

**Allergeninduzierte Transmitterfreisetzung in der menschlichen  
Plazenta  
als mögliche Rolle für die  
Fetale Programmierung von Allergien in utero**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Frauke Varosi  
geboren am 09.02.1981 in Leinefelde

### **Gutachter**

1. Herr Prof. Dr. med. Udo Markert, Jena
2. Frau PD Dr. rer. nat. et med. Uta- Christina Hipler, Jena
3. Frau PD Dr. rer. nat. Alexandra Gellhaus, Essen

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.03.2015**

## INHALTSVERZEICHNIS

	<b>Seite</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	IV
<b>Zusammenfassung</b>	1
<b>1. Einleitung</b>	2
1.1. Immunsystem	3
1.1.1. Überblick	3
1.1.2. Aufbau des Immunsystems	5
1.1.2.1. Angeborene oder unspezifische Immunabwehr	5
1.1.2.2. Adaptive oder spezifische Immunabwehr	8
1.2. Allergie	12
1.2.1. Definition	12
1.2.2. Pathogenese allergischer Reaktionen	12
1.2.3. Einteilung allergischer Reaktionen	14
1.2.4. Ursachen des Anstieges allergischer Erkrankungen	14
1.3. Allergie und Schwangerschaft	15
1.3.1. Aufbau und Funktion der reifen Plazenta	16
1.3.2. Immunsystem in Schwangerschaft	18
1.4. „Fetal Programming“	21
1.4.1. Überblick	21
1.4.2. „Fetal programming“ von Allergien	22
<b>2. Ziel</b>	24
<b>3. Methoden</b>	25
3.1. Auswahl der Probanden	25
3.1.1. Rast-Test (Radio-Allergo-Sorbent-Test) zur Allergietestung	25
3.2. Auswahl der Allergene	27
3.3. Auswahl des Plazentagewebes	27
3.4. Einseitige offene Perfusion	27

	Inhalt	
3.4.1.	Hintergrund	27
3.4.2.	Durchführung	28
3.5.	Auswahl der zu ermittelnden Zytokine	30
3.5.1.	Fluoreszenzphotometrische Histaminbestimmung mit o-Phtaldialdehyd	30
3.5.1.1.	Durchführung	31
3.5.2.	Quantitative Zytokinbestimmung mittels Cytometric Bead Array	31
3.5.2.1.	Durchführung	32
3.6.	Dünnschnitttechnik und Zytokinfärbung der perfundierten Plazentagewebeproben mit TNF- $\alpha$ -Antikörpern	32
3.6.1.	Eponeinbettung der Plazentagewebeproben	33
3.7.	Ergebnisdarstellung und Fehlerberechnung	33
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
4.1.	Vorbetrachtung	35
4.2.	Entwicklung des Modells der einseitig offenen Perfusion	35
4.3.	Analyse der Histaminfreisetzung im Plazentagewebe	36
4.3.1.	Adaptation der ursprünglichen Histaminextraktionsvorlage an das Perfusionsmedium	36
4.3.2.	Histaminfreisetzung nach Zugabe des Mastzelldegranulators Compound 48/80	38
4.3.3.	Histaminfreisetzung nach Zugabe von Allergenen	38
4.4.	Bestimmung der Zytokinfreisetzung	39
4.4.1.	Zytokinanalyse nach Zugabe von Apfelallergen	39
4.4.1.1.	Analyse von TNF- $\alpha$ nach Zugabe von Apfelallergen	39
4.4.1.2.	Analyse von IL-6 und IL-10 nach Zugabe von Apfelallergen	41
4.4.1.3.	Analyse von IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 nach Zugabe von Apfelallergen	42
4.4.2.	Zytokinfreisetzung nach Zugabe von Hausstaubmilbenallergen	42
4.4.3.	Interleukinfreisetzung nach Milcheiweißallergenzugabe bei Milcheiweißallergikerin	45
4.4.4.	Interleukinfreisetzung nach Zugabe von Compound 48/80	46
4.5.	Zytokinfärbung (TNF- $\alpha$ ) in Plazentagewebeproben	47
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>48</b>

<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	56
	<b>Anhang</b>	VI
	Abbildungsverzeichnis	VI
	Tabellenverzeichnis	VII
	Technische Ausrüstung	VIII
	Verwendete Geräte	VIII
	Verwendete Materialien und Chemikalien	VIII
	Lebenslauf	X
	Publikationsliste	XI
	Ergänzung zur statistischen Auswertung	XIV
	Ehrenwörtliche Erklärung	XVI
	Danksagung	XVII

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS****Naturwissenschaftliche Abkürzungen**

Aa	-	Arteriae
CAP	-	Cellulose Acetat Propionat
CBA	-	Cytometric Bead Array
CD	-	Cluster of Differentiation
Co <sub>2</sub>	-	Kohlendioxid
g	-	gramm (physikalische Maßeinheit für Masse)
	-	Fallbeschleunigung (Vielfaches der Erdbeschleunigung)
HCG	-	Humanes Choriongonadotropin
HCl	-	Salzsäure
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	-	Phosphorsäure
HLA	-	Human Leucocyte Antigen
HO-1	-	Hämoxygenase-1
HPL	-	Humanes Plazentalaktogen
HPLC	-	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ("High-performance liquid chromatography")
HWZ	-	Halbwertszeit
IFN- $\gamma$	-	Interferon gamma
Ig	-	Immunglobulin
IL	-	Interleukin
KIR	-	"killing inhibitory receptors"
$\lambda$ Ex	-	Anregungswelle
LIF	-	Leucemia inhibitory factor
LPS	-	Lipopolysaccharide
MALT	-	mucous membrane associated lymphoid tissue
MeOH	-	Methanol
mg	-	Milligramm
MHC	-	Major Histocompatibility Complexes
$\mu$ g	-	Mikrogramm
NaOH	-	Natriumhydroxid

NK-Zellen	-	Natürliche Killer Zellen
nl	-	Nanoliter
nm	-	Nanometer
O <sub>2</sub>	-	Sauerstoff
OPT	-	o-Phtaldialdehyd
PBS-Puffer	-	Phosphatgepufferte Salzlösung
pg	-	Pikogramm
pH	-	potentia Hydrogenii
RAST-Test	-	Radio-Allergo-Sorbent-Test)
SSW	-	Schwangerschaftswoche
TGF-β	-	Transforming growth factor beta
TH1	-	T-Helferzellen Typ 1
TH2	-	T-Helferzellen Typ 2
TLR	-	Toll-like receptor
TNF-α	-	Tumornekrosefaktor alpha
U/min	-	Umdrehungen pro Minute
V	-	Vena

### **Allgemeine Abkürzungen**

Abb.	-	Abbildung
°C	-	Grad Celsius
ca	-	Circa
d.h.	-	das heißt
et al	-	et alii
h	-	Stunde
min.	-	Minute
o.g.	-	oben genannt
pos.	-	positiv
sec.	-	Sekunde
sog.	-	sogenannt
u.	-	und
z.B.	-	zum Beispiel

**Zusammenfassung: Allergeninduzierte Transmitterfreisetzung in der menschlichen Plazenta als mögliche Rolle für die Fetale Programmierung von Allergien in utero**

**Fragestellung:** Verschiedene Studien zeigten, dass für die spätere Entwicklung von Allergien das Milieu in utero für den Feten eine entscheidende Rolle spielt, da hier der Fötus bereits Allergenen ausgesetzt ist. Eine deziduale Zytokin- und Histaminproduktion der Mastzellen kann die Entstehung von Immunantworten beeinflussen. Genaue intraplazentare Mechanismen und verantwortliche Mediatoren sind noch unbekannt.

**Methoden und Materialien:** In dieser Dissertation untersuchten wir Unterschiede in der Zytokinproduktion und Transmitterfreisetzung der Plazenta nach Kontakt mit einem relevanten Allergen bei allergischen und nichtallergischen Müttern. Hierzu entwickelten wir ein Plazentaperfusionsmodell, um simultan zwei getrennte Kotyledone einer Plazenta mit allergenenthaltendem Medium (Apfel, Hausstaub oder Milcheiweiß) einerseits und allergenfreiem Medium andererseits zu perfundieren. Zur Evaluierung dieses Modells fügten wir den Mastzell-Degranulator Compound 48/80 zum System hinzu, um zu prüfen, ob eine selektive Histaminfreisetzung aus plazentarem Gewebe von gesunden Müttern möglich ist. Die Kotyledone allergischer und gesunder Mütter wurden für 5 Stunden perfundiert, wobei alle 10 Minuten Proben aus dem Perfusionsmedium entnommen wurden. In den gesammelten Proben analysierten wir die Freisetzung von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  mittels eines Cytometric Bead Array. Die Histaminkonzentration wurde nach Extraktion und Bindung an o-Phthalaldehyd per Spektrofluorometrie bestimmt.

**Ergebnisse:** Nach Zugabe von Apfelallergen und in geringerem Maße auch nach Hausstaubmilbenallergen in das Perfusionsmedium konnte eine zeitabhängige Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-6 und in geringerem Maße auch IL-10 wesentlich früher und zu höheren Konzentrationen bei allergischen Müttern gemessen werden. In der Expression von anderen Interleukinen und Histamin ergaben sich keine signifikanten Änderungen.

**Schlussfolgerung:** Allergenkontakt ruft in der Plazenta eine veränderte Zytokinsekretion hervor und könnte somit Einfluss auf die Reifung des kindlichen Immunsystems nehmen oder auch zu Störungen im immunologischen Gleichgewicht zwischen Mutter und Fetus führen.

## **1. Einleitung**

Epidemiologisch betrachtet ist in den Industrieländern in den letzten Jahrzehnten ein deutlicher Anstieg der Prävalenz allergischer Erkrankungen, wie atopisches Ekzem und Asthma bronchiale zu verzeichnen [Aberg et al 1995, Asher et al 2006, Burr et al 1989]. Circa 30 Millionen Menschen leiden heutzutage alleine in Deutschland an einer Allergie, das entspricht fast einem Drittel der gesamten Bevölkerung.

