von CD54 (ICAM-1) auf aktiviertem Endothel und antigenpräsentierenden Zellen schwach, jedoch nachweisbar war. Oberhalb der Basalzellschicht konnte, abgesehen von der Expression von CD74, keine Reaktion beobachtet werden. Insgesamt wurden in allen Schnitten dieser Inokulationsdosis nur ein bis zwei Zellen, die das CD4-Antigen exprimieren, nachgewiesen; diese fanden sich subepithelial.

Inokulationsmenge 10^5

Bei einer Inokulationsdosis von 10^5 Keimen konnten Reaktionen wiederum hauptsächlich subepithelialen Bereich beobachtet werden (CD13, CD54, CD 74, CD86, CD103). Auch war ein deutlicher Anstieg von vaskulären Endothelzellen, die das funktionell relevante Adhäsionsmolekül (ICAM-1) exprimieren, zu verzeichnen. ICAM-1 wurde subepithelial in großen Mengen exprimiert, wobei diese Zellen in Nestern angeordnet waren. In den Basalzellen wurde eine starke Expression von anti-CD103 beobachtet, weitere Markierungen waren nicht vorhanden. Auch die darüberliegenden Strata wiesen keine Markierungen auf. Die Expression von CD62 und CD80 war weiterhin negativ. Wie auch bei einer Inokulationsmenge von 10^4 wurden subepithelial nur ein bis zwei CD4-exprimierende Zellen nachgewiesen.

Inokulationsmenge 10^6

Bei der Auswertung dieser Inokulationsdosis zeigte sich eine Zunahme der Expression von CD13⁺-, CD54⁺- und CD74⁺-Zellen im subepithelialen Bereich. In den Basalzellen fanden sich geringe Mengen von CD103⁺-Zellen. Auch in den höheren Zell-Lagen wurden CD74⁺-, CD86⁺- und CD103⁺-Zellen in geringen Mengen, in der Lamina propria dagegen große Mengen CD13-exprimierende Zellen, nachgewiesen. CD4⁺-Zellen fehlten bei dieser Inokulationsdosis ganz, ebenso wie die Expression von E-Selectin (CD62E) und CD80.

Inokulationsmenge 10^7

Ein weiterer Anstieg von immunkompetenten Zellen ist bei dieser Inokulationsmenge nicht zu verzeichnen. Auffällig ist jedoch, daß CD74 hier in vier Epithellagen exprimiert wurde, in der Lamina propria, subepithelial, in der Basalzellschicht und im unteren Lagen des Stratum spinosum. CD4⁺-Zellen waren in minimaler Anzahl im Stratum basale sowie direkt unterhalb der Basalzellen zu finden. E-Selectin wurde nicht exprimiert.

Inokulationsmenge 10^5 + Glykopeptide

Sowohl subepithelial als auch in der Bereich der Lamina propria fanden sich nur geringe und geringste Mengen CD13⁺-, CD54⁺-, CD74⁺-, CD86⁺-Zellen. Das Endothel war wenig aktiviert (CD54). Bis auf eine geringfügige Expression von CD74 im unteren Stratum spinosum blieben die Reaktionen auf den subepithelialen Bereich beschränkt. In der Basalzellschicht und direkt unterhalb des Stratum basale wurden vereinzelt CD103⁺-Zellen nachgewiesen. Die Anti-CD62E Markierung war auch hier

negativ. In allen Schnitten dieser Inokulationsmenge in Verbindung mit Glykopeptiden wurden nur ein bis zwei CD4⁺-Zellen pro Schnitt markiert.

Keine Inokulation

Bei Tieren, die keine Keime erhielten, konnten anhand der hier verwendeten Zellmarker Immunreaktionen von nur geringem Ausmaß festgestellt werden. Diese waren bis auf CD74 und CD103 subepithelial lokalisiert. Wenige CD103⁺-Zellen fanden sich in der Basalzellschicht, anti-CD74 Markierungen weiterhin in der Lamina propria (ein bis zwei Zellen), wenig im unteren Stratum spinosum. CD86-exprimierende Zellen wurden lediglich vereinzelt im Stratum basale und in der Lamina propria nachgewiesen. Anti-CD54 (ICAM-1) dagegen zeigte im vaskulären Endothel eine deutliche Reaktion. CD80⁺- und CD62E⁺-Zellen konnten nicht beobachtet werden. CD4-Antigen exprimierende Zellen waren nur vereinzelt subepithelial zu finden.

4 Diskussion

4.1 Oligosaccharid-Lektin-vermittelte Adhäsionsmechanismen bei acht *C. albicans* Stämmen

Die Ergebnisse dieser Studie dienen als Grundlage für die Methode der *C. albicans*-Aufbereitung, um im nachfolgenden Tierversuch von standardisierten, reproduzierbaren Parametern ausgehen zu können. In der Untersuchung konnte eine spezifische Bindung an lösliches Muzin für alle untersuchten Stämme nachgewiesen werden. Dabei wurden die Rezeptoren zunächst nicht näher definiert, sondern nach rein funktionellen Kriterien die unterschiedliche Fähigkeit verschiedener Keime an diesen Rezeptor zu binden, beschrieben. Da Muzin ein heterogenes Oligoglykangerüst mit vielfachen Bindungsmöglichkeiten darstellt, kann diese Rezeptoreigenschaft auch von einer Gruppe von Rezeptoren innerhalb des Moleküls übernommen werden. Viele der chemischen Bestandteile der in der Einleitung beschriebenen Rezeptorsysteme finden sich auch im Muzin. Insbesondere das Adhäsion/Rezeptorsystem bei dem *C. albicans* über Lektine an Fucose oder N-Acetylglucosamin bindet, wird durch die nachgewiesene Bindung von *C. albicans* an Muzin bestätigt. Die Bindung an Muzin verläuft über ein universell verbreitetes Rezeptorsystem, das nicht auf bestimmte Lektintypen von *C. albicans* beschränkt ist. Durch den Einsatz von Muzin werden alle Adhäsionsstrukturen, die bei der Adhärenz beteiligt sind und für die eine spezifische Bindung ermittelt werden kann ohne Differenzierung ihres Lektintyps erfaßt. Damit sind vergleichende Tests bezüglich der Wirkung des Muzins auf verschiedene *C. albicans*-Stämme möglich und nicht auf Stämme eines bestimmten Lektintyps beschränkt.

4.1.1 Höhe des Bindungspotentials

Die durchschnittliche spezifische Bindung aller Candida-Stämme im Bezug zur Gesamtbindungsfähigkeit von Candida an Muzin betrug 38 %. *Klotz et al.* zeigten, daß bei dem Einsatz einer 0,5 %-igen Muzinlösung eine Verdrängung bis zu 83 % erreicht werden konnte (125). In dieser Studie wurden zur Bestimmung der Adhärenz jedoch intestinale Zellen verwendet und die Verdrängung wurde nicht kompetitiv gemessen, sondern es fand zuvor eine Koinkubation der Keime mit Muzin statt. Die differierenden Ergebnisse scheinen demnach im Verfahren begründet.

Das Bindungspotential resultiert aus einem im Überschuß eingesetzten löslichen Muzin. Die Ergebnisse bestätigen, daß die Bindung an Muzin vom Verhältnis des immobilisierten Muzins zu löslichem Muzin abhängig sind, eine Verdrängung durch lösliches Muzin also nur durch ein Übermaß an löslichem Muzin zu erreichen ist. Möglicherweise werden bei einem größeren Verhältnis von Verdrängungsmuzin zu

Muzin mehr spezifische Rezeptoren besetzt, somit wäre eine ausgeprägtere Verdrängung als in dieser Studie nachgewiesen, möglich. Ein weiterer limitierender Faktor für die Verdrängung durch Muzin besteht in der Anzahl eingesetzter Keime.

4.1.2 Temperaturabhängigkeit

Die Ergebnisse zeigten eine Temperaturabhängigkeit der spezifischen Bindung von *C. albicans* an Muzin, unabhängig vom ausgewählten Stamm. Somit scheint eine Membrangestaltung oder Neusynthese, die mit der Änderung der Adhäsineexpression einhergeht, temperaturabhängig zu sein. Frühere Untersuchungen konnten ebenfalls zeigen, daß die Ausbildung von Adhäsinen durch die Wachstumsbedingungen der Zellen beeinflusst wird (51, 260).

Die Ergebnisse zeigten, daß sich die Adhäsineexpression im untersuchten Temperaturintervall mit dem Anstieg der Temperatur erhöhte. Bei 25 und 27°C war die Expression am niedrigsten. Erst beim Erreichen höherer Temperaturen, die denjenigen Körperbereichen des Wirts entsprechen, an die sich der Mikroorganismus stammenspezifisch anlagert, war eine deutliche Expression der Adhäsine vorhanden. *C. albicans* besiedelt selten Körperbereiche, deren Temperatur niedriger als 35°C beträgt. Selbst in Körperbereichen, die niedrigere Temperaturen aufweisen, wie z.B. Haut, werden intertriginöse Bereiche zu Kolonisation bevorzugt, da hier höhere Temperaturen vorliegen als im ungeschützten Hautbereich (180).

Für die Verarbeitung von *C. albicans* bedeutet diese Temperaturabhängigkeit, daß Versuchsaufbauten ohne Konstanthaltung der Temperatur nicht reproduzierbar sind. *Odds et al.* wiesen in ihren Untersuchungen darauf hin, daß bei der Entwicklung standardisierter Antimykotika-Suszeptibilitätstests experimentelle Variablen wie Temperatur einer Kontrolle unterliegen müssen (182). Aus vorliegenden Ergebnissen können Inkubationstemperaturen empfohlen werden, die bei 35°C lagen. Vom National Committee for Clinical and Laboratory Standards wird für Antimykotika-Suszeptibilitätstests ebenfalls eine Inkubationstemperatur von 35°C empfohlen (175).

4.1.3 Zeitabhängigkeit

Nicht der zeitliche Verlauf der Adhäsion, sondern der Einfluß der Inkubationsdauer sollte bei dem Versuchsaufbau berücksichtigt werden. Es sollte gezeigt werden, nach welcher Inkubationsdauer *C. albicans* auf einen Temperaturreiz mit der Ausbildung von Adhäsinen reagiert. Bei der Untersuchung der Stämme war für Stamm DSM 1577, 6569 und 6659 eine deutliche Zeitabhängigkeit erkennbar. Diese reagierten nach Temperaturreiz mit einem Anstieg der Adhäsineexpression, bei einem Maximum 40 Minuten und einem Abfall 60 Minuten nach Temperaturreiz. Die Adhäsineexpressi-

on verlief dabei nicht linear ansteigend bis zum Zeitpunkt 40 Minuten, sondern zweigipfelig. Jeweils nach 20 Minuten erreichte die Expression ein Maximum, das niedriger ausfiel als bei 40 Minuten. Möglicherweise wird eine zweigipfelige Expression durch zwei unterschiedliche Modi bei der Adhäsinexpression hervorgerufen.

4.2 Tiermodell

In vorliegender Untersuchung wurde die Infektion mit *C. albicans* experimentell anhand eines Mausmodells dargestellt. Bisherige histopathologische Studien zeigten, daß das Mausmodell für die Darstellung der oralen Candidiasis beim Menschen geeignet ist (18, 52, 62, 105, 106, 134).

Für Untersuchungen zu klinischen Veränderungen der oralen Candidiasis wurden Ratten wegen der größeren Mundhöhle und der besseren Zugänglichkeit bevorzugt (7-10, 77, 87, 88, 113, 117, 169, 248). Da es sich bei vorliegender Untersuchung jedoch um eine histopathologische Studie handelte, konnte eine niedrigere Tierspezies gewählt werden. Ein weiterer Grund für die Wahl des Mausmodells war die Tatsache, daß *C. albicans* Bestandteil der physiologischen Mundflora der Ratte ist und daher für Untersuchungen zur Keimmenge und immunologischen Reaktionen weniger geeignet scheint (134).

Für immunologische Studien sind Mäuse als Versuchstiere hervorragend geeignet, da sie in einer Vielzahl an Inzuchtstämmen erhältlich sind, die bezüglich ihres Immunstatus genau charakterisiert sind.

Bei Balb/c Mäusen handelt es sich um Inzuchtmäuse, eine spezielle Züchtung, die in allen Loci homozygot ist. Die Individuen eines Stammes sind daher genetisch identisch.

Die homozygote *scid/scid* Inzuchtmaus, eine rezessive Mausmutation, zeichnet sich durch die fehlende Ausdifferenzierung von B- und T-Lymphozyten aus. Die Mutation im homozygoten Zustand hindert die Differenzierung von Lymphozyten aus Stammzellen durch einen Defekt der DNA-abhängigen Proteinkinase, die Tiere produzieren daher nur unbedeutende Mengen an Immunglobulinen oder T-Zell-Rezeptoren. Ihre lymphatischen Organe sind unterentwickelt, schwere Schädigung der B- und T-Lymphozytenfunktion, Lymphopenie sowie Hypoimmunglobulinämie sind die Folge (35). Dieses Mausmodell eines schweren kombinierten Immundefekts (SCID) bietet eine Möglichkeit, die Interaktion zwischen *C. albicans* und einem Wirt, dessen B- und T-Zell Funktionen unzureichend sind, zu untersuchen.

Untersuchungen zeigten, daß Antibiotika, darunter besonders Tetrazyklin, zur Unterstützung der Etablierung einer Candidiasis im Tiermodell geeignet sind (6, 87, 88, 102, 115, 228, 230). In einer Untersuchung von *Jones et al.* konnte dagegen nach-

gewiesen werden, daß die Verwendung von gnotobiotischen, d.h. keimfrei zur Welt gebrachten und aufgezogenen Mäusestämmen bei der Etablierung einer Candidiasis ebenso effizient ist wie eine Vorbehandlung mit Tetrazyklin (115). Diese Methode ist jedoch teuer und technisch oft problematisch, des weiteren konnte gezeigt werden, daß die Monoinfektion mit *C. albicans* bei gnotobiotischen Tieren innerhalb weniger Wochen verschwand.

In vorliegender Arbeit wurden die Tiere eine Woche *post inoculationem* geopfert und die Zunge für die folgenden Untersuchungen entnommen. Eine Reihe von Forschergruppen haben den klinischen Verlauf der oralen Candidiasis primär anhand von Maus- und Rattenmodellen untersucht (1, 8, 87, 88, 114, 134, 229). Die genannten Studien kamen zu dem gemeinsamen Ergebnis, daß *C. albicans* schon in der Frühphase Gingiva, bukkale Mukosa und Zungenrücken infiziert. Der Zungenrücken scheint die Prädilektionsstelle für eine persistierende orale Candidiasis zu sein (18, 19, 52, 62, 106, 134). Histopathologisch zeigen sich Veränderungen wie Hyperparakeratose, Akanthose, Abflachung des Epithels im dorsalen Bereich der Zunge und eine Entzündungsreaktion mit Mikroabszessen in den oberen Anteilen der Stachelzellschicht sowie ein mononukleäres Infiltrat im darunterliegenden Bindegewebe.

4.3 Auswahl des *C. albicans* Stammes

In vorliegender Untersuchung wurde ein Stamm der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) verwendet. Vorteil dieser Wahl eines DSMZ bzw. ATCC-Stammes ist, daß ein Vergleich mit Untersuchungsergebnissen anderer Studien möglich wird. Dieser Stamm wurde verwendet, da in der zuvor durchgeführten *in vitro* Untersuchung gezeigt werden konnte, daß er eine hohe Bindung an Muzin und O-Glykane aufweist.

Bei Durchsicht früherer Untersuchungen zu experimentell induzierter oraler Candidiasis wird deutlich, daß bei dem überwiegenden Teil eine Charakterisierung des verwendeten Stammes fehlt (3). Folge davon sind beträchtlich von einander abweichende Resultate innerhalb der selben Tierspezies bezüglich der Virulenz des Erregers und der mukosalen Reaktionen.

Eine Vielzahl von Untersuchern verwendete zur Inokulation der Tiere *Candida* Stämme aus Isolaten zufällig ausgewählter Patienten mit oraler Candidiasis (4-6, 8-10, 62, 72, 117, 169, 186, 191, 213), mit systemischer Candidiasis (130, 134), in anderen Studien waren die Angaben über die Herkunft des Stammes nicht eindeutig (87, 88) bzw. es wurde ein Keim verwendet, der zwar durchgängig in allen Studien eingesetzt wurde, jedoch ausschließlich einer Arbeitsgruppe zur Verfügung stand

(18-22, 52, 53, 281, 282). Objektivierbare Ergebnisse, die die Verwendung definierter *C. albicans* Stämme voraussetzen, finden sich nur in kleiner Zahl (165, 269).

4.3.1 Keimzahl

Da *C. albicans* nicht Teil der murinen oralen Flora ist (134), konnten die Tiere mit einer definierten und reproduzierbaren Anzahl von Keimen inokuliert werden. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß bei einmaliger Gabe von 10^8 *C. albicans*-Zellen innerhalb weniger Stunden eine Kolonisation der oralen murinen Mukosa stattfindet. Dabei konnten histologisch Blastosporen und Keimschläuche, doch keine penetrierenden Hyphen nachgewiesen werden. Vom 3. Tag nach Inokulation erfolgt eine Candida-Proliferation und Invasion in die Mukosa (72, 133, 134).

Angaben über die inokulierte Keimmenge schwanken aufgrund der Uneinheitlichkeit der verwendeten Methoden beträchtlich. So wurden in einigen Untersuchungen Tupfer in eine Candida-Suspension von 10^6 Zellen/ml getaucht und in die Mundhöhle des Tieres ausgestrichen, Daten zur tatsächlich eingebrachten Keimzahl existieren daher nicht (19, 22). In Studien zur Besiedlung des Orogastrointestinaltrakts wurde dem Trinkwasser der Tiere 10^5 *C. albicans*-Zellen/ml zugesetzt, so daß die tatsächlich aufgenommene Keimmenge nur Schätzungen unterliegen kann (18, 19, 21, 52, 53, 282).

Kritisch am Stand der bisherigen Untersuchungen ist zusammenzufassen, daß bislang unterschiedliche Techniken in bezug auf Inokulationsmethode (Keimbeimengung ins Trinkwasser vs. oraler Inokulation), Anzahl der Inokulationen, Verwendung modifizierender Komponenten (Antibiotika, Immunsuppressiva) und Einsatz unterschiedlicher Tierspezies und Stämme publiziert wurden. Eine Standardisierung der Methoden erfolgte bisher nicht, daher können die Ergebnisse der vielfältigen Studien nur mit Zurückhaltung verglichen werden.

4.4 Histologische Techniken

4.4.1 PAS-Technik

Die PAS-Färbung der *C. albicans*-Strukturen wurde gewählt, da mit dieser Methode kohlenhydrathaltige Komponenten (neutrale Glykoproteine, Glykoproteide, Glykogen) dargestellt werden können. Die Candida-Zellwand besteht aus β -Glukanen, Mannoproteinen und Chitin, wobei die Hauptkomponente Kohlenhydrate (80-90 %) sind und alle morphologischen Formen von *C. albicans* ähnliche Zusammensetzungen aufweisen (262). Somit ist die PAS-Reaktion zur Sichtbarmachung von Blastosporen, Keimschläuchen und Hyphen etabliert.

4.4.2 Immunperoxidase-Methode

In vorliegender Untersuchung war die immunhistochemische Färbemethode mittels PAP-Methode an Azeton-fixierten Gefrierschnitten durch die käuflich erworbenen Konjugate vorgegeben. Die hier verwendete Biotin-Streptavidin-Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus. Sie stellt eine Weiterentwicklung auf dem Sektor der Immunperoxidase-Färbungen dar und ist bis zu 1000fach empfindlicher als die Immunfluoreszenz. Die Verwendung monoklonaler Antikörper gewährleistet zudem spezifische Markierungen.

Die Kryostattechnik bietet einen guten Antigengehalt und erübrigt die vorhergehende Fixierung der Biopsien. Zu berücksichtigen ist bei der Methode, daß bei einer Dicke der Gewebeschnitte von 5-7 µm jeweils mehrere Zell-Lagen betrachtet werden, und es so zu Überlagerungen kommen kann.

4.5 Diskussion der Ergebnisse

4.5.1 Klinische Befunde

Keine der entnommenen Zungen wies bei 10facher Vergrößerung Veränderungen wie erythematöse, pseudomembranöse oder opake Veränderungen bzw. Abflachung der Papillen auf. Es liegt bislang keine Studie vor, die klinische Veränderungen der murinen Mukosa nach Inokulation mit *C. albicans* beschrieben hat, da in diesen Untersuchungen lediglich Ergebnisse histologischer Präparate ausgewertet wurden. Hingegen zeigten eine Reihe von Studien am Rattenmodell, daß klinische Veränderungen der Mundschleimhaut nach Inokulation mit Candida-Keimen auftreten, wie in Tabelle 15 dargestellt.

Diese Übersicht veranschaulicht die Heterogenität der verwendeten Stämme und Dosierungen bei der experimentellen Candidiasis am Rattenmodell.

Interessant ist, daß in der Mehrzahl der Untersuchungen die klinischen Veränderungen an der Rattenzunge denen der Glossitis rhombica mediana des Menschen ähneln, dennoch besteht keine Korrelation zwischen dem klinischen Befund, den die humanen Isolate auf der Rattenzunge hervorrufen und der klinischen Veränderung, der sie entnommen wurden (4, 5).