Die Ursachen der Häufigkeit allergischer Erkrankungen sind nicht genau bekannt, es werden jedoch zahlreiche Hypothesen vertreten, wie eine vermutete genetische Prädisposition oder die Förderung allergischer Erkrankungen in frühen Kindheitsjahren durch übertriebene Hygienemaßnahmen [Riedler et al 2001; Croner et al 1996; Grüber et al 2002, Jenmalm et al 1998].

Ein weiterer neuer Aspekt der Untersuchung bezieht sich auf die Rolle des „Fetal Programming“, das heißt der Prägung lebenslanger Krankheitsveranlagungen, in diesem Falle von Allergien, bereits im Mutterleib durch ein gestörtes intrauterines Milieu [Barker 1998]. Diese Vermutung stützt sich auf die Tatsache, dass das Risiko für Kinder an einer Allergie zu erkranken bei allergischen Müttern höher ist als bei allergischen Vätern [Herz et al 2003]. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass maternaler, also pränataler Kontakt auf Bauernhöfen zu Heu und Stallungen das Risiko für allergische Atemwegserkrankungen und Ekzemen reduzieren kann [Douwes et al. 2008], währenddessen dies in späteren postnatalen Lebensphasen wesentlich schwächere Effekte erzielte [Ege et al 2006, Lampi et al 2011].

Ebenfalls als bewiesen gilt der Übertritt von Allergenen in den fetalen Kreislauf je nach Molekulargewicht und Schwangerschaftsalter [Loibichler et al 2002; Edelbauer et al. 2003].

Wie genau allerdings diese Mechanismen beim Feten zu einer Beeinflussung der Allergieentwicklung zusammenwirken ist weitgehend unbekannt und Gegenstand anhaltender Forschungen.

In den folgenden Unterkapiteln werden zum besseren Verständnis der Inhalte dieser Dissertation die Grundzüge des Immunsystems und der allergischen Erkrankungen erläutert und im weiteren Verlauf der Einfluss des Abwehrsystems im Schwangerschaftsverlauf sowie die Thesen des „Fetal Programming“ besprochen.

## 1.1. Immunsystem

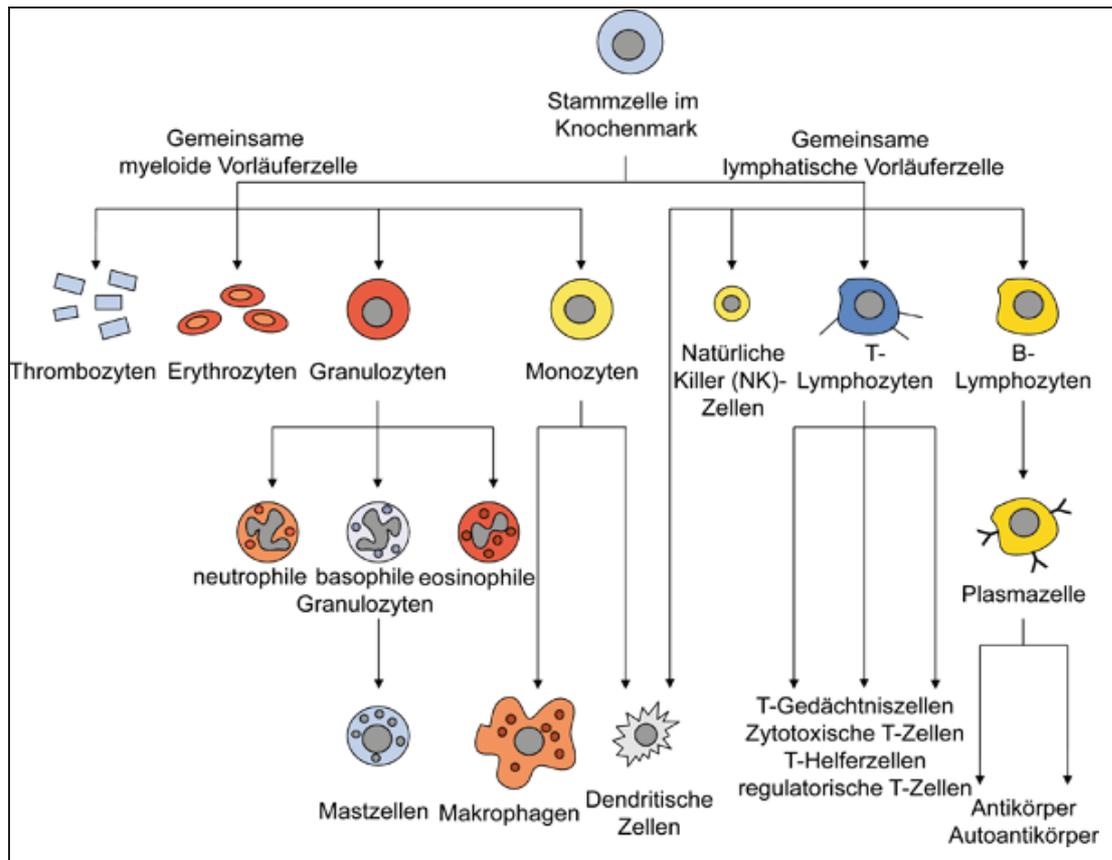
### 1.1.1. Überblick

Das Immunsystem des Menschen hat zur Aufgabe, potentiell pathogene Keime mit spezifischen Mitteln abzuwehren, indem es diese Mikroorganismen erkennt, attackiert und schließlich eliminiert. Es existieren viele Mikroorganismen, die für den Menschen krankheitsverursachende Bedeutung haben können, wie Bakterien, Viren und Parasiten, aber auch mit körpereigenen Verbindungen assoziierte Strukturen.

Um diese Keime erkennen zu können, muss die Immunabwehr in der Lage sein, zwischen körperfremden und daher möglicherweise schädlichen und körpereigenen Strukturen zu unterscheiden [Janeway et al 2005].

Einteilen lässt sich das Immunsystem in zwei sich einander ergänzende Bereiche, die angeborene oder unspezifische und die adaptative, spezifische Immunabwehr. Deren Mechanismen laufen sowohl auf zellulärer als auch auf nicht zellulärer, humoraler Ebene ab und werden durch eine Vielzahl unterschiedlicher und sehr spezialisierter Abwehrzellen vertreten. Die einzelnen Zelltypen lokalisieren sich nicht nur in einem Organ, sondern befinden sich je nach Entwicklungsstand in den primären Immunorganen (Knochenmark, Thymus) und den sekundären Organen, wie den Lymphknoten, der Milz und den Geweben des MALT (mucous membrane associated lymphoid tissue) [Bühling et al 2000].

Dabei entstehen alle Zellen des Abwehrsystems aus einer hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark, aus der über verschiedene weitere Entwicklungsstufen Zellen der myeloiden und der lymphoiden Entwicklungsreihe hervorgehen (s. Abb. 1.1.) Zum besseren Verständnis der folgenden Kapitel seien in der Tabelle 1.1. die Hauptaufgaben der wichtigsten Immunzellen kurz erläutert (adaptiert nach Piper 2007).



**Abb. 1.1.:** Überblick über die Entwicklung der Abwehrcellen

**Tabelle 1.1.:** Zellen des Immunsystems und ihre Aufgaben (adaptiert nach Piper 2007 und Janeway 2005)

Immunzelle	Funktion
Neutrophile Granulozyten	Abwehr bakterieller Infektionen durch Chemotaxis (gerichtete Bewegung zum Entzündungsherd), Phagozytose, Sekretion von Zytokinen
Basophile Granulozyten (im Gewebe Mastzellen)	Allergische Reaktion (IgE vermittelt) Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Heparin, Leukotrienen)
Eosinophile Granulozyten	Verstärkung allergischer Reaktionen, Abwehr gegen Parasiten
Monozyten (im Gewebe Makrophagen)	Phagozytose, Entzündungsreaktion, Antigenpräsentation, Elimination von Tumorzellen, Beseitigung nekrotischen Materials
Dendritische Zellen	Antigenpräsentation, Aktivierung von T- u. B-Lymphozyten, immunologische Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen
B- Lymphozyten (nach Aktivierung Plasmazellen genannt)	Antikörperproduktion
T-Lymphozyten (T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, T-Suppressorzellen, Memory-T-Zellen)	Erkennen präsentierter Antigene, Aktivierung von B-Zellen und Makrophagen, Regulation der Immunabwehr, Immuntoleranz, Gedächtnisfunktion
Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen)	Abwehr virusinfizierter Zellen und Tumorzellen

### 1.1.2. Aufbau des Immunsystems

#### 1.1.2.1. Angeborene oder unspezifische Immunabwehr

Die angeborene Immunität stellt eine Protektion des Körpers vor Krankheitserregern durch ein jederzeit einsatzbereites und schnellstens wirksames, angeborenes Abwehrsystem dar. Somit ist es diesen Abwehrmechanismen möglich, pathogene Keime abzuwehren, ohne vorher in direkten Kontakt mit den Erregern getreten zu sein. Die unspezifische Immunabwehr ist dabei ebenfalls in der Lage, körperfremde von körpereigenen Zellen zu unterscheiden, indem die sich auf jeder kernhaltigen Körperzelle befindenden Oberflächenmoleküle vom Typ HLA I (Human Leucocyte Antigen I, hierbei meist als HLA-A, -B oder -C) als körpereigen erkannt und nicht abgewehrt werden. Die Gene auf denen die HLA-Proteine kodiert sind, werden als MHC (Major Histocompatibility Complexes) bezeichnet. Die HLA Klasse II Antigene sind nicht auf allen Körperzelloberflächen vorhanden, sondern werden insbesondere von Zellen der Immunabwehr, wie Monozyten/ Makrophagen und B-Lymphozyten exprimiert.