Tab. 15: Literaturübersicht über klinische Befunde nach Inokulation von Ratten mit *C. albicans*. Zum besseren Vergleich der Studien wurden nur Tiere aufgeführt, die ohne weitere (Vor-) Behandlung mit dem angegebenen Stamm inokuliert wurden

| Arbeitsgruppe | Tierspezies | C. alb. Stamm | Inok.-Menge | Läsionen |
|-------------------------------|-----------------------|--|---|---|
| <i>Allen et al.</i> 1983 | Sprague-Dawley-Ratten | Zufällig entnommen von A. Prothesenstomatitis B. Ulcus C. Ulcus D. chronisch hyperplastische Candidiasis | 5×10^6 1/w über 25 Wochen | A. keine B. keine C. bei 40% erythematöse Veränderung und Abflachung der Papillae Zungenmitte D. keine |
| <i>Allen et al.</i> 1985 | Sprague-Dawley-Ratten | „mucosa pathogen“ | 5×10^6 1/w über 20 Wochen | bei 80% erythematöse Läsionen Zunge |
| <i>Allen et al.</i> 1987 | Sprague-Dawley-Ratten | 16 Stämme aus drei Formen der oralen Candidiasis und einer Blutkultur | 5×10^6 1/w über 16 Wochen | 6 Isolate führten zu Veränderung und Abflachung der Papillae Zungenmitte |
| <i>Dourov et al.</i> 1987 | Wistar-Ratten | C. albicans Stamm „4019“ | 1×10^6 1/w einmalige Gabe | Keine |
| <i>Allen et al.</i> 1988 | Sprague-Dawley-Ratten | „mucosa pathogen“ | 5×10^6 3/w über 8 Wochen | bei 45% demarkierte Läsion, posteriore Zungenmitte |
| <i>Allen et al.</i> 1989 | Sprague-Dawley-Ratten | „mucosa pathogen“ | 3×10^7 1/w einmalige Gabe | bei 20% Atrophie der Papillae vallatae |
| <i>Meitner et al.</i> 1990 | Sprague-Dawley-Ratten | isoliert aus oraler Candidiasis (Patient) | $\sim 5 \times 10^6$ 1/w einmalige Gabe | bei 100% kleine erhabene opake Bereiche an Gingiva und bukkaler Mukosa |
| <i>Jorge et al.</i> 1993 | Wistar-Ratten | isoliert aus chronischer oraler Candidiasis (Patient) | 3×10^8 3/w 32 Wochen | bei 10% Verlust der Papillen, Zungenrücken |
| <i>O'Grady et al.</i> 1993 | Sprague-Dawley-Ratten | isoliert aus asymptom. Keimträger | 6×10^7 jeden 2. Tag über 11 Tage | keine |
| <i>Allen et al.</i> 1994 | Sprague-Dawley-Ratten | A. „Stamm, der Läsionen bei Ratten induziert“ B. „Stamm, der keine Läsionen induziert“ | 1×10^7 jeden 2. Tag über 12 Tage | A. keine B. bei 22% Papillenatrophie Zungenmitte |

4.5.2 Histopathologie PAS

In vorliegender Untersuchung konnte gezeigt werden, daß nach einmaliger Gabe einer definierten Anzahl von *C. albicans*-Zellen/Inokulation bei immundefizienten SCID und immunkompetenten Balb/c Mäusen Hyphen in das Epithel einwandern. Diese drangen nur bis in das Stratum corneum vor, das Stratum spinosum wurde in keinem Falle erreicht. Diese Beobachtungen bestätigen frühere Studien, die die Invasion bei immunkompetenten Mäusen (3, 62, 106, 134); Mäusen mit kombiniertem B- und T-Zelldefekt (20), iatrogen immunsupprimierten Mäusen mit Cyclosporin A (selektive Beeinträchtigung der T-Zell-vermittelten Immunität und NK-Zell-Aktivität) (130) und Nude-Mäusen (ohne Thymus) (18, 19, 52, 53) untersuchten.

Einige der in Tabelle 15 dargestellten Untersuchungen kommen zu dem Ergebnis, daß lediglich bei Ratten mit klinisch sichtbaren Veränderungen der Zungenschleimhaut auch der histologische Nachweis einer Candida-Infektion erbracht werden konnte. Dieser war charakterisiert durch Invasion von Hyphen in das Stratum corneum, Abflachung der epithelialen Oberflächenmorphologie mit Parakeratose, Akanthose, Hyperplasie der Basalzellschicht, Formation von elongierten Reteleisten und verstärkter mitotischer Aktivität der Basalzellen (5-7). Im Gegensatz hierzu wurde bei den in vorliegender Untersuchung untersuchten Tieren (SCID und Balb/c Mäuse) keine Korrelation zwischen klinischen Veränderungen und Penetration von Candida-Hyphen festgestellt.

Es ist nicht auszuschließen, daß sich die bei Ratten beobachteten Befunde nicht auf das Mausmodell übertragen lassen, zumal bisher keine klinisch-histopathologischen Korrelate zu letzterem vorliegen. Andererseits könnte auch der Zeitpunkt der Organentnahme für die genannten Unterschiede maßgeblich sein, wenngleich zwei Untersuchungen am Rattenmodell zeigen konnten, daß nach einmaliger Inokulation und Opferung der Tiere nach einer Woche klinische Veränderungen der Zunge, Gingiva und bukkaler Mukosa auftraten (9, 169).

Ein älteres Konzept zur Pathogenese der Candidiasis ging davon aus, daß die Transformation der Blastosporen in die Hyphenphase den Wechsel einer Besiedlung in eine Erkrankung anzeigt (143, 293) und daß die Penetration des Epithels durch Hyphen eine Wirtsantwort hervorruft (114, 212). In weiteren Studien konnte dagegen gezeigt werden, daß auch eine Invasion von Candida-Hyphen in die oberste Epithelschicht ohne klinische Zeichen und mukosale Immunreaktion stattfinden kann. Diese Beobachtungen scheinen von dem verwendeten Isolat abzuhängen (4, 8, 10). Selbst Cyclosporin A-immunsupprimierte Ratten wiesen unter Verwendung eines „nicht-Läsionen-induzierenden“ Isolats lediglich Blastosporen und Hypheninvasion im un-

veränderten Stratum corneum (Orthokeratose) auf, wobei eine inflammatorische Reaktion fehlte (10).

Neben dem Nachweis von Candidaelementen in der Keratinschicht der Zungenmukosa wurde in dieser Arbeit die Frage nach einer Assoziation zwischen Keiminvasion und einem reaktiven zellulären Infiltrat gestellt. Übereinstimmend mit o.g. Ergebnissen zeigte sich, daß nur in der Hälfte der Fälle, in denen eine Keiminvasion nachgewiesen werden konnte, Entzündungszellen vorhanden waren. Dabei bestand kein Unterschied zwischen immundefizienten und immunkompetenten Tieren. Eine maßgebliche Erklärung hierfür ist, daß ein Isolat, welches keine klinisch sichtbaren Veränderungen hervorruft, gleichwohl eine Infektion herbeiführen kann. Ein Zeichen eines erfolgreichen Mikroorganismus ist nicht seine Fähigkeit, eine Erkrankung zu verursachen, sondern seine Möglichkeit zu adhären, zu überleben und sich zu vermehren (82).

In Untersuchungen von Biopsien HIV-positiver und HIV-negativer Individuen mit erythematöser Candidiasis wurde beobachtet, daß in vielen Fällen weder Hyphen noch Blastosporen, jedoch eine intensive Entzündungsreaktion zu beobachten ist (85, 243). Daraus wurde gefolgert, daß es sich bei der erythematösen Form um eine Hypersensitivitätsreaktion gegen Candida-Antigene handeln könnte. Bei der pseudomembranösen Form hingegen kam es auch bei ausgeprägter Hypheninvasion in die Keratinschicht zu einer schwachen Reaktion.

4.5.2.1 Bestimmung der minimalen Infektionsdosis

In vorliegender Untersuchung konnte gezeigt werden, daß ein deutlicher Unterschied besteht in der Anzahl der Keime, die notwendig sind, eine Infektion bei immunkompetenten bzw. immundefizienten Mäusen zu etablieren. Die minimale Dosis, die benötigt wird, um bei Balb/c Mäusen eine Invasion von Hyphen hervorzurufen, war 1000fach höher als die bei SCID Mäusen benötigte. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung wurde in keiner der bisher publizierten tierexperimentellen Studien zur mukosalen Candida-Infektion untersucht.

Untersuchungen beim Menschen zeigten, daß unabhängig von der Art der Probenentnahme (Abstrich, Mundspülung) keine Korrelation zwischen Anzahl der nachgewiesenen Keimzahlen und dem Auftreten einer oralen Candidiasis besteht, so daß ein „Schwellenwert“ festgelegt werden könnte (23, 149, 240, 274). Immunkompetente Individuen ohne klinische Manifestationen einer Candidiasis weisen unter Verwendung der Abstrichtechnik bis zu 10^3 CFU/ml auf (180, 234), bei Patienten mit HIV-Infektion wurden in einigen Fällen trotz klinischer Veränderungen im Sinne einer oralen Candidiasis lediglich 50 CFU/ml nachgewiesen (23).

Die Ergebnisse der Dosis-Wirkungsbeziehung, die in vorliegender Studie nachgewiesen werden konnte, müssen wie jeder Tierversuch generell in Hinblick auf die Übertragbarkeit auf den Menschen diskutiert werden. *Candida spp.* sind nicht Teil der murinen oralen Flora, während dieser Mikroorganismus bei 20 % - 60 % als Kommensale des Orogastrointestinaltrakts von gesunden Individuen vorkommt (83, 89, 174, 180, 234). Eine einzige Studie konnte nachweisen, daß *C. albicans* nach oraler Aufnahme von 10^{12} Keimen bei einem Immungesunden *via* intestinale Mukosa zu einer Fungämie begleitet von klinischen Zeichen einer Sepsis führte (131). Dosis-Wirkungsbeziehungen finden sich beim Menschen bei Infektionen mit Keimen, die obligat humanpathogen sind. Studien an Freiwilligen zeigten, daß die orale Aufnahme von 10^3 Salmonellen (*S. typhi*) zur Infektion der Darmmukosa und Erkrankung führt (30), die Infektionsdosis von Shigellen liegt bei ca. 10^{1-2} , *Campylobacter jejuni* bei 10^{2-6} , *E. coli* bei 10^8 Keimen.

4.5.2.2 Inokulation der Infektionsdosis und Glykopeptiden

Ziel vorliegender Untersuchung war u.a. die Bestimmung der Infektiosität eines *C. albicans* Inokulats in Gegenwart von anti-adhäsiven Substanzen (aus Muzinen abgespaltenen Glykopeptiden) *in vivo*. Hierzu wurde die für die Infektion erforderliche Mindestmenge an *C. albicans* jeweils mit Glykopeptiden vermischt und auf die murine Mukosa appliziert.

In einer *in vitro* Studie konnte zuvor nachgewiesen werden, daß jeder der acht untersuchten *C. albicans* Stämme, unter denen auch der verwendete Stamm war, eine spezifische Bindung an lösliches Muzin aufwies. Die Bindung an Muzin verläuft über ein universell verbreitetes Rezeptorsystem, welches nicht auf wenige Lektintypen von *C. albicans* beschränkt ist. Durch den Einsatz dieses ubiquitär auf verschiedene Rezeptormechanismen wirkenden Stoffes, wurden alle Adhäsinstrukturen, die bei der Adhärenz an Muzin beteiligt sind und für die eine spezifische Bindung ermittelt werden kann ohne die Ausdifferenzierung ihres Lektintyps erfaßt. Damit ist die Wirkung des Muzins an verschiedenen *C. albicans*-Stämmen im Vergleichstest möglich und nicht auf Stämme eines bestimmten Lektintyps beschränkt.

Glykopeptide, d.h. die enzymatischen Aufspaltungprodukte von Muzin, wurden verwendet, um die lektinbindenden Anteile des an der Zelladhäsion beteiligten (Epithelzell-) Rezeptors zu blockieren. Diese Glykopeptide weisen eine höhere spezifische Bindung auf. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsansätze:

a) Die verminderte sterische Hemmung bei kleineren Teilchen ergibt eine bessere Erreichbarkeit der Rezeptoren eines Typs und damit einen erhöhten Anteil an spezifischer Bindung.

b) Durch die Veränderung der Einzelbestandteile können nicht nur eine größere Anzahl von Rezeptoren, sondern weitere Rezeptortypen reagieren. Der Einfluß bestimmter Anteile des ehemaligen Muzinmoleküls z.B. der des Kohlenhydratanteils, könnte proportional zu anderen Teilbereichen größer werden. Für die verstärkte Inhibition durch Glykopeptide spricht eine Studie von *Brassart et al.* (40). Sie untersuchten die Auswirkungen verschiedener Glykopeptide aus der Nabelschnur von Neugeborenen auf die Adhärenzfähigkeit von *C. albicans*. Bei der weiteren Fraktionierung erreichte die Unterfraktion der O-Glykane den stärksten inhibitorischen Effekt.

Bei Bakterienstämmen wie z.B. *Streptococcus pneumoniae* an humane oropharyngeale Epithelzellen (11) oder *Haemophilus influenzae* an die humane bukkale Mukosa (12) konnte die protektive Wirkung von Glykokonjugaten durch Inhibition der Adhärenz in *in vitro* Untersuchungen nachgewiesen werden. Anhand eines Mausmodells wurde eine Harnwegsinfektion durch *E. coli* mit einem Mannose-spezifischen Fimbrienlektin durch Glykoproteine kompetitiv gehemmt (15).

Wie schon in der Kapitel 1 (Einleitung/ Literaturübersicht) dargestellt, zeigten *in vitro* Untersuchungen, daß auch die Adhäsion von *C. albicans* an vaginale und bukkale Epithelzellen durch verschiedene Lektine bzw. Zucker inhibiert werden kann (40, 65, 76, 154).

Die Ergebnisse vorliegender Untersuchung konnten nachweisen, daß bei gleichzeitiger Inokulation von Glykopeptiden und 10^5 *C. albicans* - Zellen in Serienschritten der Zungenmukosa von acht SCID Mäusen keine Invasion von Hyphen nachweisbar war. Da für die Serienschritte der halben Zunge von der Mitte aus begonnen wurde, wäre auf diese Weise in jedem Falle die Prädilektionsstelle für eine Infektion erfaßt worden. Nur bei einer Maus wurden vereinzelt Entzündungszellen nachgewiesen, die jedoch nicht Reaktion auf die Adhärenz von *C. albicans* an das Epithel sondern ebenso Reaktion auf Mikroläsionen darstellen könnte. Den Ergebnissen zufolge reichte die Glykopeptidkonzentration bei dieser Inokulationsmenge aus, um eine Adhärenz zu verhindern.

Die Balb/c Mäuse wurden mit 10^8 *C. albicans*-Zellen im Glykopeptidgemisch inokuliert. Die Ergebnisse zeigten, daß bei 2/8 Mäusen (25 %) eine Invasion von Hyphen erfolgte, 19/96 Schnitten (19,8 %) waren PAS-positiv. Nach einmaliger Inokulation von 10^8 Zellen ohne Zugabe von Glykopeptiden hingegen wiesen 5/6 Mäusen (83 %) PAS-positive Strukturen auf. Obwohl die Anzahl der Tiere gering war, ergibt sich ein Trend in bezug auf eine antiadhäsive Wirkung und eine Abnahme der Infektiosität auch bei einer 1000fach höheren Keimzahl.

Ein bestimmender Faktor für die unterschiedliche Inhibition innerhalb der Versuchstiergruppen scheint die Anzahl der Keime in Relation zum Angebot der Glyko-

peptide zu sein. Diese Annahme wird durch Untersuchungen bestätigt, die zeigen konnten, daß nur bei einem Überschuß an gelöstem Muzin die Rezeptoren für *C. albicans* kompetitiv inhibiert werden (160). Die Wirkung des Muzins bzw. seiner Untergruppe den Glykopeptiden ist weiterhin von der Konzentration abhängig. Bovines Muzin einer Konzentration von 0,5 % vermindert die Adhäsion von *Candida spp.* an intestinale Zellen um 83 %, niedrigere Muzinkonzentrationen (0,05 %) nur um ca. 40 % (125). Glykoproteine und Muzine führen, wenn im Überschuß vorhanden, zur Blockierung von Epithelrezeptoren, indem sie sich auf die Rezeptoren oder direkt an den Keim anlagern (80).

4.5.2.3 Analyse der Infektionsexperimente

In vorliegender Untersuchung konnte makroskopisch nicht beurteilt werden, ob eine Infektion der oralen Mukosa vorlag, da keine klinischen Veränderungen der Zunge im Sinne einer oralen Candidiasis vorlagen. Somit mußte der Nachweis einer Infektion mikroskopisch nach histologischer Aufbereitung mittels Serienschnitten und PAS-Reaktion erfolgen. Die Anzahl der Tiere, die auf diesem Wege beurteilt werden konnten, war durch die Vorgehensweise limitiert. Darüber hinaus war ein Schwerpunkt dieser Arbeit die Festlegung der minimalen Infektionsdosis für Balb/c und SCID Mäuse, die die Grundlage der Adhärenzinhibitionsversuche bildeten. Eine eindeutige, statistisch gesicherte Bewertung des Effekts der Inokulationsdosis auf die Entstehung einer Infektion bezogen auf das einzelne Tier war aufgrund der z.T. geringen Gruppengröße nicht möglich und müßte durch höhere Fallzahlen validiert werden. Dennoch ergaben sich bei der Analyse der Ergebnisse folgende Tendenzen: In der Gruppe der Balb/c Mäuse war ein Unterschied bezüglich der Inokulationsmengen von 10^7 und 10^8 Keimen festzustellen. Die Zahlen deuten darauf hin, daß bei einer Inokulation von 10^8 *C. albicans*-Zellen häufiger eine Infektion entsteht als bei Inokulation von 10^7 Keimen. Interessanterweise entsprach die Keimmenge von 10^8 der minimalen Infektionsdosis, dem sog. Schwellenwert. Unterschiede zwischen den Inokulationsmengen von 10^5 , 10^6 und 10^7 auf die Entstehung einer Infektion wurden nicht gefunden. Bei der Prüfung des Effekts der Inokulation von 10^8 Keimen versus 10^8 Keimen zusammen mit Glykopeptiden wiesen die Zahlen auf einen Unterschied hin: Werden 10^8 *C. albicans*-Zellen zusammen mit Glykopeptiden inokuliert, entstehen weniger häufig Infektionen als bei Inokulation derselben Keimmenge ohne Glykopeptide.

In der Gruppe der SCID Mäuse wurden keine Unterschiede zwischen den Inokulationsmengen von 10^5 , 10^6 und 10^7 *C. albicans*-Zellen auf die Entstehung einer Infektion gefunden. Eine Prüfung der Unterschiede zwischen der Inokulationsdosis von 10^4

versus 10^5 war im Vierfeldertest nicht durchführbar. Durch eine größere Anzahl der Tiere pro Gruppe könnte statistisch gesichert werden, ob nach Inokulation der Infektionsdosis von 10^5 Keimen versus der Inokulation von 10^4 Keimen, bei der alle Serienschnitte PAS-negativ waren, ein Unterschied nachgewiesen werden kann. Bei Prüfung des Effekts der Inokulation von 10^5 Keimen versus 10^5 Keimen zusammen mit Glykopeptiden wiesen die Zahlen auch bei SCID Mäusen auf einen Unterschied hin: Werden 10^5 *C. albicans*-Zellen zusammen mit Glykopeptiden inokuliert, entstehen weniger häufig Infektionen als bei Inokulation derselben Keimmenge ohne Glykopeptidzusatz. Wie bei der Auswertung der PAS-Befunde der Serienschnitte nachgewiesen werden konnte, war kein Serienschnitt der Zungen von 8 Mäusen, die mit der Keim/Glykopeptidmischung inokuliert wurden, PAS-positiv.

4.5.3 Immunhistologie

In vorliegender Studie wurde der Zeitpunkt der Zungenentnahme eine Woche *post inoculationem* so gewählt, daß zwei Phasen der Immunabwehr erfaßt werden konnten. Bis zum Einsatz der erworbenen Immunantwort als Reaktion des Immunsystems auf die Adhärenz und Invasion eines Mikroorganismus vergehen vier bis sieben Tagen, da die antigenspezifischen T- und B-Zellen erst proliferieren und zu Effektorzellen differenzieren müssen.

Ein Ziel vorliegender Untersuchung war, die zelluläre Immunantwort im Epithel sowie subepithelialen Bindegewebe bei definierten Keimmengen und in Abhängigkeit zum Immunstatus zu untersuchen. Hierzu wurde die Antigenexpression immunkompetenter Zellen, die zur Abwehr einer Candida-Infektion relevant sind, dargestellt. Weiterhin sollte die Aktivierung des Endothels in Abhängigkeit zu Keimmenge und Immunstatus untersucht werden. Diese wurde anhand der Expression von Adhäsionsmolekülen, die zu einer erhöhten Leukozytenmigration an den Infektionsort führen, dargestellt. Weiterhin sollte die Immunantwort der oralen Mukosa auf die Inokulation von *C. albicans* in Anwesenheit von Glykopeptiden charakterisiert werden.

Bisherige immunhistologische und elektronenmikroskopische Studien zeigen, daß im oralen Epithel eine konstante Population immunkompetenter Zellen, die einer lokalen immunologischen Barriere entsprechen, vorhanden ist (27, 34, 214). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß Langerhans-Zellen (LHZ) und Lymphozyten sowohl in der Basalzellschicht als auch suprabasal und im Stratum spinosum lokalisiert sein können. Anhand ultrastruktureller Untersuchungen wurde eine Migration von Lymphozyten in das Epithel und LHZ aus dem Epithel nachgewiesen. In Hinblick auf Anzahl, Verteilung und Migration immunkompetenter Zellen ließen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen muriner und humaner oraler Mukosa feststellen (46).

In der vorliegenden Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene verwendet, die einerseits zur Identifikation der Zellen andererseits zur Markierung des Differenzierungsstadiums, das mit spezifischen Funktionen assoziiert ist, dienen.

Wesentlich bei dem vorliegenden Candidiasismodell bei der Maus ist, daß nicht sämtliche CD-Antigene, die beim Menschen bereits definiert sind, ein Maushomolog besitzen, da sich bestimmte Molekülstrukturen bei der Maus (bislang) nicht darstellen lassen.

Tab. 16: Übersicht der in der Untersuchung dargestellten CD-Antigene, deren Funktion sowie Bezug zur Immunglobulinsuperfamilie

| CD-Antigen | murine Zellen, die das Antigen exprimieren | Funktion | Verbindung zu |
|------------|--|--|---|
| CD4 | Helfer-T-Zellen | Corezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle | Immunglobulin-superfamilie |
| CD13 | Aminopeptidase N auf LHZ, (BZ), Makrophagen | Zink-Metallproteinase | |
| CD54 | akt. Endothel, LHZ, (akt.) B-Zellen, Makrophagen und T-Lymphozyten | Interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM-1); bindet das CD11a/CD18-Integrin (LFA-1) und das CD11b/CD18-Integrin (Mac-1) | Immunglobulin-superfamilie |
| CD 62E | akt. Endothel (E-Selectin) | endothelium leukocyte adhesion molecul (ELAM); bindet Sialyl-Lewis-x; vermittelt die Interaktion zwischen Blutplättchen und Endothelzellen bzw. Monozyten sowie das Entlangrollen von Neutrophilen am Endothel | C-Typ-Lektin, EGF- und CCP-Superfamilie |
| CD74 | B-Zellen, Makrophagen, LHZ, MHC-Klasse II positive Zellen | MHC-Klasse-II-assoziierte invariante Kette (Ii) (involviert in intrazellulären Transport von MHC-Klasse-II Molekülen und Antigenpräsentation) | |
| CD80 | (akt.) Makrophagen, (akt.) BZ | T-Zell-Costimulator, Ligand für CD28 und CTLA-4 | Immunglobulin-superfamilie |
| CD86 | (akt.) Makrophagen, (akt.) BZ | T-Zell-Costimulator, Ligand für CD28 und CTLA-4 | Immunglobulin-superfamilie |
| CD103 | CD8 ⁺ -Zellen in Lamina propria | α_E -Integrin | Integrin- α |

Weiterhin lassen sich, wenn auch nur wenige, Unterschiede feststellen zwischen der Antigen-Expression muriner und humaner Zellen, so daß in Tabelle 16 veranschaulicht wird, welche murinen Zellen das Antigen exprimieren und welche Funktion mit der Expression verbunden ist.

Die zu charakterisierenden murinen Zellen exprimieren folgende Oberflächenantigene:

Antigenpräsentierende Zellen (APZ)

Makrophagen: CD13, CD54, CD74, CD80, CD86

LHZ: CD13, CD54, CD74, CD80, CD86

B-Zellen: CD13, CD54, CD 74, CD80, CD86

T-Zellen: CD4, CD54, CD103

Endothelzellen: CD54, CD62E,

Die Expression der murinen Antigene ist bei einigen der o.g. Zellen abhängig von ihrem Aktivierungsstadium (aktivierte Makrophagen exprimieren CD74, aktivierte LHZ CD54 (266), aktivierte T-Zellen CD54; aktivierte B-Zellen CD54, CD80, CD86, aktiviertes Endothel CD54, CD62E).

Das murine L3T4 Antigen (ursprüngliche Bezeichnung) entspricht dem **CD4** Antigen des Menschen und konnte durch einen monoklonalen Antikörper (Ratte-antiMaus) charakterisiert werden. Im Gegensatz zu dem homologen Protein beim Menschen zeigten Untersuchungen, daß murines CD4 Antigen nur auf T-Zellen exprimiert wird (73).

Ein deutlicher Unterschied bezüglich des Immunstatus der Tiere war sowohl bei der Menge als auch bei der Verteilung dieser Zellen innerhalb der Zellschichten zu finden. Während bei niedrigen Inokulationsmengen SCID Mäuse die Expression reduziert war und abgesehen von der höchsten Inokulationsdosis subepithelial stattfand, war bei Balb/c Mäusen der subepitheliale Bereich und die Basalzellschicht involviert. Auch nach Gabe von Keimen mit Glykopeptidzusatz fanden Reaktionen bei SCID Mäusen ausschließlich in der superfiziellen Lamina propria, bei Balb/c Mäusen wiederum im Stratum basale und direkt unterhalb der Basalzellschicht statt.

Die Aminopeptidase N (**CD13**) der Maus ist ein Marker für APZ und wird mit MHC-Klasse II Molekülen coexprimiert. Er markiert Aminopeptidase N (APN) auf Ma-

krophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen, jedoch nicht auf T-Zellen und Thymozyten. APN wird eine Rolle bei der Antigenverarbeitung zugeschrieben (101). Bei beiden Mäusestämmen konnte ein Anstieg der Menge an CD13 exprimierenden Zellen in Abhängigkeit von der Inokulationsdosis in der gesamten Lamina propria gefunden werden. Ein Unterschied zeigte sich darin, daß SCID Mäuse bei einer Keimmenge von 10^5 deutlich mehr CD13-exprimierende Zellen zu beobachten waren als bei Balb/c Mäusen. Ebenso verhielt es sich mit den höheren Inokulationsdosen. Bei 10^6 Keimen zeigten SCID Mäuse eine beträchtliche Expression, die der Balb/c Mäuse war dagegen minimal. Interessanterweise zeigte sich bei der jeweils höchsten Inokulationsdosis (SCID $\Rightarrow 10^7$ und Balb/c $\Rightarrow 10^8$) ein Abfall der Zahl CD13⁺ Zellen in der Lamina propria gegenüber der um eine log Stufe geringeren Dosis. Die Inokulation von Keimen und Glykopeptiden reduzierte in beiden Stämmen deutlich die Expression von positiven Zellen, diese waren im subepithelialen Bereich und in der Lamina propria lokalisiert.

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM-1) **CD54** Antigen wird sowohl auf dem (Maus-) Endothel exprimiert als auch auf APZ (238) und murinen und humanen LHZ (265, 266). Eine Bindung an diese Moleküle befähigt die T-Lymphozyten dazu, durch Blutgefäße zu wandern. Bei Stimulation durch inflammatorische Mediatoren wie Lipopolysaccharide oder Zytokine steigt die Expression von CD54. Weiterhin erhöht CD54 die antigenspezifische T-Zell Aktivierung (255).

Bei beiden Stämmen fanden sich ICAM-1 positive Zellen in der superfiziellen Lamina propria, das Endothel war durchgehend aktiviert. Deutlich unterschieden sich die immundefizienten Mäuse jedoch von Balb/c Mäusen bezüglich der Menge exprimierender Zellen: Während Balb/c Mäuse erst bei der höchsten Inokulationsdosis eine starke Expression im subepithelialen Bereich und eine deutliche Aktivierung des Endothels zeigten, wurde bei SCID Mäusen eine hochgradige Expression schon ab einer Inokulationsdosis von 10^5 , also der Dosis, die eine Infektion der oberen Epithelschichten auslöste, erreicht. Auf die Gabe des Keim-Glykopeptidgemisches reagierten beide Stämme mit einer geringfügigen Expression in der oberen Lamina propria und einer minimalen Aktivierung des Endothels.

Bei dem **CD62E** Antigen (E-Selectin, auch bekannt als endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) handelt es sich um ein Zelloberflächenmolekül ebenfalls aus der Gruppe der Adhäsionsmoleküle, den Selektinen. Es wird auf Endotoxin- oder Zytokin-stimulierten (Maus-) Endothelzellen exprimiert (146).

Eine Expression von E-Selectin konnte weder bei SCID noch bei Balb/c Mäusen bei keiner Inokulationsmenge und noch ohne Inokulation nachgewiesen werden.

Das **CD74** Antigen spielt beim intrazellulären Transport von MHC-Klasse-II Molekülen und der Antigenpräsentation eine Rolle. Untersuchungen konnten zeigen, daß bei Mäusestämmen, denen CD74 Antigen (MHC-Klasse-II assoziierte invariante Kette) fehlte, der Transport von MHC-Klasse II Molekülen insuffizient war, so daß eine Reduktion der Menge und Funktion von Klasse II Komplexen auf der Zelloberfläche resultierte. Die Folge waren eine verminderte CD4⁺-Zell Aktivierung (280). Während beim Menschen aktivierte T-Zellen MHC-Klasse II Moleküle exprimieren, sind bei Mäusen alle T-Zellen MHC-II-negativ.

Bei der Verteilung der markierten Zellen innerhalb der Strata ergab sich bei beiden Mäusestämmen ein ähnliches Verteilungsmuster. Reaktionen verliefen im unteren Anteil des Stratum spinosum, subepithelial und in der Lamina propria. Während die Lamina propria von SCID Mäusen schon bei niedrigen Inokulationsdosen in geringem Ausmaß beteiligt war, wurden CD74⁺-Zellen bei Balb/c Mäusen in der Lamina propria erst bei Inokulation von 10⁷ und 10⁸ Keimen beobachtet. Bezüglich der Anzahl exprimierender Zellen ergab sich bei SCID Mäusen ein heterogenes Bild, eine Abhängigkeit von der Inokulationsmenge konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Balb/c Mäuse reagierten hingegen bis zu einer Inokulationsmenge von 10⁷ *C. albicans*-Zellen mit einer geringen, bei 10⁸ Keimen mit einer starken Expression. Die Inokulation von *C. albicans* mit Glykopeptiden führte bei Balb/c Mäusen zu einer deutlichen Reduktion exprimierender Zellen auf eine bis zwei Zellen pro Schnitt und Epithellage. Bei SCID Mäusen war die Expression nach Gabe von Keimen und Glykopeptiden gering und dementsprechend vergleichbar mit SCID Mäusen, die nicht mit *C. albicans* inokuliert wurden.

Die Bildung von T-Effektorzellen wird ausgelöst, wenn die antigenspezifischen Rezeptoren und die Corezeptoren, entweder CD4 oder CD8, an einen Peptid:MHC-Komplex binden. Darüber hinaus wird noch ein zweites Signal von der APZ benötigt, um eine klonale Expansion der antigenspezifischen naiven T-Zelle hervorzurufen. **CD80** und **CD86**, beides strukturverwandte Glykoproteine, gehören zu diesen costimulierenden Molekülen auf APZ. Man findet sie ausschließlich auf der Oberfläche von Zellen, die das T-Zell Wachstum anregen können. Während man bis vor einiger Zeit davon ausging, daß LHZ keine costimulierende Aktivität aufweisen, zeigen neuere Untersuchungen, daß sie sowohl CD86 als auch CD80 exprimieren (139, 179, 218, 233).

Sowohl bei SCID als auch Balb/c Mäusen fand sich nur eine unerhebliche Anzahl an CD80-exprimierenden Zellen. Ein Unterschied ließ sich jedoch in Bezug auf deren Lokalisation feststellen: Während CD80⁺-Zellen bei SCID Mäusen im subepithelialen Bereich nachgewiesen wurden, konnte bei Balb/c Mäusen eine Expression in der Lamina propria beobachtet werden.

Ein Unterschied bei der Antigenexpression zwischen den beiden Tierstämmen zeigte sich bei CD86. Während dieses Antigen bei SCID Mäusen bei allen Inokulationsmengen von einer geringen Zellzahl subepithelial und in der Lamina propria exprimiert wurde, zeigte sich bei Balb/c Mäusen und der Inokulationsdosis, die zu einer Hypheninvasion führte, eine Expression in vier Bereichen des Epithels, die Anzahl CD86 exprimierender Zellen war subepithelial am höchsten.

Das **CD103** Antigen ist ein mukosales Lymphozyten-Integrin und spielt nach mikrobieller Kolonisation eine Rolle bei der Entwicklung, Zunahme und Verstärkung CD8⁺-intraepithelialer Lymphozyten (162, 242). Der Antikörper gegen CD103 reagiert mit einer Subpopulation von CD8⁺-T-Zellen. Studien an CD103-defizienten Mäusen zeigten eine Reduktion mukosaler T-Lymphozyten in Epithelzellen und der Lamina propria (242).

Sowohl SCID als auch Balb/c Mäuse exprimierten dieses Antigen in der superfiziellen Lamina propria, in der Basalzellschicht als auch bei höheren Inokulationsdosen im unteren Bereich des Stratum spinosum. Deutlich wird dennoch, daß bei SCID Mäusen die Expression dieses Antigens in Abhängigkeit von der Inokulationsdosis ansteigt, bei den höheren Inokulationsdosen jedoch nur wenig exprimiert wird. Bei Balb/c Mäusen dagegen findet sich ein Anstieg der Expression nahezu linear zur Inokulationsdosis. Eine Reduktion von CD103⁺-Zellen nach Gabe des Keim-Glykopeptidgemisches konnte bei SCID und Balb/c Mäusen in dem selben Maße und in den dieselben Bereichen (Basalzellschicht und direkt unterhalb) beobachtet werden.

4.5.3.1 Immunreaktion nach Invasion von *C. albicans* in das murine Epithel

Wie die Ergebnisse der PAS-Untersuchungen zeigten, führte die Inokulation von 10⁵ Keimen bei den SCID Mäusen zu einer Hypheninvasion in das Stratum corneum, während Balb/c Mäusen zur Infektion der Zungenmukosa eine tausendfach höhere Menge benötigten.

Vergleicht man den „Schwellenwert“ von 10⁵ Keimen bei SCID Mäusen mit dem der Balb/c Mäuse, der bei 10⁸ lag, ergibt sich folgende Verteilung immunologischer Reaktionen:

Das Endothel war nach Invasion in beiden Gruppen deutlich aktiviert (CD54), subepithelial fand sich eine große Anzahl APZ. In beiden Gruppen wurde darüber hinaus im Stratum basale eine große Anzahl CD103⁺-Zellen beobachtet, die Hinweis auf eine Entwicklung CD8⁺-Lymphozyten gaben. In Untersuchungen zur Verteilung immunkompetenter Zellen bei oraler Candidiasis HIV-infizierter Patienten lagen Lymphozyten, die mit einem Antikörper gegen CD8 Antigen detektiert wurden, ebenfalls im Stratum basale (222). Da in jener Studie keine immunkompetente Kontrollgruppe mit oraler Candidiasis zum Vergleich herangezogen wurde, konnte nicht gezeigt werden, ob CD8⁺-Zellen hauptsächlich in der Basalzellschicht und in geringer Zahl im Stratum spinosum und subepithelial nachweisbar waren, so wie es in vorliegender Studie anhand des Entwicklungsmarkers für CD8-Lymphozyten (CD103) beobachtet werden konnte. Untersuchungen zur Verteilung und Dynamik muriner und humaner intraepithelialer Lymphozyten in der normalen oralen Mukosa zeigten jedoch, daß diese gelegentlich die Basalmembran durchqueren und daß nicht in allen Fällen eindeutig nachgewiesen werden kann, ob diese in das Epithel einwandern oder durch die Basalmembran in die Lamina propria wandern (34, 46)

Die Zellen der Balb/c Mäuse reagierten auf die Hyphen-Invasion zusätzlich mit einer deutlichen Expression des Glykoproteins CD86, welches zu den costimulierenden Molekülen auf APZ gehört und in die Bildung von T-Effektorzellen involviert ist. Dieses Protein war besonders subepithelial aber auch bis in das obere Stratum spinosum nachweisbar. In normalem murinen Epithel exprimieren nur wenige LHZ bzw. dendritische Zellen CD86 Antigen, wohingegen Balb/c Mäuse nach Kontakt mit einem Hapten (Dinitrofluorobenzol) mit einer vermehrten Expression reagieren (218). Dieses kostimulierende Signal war in der vorliegenden Studie bei immundefizienten Mäusen nach Inokulation von *C. albicans* wenig ausgeprägt, d.h. die Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zellen zu T-Effektorzellen könnte somit erschwert sein.

In beiden Gruppen war keine Expression des zweiten costimulierenden Signals (CD80) zu beobachten. Ursache hierfür kann der Zeitpunkt der Organentnahme sein, da Studien am Mausmodell zeigten, daß CD80 später als CD86 exprimiert wird. In einer früheren Untersuchung an Balb/c Mäusen konnte zudem gezeigt werden, daß die Expression von CD80 Antigen nach Stimulation mit einem Fremdanigen geringer ist als die von CD86 (218).

Ein deutlicher Unterschied zeigte sich auch bei der CD74 Expression. Während sich bei immunkompetenten Mäusen nach Keiminvasion vermehrt CD74⁺-Zellen subepithelial und im unteren Stratum spinosum nachweisen ließen, war bei SCID Mäusen die Anzahl CD74⁺-Zellen gering, jedoch in denselben Epithelschichten zu beobach-

ten. Wie Untersuchungen an Mäusen zeigten, wird dieses Antigen zum regelrechten Transport von MHC-Klasse II Molekülen an die Zellmembran der APZ benötigt. Fehlt die invariante Kette, resultiert daraus eine reduzierte Anzahl von MHC-Klasse II Molekülen, eine insuffiziente Bindung an die Fremdanigenpeptide und in Folge eine verminderte Produktion von CD4⁺-T-Zellen (280).

Den Ergebnissen bei der Inokulationsdosis von 10⁵ *C. albicans*-Zellen zufolge könnte vermutet werden, daß die Keiminvansion in das Epithel bei SCID Mäusen keine Folgen auf die Expression von CD74 hat. Betrachtet man jedoch die Keimmengen um eine log Stufe darüber und darunter, so wird deutlich, daß CD74⁺-Zellen sowohl im unteren Stratum spinosum als auch in hoher Anzahl im subepithelialen Bereich nachweisbar waren. Daher scheint die bei einer Inokulationsmenge von 10⁵ *C. albicans*-Zellen beobachtete reduzierte Expression von CD74 nicht typisch für Mäuse mit B- und T-Zelldefekt zu sein.

Das Enzym Aminopeptidase N (CD13) konnte subepithelial in beiden Tiergruppen bei der jeweils für eine Infektion benötigten Inokulationsdosis nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fanden *Romagnoli et al.* bei HIV-seropositiven Individuen in der unveränderten Mukosa eine Reduktion der Expression von MHC-Klasse II Molekülen auf LHZ (222). Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, daß das CD13 Antigen nicht nur von LHZ, sondern ebenso von Makrophagen und B-Zellen exprimiert wird, so daß in dieser Untersuchung keine Aussage über diese spezifische Funktion der LHZ abgeleitet werden kann.

Bei B- und T-Zell defizienten Mäusen waren CD4⁺-Zellen nur vereinzelt (1-2 positive Zellen pro Zunge) nachweisbar und auf den subepithelialen Bereich beschränkt. Bei Balb/c Mäusen konnten CD4⁺-Zellen jedoch bis ins untere Stratum spinosum beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Restriktion von CD4⁺-Zellen auf den subepithelialen Bereich konnten bei HIV-infizierten Individuen mit oraler erythematöser Candidiasis beobachtet werden (222). Weiterhin zeigten immunhistochemische Untersuchungen von Biopsien HIV-seropositiver Personen mit erythematöser und pseudomembranöser Candidiasis, daß im gesamten Epithel keine CD4⁺-Lymphozyten nachweisbar waren. Auch im Epithel gesunder, HIV-seronegativer Individuen fanden sich keine CD4⁺-T-Lymphozyten (215, 222). Im Gegensatz hierzu konnten in anderen Studien CD4⁺-Lymphozyten in der normalen humanen Mukosa auch intraepithelial nachgewiesen werden (198, 273).

Wie in Material und Methoden dargestellt, handelte es sich bei dem verwendeten Marker um einen monoklonalen Antikörper ausschließlich gegen murine CD4⁺-T-Zellen. Studien zeigten, daß das CD4 Antigen bei der Maus lediglich auf T-Zellen exprimiert wird und nicht wie bei dem homologen Protein von Ratte und Mensch zu-

sätzlich auf Makrophagen (66, 73). Das CD4 Antigen ist weiterhin auf humanen LHZ in kleinen Mengen vorhanden (69, 187, 283).

Die Markierung der CD4⁺-Zellen zeigte, daß der Antikörper RM4-5 (Pharmingen, Hamburg, Deutschland) dendritische Zellen markierte (Abb. 25 und 26).

Daher muß im Gegensatz zu den Angaben des Herstellers sowie o.g. Untersuchungen angenommen werden, daß auch dendritische Zellen der Maus eine CD4 Antigen determinante aufweisen. In einer Studie wurde bislang der Nachweis für eine Expression von CD4 und CD8 in murinen dendritischen Thymuszellen erbracht (292).

Weder bei der Inokulationsmenge, die eine Infektion hervorrief, noch bei anderen Keimmengen wurde E-Selectin (CD62E) exprimiert. Das Adhäsionsmolekül ist an der Leitung phagozytierender Zellen zu den Infektionsherden beteiligt. Durch eine Wechselwirkung zwischen dem auf den Endothelzellen induziertem Selektin und dem Leukozyten kommt es zunächst zu einer schwachen Bindung des Leukozyten an das Gefäßendothel. Da diese Bindung nicht stark genug ist, wird zusätzlich ICAM-1 (CD54) auf dem Endothel exprimiert, wodurch der Leukozyt stabilisiert wird. Hiermit wird das „rolling“ beendet und der Leukozyt kann sich durch die Endothelzellen hindurchzwängen. In einer aktuellen Studie an E-Selectin-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, daß es trotz fehlender endothelialer Selektine zu einer Migration von Leukozyten an den Infektionsort kam. Bei Mäusen mit ICAM-1 Defekt jedoch blieb die Einwanderung von Leukozyten komplett aus (24). In einem weiteren Mausmodell konnte im Verlauf einer experimentellen murinen Listeriose eine generelle Expression von P-Selectin (CD62P) und ICAM-1 in den untersuchten Organen (Leber, Milz) beobachtet werden; die Expression von E-Selectin dagegen war äußerst schwach (148). Schon in früheren Studien konnte gezeigt werden, daß E-Selectin zwar an die Migration muriner Leukozyten zum Infektionsort beteiligt ist, die Selektine CD62P und CD62L (P- und L-Selectin) in diesem Prozeß jedoch die dominante Rolle spielen (36).

Vorliegende Untersuchung gibt Hinweis darauf, daß nicht nur nach viraler, sondern auch nach Infektion mit *C. albicans* eine CD62E Expression nicht zwingend notwendig ist, um eine Leukozytenwanderung zu ermöglichen. Diese Beobachtung traf für immunkompetente und immundefiziente Mäuse zu. Da die Expression von E-Selectin auf Endothelzellen Kennzeichen einer akuten, durch Zytokine vermittelten Entzündungsreaktion ist, kann eine weitere Erklärung für den fehlenden Nachweis von E-Selectin der Zeitpunkt der Organentnahme sein. Möglicherweise wird das Antigen zu einem früheren Zeitpunkt exprimiert, so daß dieses eine Woche *post inoculationem* nicht mehr nachweisbar ist.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten, daß bei immundefizienten Mäusen ohne Inokulation, nach Inokulation und Invasion von *C. albicans* in das Epithel die Anzahl CD4⁺-Zellen in der oralen Mukosa reduziert und ein zur Aktivierung von naiven T-Zellen benötigtes costimulierendes Signal der APZ nur in geringem Maße vorhanden war. Weiterhin beschränkten sich Immunreaktionen bei immundefizienten Mäusen abgesehen von CD74 auf den subepithelialen Bereich, während bei immunkompetenten Tieren APZ einschließlich CD4⁺-dendritischer Zellen intraepithelial zu finden waren. Untersuchungen konnten zeigen, daß die Zahl von LHZ in der Zungenmukosa bei SCID Mäusen verglichen mit Balb/c Mäusen nicht reduziert ist (285). Bezogen auf vorliegende Ergebnisse könnte gefolgert werden, daß bei SCID Mäusen die intraepitheliale Schutzfunktion bei gleicher Anzahl von LHZ durch eingeschränkte Reaktionen auf ein Fremdantigen reduziert ist, so daß schon geringe Inokulationsdosen zu einer mukosalen Infektion führen können.

Weitere Ursache für eine Infektion bei geringerer Inokulationsdosis bei immundefizienten Tieren kann eine Veränderung eines Mechanismus sein, der der Adhärenz und Invasion des Pathogens vorgeschaltet ist. Ein wesentlicher Faktor ist hierbei die Zusammensetzung des Speichels und der Speichelmuzine. *In vitro* Untersuchungen zeigten, daß Speichel von Patienten unter Chemoradiotherapie eine reduzierte Adhärenzinhibition gegenüber *C. albicans* aufweist. Ursache hierfür war die durch die Therapie induzierte Reduktion des Glykoproteins Lactoferrin im Speichel, es erfolgte ein Anstieg der adhäsiven Eigenschaften sowohl von *C. albicans* als auch den oralen Epithelzellen (272).