Zu den wichtigsten Komponenten der angeborenen Abwehr zählen [adaptiert nach Piper 2007]

- ***anatomische und physikalische Barrieren:***

Hierzu zählen zum Beispiel die mechanische Schranke für Mikroorganismen durch Epithelien oder die Produktion von Abwehrstoffen an der Oberfläche von Haut und Schleimhäuten, wie Fettsäuren der Haut, Lysozyme im Speichel oder Pepsin im Darm. Weiterhin sorgt die normale Bakterienbesiedlung mit apathogenen Keimen vieler epithelialer Oberflächen im Körper dafür, dass schädigende Keime verdrängt und in ihrem Wachstum eingeschränkt werden.

- ***Phagozytose***

Überwinden Mikroorganismen die physikalischen Barrieren von Zellen, können sie durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten abgefangen werden. Diese Immunzellen erkennen die pathogenen Keime anhand bestimmter unveränderlicher Oberflächenstrukturen (sog. pathogen-associate molecular

patterns) und können diese dann phagozytieren (intrazellulär aufnehmen) und damit eliminieren [Janeway et al 2005].

- **Komplementsystem**

Zu den humoralen d.h. nicht zellulär ablaufenden Abwehrreaktionen zählt ein System aus zahlreichen Plasmaproteinen (C1-C9, Faktoren B, D und MBL), die eine proteolytische Kaskade in Gang setzen, deren Endprodukt, ein membranangreifender Proteinkomplex, Bakterien durch die Perforation ihrer Membran abtötet.

- **Entzündungsreaktionen durch Zytokinfreisetzung aus Makrophagen**

Makrophagen können durch pathogene Keime nicht nur zur Phagozytose, sondern auch zur Sekretion von bestimmten entzündungsfördernden Botenstoffen (den Zytokinen) stimuliert werden. Ein Beispiel hierfür findet sich in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, die Lipopolysaccharide (LPS) enthält. Diese werden im Blutplasma an Proteine gebunden (LPS-bindende Proteine), die wiederum an den Makrophagenrezeptor CD14 anheften können. Durch Assoziation mit einem transmembranösen Rezeptor, dem TLR-4 (Toll-like receptor 4) wird die Sekretion von Zytokinen wie unter anderem dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  induziert. Diese führen zu entzündlichen Prozessen, wie der Aktivierung des Gefäßendothels mit erhöhter Gefäßpermeabilität und damit zum vermehrten Zustrom von Plasmaproteinen und weiteren Abwehrzellen zum Entzündungsherd. Dadurch kommt es zur Entstehung von Fieber, bei systemischer Freisetzung zum septischen Schock [Rivest et al. 2000].

- **Infektabwehr durch natürliche Killerzellen**

Virusinfizierte Körperzellen werden durch natürliche Killerzellen über aktivierende Rezeptoren eliminiert. Inhibierende Rezeptoren, die an den Oberflächenmolekülen der HLA-I Proteine angreifen, supprimieren diesen Killereffekt.

Einen Überblick über die wichtigsten von Immunzellen freigesetzten Zytokine und deren Aufgaben liefert Tabelle 1.2.

**Tabelle 1.2.** Überblick über die häufigsten wichtigsten Zytokine und deren Wirkungen [adaptiert nach Janeway 2005 und Bühling 2000]

Name	Herkunft	Aufgaben
Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ )	Makrophagen, Monozyten, TH1-Zellen, einige TH2-Zellen, Eosinophile Granulozyten, Epithelzellen	Aktivierung von B- und T-Zellen, Granulozyten und Makrophagen mit Stimulierung der Phagozytose, Auslöser lokaler Entzündungsreaktionen, Erzeugung von Fieber und Akute-Phase-Proteinen, Aktivierung von Gefäßendothelien, Chemotaxis von Entzündungszellen, Sekretion anderer Zytokine
Interferon gamma (IFN- $\gamma$ )	TH1-Zellen, NK-Zellen	Aktivierung von Makrophagen, Vermehrung von B-Zellen, Suppression von TH2- Zellen, Virusabwehr
Interleukin 1 (IL-1)	Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Epithelzellen, B-Lymphozyten	Aktivierung von T- u. B-Lymphozyten, Makrophagen/ Monozyten, NK-Zellen, Aktivierung von Gefäßendothel Lokale Gewebsdestruktion, Förderung des Zuganges für Gefäßzellen, Schocksymptomatik, Induktion von Fieber
Interleukin 2 (IL-2)	TH1- Zellen NK-Zellen	Induktion der Differenzierung von B-Zellen, Stimulierung der Proliferation von T-Zellen
Interleukin 4 (IL-4)	TH2-Zellen Mastzellen	Wachstum u. Differenzierung der B-Zellen, Ig-Switch nach IgG und IgE, Hemmen der Makrophagenaktivierung
Interleukin 5 (IL-5)	TH2-Zellen, Mastzellen	Wachstum u. Differenzierung der B-Zellen, Regulation der Ig-Freisetzung, Co-Stimulation für T-Zellen, Ausreifung/ Aktivierung von eosinophilen Granulozyten
Interleukin 6 (IL-6)	Makrophagen, TH2-Zellen	Induktion von Fieber und Akute-Phase-Proteinen in der Leber, Proliferation u. Differenzierung von B-Zellen, Co-Stimulation für T-Zellen
Interleukin 8 (IL-8)	Makrophagen	Chemotaxis von Neutrophilen, Basophilen und T-Zellen zum Entzündungsherd
Interleukin 10 (IL-10)	Makrophagen, Monozyten TH2-Zellen, B-Zellen	Co-Stimulation für B-Zellen, Hemmung der Zytokinfreisetzung in Makrophagen/ Monozyten (z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-12), Hemmung der TH1-Zellen, Förderung der TH2-Differenzierung
Interleukin 12 (IL-12)	Makrophagen	Aktivierung von NK-Zellen, Stimulation der Differenzierung von TH-Zellen
Interleukin 13 (IL-13)	TH1-u. TH2-Zellen, Mastzellen	Ig-Isotypumschaltung nach IgE, Hemmung der Zytokinproduktion von Makrophagen und Monozyten

### 1.1.2.2. Adaptive oder spezifische Immunabwehr

Zellen der adaptiven Immunabwehr sind in der Lage, Krankheitserreger über spezifische Oberflächenstrukturen (Antigene) zu erkennen und diese gezielt über zelluläre Abwehrmechanismen und die Produktion von Antikörpern zu bekämpfen. Hierbei wird ein antigenspezifischer Zellklon gebildet, der durch Gedächtniszellen langfristig aktiviert werden kann. Dabei werden auch Teilsysteme der unspezifischen Abwehr in Gang gesetzt, wobei sich beide Formen der Immunantworten ergänzen.

Die entscheidenden Komponenten hierbei sind antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen, Makrophagen sowie B-Lymphozyten auf der einen und die immunologischen Effektorzellen, vor allem die T-Lymphozyten (CD4 pos. T-Helferzellen und die zytotoxischen CD8 pos. T-Zellen) und die antikörperbildenden B-Lymphozyten auf der anderen Seite.

Bei Erstinfektion erkennen die antikörperpräsentierenden Zellen anhand spezifischer Oberflächenmerkmale die Krankheitserreger, phagozytieren diese und präsentieren die dabei anfallenden Peptide im Verbund mit neu gebildeten HLA-Molekülen an ihrer Zelloberfläche den spezifischen T-Lymphozyten [Janeway 2005, Bühling 2000].

#### ***Aktivierung und Funktion der T-Lymphozyten***

T-Zellen wandern nach ihrer Ausreifung und immunologischen Prägung aus der Thymusrinde über die Blutbahn in die sekundären Immunorgane wie Milz und Lymphknoten.

Verschiedene Subtypen von T-Zellen lassen sich klassifizieren anhand spezifischer Oberflächenstrukturen, den sog. Cluster of differentiation (CD), wobei mehrerer CD-Marker auf den jeweiligen Zellen vorkommen. Allen T-Zellen gemein ist die CD3-Region, die sich neben dem T-Zellrezeptor befindet.

Die wichtigsten Subtypen von T-Zellen sind dabei folgende [nach Bühling 2000]:

#### ***T-Helferzellen (TH)***

- charakteristischer Marker CD4
- Erkennen von durch HLA-II- Molekülen präsentierten Antigene,
- Induktion der Sekretion von Zytokinen
- Zwei Subtypen:

- **TH1:** Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen über Sekretion von v. a. IL-2, IFN- $\gamma$  (zelluläre Immunantwort)
- **TH2:** Anregung der Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten v. a. über IL-4 und IL-5 (humorale Immunantwort)

### **Zytotoxische T-Zellen:**

- charakteristischer Marker CD8,
- Erkennen und Elimination von HLA- Typ-II tragenden Zellen über Bindung und Freisetzung von zytotoxischen Substanzen z.B. von infizierten Zellen, allogenen Zellen (Transplantatabstoßung), Tumorzellen

### **T-Suppressorzellen (Regulatorische T-Zellen)**

- unterschiedliche Marker
- Supprimieren z.B. die Makrophagenwirkung

### **Memory-T-Zellen**

- inaktive antigenspezifische T-Lymphozyten
- erneute Aktivierung über Zweitkontakt der T-Zelle mit Antigen

Die Aktivierung der T-Zellen vollzieht sich über die Bindung des präsentierten Komplexes aus Antigen und HLA-Molekül an den T-Zell-Rezeptor. Durch Vermittlung der CD3-Region wird die T-Zelle zu ihren unterschiedlichen Funktionen animiert. Die vormals naiven T-Zellen (ohne vorherigen Antigenkontakt) gehen in armierte T-Zellen (durch HLA-Antigen-Komplexe gebundene und aktivierte T-Zellen) und zur klonalen Expansion über. Die aktivierten CD4+ T-Zellen differenzieren zu den bereits erwähnten TH1- und TH2- Zellen, die zelluläre (TH1) und humorale (TH2) Abwehrreaktionen stimulieren. Armierte TH1-Zellen setzen IFN- $\gamma$  frei, das seinerseits zur Aktivierung von Makrophagen und zur Phagozytose der Erreger führt, die über IL-1 stimulierend auf die TH-1 Zellen zurückwirken.