4.5.3.2 Immunreaktion nach Inokulation von *C. albicans* in Abhängigkeit zur Inokulationsdosis

Die Ergebnisse der Immunreaktionen in Abhängigkeit zur Inokulationsdosis und dem Immunstatus müssen zurückhaltend interpretiert werden, obwohl beiden Gruppen 10⁵, 10⁶ und 10⁷ *C. albicans*-Zellen inokuliert wurden. Von maßgeblicher Bedeutung ist jedoch, daß eine Invasion von Hyphen und damit eine Infektion bei SCID Mäusen bereits bei einer Inokulation von 10⁵ Keimen auftrat. Bei Balb/c Mäusen wurde ebenfalls eine Menge von 10⁵ Zellen inokuliert, doch fand in dieser Gruppe erst eine Hypheninvasion bei einer Inokulationsmenge von 10⁸ Keimen statt. Weitere Steigerungen der Keimmenge wurden nicht vorgenommen, da Ziel der Untersuchung die Festlegung einer minimalen Infektionsdosis war. Ein weiterer Grund, der eine vorsichtige Interpretation verlangt, ist die geringe Anzahl der Tiere. Dennoch schienen bei SCID Mäusen die Immunreaktionen nach Inokulation zwei Mechanismen zu folgen: 1. Vermehrte Expression (ICAM-1 im Endothel und subepithelial) nach Invasion

von Candida-Hyphen, unabhängig von der steigenden Dosis 2. Expression in Abhängigkeit zur Inokulationsdosis (CD13, CD86), was auf eine regelrechte, der Menge der Fremdartigene angepaßte Antigenverarbeitung in den APZ schließen läßt.

4.5.3.3 Immunreaktion nach Inokulation der Infektionsdosis und Glykopeptiden

Den Ergebnissen der PAS-Untersuchungen bei SCID Mäusen zufolge, reichte die Konzentration an Glykopeptiden bei einer Inokulationsmenge von 10^5 Keimen aus, um eine Adhärenz zu verhindern. Balb/c Mäusen wurden mit der Infektionsdosis von 10^8 *C. albicans*-Zellen und Glykopeptiden inokuliert, wobei in 2/8 Mäusen eine Invasion von Hyphen stattfand. Die immunologischen Reaktionen des Wirtes auf diese Verbindung entsprach in bezug auf die Verteilung innerhalb der Strata und Menge exprimierender Zellen bei SCID und Balb/c Mäusen denen ohne Inokulation. Interessanterweise zeigte sich bei SCID Mäusen ohne Keiminokulation dennoch ein deutlich aktiviertes Endothel, welches bei der Gabe von Glykopeptiden und Keimen nicht zu beobachten war. Möglicherweise läßt sich die Beobachtung dadurch erklären, daß in vorliegender Untersuchung ausschließlich die Invasion von *C. albicans* mittels PAS-Methode nachgewiesen wurde. Daher ist es nicht auszuschließen, daß, vor allem bei Mäusen mit kombinierten B- und T-Zelldefekt, diese Reaktion durch andere Fremdantigene wie Bakterien bestimmt wurde.

Wie im vorherigen Abschnitt diskutiert wurde, zeigten Balb/c Mäuse, die mit der minimalen Infektionsdosis inokuliert wurden, immunologische Reaktionen bis hin in den unteren (CD4, CD74, CD86 und CD103) und oberen Bereich des Stratum spinosum (CD86). Bei zusätzlicher Gabe von Glykopeptiden waren diese hauptsächlich auf den subepithelialen Bereich begrenzt.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung zeigten, daß die lokalen murinen Immunreaktionen bei Zugabe von Glykopeptiden denen ohne *C. albicans*-Inokulation ähnelten. Hieraus läßt sich schließen, daß ein Glykan-vermittelter Schutz *in vivo* die Infektiosität von *C. albicans* durch Inhibition der Adhäsion an das murine Epithel mindern kann.

Die protektive Wirkung des Glykananteils löslicher Glykokonjugate wurde bereits in bezug auf Bakterien in *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen belegt. Bereits in den siebziger Jahren konnte sowohl eine prophylaktische Wirkung von keimspezifischen löslichen Glykanen auf die Infektion der Schleimhaut als auch eine Desorption durch Glykokonjugate nach Adhärenz von Bakterien nachgewiesen werden (185). Am Beispiel von *E. coli* wurde gezeigt, daß sich die Glykanspezifität verschiedener Bakterien erheblich von einander unterscheidet, selbst innerhalb von Subspezies werden wesentliche Unterschiede in der Spezifität der Glykanbindung beobachtet (150, 151).

Darüber hinaus konnten Präparationen des GlcNAc-Polymers Chitin vor *C. albicans* induzierter muriner Vulvovaginitis schützen (144, 245).

Tierexperimentell wurde schon in früheren Studien belegt, daß eine verminderte Speichelproduktion und damit eine Reduktion von Muzinen zu einer schnelleren Besiedlung der Mundhöhle mit *Streptococcus mutans* und *C. albicans* sowie zu einer verzögerten Wundheilung führt (37, 68, 116, 117, 169, 193).

4.6 Kritische Aspekte und Perspektiven

Die Therapie der oralen Candidiasis besteht in der lokalen oder systemischen Applikation von Antimykotika. Es werden zunehmend Resistenzen nach Langzeittherapie Azolderivaten (Ketoconazol, Fluconazol) beobachtet, darüber hinaus treten Kreuzresistenzen mit anderen Fungistatika auf (54, 109, 172, 226, 271). In vorliegender Studie wurde von einer Oligosaccharid-Lektin-vermittelten Invasion des Wirtes ausgegangen, woraus sich direkt ein protektives Interventionskonzept ableiten ließ. Es sollte daher ein alternativer Weg, nämlich das Eingreifen in den Adhärenzprozeß von *C. albicans* untersucht werden, da die Adhärenz den ersten Schritt auf dem Weg zur Infektion darstellt (110, 197, 258).

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit zeigten, daß eine Inhibition der Adhärenz von *C. albicans* durch Glykopeptide, gewonnen aus einem Präparat, das in Deutschland zum Einsatz bei Xerostomie eingeführt wurde, erreicht wurde. *In vitro* Untersuchungen zeigten, daß die Bindung dieses Präparats an verschiedene Lektine ca. 10fach stärker ist als die von menschlichem Speichel, so daß dessen Schutzkapazität die des menschlichen Speichels übertrifft (119).

Aus vorliegender Untersuchung ergeben sich folgende Fragen bzw. Ansätze für zukünftige Forschungsschwerpunkte :

1. Ist eine adhäsionsinhibitorische Wirkung von Glykopeptiden auch dann gewährleistet, wenn diese nicht zuvor mit *C. albicans* vermenget werden. Erfolgt eine Desorption durch Glykopeptide auch nach Adhärenz von *C. albicans*, so wie es für *E. coli* bei der Maus nachgewiesen werden konnte.
2. In welchem Verhältnis müssen Glykopeptide zur Anzahl der Mikroorganismen stehen. Bei der Frage der benötigten Dosis muß die Wirkung der von *C. albicans* sezernierten Säureproteinasen berücksichtigt werden, die *in vitro* Muzin hydrolytisch spalten können und schon von Blastosporen, die an Epithelzellen adhäreren, exprimiert werden (31).
3. Ist die Gabe von Glykopeptiden auch bei klinisch apparenter Candida-Infektion wirksam oder kann sie lediglich der Prävention dienen.

4. Stellt die Adhärenzinhibition einen alternativen Weg bei Resistenzen gegenüber Antimykotika dar. Hierzu konnte eine *in vitro* Studie bereits nachweisen, daß azolresistente Keime eine ebenso spezifische Bindung an Muzine aufweisen, wie nicht resistente Stämme (171). Bei einigen der resistenten Stämme wurde überdies eine höhere spezifische Muzinbindung beobachtet. Ursache dafür sind möglicherweise Veränderungen des Lektintyps während der Azoltherapie, wie auch von *Korting et al.* beschrieben (129). Veränderungen des Lektintyps ziehen jedoch nur in geringem Maße Veränderungen der Zellmembranbestandteile nach sich, welche das Adhärenzverhalten an Muzin beeinflussen könnten. Selbst bei Änderung des Lektintyps unter Azoltherapie behalten Muzine die Fähigkeit, den Keim zu verdrängen.
5. Welche Struktur des Glykananteils der Glykopeptide bestimmt die Adhärenzinhibition.

Der Einsatz von Muzin oder dessen Spaltprodukten zur Prophylaxe bzw. zur Therapie bietet einen weiteren Vorteil, da es sich hierbei um einen physiologischen Bestandteil vieler Körpersekrete handelt. Die Resorption ist ebenso wie die Toxizität gering. Unerwünschte Wirkungen nach Gabe tierischen Muzins sind bisher bei der prophylaktischen Anwendung nicht beobachtet worden.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren stieg die Zahl immunkompromittierter Patienten infolge von Infektionen sowie dem Einsatz von Immunsuppressiva und Chemotherapeutika. Seit den ersten Berichten über HIV/AIDS wurden zahlreiche Berichte publiziert, die einen engen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer oropharyngealen Candidiasis und der Progression zur Krankheit AIDS beschrieben. Es ist davon auszugehen, daß jeder HIV-Patient im Verlauf seiner Erkrankung mindestens eine Episode einer oralen Candidiasis erfährt. Angeborene oder erworbene T-Zelldefekte bei Mensch und Tier haben eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber Infektionen mit extrazellulären Erregern zur Folge.

Bisherige Untersuchungen zeigten, daß keine direkte Assoziation zwischen dem mikrobiologischen Nachweis einer hohen Anzahl von koloniebildenden Einheiten (CFU)/ml in Rachenspülwasser oder Abstrichen und dem Auftreten einer Schleimhautveränderung besteht. Immungesunde Personen ohne klinische Manifestationen weisen bis zu 10^3 CFU/ml in mittels Abstrichtechnik gewonnene Proben auf, während bei Patienten mit HIV-Infektion in einigen Fällen mikrobiologisch nur 50 CFU/ml nachweisbar waren und dennoch klinische Veränderungen beobachtet wurden. Die Therapie der oralen und oropharyngealen Candidiasis beruht hauptsächlich auf der topischen bzw. systemischen Gabe von fungizid oder fungistatisch wirkenden Substanzen. Sowohl Rezidive und Resistenzbildungen als auch eine Tachyphylaxie können die Therapie und die Auswahl des Antimykotikums erschweren.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand eines Candidiasismodells unter Verwendung von immunkompetenten Inzuchtmäusen (Balb/c) (n=27) und Mäusen mit kombiniertem B- und T-Zelldefekt (SCID) (n=30) folgende Fragen untersucht

1. Gibt es eine Abhängigkeit zwischen inokulierter Keimmenge und der Entstehung einer *C. albicans*-Infektion (Dosis-Wirkungsbeziehung).

Hierzu wurden Balb/c Mäuse (n=3) mit einer Keimmenge von 10^5 *C. albicans*-Zellen/10 μ l (Stamm DSM 3454) oral inokuliert, n=3 mit 10^6 , n=6 mit 10^7 und n=6 mit 10^8 *C. albicans*-Zellen. SCID Mäuse (n=2) wurden mit einer Keimmenge von 10^4 , n=6 mit 10^5 , n=3 mit 10^6 und n=6 mit 10^7 *C. albicans*-Zellen oral inokuliert. Eine Woche *post inoculationem* wurden die Tiere geopfert, die Zunge entnommen und eine Hälfte histochemisch mittels Periodic-Acid-Schiff-Methode zur Darstellung morphologischer Strukturen von *C. albicans* untersucht. Makroskopisch fanden sich weder bei Balb/c noch bei SCID Mäusen klinische Zeichen einer Veränderung der Zunge im Sinne einer erythematösen oder pseudomembranösen Candidiasis.

2. Welche zelluläre Immunantwort findet als Reaktion auf die Inokulation mit definierten Keimmengen in der oralen Mukosa statt.

Hierzu wurde anhand von Gefrierschnitten der anderen Zungenhälfte und Immunperoxidase-Technik immunkompetente Zellen und deren Funktionen mit Antikörpern gegen CD4, CD13, CD54 (ICAM-1), CD62E (E-Selectin), CD74, CD80, CD86 und CD103 untersucht.

3. Ist durch Inhibition der Adhärenz von *C. albicans* an murine Epithelzellen mittels gleichzeitiger lokaler Applikation der Spaltprodukte von Muzin (Glykopeptiden) auf die orale Mukosa eine protektive Wirkung möglich, so daß eine Infektion verhindert werden kann. Hiermit sollte ein alternativer Therapieansatz untersucht werden, der auf einer Blockade der Adhäsion der Erreger beruht. Es wurden Balb/c Mäusen (n=8) 10^8 *C. albicans*-Zellen mit Glykopeptiden und SCID Mäusen (n=8) 10^5 *C. albicans*-Zellen zusammen mit Glykopeptiden inokuliert. Eine zuvor durchgeführte *in vitro* Studie zeigte, daß eine Standardisierung temperaturabhängiger Prozesse im Labor notwendig ist, um in Untersuchungen mit *C. albicans* eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erhalten.

ad 1)

Nach vollständiger histochemischer Aufbereitung und Untersuchung einer Zungenhälfte ließ sich bei Balb/c Mäusen bis zu einer Inokulationsmenge von 10^7 Keimen keine Invasion von Hyphen nachweisen. Erst bei Inokulation von 10^8 Keimen zeigte sich bei 5/6 Tieren bzw. in 26/51 Schnitten (51 %) eine Invasion in das Stratum corneum. Bei SCID Mäusen fanden sich invadierende Hyphen bei 4/6 Tieren schon bei einer Inokulationsdosis von 10^5 Keimen, 33/108 Schnitten (33,6 %) zeigten PAS-positive Strukturen. Die minimale Dosis, die bei Balb/c Mäusen zu einer Infektion der Zungenmukosa führt, lag bei einer Inokulationsmenge von 10^8 *C. albicans*-Zellen, bei SCID Mäusen führte eine Menge von 10^5 Keimen zu einer Infektion.

ad 2)

Trotz fehlender makroskopischer Zeichen einer Candidiasis fand bei oraler Inokulation mit *C. albicans* eine immunologische Reaktion in der Zungenmukosa beider Versuchstiergruppen statt. Das Ausmaß dieser Reaktion war abhängig von der Inokulationsdosis sowie vom Immunstatus der Tiere. Bei der höchsten inokulierten Keimmenge konnten CD4⁺-Zellen bei Balb/c Mäusen bis ins untere Stratum spinosum beobachtet werden, während diese bei SCID Mäusen nur vereinzelt und im subepithelialen Bereich nachweisbar waren. Die Morphologie der CD4 Antigen-exprimierenden Zellen ließ darauf schließen, daß es sich hierbei nicht um T-

Lymphozyten, sondern um dendritische Zellen handelt. Deutlich unterschieden sich Balb/c von SCID Mäusen bezüglich der Menge CD54⁺-Zellen: Während im subepithelialen Bereich der Mukosa von Balb/c Mäusen erst bei einer Inokulationsdosis von 10⁸ *C. albicans*-Zellen eine starke Expression im subepithelialen Bereich und eine Aktivierung des Endothels beobachtet wurde, reagierten die Zellen der SCID Mäuse schon bei einer Inokulationsdosis von 10⁵ Keimen mit einer ausgeprägten Expression des CD54-Antigens. Nach Hypheninvasion in das Zungenepithel fand bei Balb/c Mäusen eine deutliche CD74 Expression subepithelial und im unteren Stratum spinosum statt, SCID Mäuse wiesen in den selben Epithelschichten eine geringere Anzahl CD74⁺-Zellen auf. Die Expression von CD80 Antigen bei Balb/c Mäusen war nach Stimulation mit einem Fremdartigen geringer als die von CD86, letzteres ließ sich bei immundefizienten Mäusen nach Inokulation der minimalen Infektionsdosis nur in geringem Maße nachweisen. Nach Inokulation der minimalen Infektionsdosis wurden in beiden Tierspezies im Stratum basale eine große Anzahl CD103⁺-Zellen beobachtet, die Hinweis auf eine Entwicklung CD8⁺-Lymphozyten gibt.

ad 3)

Die Ergebnisse der Inokulation von 10⁸ *C. albicans*-Zellen zusammen mit Glykopeptiden zeigten bei 2/8 Balb/c Mäusen eine Hypheninvasion in das Zungenepithel. Bei 0/8 SCID Mäusen wurde nach Inokulation von 10⁵ *C. albicans*-Zellen zusammen mit Glykopeptiden eine Hypheninvasion in das Zungenepithel beobachtet. Obwohl die Anzahl der Tiere begrenzt war und die statistische Analyse nur als Orientierungshilfe diente, wiesen die Ergebnisse darauf hin, daß nach Inokulation von *C. albicans*-Zellen zusammen mit Glykopeptiden weniger häufig Infektionen entstehen als bei Inokulation derselben Keimmenge ohne Glykopeptide.

Ein bestimmender Faktor für die unterschiedliche Inhibition bei Balb/c und SCID Mäusen scheint die Anzahl der Keime in Relation zum Angebot an Glykopeptiden zu sein. Die immunhistochemischen Ergebnisse zeigten, daß die Reaktionen des Wirtes auf die Gabe der Keim-Glykopeptidlösung hinsichtlich der Verteilung innerhalb der Epithelschichten und Menge exprimierender Zellen bei SCID und Balb/c Mäusen denen ohne Inokulation entsprachen.

Da Nebenwirkungen der oralen Applikation von Muzinen bisher nicht nachgewiesen wurden, wäre der unterstützende Einsatz von Muzinen oder deren Spaltprodukten bei Patienten mit erhöhtem Candidiasisrisiko zu erwägen.

6 Summary

In recent years, the number of immunocompromised patients has risen due both to infection and to the use of immunosuppressive drugs and chemotherapy. Since the first reports on HIV, numerous publications have described a strong correlation between oropharyngeal candidiasis and progression of the disease to AIDS. It is a safe assumption that every HIV patient will experience at least one episode of oral candidiasis during the course of his or her disease. In both humans and animals, congenital or acquired immunodeficiencies increase susceptibility to infection with extracellular pathogens.

Previous studies have shown that a direct association between mucosal changes and a high number of colony forming units (CFU/ml) in either pharyngeal lavage or swab test results does not exist. Persons with a healthy immune response and no symptoms have shown up to 10^3 CFU/ml in swab samples, whereas some patients infected with HIV have shown as little as 50 CFU/ml in cases where clinical symptoms were present.

Treatment of oropharyngeal candidiasis consists primarily of topical or systemic application of fungistatic or fungicide substances. Factors such as recurrent infection, resistance and tachyphylaxis complicate therapy and the choice of antimycotic.

This study applied a candidiasis model to immunocompetent inbred mice (Balb/c) (n=27) and mice with combined B- and T-cell defects (SCID) (n=30) to address the following questions

1. Does a correlation exist between the inoculated pathogen load and the emergence of a *C. albicans* infection (dose/effect relationship).

To investigate this, Balb/c mice (n=3) were orally inoculated with a pathogen load of 10^5 *C. albicans* cells/10 μ l (Strain DSM 3454), n=3 with 10^6 , n=6 with 10^7 and n=6 with 10^8 *C. albicans* cells/10 μ l, respectively. SCID mice (n=2) were also inoculated orally, with a pathogen load of 10^4 , n=6 with 10^5 , n=3 with 10^6 and n=6 with 10^7 *C. albicans* cells/10 μ l. One week following the inoculation, the animals were sacrificed, and one half of the tongue tissue was histochemically examined with the Periodic Acid Schiff Method for displaying morphological structures of *C. albicans*. Macroscopically, neither group's tissue showed clinical signs of mycosis, such as the erythematous or pseudomembranous changes associated with candidiasis.

2. Which cellular immune response takes place on the oral mucosa following inoculation with defined pathogen loads.

For this purpose, the other half of the tongue tissue was examined with frozen section methods and immunocompetent cells were examined by immune peroxidase methods using antibodies specific for CD4, CD13, CD54 (ICAM-1), CD62E (E-Selectin), CD74, CD80, CD86 and CD103.

3. Is it possible achieve to a protective effect by inhibiting *C. albicans* adhesion to murine epithelium cells through the local application of mucine (glycopeptides) metabolites to the oral mucosa, and so to prevent infection?

A possible alternative therapy consisting of a blockade of the pathogen's adhesion to tissues was tested. Balb/c mice (n=8) were inoculated with 10^8 *C. albicans* cells in combination with glycopeptides and SCID mice (n=8) were inoculated with 10^5 *C. albicans* cells, also in combination with glycopeptides. Previous *in vitro* studies have shown that a standardisation of temperature dependent processes in the laboratory is necessary to attain reproducible results.

ad1)

Following complete histochemical preparation and examination of the tongue tissue, the Balb/c mouse specimens showed no invasion by hyphae up to an inoculation load of 10^7 pathogens. With a load of 10^8 , 5/6 of the animals and 26/51 slices (51%) displayed an invasion of the stratum corneum. In the case of the SCID mice, hyphae invasion was present in 4 of 6 of the animals with the initial inoculation load of 10^5 pathogens, and 33 of 108 slices (33.6%) showed PAS positive structures. The minimal inoculation dose leading to infection of the tongue mucosa in the case of Balb/c mice was 10^8 pathogens. In the case of SCID mice, a load of 10^5 pathogens had this effect.

ad 2)

Despite the lack of macroscopic signs of candidiasis, an immunologic reaction took place in the tongue mucosa of both groups of test animals. The extent of this reaction depended both on the inoculation dose given to the animals and on their immune status. Following inoculation with the greatest pathogen load, CD4⁺ cells were observed infiltrating the lower stratum spinosum in Balb/c mice, whereas in the tissues of SCID mice, these cells could be demonstrated only sporadically in subepithelial regions. The morphology of the cells expressing CD4 antigen supported the conclusion that these were dendritic cells, not T-lymphocytes. The Balb/c mice differed greatly from the SCID mice with respect to the number of CD54⁺ cells: whereas an inoculation of 10^8 *C. albicans* cells was required to illicit a strong expression in the

subepithelial region and changes in the endothelium in the Balb/c mice, an inoculation with a pathogen load of only 10^5 brought about a strong expression of the CD54 antigen in the cells of the SCID mice. Following hyphae invasion of the tongue epithelium, a distinct expression of CD74 antigen occurred in subepithelial regions and in the lower stratum spinosum in the Balb/c mice. The SCID group showed a much lower number of CD74⁺ cells in the same cell layers. The expression of CD80 antigen in the Balb/c mice following stimulation with foreign antigen was less than that of CD86. In immune deficient mice, the latter could be demonstrated only in small amounts following inoculation with the minimal infective dose. Both species showed a high number of CD103⁺ cells following this dose, which suggests the development of CD8⁺ lymphocytes.

ad 3)

The results of an inoculation of 10^8 *C. albicans* cells in combination with glycopeptides showed a hyphae invasion of the tongue epithelium in 2/8 Balb/c mice. In the tongue epithelium of SCID mice, hyphae invasion could be demonstrated in 0/8 cases following an inoculation of 10^5 *C. albicans* cells in combination with glycopeptides. Despite the fact that the number of animals was limited and that statistical analysis served only to guide in orientation, the results indicate that when inoculation of *C. albicans* cells is combined with the application of glycopeptides, fewer infections occur than in cases where the same pathogen load is given without glycopeptides. A decisive factor for the differences in inhibition in Balb/c and SCID mice appears to be the pathogen load in relation to the glycopeptide dose. The results of immunohistochemical studies showed that the host's reaction to combined glycopeptide pathogen inoculation corresponds to the reaction without inoculation with respect to distribution within epithelial layers and the number of expressing cells in SCID and Balb/c mice.