Die armierten und an die Oberfläche ihrer Zielzellen gebundenen CD8+ T-Zellen entleeren zytotoxische Granula, die über Proteasenfreesetzung in das Zellinnere zum Zelltod führen. Eine weitere Möglichkeit der Abtötung von Zielzellen stellt die Apoptose (programmierter Zelltod) dar, dabei wird über einen spezifischen Liganden

auf aktivierten CD8<sup>+</sup>-Zellen, den Fas-Ligand, über Bindung an den Fas-Rezeptor der Zielzelle eine Fragmentierung der DNA ausgelöst. Führen diese Mechanismen zum Absterben der Zielzelle lösen sich die zytotoxischen T-Zellen und können weitere infizierte Zellen eliminieren.

T-Zellen wie auch Makrophagen zählen zu den Mechanismen der zellulären Immunantwort, wo hingegen B-Lymphozyten für die humorale Immunabwehr mit Bildung von Antikörpern (Immunglobulinen) verantwortlich sind.

### ***Aktivierung und Funktion der B-Lymphozyten***

B-Zellen werden im Knochenmark gebildet und zirkulieren im Blut und den peripheren lymphatischen Geweben, in denen ihre immunologische Prägung, d.h. der erste Antigenkontakt reifer, aber noch naiver B-Lymphozyten stattfindet. Hierbei binden B-Zellen die löslichen ungebundenen Antigene über ihren spezifischen B-Zell-Rezeptor. Um zur Antikörperbildung aktiviert zu werden, wird zumeist eine Unterstützung durch T-Helferzellen (TH2) benötigt und nach Internalisierung des Antigens wird dieses zusammen mit einem HLA-II-Molekül als Komplex auf der B-Zellenoberfläche präsentiert. Hiernach kann eine entsprechende T-Helferzelle binden und durch Zytokinsekretion (v.a. IL-4, IL-5, IL-10 und TGF- $\beta$ ) zur Aktivierung der B-Zellen führen, resultierend in der Vermehrung (klonale Expansion) und Differenzierung in eine Antikörper produzierende B-Zelle (Plasmazelle). IL-4 stimuliert dabei die Bildung von IgE und IgG, IL-5 von IgA und die Produktion von eosinophilen Granulozyten. IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  führen zu einem antagonistischen Effekt auf IL-2 und INF- $\gamma$  und verhindern die Aktivierung von Makrophagen durch TH1-Zellen.

Im Genom jeder B-Zelle ist die Spezifität des von ihr gebildeten Antikörpers determiniert, es existiert entsprechend der Vielfalt der Antikörper ebenfalls eine Vielfalt der B-Lymphozyten. Die B-Zell-Aktivierung kann auch ohne Beteiligung von T-Zellen ablaufen, indem sich B-Zellrezeptoren nach Bindung an ein Antigen kreuzvernetzen. Auslöser hierfür sind vor allem sich wiederholende Polysaccharide an der Oberfläche von Bakterien. Die aktivierte B-Zelle bildet dann vor allen Antikörper der IgM- Klasse [Bühling 2000, Piper 2007, Janeway 2005].

Eine Übersicht über die verschiedenen Formen der Antikörper sowie ein kurze Aufzählung ihrer hauptsächlichlichen Aufgaben liefert die Tabelle 1.3.

**Tabelle 1.3.:** Überblick über Immunglobuline und ihre Eigenschaften [adaptiert nach Bühling 2000]

Antikörper	Funktion
Immunglobulin G (IgG)	Bildung drei Wochen nach Erstinfektion, Infektionsschutz, Neutralisation von Toxinen, Viren, Bakterien, plazentagängig, mütterliche Immunität bis zum ca 6.Lebensmonat, Hauptanteil der Immunglobuline (ca 70-80%), HWZ 14-21 Tage, Vorkommen in Körperflüssigkeiten
Immunglobulin A (IgA)	Lokale Protektion gegenüber Mikroorganismen in Schleimhäuten/ Sekreten (Erstantwort) durch Bakteriolyse, Virusneutralisation, muttermilchgängig, nicht plazentagängig, Anteil ca 10-20% aller Immunglobuline, HWZ 5 Tage
Immunglobulin M (IgM)	Aktivierung des Komplementsystems über Antigenbindung, Vorkommen in allen Körperflüssigkeiten, Erstantwort, nicht plazentagängig, Anteil ca 5-10% aller Immunglobuline, HWZ 5 Tage
Immunglobulin D (IgD)	Interaktion mit T- u. B-Lymphozyten, Vorkommen in Serum, B-Lymphozyten, HWZ 2-3 Tage, Anteil 0,2-1% aller Immunglobuline, nicht plazentagängig
Immunglobulin E (IgE)	Bindung an Oberfläche der Mastzellen und Eosinophilen, HWZ 1-3 Tage, nicht plazentagängig, Anteil < 1% aller Immunglobuline, Abwehr v. a. von Wurminfektionen und Parasiten, Mastzelldegeneration bei allergischen Reaktionen

Bei der primären Immunantwort werden sowohl von B- als auch von T-Zellen langlebige Zellklone gebildet, die im Falle eines erneuten Kontaktes mit dem gleichen Krankheitserreger eine schnellere und stärkere Immunantwort bewirken können.

Einen weiteren Subtyp der T-Lymphozyten stellen die NK-Zellen dar, die sich auch aus den lymphatischen Stammzellen im Knochenmark entwickeln und reif im Blutkreislauf zirkulieren. Sie reagieren nicht auf die Präsentation von Antigenen über HLA-Moleküle, sondern binden unspezifisch Partikel, die über Immunglobuline als fremd markiert wurden und töten diese Zellen ab. Bei körpereigenen Zellen allerdings wird dieser „killing“-Mechanismus unterdrückt, da hierbei die auf der Oberfläche von NK-Zellen befindlichen „killing inhibitory receptors“ (KIR) nach Kontakt mit HLA-I Molekülen aktiviert werden. Somit werden diese HLA-I exprimierenden körpereigenen Zellen nicht angegriffen [Markert 2002].

## 1.2. Allergie

### 1.2.1. Definition

Unter Allergie oder auch Hypersensibilität versteht man die abnorme immunologische Reaktion eines Organismus auf ein bestimmtes, normalerweise harmloses Antigen (Allergen), die sich in typischen oft entzündlichen Prozessen äußert.

Allergene sind chemisch gesehen meist einfache oder zusammengesetzte Proteine, aber auch Polysaccharide und niedermolekulare Substanzen, die sog. Haptene, wenn sie an Proteinmoleküle gebunden auftreten. Unterscheiden lassen sich Allergene dabei nach ihrem Eintrittsmodus in Inhalationsallergene (z.B. Tierhaarepithelien, Blüten- u. Gräserpollen, Hausstaubmilben, Schimmelpilze, Waschmittel), Ingestionsallergene (Fleisch, Fisch, Früchte, Pharmaka), Kontaktallergene (Metalle, Kunststoffe, Chemikalien) und Invasionsallergene (Insektengifte, Impfstoffe).

[Piper 2007]

### 1.2.2. Pathogenese allergischer Reaktionen

Jede allergische Reaktion wird durch eine Sensibilisierung, d.h. eine spezifische Immunisierung gegen das auslösende Allergen verursacht. Dieser Prozess findet beim ersten Kontakt mit dem induzierenden Agens statt und verläuft klinisch symptomfrei, führt aber zur Bildung von Antikörpern oder immunologischen Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt oder wenn das Antigen sich nach erfolgter Sensibilisierung noch im Körper befindet, eine allergische Reaktion auslösen.

Zumeist werden Antikörper der Klasse IgE gebildet, unter dem Einfluss von aktivierten TH2-Zellen, die unter anderem IL-4 und IL-13 sezernieren. Diese beiden Zytokine induzieren die IgE-Antikörperproduktion der B-Lymphozyten. IgE-Antikörper kommen hauptsächlich im Gewebe vor und sind dort vorwiegend an Mastzellen gebunden.

Bei nicht allergischen Individuen hingegen resultiert ein Allergenkontakt überwiegend mit einer TH1- Zell-vermittelten Immunreaktion, wodurch mehrheitlich Antikörper der IgG-Klasse gebildet werden, die wesentlich seltener allergische Symptome hervorrufen. Weiterhin führen TH1-Zellen auch eher zu einer Sekretion von IFN- $\gamma$ ,

welches sich wiederum supprimierend auf die durch TH2-Zellen getriggerte IgE-Synthese auswirkt.

Bei Allergikern resultiert auch die vermehrte IL-10 Sekretion durch TH2-Zellen, die die Sekretion von IFN- $\gamma$  von TH1-Zellen hemmt, zu einer gesteigerten IgE-Produktion. Weiterhin sezernieren TH2-Zellen unter anderem auch IL-5, welches zur vermehrten Ausreifung und Aktivierung der eosinophilen Granulozyten führt, die zusammen mit den Mastzellen zu den Effektorzellen allergischer Reaktionen zählen.

Eine allergische Sofortreaktion wird durch Bindung des Allergens an das IgE auf Mastzellen und Eosinophilen ausgelöst, dass dann zur Quervernetzung dieser Antikörper auf der Zelloberfläche und damit zur Degranulation der Effektorzellen führt. Die dabei sezernierten Entzündungsmediatoren sind unter anderem Histamin, Leukotriene, Adenosin, Tryptase, Heparin sowie chemotaktische Faktoren für Eosinophile, Neutrophile und Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13).

Dadurch werden zum Teil innerhalb von Sekunden Effekte ausgelöst, die zur Vasodilatation, Permeabilitätssteigerung der kleinen Blutgefäße mit Flüssigkeitsaustritt ins Gewebe, Kontraktion der glatten Muskulatur, Stimulierung der Schleim- u. Drüsensekretion und Reizung von Nervenendigungen führen können. Klinisch äußert sich dies vor allem in typischen allergischen Symptomen, wie Schleimhautschwellung, Blutdruckabfall bis hin zum Kreislaufschock, Urtikaria, Angioödem, Niesen und Augentränen.

Wird eine allergische Reaktion nicht nur durch ein, sondern mehrere unterschiedliche Allergene ausgelöst, spricht man von einer Kreuzallergie.