As no side effects have been documented for the oral application of mucines, their use or the use of their metabolites as complementary therapy for patients at an increased risk for oral candidiasis should be considered.

7 Literaturverzeichnis

1. Adams D, Jones JH. Life history of experimentally induced acute oral candidiasis in the rat. *J Dent Res* 50 (3): 643-644, 1971.
2. Akova M, Akalin HE, Uzun O, Gur D. Emergence of *Candida krusei* infection after therapy of oropharyngeal candidiasis with fluconazole (letter). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10 (7): 598-599, 1991.
3. Allen CM. Animal models of oral candidiasis. A review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78 (2): 216-221, 1994.
4. Allen CM, Beck FM. Differences in mucosal reaction related to *Candida albicans* isolates. *J Oral Pathol* 16 (2): 89-93, 1987.
5. Allen CM, Beck FM. Strain-related differences in pathogenicity of *Candida albicans* for oral mucosa. *J Infect Dis* 147 (6): 1036-1040, 1983.
6. Allen CM, Beck FM, Lurie FA, Pinsky HM. Role of tetracycline in pathogenesis of chronic candidiasis of rat tongues. *Infect Immun* 47 (2): 480-483, 1985.
7. Allen CM, Blozis GG, Rosen S, Bright JS. Chronic candidiasis of the rat tongue: a possible model for human median rhomboid glossitis. *J Dent Res* 61 (11): 1287-1291, 1982.
8. Allen CM, Paulson R, Duncan R. Clinical, histologic and scanning electron microscopic study of the development of chronic candidiasis of the rat tongue. *J Oral Pathol Med* 18 (6): 352-359, 1989.
9. Allen CM, Rossie KM, Haring JI, Beck FM. Resolution of candidal lesions of the dorsal rat tongue by ketoconazole. *J Oral Pathol* 17 (4): 158-163, 1988.
10. Allen CM, Saffer A, Meister RK, Beck FM, Bradway S. Comparison of a lesion-inducing isolate and a non-lesional isolate of *Candida albicans* in an immunosuppressed rat model of oral candidiasis. *J Oral Pathol Med* 23 (3): 133-139, 1994.
11. Andersson B, Leffler H, Magnusson G, Svanborg Eden C. Molecular mechanisms of adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human oropharyngeal epithelial cells. *Scand J Infect Dis Suppl* 39: 45-47, 1983.
12. Andersson B, Porras O, Hanson LA, Lagergard T, Svanborg-Eden C. Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *J Infect Dis* 153 (2): 232-237, 1986.
13. Arendorf TM, Walker DM. Tobacco smoking and denture wearing as local aetiological factors in median rhomboid glossitis. *Int J Oral Surg* 13: 411-415, 1984.

14. Arendorf TM, Walker DM, Kingdom RJ, Roll JRS, Newcobe RG. Tobacco smoking and denture wearing in oral candidal leukoplakia. *Br Dent J* 155 (5): 340-343, 1983.
15. Aronson M, Medalia O, Schori L, Mirelman D, Sharon N, Ofek I. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl alpha-D-mannopyranoside. *J Infect Dis* 139 (3): 329-332, 1979.
16. Axéll T, Samaranayake LP, Reichart PA, Olsen I. A proposal for reclassification of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 84 (2): 111-112, 1997.
17. Bailey A, Wadsworth E, Calderone R. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells: host-induced protein synthesis and signaling events. *Infect Immun* 63 (2): 569-572, 1995.
18. Balish E, Balish MJ, Salkowski CA, Lee KW, Bartizal KF. Colonization of congenitally athymic, gnotobiotic mice by *Candida albicans*. *Appl Environ Microbiol* 47 (4): 647-652, 1984.
19. Balish E, Filutowicz H, Oberley TD. Correlates of cell-mediated immunity in *Candida albicans*-colonized gnotobiotic mice. *Infect Immun* 58 (1): 107-113, 1990.
20. Balish E, Jensen J, Warner T, Brekke J, Leonard B. Mucosal and disseminated candidiasis in gnotobiotic SCID mice. *J Med Vet Mycol* 31 (2): 143-154, 1993.
21. Balish E, Vazquez-Torres FA, Jones-Carson J, Wagner RD, Warner T. Importance of beta2-microglobulin in murine resistance to mucosal and systemic candidiasis. *Infect Immun* 64 (12): 5092-5097, 1996.
22. Balish E, Wagner R, Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Pierson C, Warner T. Mucosal and systemic candidiasis in IL-8Rh^{-/-} BALB/c mice. *J Leukoc Biol* 66 (1): 144-150, 1999.
23. Barone R, Ficarra G, Gaglioti D, Orsi A, Mazzotta F. Prevalence of oral lesions among HIV-infected intravenous drug abusers and other risk groups. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 69 (2): 169-173, 1990.
24. Bartholdy C, Marker O, Thomsen AR. Migration of activated CD8(+) T lymphocytes to sites of viral infection does not require endothelial selectins. *Blood* 95 (4): 1362-1369, 2000.
25. Bartroli J, Turmo E, Alguero M, Boncompte E, Vericat ML, Conte L, Ramis J, Merlos M, Garcia-Rafanell J, Forn J. New azole antifungals. 3. Synthesis and antifungal activity of 3-substituted-4(3H)-quinazolinones. *J Med Chem* 41 (11): 1869-1882, 1998.

26. Bastiaan RJ, Reade RC. The prevalence of *Candida albicans* in the mouths of tobacco smokers with and without oral mucous membrane keratosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 53 (2): 148-151, 1982.
27. Becker J, Behem J, Löning T, Reichart P, Geerlings H. Quantitative analysis of immunocompetent cells in human normal oral and uterine cervical mucosa, oral papillomas and leukoplakias. *Arch Oral Biol* 30 (3): 257-264, 1985.
28. Begg MD, Panageas KS, Mitchell-Lewis D, Bucklan RS, Phelan JA, Lamster IB. Oral lesions as markers of severe immunosuppression in HIV-infected homosexual men and injection drug users. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82 (3): 276-283, 1996.
29. Bendel CM, Hostetter MK. Distinct mechanisms of epithelial adhesion for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J Clin Invest* 92 (4): 1840-1849, 1993.
30. Blaser MJ, Newman LS. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Rev Infect Dis* 4 (6): 1096-1106, 1982.
31. Borg M, Rüchel R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida spp.* during experimental infection of oral mucosa. *Infect Immun* 56 (3): 626-631, 1988.
32. Borg-von Zepelin M, Wagner T. Fluorescence assay for the detection of adherent *Candida* yeasts to target cells in microtest plates. *Mycoses* 38 (9-10): 339-347, 1995.
33. Borromeo GL, McCullough MJ, Reade PC. Quantitation and morphotyping of *Candida albicans* from healthy mouths and mouths affected by erythematous candidosis. *J Med Vet* 30 (6): 477-80, 1992.
34. Bos IR, A B. Interepithelial cells of the oral mucosa. Light and electron microscopic observations in germfree, specific pathogen-free and conventionalized mice. *J Oral Pathol* 9 (2): 65-81, 1980.
35. Bosma MJ, Carroll AM. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* 9: 323-350, 1991.
36. Bosse R, Vestweber D. Only simultaneous blocking of the L- and P-selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum. *Eur J Immunol* 24 (12): 3019-3024, 1994.
37. Bowen WH, Madison KM, Pearson SK. Influence of desalivation in rats on incidence of caries in intact cagemates. *J Dent Res* 67 (10): 1316-1318, 1988.
38. Brammer KW. Management of fungal infections in neutropenic patients with fluconazole. *Hämatol Bluttransfus* 33: 546-550, 1990.

39. Brammer KW, Feczko JM. Single-dose oral fluconazole in the treatment of vaginal candidosis. *Ann N Y Acad Sci* 544: 561-563, 1988.
40. Brassart D, Woltz A, Golliard M, Neeser JR. *In vitro* inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc alpha 1----2Gal beta-bearing complex carbohydrates. *Infect Immun* 59 (5): 1605-1613, 1991.
41. Budtz-Jørgensen E. *Candida*-associated denture stomatitis and angular cheilitis. In: Samaranayake LP, MacFarlane TW, eds. *Oral Candidosis*. London: Butterworth and Co., pp. 156-183, 1990.
42. Budtz-Jørgensen E. Denture stomatitis. IV. An experimental model in monkeys. *Acta Odontol Scand* 29 (5): 513-526, 1971.
43. Budtz-Jørgensen E. Effects of triamcinolone acetonide on experimental oral candidiasis in monkeys. *Scand J Dent Res* 83 (3): 171-178, 1975.
44. Budtz-Jørgensen E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. *J Oral Pathol* 10 (2): 65-80, 1981.
45. Bunetel L, Bonnaure-Mallet M. Oral pathoses caused by *Candida albicans* during chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82 (2): 161-165, 1996.
46. Burkhardt A. Intraepithelial lymphocytes and Langerhans cells in the oral mucosa--dynamic aspects. *J Dent Assoc S Afr* 47 (5): 200-203, 1992.
47. Burkhardt A, Bos IR, Löning T, Gebbers JO, Otto HF, Seifert G. Interepithelial cells of the oral mucosa in mice. An ultrastructural classification with reflections on the origin of the Langerhans cell. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 384 (2): 223-244, 1979.
48. Calderone R, Diamond R, Senet JM, Warmington J, Filler S, Edwards JE. Host cell-fungal cell interactions. *J Med Vet Mycol* 32 (suppl 1): 151-168, 1994.
49. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* 55 (1): 1-20, 1991.
50. Calderone RA, Cihlar RL, Lee DD, Hoberg K, Scheld WM. Yeast adhesion in the pathogenesis of endocarditis due to *Candida albicans*: studies with adherence-negative mutants. *J Infect Dis* 152 (4): 710-715, 1985.
51. Cannon RD, Nand AK, Jenkinson HF. Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite. *Microbiology* 141 (Pt 1): 213-219, 1995.
52. Cantorna MT, Balish E. Mucosal and systemic candidiasis in congenitally immunodeficient mice. *Infect Immun* 58 (4): 1093-1100, 1990.

53. Cantorna MT, Balish E. Role of CD4+ lymphocytes in resistance to mucosal candidiasis. *Infect Immun* 59 (7): 2447-2455, 1991.
54. Cartledge JD, Midgley J, Gazzard BG. Clinically significant azole cross-resistance in *Candida* isolates from HIV-positive patients with oral candidosis. *AIDS* 11 (15): 1839-1844, 1997.
55. Casanova M, Gil ML, Cardenoso L, Martinez JP, Sentandreu R. Identification of wall-specific antigens synthesized during germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect Immun* 57 (1): 262-271, 1989.
56. CDC. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *JAMA* 269 (6): 729-730, 1993.
57. Centeno A, Davis CP, Cohen MS, Warren MM. Modulation of *Candida albicans* attachment to human epithelial cells by bacteria and carbohydrates. *Infect Immun* 39 (3): 1354-1360, 1983.
58. Challacombe S. Immunological aspects of oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78 (2): 202-210, 1994.
59. Chandrasekar PH, Molinari JA. Oral candidiasis: forerunner of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 60 (5): 532-4, 1985.
60. Chavanet P, Lopez J, Grappin M, Bonnin A, Duong M, Waldner A, Buisson M, Camerlynck P, Portier H. Cross-sectional study of the susceptibility of *Candida* isolates to antifungal drugs and in vitro-in vivo correlation in HIV-infected patients. *AIDS* 8 (7): 945-950, 1994.
61. Chave JP, Francioli P, Hirschel B, Glauser MP. Single-dose therapy for esophageal candidiasis with fluconazole. *AIDS* 4 (10): 1034-1035, 1990.
62. Cole GT, Lynn KT, Seshan KR. An animal model for oropharyngeal, esophageal and gastric candidosis. *Mycoses* 33 (1): 7-19, 1990.
63. Coleman DC, Bennett DE, Sullivan DJ, Gallagher PJ, Henman MC, Shanley DB, Russell RJ. Oral *Candida* in HIV infection and AIDS: new perspectives/new approaches. *Crit-Rev-Microbiol.* 19 (2): 61-82, 1993.
64. Council for International Organizations of Medical Sciences. *Mycoses. International nomenclature of diseases. Vol. II, part 2.* Switzerland: CIOMS (World Health Organisation), 1982.
65. Critchley IA, Douglas LJ. Role of glycosides as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 133 (Pt 3): 637-643, 1987.

66. Crocker PR, Jefferies WA, Clark SJ, Chung LP, Gordon S. Species heterogeneity in macrophage expression of the CD4 antigen. *J Exp Med* 166 (2): 613-618, 1987.
67. Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 45: 187-218, 1991.
68. Dayan D, Bodner L, Horowitz I. Effect of salivary gland hypofunction on the healing of extraction wounds: a histomorphometric study in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 50 (4): 354-358, 1992.
69. De Panfilis G, Manara GC, Ferrari C, Torresani C. Simultaneous colloidal gold immunoelectronmicroscopy labeling of CD1a, HLA-DR, and CD4 surface antigens of human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 91 (6): 547-552, 1988.
70. De Wit S, Weerts D, Goossens H, Clumeck N. Comparison of fluconazol and ketoconazol for oropharyngeal candidiasis in AIDS. *Lancet* 1 (8641): 746-748, 1989.
71. DeMaria A, Buckley H, von Lichtenberg F. Gastrointestinal candidiasis in rats treated with antibiotics, cortisone, and azathioprine. *Infect Immun* 13 (6): 1761-1770, 1976.
72. Deslauriers N, Coulombe C, Carre B, Goulet JP. Topical application of a corticosteroid destabilizes the host-parasite relationship in an experimental model of the oral carrier state of *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 11 (1): 45-55, 1995.
73. Dialynas DP, Quan ZS, Wall KA, Pierres A, Quintáns J, Loken MR, Pierres M, Fitch FW. Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4m identified by monoclonal antibody GK 1.5: Similarity of L3T4 to the human LEU-3/T4 molecule. *J Immunol* 131 (5): 2445-2451, 1983.
74. Dick JD, Merz WG, Saral R. Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother* 18 (1): 158-163, 1980.
75. Dodd CL, Greenspan D, Katz MH, Westenhause JL, Feigal DW, Greenspan JS. Oral candidiasis in HIV infection: pseudomembranous and erythematous candidiasis show similar rates of progression to AIDS. *AIDS* 5 (11): 1339-1343, 1991.
76. Douglas LJ. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. *Crit Rev Microbiol* 15 (1): 27-43, 1987.
77. Dourov N, Coremans-Pelseneer J. Experimental chronic lingual candidosis induced in streptozotocin diabetic rats. *Mykosen* 30 (4): 175-183, 1987.

78. Dupont B, Drouhet E. Fluconazole in the management of oropharyngeal candidosis in a predominantly HIV antibody-positive group of patients. *J Med Vet Mycol* 26 (1): 67-71, 1988.
79. EC-Clearinghouse on oral problems related to HIV infection and WHO Collaborating Centre on Oral Manifestations of the Immunodeficiency Virus. Classification and diagnostic criteria for oral lesions in HIV infection. *J Oral Pathol Med* 22 (7): 289-91, 1993.
80. Edgerton M, Scannapieco FA, Reddy MS, Levine MJ. Human submandibular-sublingual saliva promotes adhesion of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. *Infect Immun* 61 (6): 2644-2652, 1993.
81. Eisen D, Essell J, Broun ER. Oral cavity complications of bone marrow transplantation. *Semin-Cutan-Med-Surg* 16 (4): 265-272, 1997.
82. Eisenstein BI. Pathogenic mechanisms of *Legionella pneumophila* and *Escherichia coli*. *Am Soc Microbiol News* 53 (11): 621-624, 1987.
83. Epstein J, Truelove E, Izutzu K. Oral candidiasis: pathogenesis and host defence. *Rev Infect Dis* 6 (1): 96-106, 1984.
84. Epstein JB, Pearsall NN, Truelove EL. Quantitative relationships between *Candida albicans* in saliva and the clinical status of human subjects. *J Clin Microbiol* 12 (3): 475-476, 1980.
85. Eversole LR, Reichart PA, Ficarra G, Schmidt-Westhausen A, Romagnoli P, Pimpinelli N. Oral keratinocyte immune responses in HIV-associated candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 84 (4): 372-380, 1997.
86. Feldman JG, Chirgwin K, Dehovitz JA, Minkhoff H. The association of smoking and risk of condyloma acuminatum in women. *Obstet Gynecol* 89 (3): 346-50, 1997.
87. Fisker AV, Rindum Schiott C, Philipsen HP. Long-term candidosis in rats. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect B* 90 (3): 221-227, 1982.
88. Fisker AV, Rindum Schiott C, Philipsen HP. Short-term oral candidosis in rats, with special reference to the site of infection. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect B* 90 (1): 49-57, 1982.
89. Fotos PG, Steven DV, Hellstein JW. Oral candidosis. Clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 74 (1): 41-49, 1992.
90. Franklin CD, Martin MV. The effects of *Candida albicans* on turpentine-induced hyperplasia of hamster cheek pouch epithelium. *J Med Vet Mycol* 24 (4): 281-287, 1986.

91. Fromtling RA, Shadomy HJ. An overview of macrophage-fungal interactions. *Mycopathologia* 93 (2): 77-93, 1986.
92. Fukayama M, Calderone RA. Adherence of cell surface mutants of *Candida albicans* to buccal epithelial cells and analyses of the cell surface proteins of the mutants. *Infect Immun* 59 (4): 1341-1345, 1991.
93. Fussle R, Bicoping J, Michaelis G, Sziegoleit A. *Candida*-Infektionen bei Intensivpatienten. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 26 (7): 395-7, 1991.
94. Galai N, Park LP, Wesch J, Visscher B, Riddler S, Margolick JB. Effect of smoking on the clinical progression of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 14 (5): 451-8, 1997.
95. Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res* 68 (5): 750-760, 1989.
96. Goldman M, Cloud GA, Smedema M, LeMonte A, Connolly P, McKinsey DS, Kauffman CA, Moskovitz B, Wheat LJ. Does long-term itraconazole prophylaxis result in in vitro azole resistance in mucosal *Candida albicans* isolates from persons with advanced human immunodeficiency virus infection? The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses study group. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (6): 1585-1587, 2000.
97. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305 (24): 1425-1431, 1981.
98. Greenfield RA. Host defense system interactions with *Candida*. *J Med Vet Mycol* 30 (2): 89-104, 1992.
99. Gupta KL, Ghosh AK, Kochhar R, Jha V, Chakrabarti A, Sakhuja V. Esophageal candidiasis after renal transplantation: comparative study on different immunosuppressive protocols. *Am J Gastroenterol* 89 (7): 1062-1065, 1994.
100. Hahn H, Falke D, Klein P. *Medizinische Mikrobiologie*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1991.
101. Hansen AS, Noren O, Sjostrom H, Werdelin O. A mouse aminopeptidase N is a marker for antigen-presenting cells and appears to be co-expressed with major histocompatibility complex class II molecules. *Eur J Immunol* 23 (9): 2358-2364, 1993.
102. Hassan OE, Jones JH, Russell C. Experimental oral candidal infection and carriage of oral bacteria in rats subjected to a carbohydrate-rich diet and tetracycline treatment. *J Med Microbiol* 20 (3): 291-298, 1985.

103. Hata K, Kimura J, Miki H, Toyosawa T, Moriyama M, Katsu K. Efficacy of ER-30346, a novel oral triazole antifungal agent, in experimental models of aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 40 (10): 2243-2247, 1996.
104. Hazen KC, Hazen BW. Hydrophobic surface protein masking by the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infect Immun* 60 (4): 1499-1508, 1992.
105. Helstrom PB, Balish E. Effect of oral tetracycline, the microbial flora, and the athymic state on gastrointestinal colonization and infection of BALB/c mice with *Candida albicans*. *Infect Immun* 23 (3): 764-774, 1979.
106. Holbrook WP, Sofaer JA, Southam JC. Experimental oral infection of mice with a pathogenic and a non-pathogenic strain of the yeast *Candida albicans*. *Arch Oral Biol* 28 (12): 1089-1091, 1983.
107. Hostetter MK. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida spp.* with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev* 7 (1): 29-42, 1994.
108. Hummel M, Hetzer R. Pilzinfektionen nach Herztransplantation. In: Staib F, Huhn D, eds. *Pilzinfektionen bei abwehrgeschwächten Patienten*. New York Berlin Heidelberg: Springer Verlag, pp. 96, 1991.
109. Hunter KD, Gibson J, Lockhart P, Pithie A, Bagg J. Fluconazole resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole exposed HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85 (5): 558-564, 1998.
110. Imbert-Bernard C, Valentin A, Mallie M, Bastide JM. Involvement of *Candida albicans* cell wall proteins in the adherence of blastospores to human buccal epithelial cells. *Exp Mycol* 19 (4): 247-253, 1995.
111. Jimenez-Lucho V, Ginsburg V, Krivan HC. *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Gal beta 1-4Glc beta 1-1Cer), a possible adhesion receptor for yeasts. *Infect Immun* 58 (7): 2085-2090, 1990.
112. Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J Antimicrob Chemother* 35 (1): 103-114, 1995.
113. Jones JH, Adams D. Experimentally induced acute oral candidosis in the rat. *Br J Dermatol* 83 (6): 670-673, 1970.
114. Jones JH, Russell C. The histology of chronic candidal infection of the rat's tongue. *J Pathol* 113 (2): 97-100, 1974.

115. Jones JH, Russell C, Young C, Owen D. Tetracycline and the colonization and infection of the mouths of germ-free and conventionalized rats with *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother 2 (3): 247-253, 1976.
116. Jorge AO, Totti MA, de Almeida OP, Scully C. Effect of sialoadenectomy on the carriage of *Candida albicans* in the mouths of rats. J Oral Pathol Med 22 (3): 138-140, 1993.
117. Jorge AO, Totti MA, de Almeida OP, Scully C. Oral candidiasis established in the sialoadenectomised rat. J Oral Pathol Med 22 (2): 54-56, 1993.
118. Just-Nübling G, Gentschew G, Döhle M, Böttinger C, B HE, Stille W. Fluconazole in the treatment of oropharyngeal candidosis in HIV-positive patients. Mycoses 33 (9-10): 435, 1990.
119. Kage A. Glykanseitenketten als humorale Schutzfaktoren in der Mundhöhle - Pathobiochemie und klinische Relevanz. Habilitationsschrift, Humboldt Universität zu Berlin, 2000.
120. Katz MH, Greenspan D, Westenhouse J, Hessel NA, Buchbinder SP, Lifson AR, Shiboski S, Osmond D, Moss A, Samuel M. Progression to AIDS in HIV-infected homosexual and bisexual men with hairy leukoplakia and oral candidiasis. AIDS 6 (1): 95-100, 1992.
121. Kimura LH, Pearsall NN. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. Infect Immun 21 (1): 64-68, 1978.
122. Kimura LH, Pearsall NN. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. Infect Immun 28 (2): 464-468, 1980.
123. King GN, Healy CM, Glover MT, Kwan JTC, Williams DM, Leigh IM, Thornbill MH. Prevalence and risk factors associated with leukoplakia, hairy leukoplakia, erythematous candidiasis, and gingival hyperplasia in renal transplant patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 78 (6): 18-26, 1994.
124. Klein RS, Harris CA, Small CB, Moll B, Lesser M, Friedland GH. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 311 (6): 354-358, 1984.
125. Klotz S, Penn R. Multiple mechanisms may contribute to the adherence of *Candida* yeasts to living cells. Cur Microbiol 16: 119-122, 1987.
126. Klotz SA, Drutz DJ, Harrison JL, Huppert M. Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeasts. Infect Immun 42 (1): 374-384, 1983.
127. Kocourek J, Horejsi V. Defining a lectin. Nature 290: 188, 1981.