Die Kreuzvernetzung von IgE-Antikörpern auf Mastzellen führt auch zu einer Expression eines bestimmten Liganden (CD40) auf ihrer Oberfläche, der wiederum zusätzlich zum IL-4 sich verstärkend auf die IgE-Produktion durch B-Lymphozyten auswirkt.

Mehrere Stunden nach einem Allergenkontakt, zumeist nach vier bis zwölf Stunden oder noch später können nach abgeklungener Sofortreaktion, Spät-Typ-Reaktionen oder chronische Symptome auftreten. Ursächlich hierfür sind aktivierte allergenspezifische T-Zellen und durch Chemotaxis eingewanderte Eosinophile, Basophile und Monozyten, die zu entzündlichen Reaktionen am Ort des Allergenkontaktes führen [Janeway 2005, Piper 2007].

### 1.2.3. Einteilung allergischer Reaktionen

Klinisch lassen sich die einzelnen Allergieformen nach Coombs und Gell, dargestellt in Tabelle 1.4. unterscheiden

**Tabelle 1.4.:** Einteilung allergischer Reaktionen nach Coombs und Gell 1963 [adaptiert nach Bühling 2000]

	<b>Typ I Anaphylak- tischer Typ</b>	<b>Typ II Zytotoxischer Typ</b>	<b>Typ III Immunkomplextyp</b>	<b>Typ IV Zellvermittelter Typ</b>
<b>Ursache</b>	z.B. Pollen, Medikamente, Eiweiß	Zellständige Antigene	Artfremdes Serum, Pilzsporen, Tierproteine	Kontaktallergene, Transplantations- gewebe
<b>Mechanis- mus</b>	IgE- vermittelte Degranulation von Mastzellen	AK-Reaktion gegen Antigene auf Zellmembranen	Komplementaktivierung durch Ag-AK-Komplexe in z.B. Gefäßwänden	Reaktion des Antigens mit T- Lymphozyten
<b>Beispiel- krankungen</b>	Allergische Rhinitis, Asthma, Anaphylaxie	Transfusions- reaktionen	Serumkrankheit	Kontaktallergie, Transplantat- abstoßung
<b>Reaktions- zeit</b>	Sofortreaktion (sec – min)	6-12h	6-12h	Spätreaktion 12-72h

### 1.2.4. Ursachen des Anstieges allergischer Erkrankungen

Es existieren vielfältige Ansätze zur Erklärung der vermehrten Inzidenz allergischer Erkrankungen in den Industrienationen, die wichtigsten werden im Folgenden kurz erläutert.

#### ***Genetische Disposition***

Als gesichert gilt, dass Kinder allergischer Eltern in höherem Maße dem Risiko ausgeliefert sind, im Laufe ihres Lebens an einer Allergie zu erkranken, als Kinder aus Familien, die nicht allergisch vorbelastet sind. So ist das Risiko eines Kindes eine Allergie zu entwickeln von 10% auf 20-30% erhöht, wenn ein Elternteil betroffen ist, sind beide Eltern erkrankt, erhöht sich das Risiko auf ca 60% [Bjöksten et al 1994]. Angenommen wird auch, dass Allergien auf genetischem Polymorphismus beruhen, das bedeutet, mehrere Gene sind zur Ausbildung einer erblichen Allergieneigung (Atopie) verantwortlich. Wissenschaftlich belegt wurde dies bereits bei allergischen Formen der Rhinitis und des Asthma bronchiale [Van Eerdewegh et al 2002].

### ***Hygienehypothese***

Übertriebene Hygienemaßnahmen und vermindertes Auftreten von bakteriellen und viralen Infektionen führen zu einer Unterforderung des Abwehrsystems vor allem in den ersten Lebensjahren, resultierend in einem verschobenen Gleichgewicht von TH1- und TH2-Zellen zugunsten der letzteren [Herz et al 2000; Bufer 2001, Riedler et al 2001]. Weiterhin ursächlich könnte das vermehrte Auftreten von Allergenen durch die erhöhte Umweltbelastung, höhere Nahrungsvielfalt und vermehrte künstliche Nahrungsmittelzusätze sein, welches in einer vermehrten TH2-Bildung resultiert [Popescu et al. 1996]. Ebenfalls soll die Anzahl der Geschwister Einfluss haben, wobei die Tatsache dass ältere Geschwister vorhanden sind, allergievermindernd wirken soll [Strachan 1989].

### ***Umweltverschmutzung***

Manche Allergene, wie das Birkenpollenallergen Betv1 können sich an Feinstaubpartikel heften und so als Allergenträger möglicherweise eine zusätzliche pathogene Wirkung entfalten [Ring et al, 2001, Takano et al 2007].

### ***Rückgang parasitärer Erkrankungen***

In westlichen Ländern vollzieht sich ein starker Rückgang parasitärer Erkrankungen, dies könnte zu einer gesteigerten Konzentration der IgE-Wirkung auf die sonst harmlosen Allergene führen. Diese These ist letztlich nicht ganz unumstritten [Zutavern et al 2005]. Als bewiesen jedoch gilt dass in westlichen Ländern Allergien deutlich gehäuft vorkommen [Holt et al 1995] und hierbei auch in Stadtbevölkerungsschichten stärker auftreten als in Bevölkerungsteilen aus ländlichen Gebieten [Nilsson et al 1999, Bjöksten 1994].

### **1.3. Allergie und Schwangerschaft**

Zahlreiche Studien belegen, dass für die spätere Entwicklung von Allergien bereits das Milieu in utero eine entscheidende Rolle spielt [Douwes et al 2008, Ege et al 2006, Lampi et al 2011]. Als wahrscheinlich gilt auch, dass bereits im Mutterleib ein erster Kontakt mit Allergenen stattfindet. So konnte unter anderem das Allergen der Hausstaubmilbe im Fruchtwasser und im fetalen Anteil der Plazenta nachgewiesen

werden, was einen Transfer via Plazenta und Fruchtwasser nahe legt [Holloway et al 2000]. Ebenso zeigten Studien mit dualer Perfusion der Plazenta einen Übertritt von Allergenen wie  $\beta$ -Laktoglobulin, Ovalbumin und Birkenpollen von der maternalen auf die fetale Seite der Plazenta [Edelbauer et al 2004/ 2003, Loibichler et al 2002].

Wie genau sich allerdings Umwelteinflüsse während der Schwangerschaft auf die Entwicklung des Immunsystems beim Feten auswirken, ist Gegenstand anhaltender Forschungen.

Um die hierzu notwendigen Grundlagen besser zu verstehen, erfolgt zunächst eine kurze Erläuterung des Aufbaus und der Funktionsweise der Plazenta.

### 1.3.1. Aufbau und Funktion der reifen Plazenta

Die reife Plazenta ist in ihrer Form rund oder oval mit einem Durchmesser von ca 20cm und einem Gewicht von ungefähr 500g. Unterteilen kann man sie in einen fetalen Anteil, das Chorion frondosum und einen maternalen, die Decidua basalis, welche aus der Funktionalis des Endometriums entsteht und wiederum in eine innere feste Schicht (Decidua compacta) und eine äußere aufgelocktere Schicht (Decidua spongiosa) unterschieden werden kann [Dudenhausen 2008].

Das Chorion frondosum wird gebildet von der Chorionplatte und den von ihr ausgehenden Zotten. Während der Entwicklung der fetomaternalen Grenzfläche wachsen fetale Zellen, die Trophoblasten, in die mütterliche Uterusschleimhaut ein, arrodieren mütterliche Blutgefäße und bilden in der reifen Plazenta die Auskleidung eines mütterlichen Blutsees. Diesen zwischen mütterlichem und kindlichem Anteil befindlichem Raum bezeichnet man als den intervillösen Raum, der mit ca 200ml maternalem Blut gefüllt ist und in den die fetalen Zotten hineinragen [Norwitz et al 2001]. Eine schematische Darstellung des Aufbaus der reifen Plazenta zeigt Abb. 1.2.



Die Produktion von Zytokinen vollzieht sich in vielen Zellen der reifen Plazenta, wie Zellen glatter Muskulatur, Fibroblasten, sowie T-Zellen, den Hauptanteil jedoch liefern Endothelzellen, Trophoblastzellen und Makrophagen bzw. Mastzellen.

**Tabelle 1.5.** Stoffaustausch in der Plazenta [adaptiert nach Dudenhausen 2008]

<b>Mechanismus</b>	<b>Stoff</b>
<b><i>Passiver Durchtritt</i></b>	
Einfache Diffusion	O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , Kreatinin, Medikamente
Erleichterte Diffusion	Glukose
Diapedese (durch Defekte oder Poren der synzytiokapillaren Membran)	Medikamente
<b><i>Aktiver Transport</i></b>	
Enzymatischer Prozeß	Anorganische Ionen, Aminosäuren, Fettsäuren, Vitamine, Hormone
Pinozytose	Proteine, Lipide, Immunglobuline

### 1.3.2. Immunsystem in Schwangerschaft

Die Schwangerschaft ist ein natürliches erfolgreiches Modell immunologischer Toleranz [Scholz 2010]. Der Fet bzw. Embryo, dessen genetisches Material zu 50% vom Vater stammt und damit semiallogen ist, unterliegt einer Akzeptanz durch das maternale Abwehrsystem, indem immunologische Mechanismen als komplexes Zusammenspiel zahlreicher ineinander abgestimmter Vorgänge zentral an der Invasion des Trophoblasten in die mütterliche Dezidua beteiligt sind. Dieses immunologische Milieu im Bereich der fetomaternalen Grenzzone trägt entscheidend zum Schwangerschaftserfolg bei. Die fetomaternale Grenzfläche lässt sich dabei noch genauer unterteilen in drei Hauptkomponenten: eine Blut-Trophoblast-Grenze im Bereich der Zotten, die von fetalen Zellen, den Synzytiotrophoblasten ausgekleidet sind und vom mütterlichen Blut umspült werden, eine Dezidua-Trophoblast-Grenze, an der Trophoblastzellen in die maternale Dezidua migrieren und eine weitere Blut-Trophoblast-Grenze im Bereich der Dezidua, in der Trophoblastzellen auf maternale Blutgefäße zugewandert sind und dort das Endothel ersetzen [Markert 2002].