128. Koletar SL, Russell JA, Fass RJ, Plouffe JF. Comparison of oral fluconazole and clotrimazole troches as treatment for oral candidiasis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 34 (11): 2267-2268, 1990.
129. Korting HC, Abeck D. The lectin type of *Candida albicans*--an epidemiological marker relevant to pathogenesis. *Mycoses* 35 (3-4): 89-94, 1992.
130. Krause MW, Schaffner A. Comparison of immunosuppressive effects of cyclosporine A in a murine model of systemic candidiasis and of localized thrush-like lesions. *Infect Immun* 57 (11): 3472-3478, 1989.
131. Krause W, Matheis H, Wulf K. Fungaemia and funguria after oral administration of *Candida albicans*. *Lancet* 1 (7595): 598-599, 1969.
132. Kwon-Chun K, Bennet J. *Medical Mycology*. 1st ed. Pennsylvania, USA: Lea & Febinger, 1992.
133. Lacasse M, Fortier C, Chakir J, Cote L, Deslauriers N. Acquired resistance and persistence of *Candida albicans* following oral candidiasis in the mouse: a model of the carrier state in humans. *Oral Microbiol Immunol* 8 (5): 313-318, 1993.
134. Lacasse M, Fortier C, Trudel L, Collet AJ, Deslauriers N. Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects. *J Oral Pathol Med* 19 (3): 136-141, 1990.
135. Laine L, Dretler RH, Contreas CN, Tuazon C, Koster FM, Sattler F, Squires K, Islam MZ. Fluconazole compared with ketoconazole for the treatment of *Candida* esophagitis in AIDS. A randomized trial. *Ann Intern Med* 117 (8): 655-660, 1992.
136. Laine L, Rabeneck L. Prospective study of fluconazole suspension for the treatment of oesophageal candidiasis in patients with AIDS. *Aliment Pharmacol Ther* 9 (5): 553-556, 1995.
137. Lamb DJ, Martin MV. An *in vitro* and *in vivo* study of the effect of incorporation of chlorhexidine into autopolymerizing acrylic resin plates upon the growth of *Candida albicans*. *Biomaterials* 4 (3): 205-209, 1983.
138. Lamey PJ, Darwaza A, Fisher BM, Samaranyake LP, MacFarlane TW, Frier BM. Secretor status, candidal carriage and candidal infection in patients with diabetes mellitus. *J Oral Pathol* 17 (7): 354-357, 1988.
139. Larsen CP, Ritchie SC, Hendrix R, Linsley PS, Hathcock KS, Hodes RJ, Lowry RP, Pearson TC. Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J Immunol* 152 (11): 5208-5219, 1994.

140. Law D, Moore CB, Wardle HM, Ganguli LA, Keaney MG, Denning DW. High prevalence of antifungal resistance in *Candida* spp. from patients with AIDS. *J Antimicrob Chemother* 34 (5): 659-668, 1994.
141. Leen CLS, Dunbar EM, Ellis ME, Mandal BK. Once-weekly fluconazole to prevent recurrence of oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS and AIDS-related complex: a double-blind placebo-controlled study. *J Infect* 21 (1): 55-60, 1990.
142. Lehner T. Classification and clinico-pathological features of *Candida* infections in the mouth. In: Winner H, Hurley R, eds. *Symposium on Candida infections*. Edinburgh, pp. 119-137, 1966.
143. Lehner T. Oral thrush, or acute pseudomembranous candidiasis. *Oral Surg* 18: 27, 1964.
144. Lehrer N, Segal E, Lis H, Gov Y. Effect of *Candida albicans* cell wall components on the adhesion of the fungus to human and murine vaginal mucosa. *Mycopathologia* 102 (2): 115-121, 1988.
145. Levine MJ, Reddy MS, Tabak LA, Loomis RE, Bergey EJ, Jones PC, Cohen RE, Stinson MW, Al-Hashim I. Structural aspects of salivary glycoproteins. *J Dent Res* 66 (2): 436-441, 1987.
146. Levinovitz A, Muhloff J, Isenmann S, Vestweber D. Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells. *J Cell Biol* 121 (2): 449-459, 1993.
147. Liss RH, Letourneau RJ. Fungispecificity of Fluconazole against *Candida albicans*. *Mycopathol* 108 (3): 173, 1989.
148. Lopez S, Prats N, Marco AJ. Expression of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 during experimental murine listeriosis. *Am J Pathol* 155 (4): 1391-1397, 1999.
149. Luangjamekorn L, Silverman SJ, Gallo J, McKnight M, Migliorati C. Findings in 50 AIDS virus-infected patients with positive oral *Candida* cultures. *J Dent Assoc Thai* 40 (4): 157-164, 1990.
150. Lund B, Lindberg F, Marklund BI, Normark S. Tip proteins of pili associated with pyelonephritis: new candidates for vaccine development. *Vaccine* 6 (2): 110-112, 1988.
151. Lund B, Marklund BI, Stromberg N, Lindberg F, Karlsson KA, Normark S. Uropathogenic *Escherichia coli* can express serologically identical pili of different receptor binding specificities. *Mol Microbiol* 2 (2): 255-263, 1988.

152. Lyman CA, Walsh TJ. Systemically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. *Drugs* 44 (1): 9-35, 1992.
153. MacFarlane TW. Ecology and epidemiology of *Candida*. In: Samaranayake LP, MacFarlane TW, eds. *Oral Candidosis*. London: Butterworth and Co., 1990.
154. Macura AB, Tondyra E. Influence of some carbohydrates and concanavalin A on the adherence of *Candida albicans* in vitro to buccal epithelial cells. *Zentralbl Bakteriologie* 272 (2): 196-201, 1989.
155. Maesaki S, Hossain MA, Miyazaki Y, Tomono K, Tashiro T, Kohno S. Efficacy of FK463, a (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitor, in disseminated azole-resistant *Candida albicans* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (6): 1728-1730, 2000.
156. Martin MV, Appleton J, Chesters J, Smalley JW. The effect of *Candida albicans* on the permeability of rat palatal epithelium: an ultrastructural and biochemical study. *J Med Vet Mycol* 25 (1): 19-28, 1987.
157. Martin MV, Craig GT, Lamb DJ. An investigation of the role of true hypha production in the pathogenesis of experimental oral candidosis. *Sabouraudia* 22 (6): 471-476, 1984.
158. Mc Quillen DP, Zingman BS, F M, Levitz FM. Invasive infections due to *Candida krusei*: report of ten cases of fungemia that include three cases of endophthalmitis. *Clin Infect Dis* 14 (2): 272-278, 1992.
159. McCarthy GM. Host factors associated with HIV-related oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 73 (2): 181-186, 1992.
160. McCourtie J, Douglas LJ. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect Immun* 32 (3): 1234-1241, 1981.
161. McDonald GB, Sharma P, Hackman RC, Meyers JD, Thomas ED. Esophageal infections in immunosuppressed patients after marrow transplantation. *Gastroenterology* 88 (5 Pt 1): 1111-1117, 1985.
162. McFarland RD, Douek DC, Koup RA, Picker LJ. Identification of a human recent thymic emigrant phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (8): 4215-4220, 2000.
163. McKendrick AJ. Denture stomatitis and angular cheilitis in patients receiving long-term tetracycline therapy. *Br Dent J* 124 (9): 412-417, 1968.
164. McKendrick AJ, Wilson MI, Main DMG. Oral candida and long - term tetracycline therapy. *Arch Oral Biol* 12 (2): 281-290, 1967.

165. McMillan MD, Cowell VM. Effects of chronic *Candida albicans* in the hamster cheek pouch. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 74 (4): 492-498, 1992.
166. McMillan MD, Cowell VM. Experimental candidiasis in the hamster cheek pouch. *Arch Oral Biol* 30 (3): 249-255, 1985.
167. Mehentee JF, Hay RJ. Effect of antifungal agents on the adherence of *Candida albicans* to murine gastrointestinal mucosal surfaces. *J Antimicrob Chemother* 25 (1): 111-119, 1990.
168. Meinhof W, Spring R. Incidence of oral candidosis. *Mycoses* 32 (suppl 2): 9-11, 1989.
169. Meitner SW, Bowen WH, Haidaris CG. Oral and esophageal *Candida albicans* infection in hyposalivatory rats. *Infect Immun* 58 (7): 2228-2236, 1990.
170. Meunier F, Aoun M, Gerard M. Therapy for oropharyngeal candidiasis in the immunocompromised host: a randomized double-blind study of fluconazole vs. ketoconazole. *Rev Infect Dis* 12 (suppl 3): S364-368, 1990.
171. Meyer AS. In vitro Untersuchung zur spezifischen Bindung von 8 *Candida albicans*-Stämmen an Muzin. Diss., Humboldt Universität, Charité, 1999.
172. Millon L, Manteaux A, Reboux G, Drobacheff C, Monod M, Barale T, Miche-Briand Y. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J Clin Microbiol* 32 (4): 1115-1118, 1994.
173. Miyakawa Y, Kuribayashi T, Kagaya K, Suzuki M, Nakase T, Fukazawa Y. Role of specific determinants in mannan of *Candida albicans* serotype A in adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* 60 (6): 2493-2499, 1992.
174. Mooney MA, Thomas I, Sirois D. Oral candidosis. *Int J Dermatol* 34 (11): 759-765, 1995.
175. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Antifungal susceptibility testing: committee report. Vol. Vol 5. Villanova Pa., 1986.
176. Nielsen H, Bentsen KD, Hojtvad L, Willemoes EH, Scheutz F, Schiodt M, Stolte K, Pindborg JJ. Oral candidiasis and immune status of HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med* 23 (3): 140-143, 1994.
177. Nomeir AA, Kumari P, Hilbert MJ, Gupta S, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Hare R, Miller GH, Lin CC, Cayen MN. Pharmacokinetics of SCH 56592, a new azole broad-spectrum antifungal agent, in mice, rats, rabbits, dogs, and cynomolgus monkeys. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (3): 727-731, 2000.
178. Norris MM, Lamb DJ, Craig GT, Martin MV. The effect of miconazole on palatal candidosis induced in the Wistar rat. *J Dent* 13 (4): 288-294, 1985.

179. Nuriya S, Yagita H, Okumura K, Azuma M. The differential role of CD86 and CD80 co-stimulatory molecules in the induction and the effector phases of contact hypersensitivity. *Int Immunol* 8 (6): 917-926, 1996.
180. Odds FC. *Candida and Candidosis*. 2nd ed. London: Ballière Tindall, 1988.
181. Odds FC. Ecology of *Candida* and epidemiology of candidosis. In: Odds FC, ed. *Candida and Candidosis*. 2nd ed. London: Ballière Tindall, 1988.
182. Odds FC. Effects of temperature on anti-*Candida* activities of antifungal antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 37 (4): 685-691, 1993.
183. Odds FC. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. *J Antimicrob Chemother* 31 (4): 463-471, 1993.
184. Odds FC, Arai T, Disalvo AF, Evans EG, Hay RJ, Randhawa HS, Rinaldi MG, Walsh TJ. Nomenclature of fungal diseases: a report and recommendations from a sub-committee of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). *J Med Vet Mycol* 30 (1): 1-10, 1992.
185. Ofek I, Mirelman D, Sharon N. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* 265 (5595): 623-625, 1977.
186. O'Grady JF, Reade PC. Role of thermal trauma in experimental oral mucosal *Candida* infections in rats. *J Oral Pathol Med* 22 (3): 132-137, 1993.
187. Olive D, Mawas C. Therapeutic applications of anti-CD4 antibodies. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 10 (1): 29-63, 1993.
188. Oliver DE, Shillitoe EJ. Effects of smoking on the prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans*. *J Oral Pathol* 13 (3): 265-270, 1984.
189. Ollert MW, Sohnchen R, Korting HC, Ollert U, Bräutigam S, Bräutigam W. Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. *Infect Immun* 61 (11): 4560-4568, 1993.
190. Olsen I. Oral adhesion of yeasts. *Acta Odontol Scand* 48 (1): 45-53, 1990.
191. Olsen I, Bondevik O. Experimental *Candida*-induced denture stomatitis in the Wistar rat. *Scand J Dent Res* 86 (5): 392-398, 1978.
192. Olsen I, Haanaes HR. Experimental palatal candidosis and saliva flow in monkeys. *Scand J Dent Res* 85 (2): 135-141, 1977.
193. Ooshima T, Hashida T, Fuchihata H, Fujiwara T, Yoshida T, Izumitani A. Effect of experimental hyposalivation on the induction of dental caries in rats infected with *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 24 (6): 446-451, 1990.
194. Pahls S, Schaffner A. Comparison of the activity of free and liposomal amphotericin B *in vitro* and in a model of systemic and localized murine candidiasis. *J Infect Dis* 169 (5): 1057-1061, 1994.

195. Palacio H, Hilton JF, Canchola AJ, Greenspan D. Effect of cigarette smoking on HIV-related oral lesions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 14 (4): 338-42, 1997.
196. Pelletier R, Peter J, Antin C, Gonzalez C, Wood L, Walsh TJ. Emergence of resistance of *Candida albicans* to clotrimazole in human immunodeficiency virus-infected children: in vitro and clinical correlations. *J Clin Microbiol* 38 (4): 1563-1568, 2000.
197. Pendrak ML, Klotz SA. Adherence of *Candida albicans* to host cells. *FEMS Microbiol Lett* 129 (2-3): 103-113, 1995.
198. Pépin LF, Roger T, Morisset J, Seman M. Preferential V delta 1 expression among TcR gamma/delta-bearing T cells in human oral epithelium. *Scand J Immunol* 37 (3): 289-294, 1993.
199. Phelan JA, Begg MD, Lamster IB, Gorman J, Mitchell-Lewis D, Bucklan RD, El-Sadr WM. Oral candidiasis in HIV infection: predictive value and comparison of findings in injecting drug users and homosexual men. *J Oral Pathol Med* 26 (5): 237-243, 1997.
200. Pindborg JJ. *Farbatlas der Mundschleimhauterkrankungen*. 5., erw. Auflage ed. Köln: Dt. Ärzte-Verlag, 1993.
201. Pitzurra L, Fringuelli R, Perito S, Schiaffella F, Barluzzi R, Bistoni F, Vecchiarelli A. A new azole derivative of 1,4-benzothiazine increases the antifungal mechanisms of natural effector cells. *Antimicrob Agents Chemother* 43 (9): 2170-2175, 1999.
202. Plettenberg A, Stoehr A, Höffken G, Bergs C, Tschechne B, Ruhnke M, Heise W, Dieckmann S, Meigel W. Fluconazole therapy of oral candidiasis in HIV-infected patients: results of a multicenter study. *Infection* 22 (2): 118-123, 1994.
203. Polak A. Antifungal combination therapy in localized candidosis. *Mycoses* 33 (7): 353-358, 1990.
204. Polak A. Experimental models in antifungal chemotherapy. *Mycoses* 41 (1-2): 1-30, 1998.
205. Polak A, Schaffner A. A new experimental model of localized candidosis for the study of antifungal chemotherapy. *Mycoses* 32 (8): 398-404, 1989.
206. Powderly WG, Finkelstein D, Feinberg J, Frame P, He W, van der Horst C, Koletar SL, Eyster ME, Carey J, Waskin H. A randomized trial comparing fluconazole with clotrimazole troches for the prevention of fungal infections in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. NIAID AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med* 332 (11): 700-705, 1995.

207. Prasad KN, Agarwal J, Dixit AK, Tiwari DP, Dhole TN, Ayyagari A. Role of yeasts as nosocomial pathogens & their susceptibility to fluconazole & amphotericin B. *Indian J Med Res* 110: 11-17, 1999.
208. Ramirez-Amador V, Esquivel-Pedraza A, Mohar A, Reynoso-Gómez E, Volkow-Fernández P, Guarner J, Sánchez-Mejorada G. Chemotherapy-associated oral mucosal lesions in patients with leukaemia or lymphoma. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 32B (5): 322-327, 1996.
209. Ramirez-Amador V, Silverman SJ. Candidal colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 84 (2): 149-153, 1997.
210. Rauvala H, Hakomori SI. Studies on cell adhesion and recognition. III. The occurrence of alpha-mannosidase at the fibroblast cell surface, and its possible role in cell recognition. *J Cell Biol* 88 (1): 149-159, 1981.
211. Ray T, Digre K, Payne C. Adherence of *Candida* species to human epidermal corneocytes and buccal mucosal cells: correlation with cutaneous pathogenicity. *J Invest Dermatol* 83 (1): 37-41, 1984.
212. Ray TL, Wuepper KD. Experimental cutaneous candidiasis in rodents. *J Invest Dermatol* 66 (1): 29-33, 1976.
213. Reed MF, Scragg MA, Williams DM, Soames JV. In vivo effects of *Candida albicans* products on rat oral epithelium. *J Oral Pathol Med* 19 (7): 326-329, 1990.
214. Reibel J, Dabelsteen E, Kenrad B, Buschard K. Pattern of distribution of T lymphocytes, Langerhans cells and HLA-DR bearing cells in normal human oral mucosa. *Scand J Dent Res* 93 (6): 513-521, 1985.
215. Reichart PA, Samaranayake LP, Philipsen HP. Pathology and clinical correlates in oral candidiasis and its variants: a review. *Oral Dis* 6 (2): 85-91, 2000.
216. Reichart PA, Schmidt-Westhausen A, Samaranayake LP, Philipsen HP. *Candida*-associated palatal hyperplasia in HIV-infection. *J Oral Pathol Med* 23 (9): 403-405, 1994.
217. Reichart PA, Weigel D, Schmidt-Westhausen A, Pohle HD. Exfoliative cheilitis (EC) in AIDS: association with *Candida* infection. *J Oral Pathol Med* 26 (6): 290-293, 1997.
218. Reiser H, Schneeberger EE. Expression and function of B7-1 and B7-2 in hapten-induced contact sensitivity. *Eur J Immunol* 26 (4): 880-885, 1996.
219. Rindum JL, Stenderup A, Holmstrup P. Identification of *Candida albicans* types related to healthy and pathological oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 23 (9): 406-12, 1994.

220. Robinson PG, Challacombe SJ, Sheiham A, Zakrzewska JM. Is erythematous candidiasis associated with advanced HIV disease? *Oral Dis* 3 (suppl 1): S 116-S 118, 1997.
221. Rogers TE, Galgiani JN. Activity of fluconazole (UK 49,858) and ketoconazole against *Candida albicans* *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* 30 (3): 418-422, 1986.
222. Romagnoli P, Pimpinelli N, Mori M, Reichart PA, Eversole LR, Ficarra G. Immunocompetent cells in oral candidiasis of HIV-infected patients: an immunohistochemical and electron microscopical study. *Oral Dis* 3 (2): 99-105, 1997.
223. Rotrosen D, Calderone RA, Edwards JEJ. Adherence of *Candida species* to host tissues and plastic surfaces. *Rev Infect Dis* 8 (1): 73-85, 1986.
224. Rotrosen D, Edwards JEJ, Gibson TR, Moore JC, Cohen AH, Green I. Adherence of *Candida* to cultured vascular endothelial cells: mechanisms of attachment and endothelial cell penetration. *J Infect Dis* 152 (6): 1264-1274, 1985.
225. Rùchel R. Pathogenität von *Candida albicans*. *Immun Infekt* 19 (4): 108-110, 1991.
226. Ruhnke M, Eigler A, Tennagen I, Geiseler B, Engelmann E, Trautmann M. Emergence of Fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 32 (9): 2092-2098, 1994.
227. Ruhnke M, Tennagen I, Engelmann E. Korrelation zwischen Resistenztestung und Typisierung von *Candida albicans* Isolaten bei AIDS-Patienten und chronisch rezidivierender oraler Candidiasis. *Mycoses* 37 (suppl 1): S 60-63, 1994.
228. Russel C, Jones JH. Effects of oral inoculation of *Candida albicans* on tetracycline-treated rats. *J Med Microbiol* 6 (3): 275-279, 1973.
229. Russell C, Jones JH. The histology of prolonged candidal infection of the rat's tongue. *J Oral Pathol* 4 (6): 330-339, 1975.
230. Russell C, Jones JH, Gibbs AC. The carriage of *Candida albicans* in the mouths of rats treated with tetracycline briefly or for a prolonged period. *Mycopathologia* 58 (3): 125-129, 1976.
231. Saah AJ, Munoz A, Kuo V, Fox R, Kaslow RA, Phair JP, Rinaldo CRJ, Detels R, Polk BF. Predictors of the risk of development of acquired immunodeficiency syndrome within 24 months among gay men seropositive for human immunodeficiency virus type 1: a report from the Multicenter AIDS Cohort Study. *Am J Epidemiol* 135 (10): 1147-1155, 1992.

232. Sakki TK, Knuutila ML, Laara E, Antilla SS. The association of yeasts and denture stomatitis with behavioural and biologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 84 (6): 624-9, 1997.
233. Salgado CG, Nakamura K, Sugaya M, Tada Y, Asahina A, Fukuda S, Koyama Y, Irie S, K T. Differential effects of cytokines and immunosuppressive drugs on CD40, B7-1, and B7-2 expression on purified epidermal Langerhans cells¹. *J Invest Dermatol* 113 (6): 1021-1027, 1999.
234. Samaranayake LP. Oral candidosis: predisposing factors and pathogenesis. In: Derrick DD, ed. *Dental Annual*. Bristol: Wright, 1989.
235. Samaranayake LP, MacFarlane TW, Williamson MI. Comparison of Sabouraud's dextrose and Pagano-Levin agar media for the detection and isolation of yeasts from oral samples. *J Clin Microbiol* 25 (1): 162-164, 1987.
236. Samaranayake LP, Yaacob H. Classification of oral Candidosis. In: Samaranayake LP, MacFarlane TW, eds. *Oral candidosis*. London: Butterworth and Co., pp. 124-132, 1990.
237. Sandin RL, Rogers AL, Patterson RJ, Beneke ES. Evidence for mannose-mediated adherence of *Candida albicans* to human buccal cells in vitro. *Infect Immun* 35 (1): 79-85, 1982.
238. Scheynius A, Camp RL, Puré E. Reduced contact sensitivity reactions in mice treated with monoclonal antibodies to Leukocyte-Function-Associated Molecule-1 and Intracellular Adhesion Molecule-1. *J Immunol* 150 (2): 655-663, 1993.
239. Schmid J, Hunter PR, White GC, Nand AK, Cannon RD. Physiological traits associated with success of *Candida albicans* strains as commensal colonizers and pathogens. *J Clin Microbiol* 33 (11): 2920-2926, 1995.
240. Schmidt-Westhausen A, Schiller RA, Grünwald T, Reichart PA. Candidiasisprophylaxe mit Fluconazol bei HIV-infizierten Patienten. *Dtsch Zahnärztl Z* 48 (1): 50-52, 1993.
241. Schmidt-Westhausen A, Schiller RA, Pohle HD, Reichart PA. Oral Candida and Enterobacteriaceae in HIV-1 infection: correlation with clinical candidiasis and antimycotic treatment. *J Oral Pathol Med* 20 (10): 469-472, 1991.
242. Schön MP, Arya A, Murphy EA, Adams CM, Strauch UG, Agace WW, Marsa IJ, Donohue J, Her H, Beier DR, Olson S, Lefrancois L, Brenner MB, Grusby MJ, Parker CM. Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J Immunol* 162 (11): 6641-6649, 1999.
243. Scully C, el-Kabir M, Samaranayake LP. Candida and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 5 (2): 125-157, 1994.

244. Seebacher C, Blaschke-Hellmessen R. Allgemeine Grundlagen der Medizinischen Mykologie. In: Seebacher C, Blaschke-Hellmessen R, eds. Mykosen. Epidemiologie-Diagnostik-Therapie. 1. ed. Jena: Gustav Fischer Verlag, pp. 13-46, 1990.
245. Segal E, Gottfried L, Lehrer N. Candidal vaginitis in hormone-treated mice: prevention by a chitin extract. *Mycopathologia* 102 (3): 157-163, 1988.
246. Segal E, Lehrer N, Ofek I. Adherence of *Candida albicans* to human vaginal epithelial cells: inhibition by amino sugars. *Exp Cell Biol* 50 (1): 13-17, 1982.
247. Shakir BS, Martin MV, Smith CJ. Effect on experimental palatal candidosis in the Wistar rat of removal and re-insertion of acrylic appliances. *Arch Oral Biol* 31 (9): 617-621, 1986.
248. Shakir BS, Martin MV, Smith CJ. Induced palatal candidosis in the wistar rat. *Arch Oral Biol* 26 (10): 787-793, 1981.
249. Shakir BS, Martin MV, Smith CJ. Relative effectiveness of various yeasts, *Candida spp.* and *Torulopsis glabrata*, for inducing palatal infection in the Wistar rat. *Arch Oral Biol* 28 (11): 1069-1071, 1983.
250. Shakir BS, Smith CJ, Martin MV. Epithelial mitotic activity during the induction of palatal candidosis in the Wistar rat. *J Oral Pathol* 15 (7): 375-380, 1986.
251. Sharon N, Lis H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am* 268 (1): 82-89, 1993.
252. Shepherd M, Poulter R, Sullivan P. *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity. *Ann Rev Microbiol* 39: 579-614, 1985.
253. Sherwood J, Gow NAR, Gooday GW, Gregory DW, Marshall D. Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. *Med Vet Myc* 30 (6): 461-469, 1992.
254. Silverman SJ, Gallo JW, McKnight ML, Mayer P, deSanz S, Tan MM. Clinical characteristics and management responses in 85 HIV-infected patients with oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82 (4): 402-407, 1996.
255. Siu G, Hedrick SM, Brian AA. Isolation of the murine intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene. ICAM-1 enhances antigen-specific T cell activation. *J Immunol* 143 (11): 3813-3820, 1989.
256. Smith D, Boag F, Midgley J, Gazzard B. Fluconazole resistant *Candida* in AIDS. *J Infect* 23 (3): 345-346, 1991.

257. Sobel JD, Hasegawa A, De Bernardis F, Adriani D, Pellegrini G, Cassone A, Fidel PL, Haidaris CG, Gigliotti F, Harmsen AG, Fujita S, Yamamoto K, Maki-mura K, Shibuya K, Uchida K, Yamaguchi H. Selected animal models: vaginal candidosis, *Pneumocystis pneumonia*, dermatophytosis and trichosporonosis. *Med Mycol* 36 (suppl I): 129-136, 1998.
258. Sobel JD, Myers PG, Kaye D, Levison ME. Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and buccal cells. *J Infect Dis* 143 (1): 76-82, 1981.
259. Sofaer JA, Holbrook WP, Southam JC. Experimental oral infection with the yeast *Candida albicans* in mice with or without inherited iron-deficiency anaemia (sla). *Arch Oral Biol* 27 (6): 497-503, 1982.
260. Staddon W, Todd T, Irvin RT. Equilibrium analysis of binding of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Can J Microbiol* 36 (5): 336-340, 1990.
261. Stellbrink HJ, Albrecht S, Fenske S, Koperski K. *Candida krusei* sepsis in HIV-infection. *AIDS* 6 (7): 746-748, 1992.
262. Sullivan PA, Yin CY, Molloy C, Templeton MD, Shepherd MG. An analysis of the metabolism and cell wall composition of *Candida albicans* during germ-tube formation. *Can J Microbiol* 29 (11): 1514-1525, 1983.
263. Svanborg Eden C, Hagberg L, Leffler H, Lomberg H. Recent progress in the understanding of the role of bacterial adhesion in the pathogenesis of urinary tract infection. *Infection* 10 (5): 327-332, 1982.
264. Syrjänen S, Valle SJ, Anttonen J, Suni J, Saxinger C, Krohn K, Ranki A. Oral candida infection as a sign of HIV infection in homosexual men. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 65 (1): 36-40, 1988.
265. Tang A, Udey MC. Inhibition of epidermal Langerhans cell function by low dose ultraviolet B radiation. Ultraviolet B radiation selectively modulates ICAM-1 (CD54) expression by murine Langerhans cells. *J Immunol* 146 (10): 3347-3355, 1991.
266. Teunissen MB, Rongen HA, Bos JD. Function of adhesion molecules lymphocyte function-associated antigen-3 and intercellular adhesion molecule-1 on human epidermal Langerhans cells in antigen-specific T cell activation. *J Immunol* 152 (7): 3400-3409, 1994.
267. Torosantucci A, Bromuro C, Gomez MJ, Ausiello CM, Urbani F, Cassone A. Identification of a 65-kDa mannoprotein as a main target of human cell-mediated immune response to *Candida albicans*. *J Infect Dis* 168 (2): 427-435, 1993.

268. Torssander J, Morfeldt-Manson L, Biberfeld G, Karlsson A, Putkonen P-O, Wasserman J. Oral *Candida albicans* in HIV infection. Scand J Infect Dis 19 (3): 291-295, 1987.
269. Totti MA, Jorge AO, dos Santos EB, de Almeida OP, Scully C. Implantation of *Candida albicans* and other *Candida* species in the oral cavity of rats. J Oral Pathol Med 25 (6): 308-310, 1996.
270. Tschechne B, Brunkhorst U, Ruhnke M, Trautmann M, Dempe S, Deicher H. Fluconazol in der Therapie der Kandidose des Mund-Rachen-Raumes bei Patienten mit HIV-Infektion. Ergebnisse einer offenen multizentrischen Studie zum Nachweis der Wirksamkeit und Verträglichkeit von Fluconazol. Med Klin 86 (10): 508-511, 1991.
271. Tumbarello M, Tacconelli E, Caldarola G, Morace G, Cauda R, Ortona L. Fluconazole-resistant oral candidiasis in HIV-infected patients. Oral Dis 3 (suppl 1): S110-112, 1997.
272. Umazume M, Ueta E, Osaki T. Reduced inhibition of *Candida albicans* adhesion by saliva from patients receiving oral cancer therapy. J Clin Microbiol 33 (2): 432-439, 1995.
273. van Loon LA, Krieg SR, Davidson CL, Bos JD. Quantification and distribution of lymphocyte subsets and Langerhans cells in normal human oral mucosa and skin. J Oral Pathol Med 18 (4): 197-201, 1989.
274. van Meter F, Gallo JW, Garcia-Rojas G, Tan MM, Silverman SJ. A study of oral candidiasis in HIV-positive patients. J Dent Hyg 68 (1): 30-4, 1994.
275. van Wyk CW, Basson NJ, Gibson B. Non-inbred Sprague-Dawley germfree rats as a model for oral candidiasis. J Dent Assoc S Afr 42 (11): 683-687, 1987.
276. van Wyk CW, Basson NJ, Gibson BM. Evaluation of inbred germ-free Fischer 344 albino rats as an experimental model for oral candidiasis. Lab Anim 23 (3): 248-255, 1989.
277. Vanden Bossche H, Dromer F, Improvisi I, Lozano-Chiu M, Rex JH, Sanglard D. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. Med Mycol 36 (suppl 1): 119-128, 1998.
278. Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. Trends Microbiol 2 (10): 393-400, 1994.
279. Vasilas A, Molina L, Hoffman M, Haidaris CG. The influence of morphological variation on *Candida albicans* adhesion to denture acrylic in vitro. Arch Oral Biol 37 (8): 613-622, 1992.

280. Viville S, Neefjes J, Lotteau V, Dierich A, Lemeur M, Ploegh H, Benoist C, Mathis D. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72 (4): 635-48, 1993.
281. Wagner RD, Pierson C, Warner T, Dohnalek M, Farmer J, Roberts L, Hilty M, Balish E. Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infect Immun* 65 (10): 4165-4172, 1997.
282. Wagner RD, Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Warner T, Balish E. B cell knockout mice are resistant to mucosal and systemic candidiasis of endogenous origin but susceptible to experimental systemic candidiasis. *J Infect Dis* 174 (3): 589-597, 1996.
283. Walsh LJ, Parry A, Scholes A, Seymour GJ. Modulation of CD4 antigen expression on human gingival Langerhans cells by gamma interferon. *Clin Exp Immunol* 70 (2): 379-385, 1987.
284. Warnock DW, Burke J, Cope NJ, Johnson EM, von Fraunhofer NA, Williams. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Lancet* 2 (8623): 1310, 1988.
285. Watanabe M, Kobayashi M, Iida K, Ozeki M, Doi S, Hoshino T. Langerhans cells in mice with severe combined immunodeficiency (SCID). *Arch Histol Cytol* 59 (4): 347-355, 1996.
286. Weis C, Kappe R, Sonntag HG. Western blot analysis of the immune response to *Candida albicans* antigens in 391 long-term intensive care patients. *Mycoses* 40 (5-6): 153-157, 1997.
287. Williams DW, Potts AJC, Wilson MJ, Matthews JB, Lewis MAO. Characterisation of the inflammatory cell infiltrate in chronic hyperplastic candidosis of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 26 (2): 83-89, 1997.
288. Wingard JR. Infections due to resistant *Candida* species in patients with cancer who are receiving chemotherapy. *Clin Infect Dis* 19 (suppl 1): S49-53, 1994.
289. Wingard JR, Dick JD, Merz WG, Sandford GR, Saral R, Burns WH. Differences in virulence of clinical isolates of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* in mice. *Infect Immun* 37 (2): 833-836, 1982.
290. Wingard JR, Dick JD, Merz WG, Sandford GR, Saral R, Burns WH. Pathogenicity of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* after gastrointestinal inoculation in mice. *Infect Immun* 29 (2): 808-813, 1980.
291. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med* 325 (18): 1274-1277, 1991.

292. Winkel K, Sotzik F, Vremec D, Cameron PU, Shortman K. CD4 and CD8 expression by human and mouse thymic dendritic cells. *Immunol Lett* 40 (2): 93-99, 1994.
293. Winner HI. The transition from commensalism to parasitism. *Br J Dermatol* 81 (suppl 1): 62, 1969.
294. Wright BA, Fenwick F. Candidiasis and atrophic tongue lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 51 (1): 55-61, 1981.
295. Yamada H, Tsuda T, Watanabe T, Kusakabe S, Mochizuki H. Antifungal activity of D0870 against murine infections and its mechanism of action. *Chemotherapy* 44 (2): 112-120, 1998.

8 Anhang

8.1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Puffer und Lösungen

1. RPMI 1640 -Medium (Angaben in mg/l)

| | |
|--|------------------------|
| NaCl: 6000 | D-Ca-Pantothenat: 0,25 |
| KCl: 400 | Cholinchlorid: 3 |
| Na ₂ HPO ₄ × 7 H ₂ O: 1512 | Folsäure: 1 |
| Mg SO ₄ × 7 H ₂ O: 100 | i-Inosit: 35 |
| Ca (NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O: 100 | Nicotinamid: 1 |
| D-Glucose: 2000 | p-Aminobenzoessäure: 1 |
| Phenolrot: 5 | Pyridoxin × HCl: 1 |
| NaHCO ₃ : 2000 | Riboflavin: 0,2 |
| L-Arginin: 200 | Thiamin × HCl: 1 |
| L-Asparagin: 50 | L-Methionin: 15 |
| L-Asparaginsäure: 20 | L-Phenylalanin: 15 |
| L-Cystin: 50 | L-Prolin: 20 |
| L-Serin: 30 | L-Histidin: 15 |
| L-Glutaminsäure: 20 | L-Threonin: 20 |
| Glycin: 10 | L-Tryptophan: 5 |
| L-Tyrosin: 20 | L-Hydroxyprolin: 20 |
| L-Isoleucin: 50 | L-Valin: 20 |
| L-Leucin: 50 | Glutathion: 1 |
| Biotin: 0,2 | L-Lysin × HCl: 40 |
| Vitamin B ₁₂ : 0,005 | |

2. PBS (Phosphate buffered saline) als Spülpuffer

| | |
|--|---------------------------------|
| 2,4 g KH ₂ PO ₄ | (Merck, Darmstadt, Deutschland) |
| 8,65 Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O | (Merck, Darmstadt, Deutschland) |
| 45,0 g NaCl | (Merck, Darmstadt, Deutschland) |
| 5 l Aqua dest. | auf pH 7,2 einstellen |

3. Trispuffer: 6,06 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan in 1 l aqua dest. lösen und 1 ml Polyoxethylensorbitanmonolaurat zugeben, auf pH 7,5 einstellen

4. Reaktionssubstrat: AEC (3-amino 9-ethylcarbazole) (Fa. Dianova, Hamburg)

Stammlösung: 20 mg AEC lösen in 2 ml N,N-Dimethylfomamide

Substratlösung: 0,5 ml Stammlösung
 5,6 ml Acetatpuffer (pH 5,1)
 10 µl 30 % H₂O₂

5. Saures Hämaun nach Mayer (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

6. Kaiser's Glycerin-Gelatine[®] (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

7. Eukitt[®] (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland)

8. Xylol (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

8.2 Tabellen

Tab. 17: Rohdaten Auswertung PAS (Balb/c)

| TierNr. | Keim- menge | n= | Obj.Träger | | | EZ |
|---------|---------------------|----|------------|---|---|-----|------------|---|---|-----|------------|---|---|-----|------------|---|---|-----|
| B1 | 10 ⁷ | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B2 | 10 ⁷ | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B3 | 10 ⁷ | 6 | + | + | + | 0 | + | + | + | 0 | | | | | | | | |
| B4 | 10 ⁸ | 5 | 0 | 0 | | + | + | + | + | + | | | | | | | | |
| B5 | 10 ⁸ | 5 | 0 | + | | 0 | + | + | + | 0 | | | | | | | | |
| B6 | 10 ⁸ | 5 | + | + | | + | + | + | + | + | | | | | | | | |
| B7 | 10 ⁶ | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B8 | 10 ⁶ | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B9 | 10 ⁶ | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) |
| B10 | 10 ⁷ | 24 | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) |
| | | | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) |
| B11 | 10 ⁷ | 24 | + | + | + | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | + | + | + | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) |
| | | | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | + | + | + | (+) | + | + | + | (+) |
| B12 | 10 ⁷ | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B13 | 10 ⁵ | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B14 | 10 ⁵ | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B15 | 10 ⁵ | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B16 | 10 ⁸ | 12 | 0 | + | + | 0 | + | 0 | + | 0 | 0 | + | 0 | 0 | + | + | + | + |
| B17 | 10 ⁸ | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B18 | 10 ⁸ | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | + | + | 0 | + | + | + | + |
| B19 | 10 ⁸ +GP | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B20 | 10 ⁸ +GP | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B21 | 10 ⁸ +GP | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B22 | 10 ⁸ +GP | 12 | 0 | + | + | 0 | + | + | + | 0 | + | + | + | 0 | + | + | + | 0 |
| B23 | 10 ⁸ +GP | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B24 | 10 ⁸ +GP | 12 | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) |
| B25 | 10 ⁸ +GP | 12 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B26 | 10 ⁸ +GP | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B0 | keine ohne AB | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |

Tab. 18: Rohdaten Auswertung PAS (SCID)

| TierNr. | Keim- menge | n= | Obj.Träger | | | EZ |
|---------|---------------------|----|------------|---|---|-----|------------|---|---|-----|------------|---|---|-----|------------|---|---|-----|
| S1 | 10 ⁷ | 11 | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S2 | 10 ⁷ | 5 | + | + | | + | + | + | + | + | | | | | | | | |
| S3 | 10 ⁷ | 5 | + | + | | 0 | + | + | + | 0 | | | | | | | | |
| S4 | 10 ⁵ | 12 | + | + | + | 0 | + | + | + | 0 | + | + | + | 0 | + | + | + | 0 |
| S5 | 10 ⁵ | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| S6 | 10 ⁵ | 21 | + | + | + | 0 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| S7 | 10 ⁶ | 42 | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | + | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) |
| | | | 0 | 0 | 0 | (+) | + | + | + | (+) | 0 | 0 | + | (+) | + | + | + | (+) |
| | | | 0 | 0 | 0 | (+) | + | + | + | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | + | + | + | (+) |
| | | | 0 | 0 | 0 | ++ | + | + | + | ++ | | | | | | | | |
| S8 | 10 ⁶ | 21 | + | + | + | + | 0 | 0 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | | + | + | + | + | + | + | + | (+) | + | + | + | (+) | | | | |
| S9 | 10 ⁶ | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| S10 | 10 ⁷ | 42 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | (+) | + | + | + | (+) |
| | | | 0 | 0 | 0 | (+) | + | + | + | (+) | | | | | | | | |
| S11 | 10 ⁷ | 21 | + | + | + | 0 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | + | + | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | + | 0 | | | | |
| S12 | 10 ⁷ | 42 | + | + | + | + | 0 | 0 | 0 | + | + | + | + | + | 0 | 0 | 0 | + |
| | | | + | + | + | + | 0 | 0 | 0 | + | + | + | + | + | 0 | 0 | 0 | + |
| | | | 0 | 0 | 0 | + | + | + | + | + | 0 | 0 | 0 | + | + | + | + | + |
| | | | 0 | 0 | 0 | + | + | + | + | + | | | | | | | | |
| S13 | keine | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S14 | keine | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| S15 | keine | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| S16 | keine ohne AB | 18 | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) |
| | | | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | | | | | | | | |
| S17 | 10 ⁴ | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S18 | 10 ⁴ | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S19 | 10 ⁵ +GP | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S20 | 10 ⁵ +GP | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S21 | 10 ⁵ +GP | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S22 | 10 ⁵ | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| S23 | 10 ⁵ | 12 | + | + | + | 0 | + | + | + | 0 | + | + | + | 0 | + | + | + | 0 |

| TierNr. | Keim- menge | n= | Obj.Träger | | | EZ | Obj.Träger | | | EZ | Obj.Träger | | | EZ | Obj.Träger | | | EZ |
|---------|---------------------|----|------------|---|---|-----|------------|---|---|-----|------------|---|---|----|------------|---|---|----|
| | | | + | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S24 | 10 ⁵ | 21 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S25 | GP | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S26 | 10 ⁵ +GP | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S27 | 10 ⁵ +GP | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S28 | 10 ⁵ +GP | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S29 | 10 ⁵ +GP | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S30 | 10 ⁵ +GP | 12 | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

Tab. 19: Rohdaten Immunhistologie Balb/c: Antikörper gegen CD4

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | Subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|---------------------|-------|-------|-----|--------|-----|-------------|
| B13 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| B14 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| B15 | 10 ⁵ | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | |
| B7 | 10 ⁶ | 0 | 0 | + | (+) | 0 | |
| B8 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | + | (+) | |
| B9 | 10 ⁶ | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| B1 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| B2 | 10 ⁷ | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | |
| B3 | 10 ⁷ | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| B10 | 10 ⁷ | 0 | (+) | ++ | + | 0 | |
| B11 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| B12 | 10 ⁷ | 0 | 0 | (+) | + | 0 | |
| B4 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| | | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| B5 | 10 ⁸ | + | + | ++ | ++ | 0 | |
| B6 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | |
| B16 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| B17 | 10 ⁸ | 0 | (+) | ++ | + | (+) | Nester |
| B18 | 10 ⁸ | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| B19 | 10 ⁸ +GP | 0 | 0 | + | 0 | 0 | |
| B20 | 10 ⁸ +GP | 0 | 0 | + | + | (+) | Nest |
| B21 | 10 ⁸ +GP | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | |
| B00 | ohne AB/Keime | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | |

Legende: Sp. o: Stratum spinosum obere Schicht Sp.-u: Stratum spinosum untere Schicht
BZS: Basalzellschicht subep.: subepithelial Lp: Lamina propria End: Endothel

Tab. 20: Rohdaten Immunhistologie Balb/c: Antikörper gegen CD13

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | Subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|-----------------------|-------|-------|-----|--------|-----|-------------|
| B13 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | (+) | 1) |
| B14 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | (+) | (+) | 1) |
| B15 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | (+) | 1) |
| B7 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | + | + | 1) |
| B8 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | + | + | 1)Photo |
| B9 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | ++ | ++ | 1) |
| B1 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | +++ | 1) |
| B2 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | +++ | 1) |
| B3 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | +++ | 1) |
| B10 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | +++ | 1) |
| B11 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | |
| B12 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | +++ | 1) |
| B4 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| B5 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | +++ | + | |
| B6 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | +++ | + | |
| B16 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | +++ | ++ | 1) |
| B17 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | +++ | ++ | 1) |
| B18 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | +++ | ++ | 1) |
| B19 | 10 ⁸ +GP | 0 | 0 | 0 | ++ | + | 1) |
| B20 | 10 ⁸ +GP | 0 | 0 | 0 | ++ | + | 1) |
| B21 | 10 ⁸ +GP | 0 | 0 | 0 | ++ | + | 1) |
| B00 | ohne AB ohne Keime | 0 | 0 | 0 | + | + | |