Die wichtigsten Mechanismen der materno-fetalen Immuntoleranz seien im Folgenden kurz erläutert:

Der Embryo weist auf seinen Trophoblastzellen spezielle Oberflächenstrukturen auf, Proteine vom Typ HLA-I, die wie im Kapitel Immunsystem bereits erwähnt, sich auch auf jeder anderen kernhaltigen Körperzelle befinden. Mit diesen HLA Proteinen unterscheidet er sich von denjenigen der Mutter, da er die Hälfte seiner Gene vom väterlichen Vorkern erhalten hat. Diese HLA-I Proteine präsentieren Antigenkomplexe und werden durch zytotoxische CD8+ T-Zellen erkannt, bei Fremd-Antigenen wird die exprimierende Zelle zerstört. Trophoblastzellen werden vom mütterlichen Immunsystem unter anderen deswegen nicht eliminiert, da sie HLA-I Moleküle vom Typ HLA-G und HLA-E exprimieren, die von den zytotoxischen T-Zellen nicht als fremd betrachtet werden [Fournel et al 2000, Le Bouteiller et al 2000]. NK-Zellen wiederum werden von der Abtötung der Trophoblastzelle abgehalten, indem ihre auf der Oberfläche vorhandenen „killing-inhibitory-receptors“ (KIR) nach Kontakt mit HLA-I-Molekülen vom Typ HLA-G und HLA-E aktiviert werden [Rajagopalan et al 1999, King et al 2000]. NK-Zellen sind dabei auch die häufigsten in der Dezidua der Plazenta vorkommenden zytotoxischen Zelltypen des ersten Trimenons. Eine weitere ihrer Eigenschaften ist die Tatsache, dass sie für eine erfolgreiche Schwangerschaft in regelrechter Funktion und Häufigkeit vorhanden sein müssen, wie in Studien mit Mäusen festgestellt wurde [Croy et al 1997]. NK-Zellen können allerdings auch ihre über KIR abgeschaltete Zytotoxizität über weitere Stimulationen wiedererlangen. Dies geschieht beispielsweise durch IL-2, welches durch CD4+ T-Helferzellen (nach fremder Antigenpräsentation über HLA-II-Moleküle auf z.B. Makrophagen) freigesetzt wird.

Daher scheint ein ganz spezielles Interleukinprofil in der Plazenta sehr entscheidend zu sein: eine relative Verminderung der proinflammatorischen Zytokine vom Typ TH1 (insbesondere IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) und ein relativer Anstieg der anti-inflammatorischen Interleukine (u.a. IL-4, IL-6, IL-10 oder IL-11) [Wegman et al.1993]. In den letzten Schwangerschaftswochen kehrt sich dieses Verhältnis allerdings wieder zugunsten der TH1- Zytokine um und die TH2-Zytokine nehmen ab. Diese ermöglichen Mutter und Kind einen Schutz vor Infektionen peripartal und stimulieren den Geburtsvorgang selbst [Dealtry et al. 2000, Denison 1998].

Andere Studien stellten fest, dass beim Feten die entscheidenden Komponenten der adaptativen Immunabwehr mit ihrer spezifischen Reaktion auf Antigene bereits Anfang des zweiten Trimenons entwickelt werden. Dies führt zur einer besseren Antwort auf Umweltstoffe postpartal [Herz et al. 2003] und zur Differenzierung

zwischen pathogenen Keimen und apathogenen Antigenen wie Allergenen [Clark et al. 1999].

Weitere bedeutsame Mechanismen zur Regulation der materno-fetalen Immuntoleranz sind die hohe Progesteronkonzentration, die während der Schwangerschaft zur vermehrten Freisetzung immunregulatorischer Substanzen über Progesteronrezeptoren stimulierte Lymphozyten führt [Szekeres-Bartho et al 1989]. Eine ähnlich immunmodulierende Wirkung wird vermutet bei Östrogenen, HCG, Vitamin D, Prostaglandinen und Kortisol [Markert 2002]. Desweiteren exprimieren Trophoblastzellen und auch Spermien auf ihrer Oberfläche Moleküle, die den Abbau von Komplementfaktoren beschleunigen oder in Konkurrenz dazu treten können [Holmes et al 1990].

Eine weitere wichtige Schaltstelle stellt die 2-3-Indolamin-Dioxygenase dar, die als Enzym für den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan verantwortlich ist und in nahezu allen Geweben und Zellen, so auch in der Plazenta, gebildet wird. Sinkende Konzentrationen von Tryptophan bewirken eine Hemmung der T-Lymphozyten auf lokaler Ebene und somit eine Regulation der mütterlichen Abwehrzellen. Experimente mit schwangeren Mäusen bewiesen, dass eine Blockade der 2-3-Indolamin-Dioxygenase zu einer T-Zell vermittelten Abstoßung des Feten führt [Munn et al 1998, Bauer 2011, Billington 2003]. Andere Untersuchungen jedoch zeigten auch bei fehlender 2-3-Indolamin-Dioxygenase einen unauffälligen Verlauf der Schwangerschaft [Leber 2011, Baban 2004].

Eine ebenfalls bedeutende Funktion zur Aufrechterhaltung der materno-fetalen Toleranz leisten die regulatorischen T-Zellen. Deren Anzahl steigt zum Beispiel während intakten Frühgraviditäten an, im Vergleich zu Schwangerschaften mit abortivem Ausgang [Leber 2011, Sasaki 2004]. Untersuchungen konnten zeigen dass regulatorische T-Zellen durch Erhöhung von immunregulatorischen Faktoren wie LIF, TGF- $\beta$  und HO-1 zur Toleranz des Feten beitragen [Zenclussen et al 2006, Leber 2011].

Darüber hinaus existiert noch eine große Fülle weiterer bedeutsamer Mechanismen, die ihren Beitrag zur immunologischen Akzeptanz des Feten leisten, auf die hier aber nicht weiter eingegangen wird.

## 1.4. „Fetal Programming“

### 1.4.1. Überblick

„Programming“ beschreibt medizinisch gesehen einen Prozess, der zu einem lebenslang anhaltenden geänderten Effekt führt und durch eine äußere Einwirkung innerhalb einer bestimmten kritischen Entwicklungszeit verursacht wurde.

Den Begriff der fetalen Programmierung von Erkrankungen, die sich im Laufe des Lebens ausprägen, prägte Prof. David Barker von der Universität in Southampton in den 1980er Jahren. Anhand retrospektiver Untersuchungen beobachtete er, dass die Grundlage von Krankheiten wie Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus und koronarer Herzkrankheit durch veränderte intrauterine Einflüsse auf den Feten entstehen. In einer Studie an über 13000 Männern in Hertfordshire und Sheffield wurde untersucht, dass Männer mit geringem Geburtsgewicht ein bis um die Hälfte erhöhtes Risiko besitzen, an einer koronaren Herzerkrankung zu versterben, im Vergleich zu Männern mit normalem Geburtsgewicht. Andere Risikofaktoren und sozioökonomische Unterschiede wurden dabei ebenfalls berücksichtigt [Barker et al.1993]. Barker konnte auch aufführen, dass gewisse „lifestyle“- Faktoren wie Nikotinabusus, mangelnde körperliche Betätigung, Alkoholkonsum oder Arbeitslosenrate nur zu einem kleinen Einfluss in der Abhängigkeit von Geburtsgewicht und späteren Erkrankungen führen. Des Weiteren korreliert zum Beispiel der Blutdruck eines Kindes mit dem Blutdruck der Mutter, nicht aber mit dem des Vaters [Barker 1998].

Mittlerweile existieren zahlreiche Studien zu diesem Thema, insbesondere auch basierend auf Tierversuchen, die einen ähnlichen Zusammenhang feststellen konnten. Allerdings ist ebenso bekannt, dass zum Beispiel Diabetes mellitus Typ II auch auf genetische Dispositionen zurückzuführen ist, die ihrerseits wiederum zu einer diabetogenen Belastung im späteren Leben führen können [Medici 1999, Lehtovirta 2000].

Die molekularen Mechanismen die den o. g. Phänomenen zugrunde liegen sind noch weitgehend unbekannt. Überlegungen basieren aber auf folgenden Erkenntnissen: eine intrauterine Mangelernährung des Kindes, die zu einem niedrigen Geburtsgewicht führen kann, resultiert in der Fetalzeit in Kreislaufumstellungen und in einem verminderten Glucosestoffwechsel. Deswegen wird auf andere Stoffwechselwege zur Energiegewinnung wie den Laktatabbau ausgewichen. Diese

intrauterin begonnen Sparmechanismen können bis ins spätere Lebensalter persistieren und zu einer erhöhten Insulinresistenz führen [Barker 1998]. Ebenso kann ein mangelndes Nährstoffangebot zur Verminderung anaboler und zur Steigerung kataboler Hormone und Glukokorticoide führen, die wiederum später permanent veränderte Stoffwechselsituationen bedingen [Phillips et al 1998]. Weiterhin ist bekannt, dass Männer mit niedrigem Geburtsgewicht einen erhöhten Ruhepuls aufweisen, ursächlich hierfür könnte ein erhöhter Sympathikotonus während der intrauterinen Entwicklung sein, der zur einer veränderten Kreislaufsituation mit Hypertonus und Gefäßveränderungen geführt hat [Philipps & Barker 1997, Beinder 2002].