1) auch in Speicheldrüsengewebe und Endothel

Tab. 21: Rohdaten Immunhistologie Balb/c: Antikörper gegen CD54

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | subep. | Lp | End | Anmerkungen |
|--------|-----------------|-------|-------|-----|--------|----|-----|-------------|
| B13 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| B14 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| B15 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| B7 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| B8 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| B9 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| B1 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| B2 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | + | |
| B3 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | ++ | |
| B10 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | + | |
| B11 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | + | |
| B12 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| B4 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | +++ | |

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | subep. | Lp | End | Anmerkungen |
|--------|-----------------------|-------|-------|-----|--------|----|-----|-------------|
| B5 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | ++ | |
| B6 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | +++ | |
| | | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | +++ | |
| B16 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | +++ | |
| B17 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | ++ | |
| B18 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | ++ | 1) Photo |
| B19 | 10 ⁸ +GP | 0 | 0 | 0 | + | 0 | (+) | |
| B20 | 10 ⁸ +GP | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| B21 | 10 ⁸ +GP | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| B00 | ohne AB ohne Keime | 0 | 0 | 0 | + | 0 | (+) | |

In allen Schnitten sind nicht nur einzelne Zellen, sondern auch interzelluläre Räume markiert
1) streifig angeordnet

Tab. 22: Rohdaten Immunhistologie Balb/c: Antikörper gegen CD62E

| TierNr. | Inok.-Menge | Reaktion Endothel | Anmerkungen |
|---------|-----------------------|-------------------|-------------|
| B13 | 10 ⁵ | 0 | |
| B14 | 10 ⁵ | 0 | |
| B15 | 10 ⁵ | 0 | |
| B7 | 10 ⁶ | 0 | |
| B8 | 10 ⁶ | 0 | |
| B9 | 10 ⁶ | 0 | |
| B1 | 10 ⁷ | 0 | |
| B2 | 10 ⁷ | 0 | |
| B3 | 10 ⁷ | 0 | |
| B10 | 10 ⁷ | 0 | |
| B11 | 10 ⁷ | 0 | |
| B12 | 10 ⁷ | 0 | |
| B4 | 10 ⁸ | 0 | |
| B5 | 10 ⁸ | 0 | |
| B6 | 10 ⁸ | 0 | |
| B16 | 10 ⁸ | 0 | |
| B17 | 10 ⁸ | 0 | |
| B18 | 10 ⁸ | 0 | |
| B19 | 10 ⁸ +GP | 0 | |
| B20 | 10 ⁸ +GP | 0 | |
| B21 | 10 ⁸ +GP | 0 | |
| B00 | ohne AB ohne Keime | 0 | |

Tab. 23: Rohdaten Immunhistologie Balb/c: Antikörper gegen CD74

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | Subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|---------------------|-------|-------|-----|--------|-----|-------------|
| B13 | 10 ⁵ | 0 | + | 0 | + | 0 | |
| B14 | 10 ⁵ | 0 | + | 0 | + | 0 | |
| B15 | 10 ⁵ | 0 | + | 0 | + | 0 | |
| B7 | 10 ⁶ | 0 | + | 0 | + | 0 | |
| B8 | 10 ⁶ | 0 | ++ | 0 | + | (+) | |
| B9 | 10 ⁶ | 0 | + | 0 | + | 0 | |
| B1 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| B2 | 10 ⁷ | 0 | + | 0 | + | 0 | |
| B3 | 10 ⁷ | 0 | + | 0 | + | (+) | |
| B10 | 10 ⁷ | 0 | + | 0 | + | 0 | |
| B11 | 10 ⁷ | 0 | + | 0 | + | (+) | |
| B12 | 10 ⁷ | 0 | ++ | 0 | + | (+) | |
| B4 | 10 ⁸ | 0 | ++ | 0 | + | 0 | |
| B5 | 10 ⁸ | 0 | ++ | 0 | ++ | (+) | |
| B6 | 10 ⁸ | 0 | +++ | 0 | +++ | (+) | |
| B16 | 10 ⁸ | 0 | ++ | 0 | ++ | (+) | |
| B17 | 10 ⁸ | 0 | ++ | 0 | +++ | + | |
| B18 | 10 ⁸ | 0 | +++ | 0 | +++ | (+) | |
| B19 | 10 ⁸ +GP | 0 | (+) | 0 | (+) | 0 | |
| B20 | 10 ⁸ +GP | 0 | (+) | 0 | + | (+) | |
| B21 | 10 ⁸ +GP | 0 | + | 0 | + | (+) | |
| B00 | ohne AB/Keime | 0 | + | 0 | + | (+) | |

Tab. 24: Rohdaten Immunhistologie Balb/c: Antikörper gegen CD80

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | Subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|-----------------|-------|-------|-----|--------|-----|-------------|
| B13 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| B14 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| B15 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| B7 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | (+) | |
| B8 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | + | |
| B9 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | + | |
| B1 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | (+) | + | |
| B2 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | (+) | |
| B3 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | + | |
| B10 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | (+) | + | 1) |
| B11 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | + | |
| B12 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | + | |
| B4 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | 0 | + | |
| B5 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | 0 | (+) | |
| B6 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | 0 | + | |
| B16 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | 0 | + | |

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | Subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|---------------------|-------|-------|-----|--------|----|-------------|
| B17 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | + | + | |
| B18 | 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | 0 | + | |
| B19 | 10 ⁸ +GP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| B20 | 10 ⁸ +GP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| B21 | 10 ⁸ +GP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| B00 | ohne AB/Keime | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

1) massiv, dort wo auch PMN's liegen, nur eine Stelle

Tab. 25: Rohdaten Immunhistologie Balb/c: Antikörper gegen CD86

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | Subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|---------------------|-------|-------|-----|--------|-----|-------------|
| B13 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| B14 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| B15 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| B7 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| B8 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| B9 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| B1 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| B2 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| B3 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| B10 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| B11 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| B12 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| B4 | 10 ⁸ | + | + | + | +++ | 0 | |
| B5 | 10 ⁸ | + | + | + | ++ | 0 | |
| B6 | 10 ⁸ | + | + | + | +++ | 0 | |
| B16 | 10 ⁸ | + | + | 0 | +++ | + | |
| B17 | 10 ⁸ | 0 | (+) | + | +++ | + | |
| B18 | 10 ⁸ | 0 | (+) | (+) | ++ | + | |
| B19 | 10 ⁸ +GP | 0 | (+) | (+) | ++ | + | |
| B20 | 10 ⁸ +GP | 0 | (+) | 0 | ++ | (+) | |
| B21 | 10 ⁸ +GP | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| B00 | ohne AB/Keime | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | |

Tab. 26: Rohdaten Immunhistologie Balb/c: Antikörper gegen CD103

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | Subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|---------------------|-------|-------|-----|--------|----|-------------|
| B13 | 10 ⁵ | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| B14 | 10 ⁵ | 0 | 0 | (+) | (+) | 0 | |
| B15 | 10 ⁵ | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | |
| B7 | 10 ⁶ | 0 | 0 | + | (+) | 0 | |
| B8 | 10 ⁶ | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | |
| B9 | 10 ⁶ | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| B1 | 10 ⁷ | 0 | 0 | (+) | (+) | 0 | |
| B2 | 10 ⁷ | 0 | 0 | (+) | (+) | 0 | |
| B3 | 10 ⁷ | 0 | + | (+) | 0 | 0 | |
| B10 | 10 ⁷ | 0 | + | + | + | 0 | 1) Photo |
| B11 | 10 ⁷ | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| B12 | 10 ⁷ | 0 | + | + | + | 0 | |
| B4 | 10 ⁸ | 0 | ++ | +++ | + | 0 | 1) |
| B5 | 10 ⁸ | 0 | 0 | ++ | + | 0 | |
| B6 | 10 ⁸ | 0 | + | +++ | + | 0 | 2) |
| B16 | 10 ⁸ | 0 | + | +++ | + | 0 | |
| B17 | 10 ⁸ | 0 | + | +++ | ++ | 0 | Photo |
| B18 | 10 ⁸ | 0 | + | +++ | + | 0 | |
| B19 | 10 ⁸ +GP | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | |
| B20 | 10 ⁸ +GP | 0 | (+) | (+) | (+) | 0 | |
| B21 | 10 ⁸ +GP | 0 | (+) | (+) | (+) | 0 | |
| B00 | ohne AB/Keime | 0 | 0 | + | (+) | 0 | |

1) DZ auch massiv im Stratum spinosum

2) viele Nester, dazwischen nichts markiert

Tab. 27: Rohdaten Immunhistologie SCID: Antikörper gegen CD4

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|-----------------|-------|-------|-----|--------|----|-------------|
| S17 | 10 ⁴ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S18 | 10 ⁴ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S22 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S23 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S24 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S4 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S5 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S6 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S7 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | (+) | 0 | 0 | (+) | 0 | |

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|---------------------|-------|-------|-----|--------|----|-------------|
| S8 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S9 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S1 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S2 | 10 ⁷ | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| | | 0 | + | (+) | (+) | 0 | |
| S3 | 10 ⁷ | 0 | 0 | (+) | (+) | 0 | |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S10 | 10 ⁷ | + | + | + | + | 0 | |
| S11 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S12 | 10 ⁷ | 0 | 0 | + | 0 | 0 | |
| S13 | ohne Keime | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S14 | ohne Keime | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S15 | ohne Keime | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S16 | keine AB/Keime | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S19 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | |
| S20 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S21 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S25 | nur GP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

Legende: Sp. o.: Stratum spinosum obere Schicht Sp.-u.: Stratum spinosum untere Schicht
BZS: Basalzellschicht subep.: subepithelial Lp: Lamina propria End: Endothel

Tab. 28: Rohdaten Immunhistologie SCID: Antikörper gegen CD13

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|-----------------|-------|-------|-----|--------|-----|-------------|
| S17 | 10 ⁴ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| | | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S18 | 10 ⁴ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| | | 0 | 0 | 0 | + | + | |
| S22 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | + | + | |
| S23 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | |
| | | 0 | 0 | 0 | ++ | + | 1) |
| S24 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | |
| S4 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | ++ | + | |
| S5 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | + | + | |
| S6 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | |
| S7 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | +++ | +++ | |
| | | 0 | 0 | 0 | +++ | ++ | |
| S8 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | +++ | +++ | |
| | | 0 | 0 | 0 | ++ | ++ | |
| S9 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | ++ | +++ | |
| S1 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | + | |
| | | 0 | 0 | 0 | +++ | + | 1) |

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|---------------------|-------|-------|-----|--------|-----|-------------|
| S2 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | + | |
| | | 0 | 0 | 0 | ++ | ++ | |
| S3 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | + | |
| | | 0 | 0 | 0 | ++ | + | |
| S10 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | |
| | | 0 | 0 | 0 | ++ | (+) | |
| S11 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | + | |
| S12 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | + | 1) |
| | | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | |
| S13 | ohne Keime | 0 | 0 | 0 | + | + | |
| | | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| S14 | ohne Keime | 0 | 0 | 0 | + | + | |
| | | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| S15 | ohne Keime | 0 | 0 | 0 | + | + | |
| S16 | ohne AB/ Keime | 0 | 0 | 0 | + | + | |
| S19 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | 0 | + | (+) | |
| S20 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | 0 | (+) | + | |
| S21 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | 0 | + | + | |
| S25 | nur GP | 0 | 0 | 0 | (+) | + | 2) |

1) in einigen Bereichen viel, anderen sehr wenig

2) um Ausführungsgänge herum

Tab. 29: Rohdaten Immunhistologie SCID: Antikörper gegen CD54

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | subep. | Lp | End | Anmerkungen |
|--------|-----------------|-------|-------|-----|--------|----|-----|-------------|
| S17 | 10 ⁴ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1) |
| S18 | 10 ⁴ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| S22 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | +++ | 2) |
| S23 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | +++ | |
| S24 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | +++ | |
| S4 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | +++ | |
| S5 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | ++ | |
| S6 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | +++ | |
| S7 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | +++ | 3) |
| S8 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | +++ | |
| S9 | 10 ⁶ | 0 | (+) | 0 | +++ | 0 | +++ | |
| S1 | 10 ⁷ | | | | | 0 | | 4) |
| S2 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | +++ | |
| S3 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | ++ | 5) |
| | | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | +++ | 3) |
| S10 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | +++ | |
| S11 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | +++ | |
| S12 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | 0 | +++ | 6) |

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | subep. | Lp | End | Anmerkungen |
|--------|---------------------|-------|-------|-----|--------|----|-----|-------------|
| S13 | ohne Keime | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| S14 | ohne Keime | 0 | 0 | 0 | + | 0 | ++ | 6) 7) |
| S15 | ohne Keime | 0 | 0 | 0 | + | 0 | ++ | 6) |
| S16 | ohne AB/Keime | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | ++ | |
| S19 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| S20 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| S21 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |
| S25 | nur GP | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | |

Legende zu Tab. 29: 1) nur feine Linie subepithelial an Markierung 2) an einigen Stellen „Ballungszentren“ 3) Ballungszentren, dort wo monozytäres Band vorhanden 4) Schnitt nekrotisch 5) auch Zungenunterseite 6) nur Zungenrücken 7) Artefakt?

Tab. 30: Rohdaten Immunhistologie SCID: Antikörper gegen CD62E

| TierNr | Inok.-Menge | Reaktion Endothel | Anmerkungen |
|--------|---------------------|-------------------|-------------|
| S17 | 10 ⁴ | 0 | |
| S18 | 10 ⁴ | 0 | |
| S22 | 10 ⁵ | 0 | |
| S23 | 10 ⁵ | 0 | |
| S24 | 10 ⁵ | 0 | |
| S4 | 10 ⁵ | 0 | |
| S5 | 10 ⁵ | 0 | |
| S6 | 10 ⁵ | 0 | |
| S7 | 10 ⁶ | 0 | |
| S8 | 10 ⁶ | 0 | |
| S9 | 10 ⁶ | 0 | |
| S1 | 10 ⁷ | 0 | |
| S2 | 10 ⁷ | 0 | |
| S3 | 10 ⁷ | 0 | |
| S10 | 10 ⁷ | 0 | |
| S11 | 10 ⁷ | 0 | |
| S12 | 10 ⁷ | 0 | |
| S13 | ohne Keime | 0 | |
| S14 | ohne Keime | 0 | |
| S15 | ohne Keime | 0 | |
| S16 | ohne AB/Keime | 0 | |
| S19 | 10 ⁵ +GP | 0 | |
| S20 | 10 ⁵ +GP | 0 | |
| S21 | 10 ⁵ +GP | 0 | |
| S25 | nur GP | 0 | |

Tab. 31: Rohdaten Immunhistologie SCID: Antikörper gegen CD74

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|---------------------|-------|-------|-----|--------|-----|-------------|
| S17 | 10 ⁴ | 0 | ++ | 0 | +++ | + | |
| S18 | 10 ⁴ | 0 | ++ | 0 | +++ | + | |
| S22 | 10 ⁵ | 0 | + | 0 | + | (+) | 1) |
| S23 | 10 ⁵ | 0 | + | 0 | + | (+) | |
| S24 | 10 ⁵ | 0 | + | 0 | +++ | (+) | |
| S4 | 10 ⁵ | 0 | + | 0 | + | 0 | |
| S5 | 10 ⁵ | 0 | + | 0 | + | (+) | |
| S6 | 10 ⁵ | 0 | ++ | 0 | + | 0 | |
| S7 | 10 ⁶ | 0 | + | 0 | +++ | (+) | |
| S8 | 10 ⁶ | 0 | + | 0 | ++ | (+) | |
| S9 | 10 ⁶ | + | ++ | 0 | +++ | 0 | Photo LHZ |
| S1 | 10 ⁷ | 0 | + | (+) | ++ | 0 | |
| S2 | 10 ⁷ | 0 | + | (+) | +++ | + | |
| S3 | 10 ⁷ | 0 | + | 0 | ++ | (+) | |
| S10 | 10 ⁷ | 0 | + | 0 | +++ | 0 | |
| S11 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | (+) | |
| S12 | 10 ⁷ | 0 | ++ | 0 | +++ | (+) | |
| S13 | ohne Keime | 0 | + | + | + | (+) | |
| S14 | ohne Keime | 0 | (+) | + | + | (+) | |
| S15 | ohne Keime | 0 | + | (+) | + | (+) | |
| S16 | ohne AB/Keime | 0 | ++ | 0 | + | + | 2) |
| S19 | 10 ⁵ +GP | 0 | + | 0 | + | + | 2) |
| S20 | 10 ⁵ +GP | 0 | + | 0 | + | + | |
| S21 | 10 ⁵ +GP | 0 | + | 0 | + | + | |
| S25 | nur GP | 0 | + | (+) | + | (+) | |

1) in Nestern 2) gleichmäßige Verteilung, keine Nester

Tab. 32: Rohdaten Immunhistologie SCID: Antikörper gegen CD80

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|-----------------|-------|-------|-----|--------|----|-------------|
| S17 | 10 ⁴ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S18 | 10 ⁴ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S22 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S23 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S24 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S4 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S5 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S6 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S7 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S8 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S9 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S1 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|---------------------|-------|-------|-----|--------|-----|-------------|
| S2 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S3 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 1) Photo |
| S10 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S11 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S12 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S13 | ohne Keime | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S14 | ohne Keime | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S15 | ohne Keime | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S16 | ohne AB/Keime | 0 | 0 | 0 | 0 | (+) | |
| S19 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S20 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S21 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S25 | nur GP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

1) nur an einer Stelle, dort liegen auch Entzündungszellen

Tab. 33: Rohdaten Immunhistologie SCID: Antikörper gegen CD86

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|-----------------|-------|-------|-----|--------|-----|-------------|
| S17 | 10 ⁴ | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| | | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S18 | 10 ⁴ | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| | | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S22 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | + | + | |
| S23 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| | | + | + | 0 | ++ | + | |
| S24 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| | | 0 | 0 | 0 | (+) | (+) | |
| S4 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | + | (+) | |
| S5 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | |
| S6 | 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| S7 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| S8 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S9 | 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | + | + | |
| | | 0 | 0 | 0 | + | + | Photo DZ |
| S1 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S2 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | (+) | 0 | |
| S3 | 10 ⁷ | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| | | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| S10 | 10 ⁷ | + | + | 0 | ++ | ++ | |
| | | 0 | 0 | 0 | + | 0 | |
| S11 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | (+) | (+) | |
| S12 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | +++ | ++ | |
| | | + | + | 0 | ++ | 0 | |

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|---------------------|-------|-------|-----|--------|-----|-------------|
| S13 | ohne Keime | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 | (+) | |
| S14 | ohne Keime | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 | (+) | |
| S15 | ohne Keime | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S16 | ohne AB/Keime | 0 | 0 | 0 | (+) | (+) | |
| S19 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | 0 | + | (+) | |
| S20 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | 0 | + | + | |
| S21 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | 0 | + | ++ | |
| S25 | nur GP | 0 | 0 | 0 | (+) | + | |

Tab. 34: Rohdaten Immunhistologie SCID: Antikörper gegen CD103

| TierNr | Inok.-Menge | Sp.-o | Sp.-u | BZS | subep. | Lp | Anmerkungen |
|--------|---------------------|-------|-------|-----|--------|-----|-------------|
| S17 | 10 ⁴ | 0 | 0 | + | + | 0 | 1) |
| S18 | 10 ⁴ | 0 | 0 | + | + | 0 | 1) |
| S22 | 10 ⁵ | 0 | 0 | ++ | + | 0 | |
| S23 | 10 ⁵ | 0 | (+) | ++ | + | 0 | 1) |
| S24 | 10 ⁵ | 0 | (+) | ++ | ++ | 0 | Photo DZ |
| S4 | 10 ⁵ | 0 | (+) | + | + | 0 | |
| S5 | 10 ⁵ | 0 | 0 | ++ | ++ | 0 | |
| S6 | 10 ⁵ | 0 | (+) | ++ | + | 0 | |
| S7 | 10 ⁶ | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| S8 | 10 ⁶ | 0 | 0 | (+) | 0 | 0 | |
| | | 0 | 0 | + | 0 | 0 | |
| S9 | 10 ⁶ | 0 | (+) | + | + | 0 | |
| S1 | 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| S2 | 10 ⁷ | 0 | 0 | + | + | 0 | 2) |
| S3 | 10 ⁷ | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| S10 | 10 ⁷ | 0 | 0 | + | + | (+) | |
| S11 | 10 ⁷ | 0 | (+) | + | + | 0 | |
| S12 | 10 ⁷ | 0 | 0 | ++ | + | 0 | |
| S13 | ohne Keime | 0 | 0 | + | 0 | 0 | |
| S14 | ohne Keime | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| S15 | ohne Keime | 0 | 0 | + | (+) | 0 | |
| S16 | ohne AB/Keime | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| S19 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | (+) | (+) | 0 | |
| S20 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | (+) | (+) | 0 | |
| S21 | 10 ⁵ +GP | 0 | 0 | + | + | 0 | |
| S25 | nur GP | 0 | 0 | + | + | 0 | |

1) in Nestern

2) viel Hintergrundmarkierung

Danksagung

Herrn Univ.Prof. Dr. P.A. Reichart, Direktor der Abteilung für Oralchirurgie und zahnärztliche Röntgenologie, gilt mein besonderer Dank und Respekt. Er lehrte mich die Grundlagen des wissenschaftliche Arbeitens und die Freude an der Oralmedizin. Prof. Reichart hat Wissen vermittelt, das nicht nur aus Detailkenntnissen besteht, sondern das Gesamte dahinter erkennen lassen. Für seine Unterstützung und Förderung, aber auch seine offene Kritik möchte ich ihm danken.

Herrn Priv. Doz. Dr. Andreas Kage (Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité) danke ich für die enge Kooperation und die ausgezeichnete Zusammenarbeit. Seine Kompetenz auf pathobiochemischem und immunologischem Gebiet sowie seine Anregungen haben diese Arbeit wesentlich beeinflusst.

Herrn Univ.Prof. Dr. U. Gross (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum B. Franklin) möchte ich für seine Hilfe bei der gemeinsamen Durchsicht und Beurteilung der histopathologischen Präparate danken.

Frau Ursula Schulz (MTA, Abteilung für Oralchirurgie und zahnärztliche Röntgenologie) danke ich sehr für die Durchführung der labortechnischen Arbeit, ihre Hilfestellungen und die Unterstützung bei den Tierversuchen.

Mein Dank gilt auch Dr. Annika Susanne Meyer, die als Projektmitarbeiterin die *in vitro* Untersuchungen durchgeführt hat. Herrn Priv. Doz. Dr. Markus Ruhnke (Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Charité) danke ich herzlich für die Zusammenarbeit bei mehreren Studienprojekten.

Bei den Ärzten und dem Direktor der Abteilung für Infektiologie, II. Medizinische Klinik, Charité Herrn Univ.Prof. Dr. N. Suttrop sowie seinem Vorgänger Herrn Prof. Dr. H. D. Pohle bedanke ich mich ganz besonders für die langjährige intensive fachliche Zusammenarbeit bei der Patientenbetreuung und wissenschaftlichen Untersuchungen.