### 1.4.2. Fetal programming von Allergien

Hinsichtlich der Ausprägung allergischer Erkrankungen ließ sich in Studien beobachten, dass Kinder allergischer Mütter einem höheren Risiko ausgesetzt sind, an einer Allergie zu erkranken als Kinder allergischer Väter [Herz et al 2001]. Ebenso ist bekannt, dass eine erhöhte IgE-Konzentration im Nabelschnurblut mit einem gestiegenen Allergierisiko konform geht [Edenharter et al 1998], wobei diese erhöhten IgE-Konzentrationen vor allem bei Kindern allergischer Mütter gefunden wurden und nicht bzw. kaum bei Kindern mit väterlichem oder keinem Allergierisiko [Johnson et al 1996, Magnusson et al 1988]. Weiterhin ließ sich ein verändertes Zytokinmuster bei allergischen Schwangeren im Vergleich zu diesbezüglich gesunden Schwangeren im Nabelschnurblut und maternalem Serum feststellen [Bullens et al 2004, Macaubas et al 2003, Herz et al 2001] und es ließ sich in Plazenten allergischer Mütter ein verändertes TH1-/ TH2 -Gleichgewicht zugunsten TH2 feststellen [Liu et al 2003, Ruiz et al 1992].

Ein TH2- betontes Milieu in utero könnte somit als Ursache für eine Allergieentwicklung bei Nachkommen allergischer Mütter gewertet werden, da hierdurch das fetale Immunsystem hinsichtlich TH2-Verschiebung und vermehrter IgE- Expression beeinflusst wird.

Außerdem gibt es Hinweise, die einen Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und einem erhöhtes Risiko für asthmatische Erkrankungen nahe legen, die genauen Mechanismen sind allerdings noch nicht ausreichend untersucht [Tedner et al 2012].

Eine andere Studie bewies im Mausmodell, dass allergische Mäuse, die während der Schwangerschaft unter Allergeneinfluss gerieten, Nachkommen gebären, die einer erhöhten Sensibilisierung auch gegenüber weiteren Allergenen unterlagen [Herz et al 2001].

Dass Allergene auch zum Feten über die Plazentaschranke gelangen können, wurde in mehreren in-vitro Versuchen nachgewiesen. Beispiele hierfür sind das inhalative Birkenpollenallergen Betv1 und die Nahrungsmittelallergene  $\beta$ -Lactoglobulin (Kuhmilcheiweiß) und Ovalbumin (Hühnerweiweißallergen). Hierbei wurde ebenso ein verstärkter plazentarer Transport von Allergenen vor der 36. Schwangerschaftswoche festgestellt, demnach existiert auch ein Zusammenhang zum Schwangerschaftsalter [Loibichler et al 2002, Edelbauer et al 2003]. Ein Nachweis für den Allergentransfer zum Feten in vivo konnte erbracht werden, indem Allergene im Nabelschnurblut nachgewiesen wurden, hierbei zeigten sich geringe Mengen von  $\beta$ -Lactoglobulin und Ovalbumin im Nabelschnurblut [Edelbauer et al 2004].

Nachgewiesene Änderungen in der Freisetzung allergiespezifischer Zytokine durch mononukleare Zellen im Nabelschnurblut zur Geburt liefern einen weiteren Hinweis, dass sich das fetale Immunsystem bereits mit Allergenen auseinandersetzt [Kondo et al 1998, Prescott et al 1999, van der Velden et al 2001]. Desweiteren konnte festgestellt werden dass CD4+ T-Zellpopulationen beim Neugeborenen keine typischen T-Zellspezifitäten aufwiesen sondern phänotypisch eher den naiven T-Zellen ähneln. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass fetale T-Zellen somit in der Lage wären, mit einer Vielzahl von Antigenen bzw. Allergenen zu interagieren [Thornton et al 2004].

Es finden sich somit zahlreiche Hinweise auf eine allergene Beeinflussung des Feten durch das Milieu in utero, wie genau diese einzelnen Mechanismen allerdings zusammenhängen, bleibt weiterhin unklar und ist Gegenstand zahlreicher laufender Studien.

## **2. Ziel**

Bisher sind wenige Informationen darüber bekannt, welchen direkten Einfluss Allergene auf den Stoffwechsel der Plazenta ausüben, und zu welchen möglichen Veränderungen im Feten dies führt.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation lag darin, ein neues Modell zu entwickeln, das einen Allergenkontrakt der humanen Plazenta ex vivo durch Perfusion, ähnlich dem Kreislauf in vivo, nachahmt und Stoffwechselveränderungen im Sinne von Zytokinfreisetzungen aufzeichnet.

Konkret sollte geprüft werden, ob in den ex vivo perfundierten Plazenten von Schwangeren mit Allergien gegen Apfel, Hausstaubmilbe oder Milcheiweiß durch die Zugabe der entsprechenden Allergene (Apfel, Hausstaubmilbe, Milchweiweiß) im Vergleich zu gesunden Schwangeren veränderte Konzentrationen an Histamin sowie den Zytokinen IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  freigesetzt werden. Desweiteren analysierten wir diese Veränderungen in der Zytokinfreisetzung auch nach Zugabe des Mastzelldegranulators Compound 48/80.

### **3. Methoden**

#### **3.1. Auswahl der Probanden**

Für die vorliegende Dissertation wurden Typ-I-allergische und nichtallergische Schwangere im Alter von 22 bis 39 Jahren aus dem Jenaer Raum, ohne präexistente weitere Erkrankungen oder chronischer Medikamenteneinnahme, mit komplikationslosen Schwangerschaftsverläufen und Entbindungen ab der 37+0 SSW sowie unauffälligen eutrophen Neugeborenen ausgewählt. Als Untersuchungsmedien dienten Plazenta, Nabelschnurblut und mütterliches Vollblut, ein Einverständnis jeder Probandin lag vor Beginn der Untersuchungen schriftlich vor. Die Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität willigte in die Studie ein. Sämtliche Geburten fanden in der Universitätsfrauenklinik Jena per vaginalem Modus oder durch Sectio caesarea statt.

Eine ausführliche Anamnese hinsichtlich allergischer Erkrankungen wurde erhoben sowie die Neigung zur Allergie vom Typ-I per Allergietest in vitro festgestellt. Hierzu wurden die IgE-Werte im mütterlichen Serum durch einen RAST-Test (Radio-Allergo-Sorbent-Test) im immunologischen Labor des Klinikums der FSU Jena prä- oder postpartal analysiert und die Patientinnen in unterschiedliche Allergieklassen (CAP-Klassen) eingeteilt.

Insgesamt wurden von drei positiv getesteten Apfelallergikern (nach RAST-Test) Plazenten und Blutproben (maternales Venenblut und Nabelschnurblut) untersucht und mit nichtallergischen Kontrollen verglichen. Für die Entwicklung und Optimierung der Methoden wurden, angesichts der geringen Anzahl an Apfelallergikerinnen, zusätzlich auch Pollen- und Milcheiweißallergikerinnen mit in die Versuche einbezogen.

##### **3.1.1. Rast test (Radio-Allergo-Sorbent-Test) zur Allergietestung**

Mit diesem Verfahren können Typ-I-Allergien in vitro festgestellt werden indem allergenspezifisches IgE im Serum nachgewiesen wird.

Dabei wird das IgE enthaltende Patientenserum mit einem adäquaten Allergen (meist an eine feste Phase gebunden z.B. als allergenbeschichtete Zellulosepartikel) inkubiert, so dass sich ein Allergen-IgE-Komplex bildet. Nach einem Waschschrift,

um das Serum mit dem ungebundenen IgE zu eliminieren, werden radioaktiv-markierte Antikörper gegen Human-IgE hinzugegeben, die sich an die verbliebenen IgE binden. Nach nochmaligem Waschen wird die Radioaktivität gemessen und so die Anzahl des allergenspezifischen IgE analysiert. (s. Abb. 3.1.)

Dieses liefert eine Aussage über die Stärke der allergischen Reaktion: je höher der Wert der spezifischen IgE-Konzentration, desto höher die allergenspezifische Sensibilisierung des betroffenen Patienten. Das Ergebnis wird in RAST-Klassen unterteilt: Klasse 0 = negativ, Klasse 1 = zweifelhaft, Klasse 2 = schwach positiv, Klasse 3 = positiv, Klasse 4 = stark positiv [Renz et al 2011, Piper 2007].

Sämtliche dieser Untersuchungen der vorliegenden Dissertation wurden im Labor des Klinikums der Friedrich Schiller Universität durchgeführt.

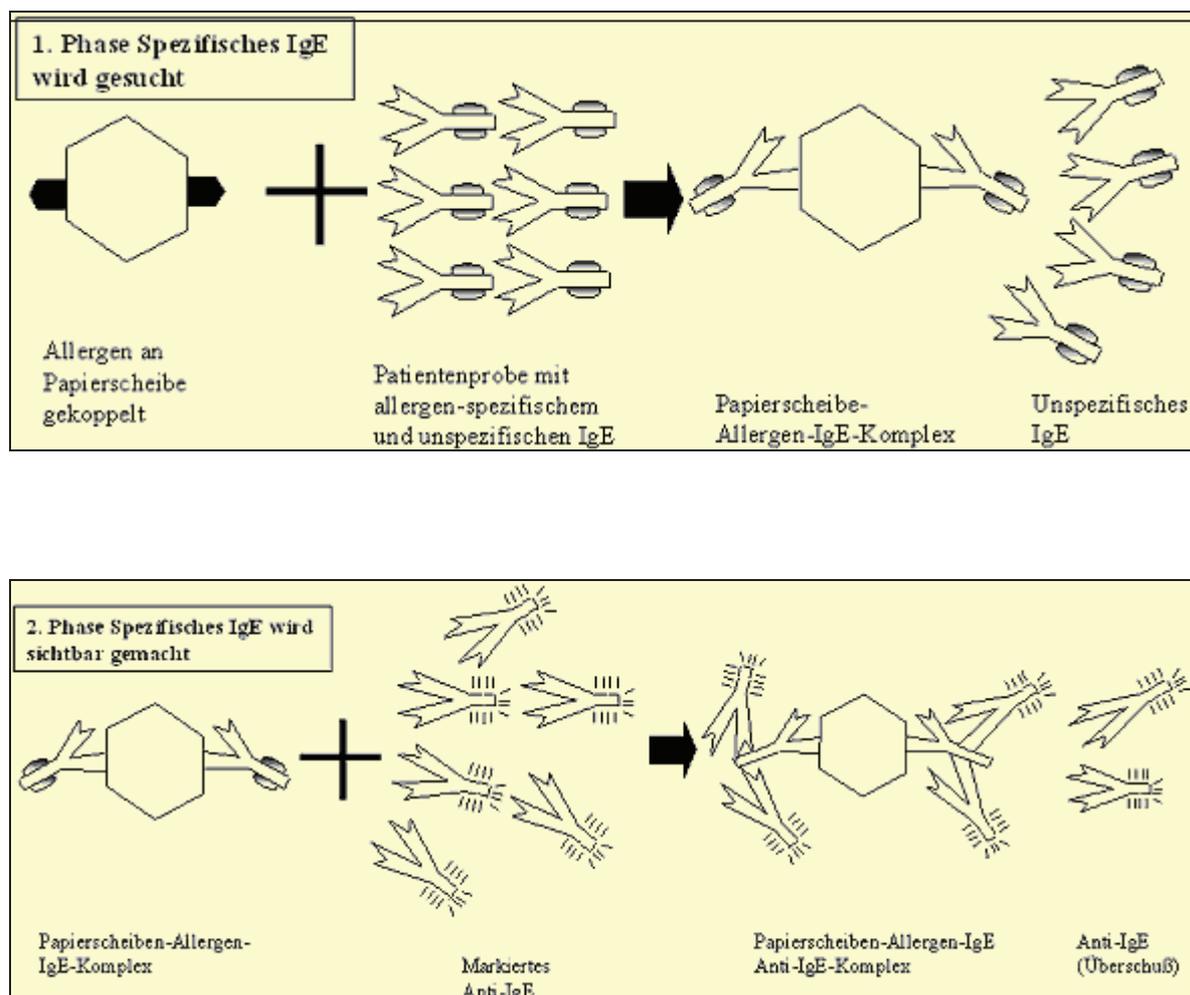


Abb. 3.1. schematische Darstellung des RAST- Allergietestverfahrens

### 3.2. Auswahl der Allergene

Eine Reihe verschiedener Allergene wurde für unsere Versuche verwendet, so das inhalative Hausstaubmilbenallergen und das Nahrungsmittelallergen Milcheiweiß. Diese Allergene wurden durch die Firmen Bencard, Abello und Alk/Scherax zur Verfügung gestellt. Unseren Hauptschwerpunkt richteten wir auf das Apfelallergen Mald 1, das durch vorhergehende Extraktion und Aufreinigung der stark allergenhaltigen Apfelsorte Golden Delicious durch Mitarbeiter des Plazentalabors gewonnen wurde [Heinzelmann 2005].

### 3.3. Auswahl des Plazentagewebes

Für die Untersuchung des Plazentagewebes wurden Plazenten allergischer und nichtallergischer Mütter, die ab der 38. SSW entbanden, ausgewählt. Die Schwangerschaften selbst verliefen komplikationslos.

Die Plazenten wurden vor Versuchsbeginn ausgehend untersucht, wobei auf Vollständigkeit und intakte deziduale und fetale Oberflächen geachtet wurde.

Weiterhin starteten die einzelnen Versuche relativ rasch (innerhalb 30 min) nach Geburt der Plazenta.

### 3.4. Einseitige offene Perfusion

#### 3.4.1. Hintergrund

Im Verlauf dieser Dissertation wurde ein neues Modell zur Perfusion der menschlichen Plazenta entwickelt. Als Modell hierfür nutzten wir das Prinzip der doppelseitigen ex vivo Plazentaperfusion, das von Schneider und Huch 1985 entwickelt wurde. Dieses Modell ermöglicht einen imitierenden getrennten Kreislauf beider Seiten der Plazenta, indem je an einem Kotyledo auf der maternalen und auf der fetalen Seite die zuführenden Gefäße durch Punktion mit dünnen stumpfen Kanülen mit Perfusionsmedium durchspült werden. Mit dieser Methode kann z.B. der Übertritt von Substanzen über die Plazentaschranke analysiert werden [Schneider 1985].

Dabei ist jedoch auf eine intakte feto-maternale Grenzschicht zu achten, bei Beschädigungen dieser ist eine Perfusion aufgrund falschen Perfusionsdruckes und damit Durchmischung beider Kreisläufe nicht möglich. Aufgrund dieser Anfälligkeit verzeichneten wir oft hohe Ausschussraten an Versuchsmaterial bei geringer Verfügbarkeit von Plazenten allergischer Schwangerer. Daher zeigte es sich notwendig, ein Modell zu entwickeln, welches es mit höherer Erfolgsrate ermöglicht, Reaktionen in der Plazenta zu analysieren. Dieses konnten wir durch die Entwicklung der einseitig offenen Perfusion der Plazenta realisieren.

#### 3.4.2. Durchführung

Die einseitig offene Perfusion der Plazenta ermöglicht es, zwei voneinander getrennte Kotyledone einer Plazenta simultan und unabhängig voneinander zu perfundieren. In allen Versuchen wurde jeweils ein Kotyledon mit Allergen oder Compound 48/80 und der andere mit reinem Perfusionsmedium gespült.

Vor Start der Versuchsreihe verglichen wir entscheidende plazentare Stoffwechselfparameter im Perfusionsmedium nach einseitiger und zuvor in unserem Labor durchgeführter doppelseitiger Perfusion. Dabei fanden sich keine Unterschiede im Verbrauch von Glucose oder Sauerstoff sowie in der Produktion von Laktat oder  $\beta$ -HCG.

Unmittelbar nach Entbindung wurden die Plazenten im Labor oberflächlich mit physiologischer Kochsalzlösung gereinigt und von je einer Plazenta zwei voneinander getrennt liegende Kotyledone mit dazugehörigem Randgewebe ausgewählt und herauspräpariert. Diese beiden Kotyledone wurden in zwei getrennte Perfusionsapparaturen appliziert, wobei die deziduale maternale Seite dabei nach oben gerichtet wurde. Hier wurden vier feine dünne stumpfe Metallkanülen eingespannt, in denen das Perfusionsmedium durch die Dezidua in den intervillösen Raum gespült wurde. Die fetale Seite der Kotyledone blieb unverändert.

Das aus den Venenöffnungen der Dezidualeseite ausgetretene Perfusionsmedium wurde ebenfalls durch dünne Kanülen abgeleitet, im Eiswasserbad aufgefangen und daraus wurden in 10 minütigen Abständen Proben gewonnen, sofort zentrifugiert (bei 4°C für 10 min mit 3000 U/min) und nach Abnahme des Überstandes bei -46°C aufbewahrt. Eine schematische Übersicht über die Versuchsanordnung zeigt die Abbildung 3.2.

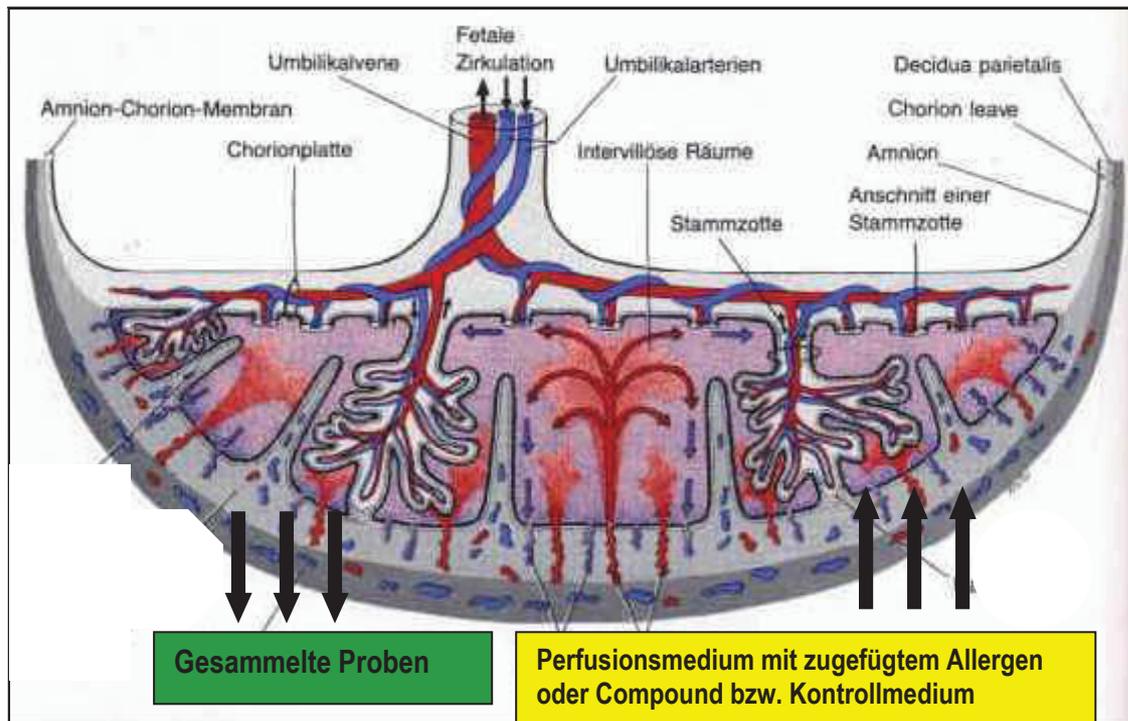


Abb. 3.2.: Schema offene einseitige Plazentaperfusion

Die Dauer der Perfusion betrug jeweils sechs Stunden mit einer Flußgeschwindigkeit in beiden Kotyledonen von 2,2 ml/min. Beide Kotyledone wurden in der ersten Stunde nur mit reinem Perfusionsmedium gespült, nach exakt einer Stunde applizierten wir in das Medium des einen Kotyledos Allergen oder Compound 48/80, der andere wurde als Kontrolle unverändert mit reiner Perfusionslösung weitergespült. Unmittelbar vor Beginn der Perfusion wurde das Perfusionsmedium erwärmt auf 37,0 °C und mit Sauerstoff angereichert (Silox-S Oxygenator der Firma Mera Senko Medical Instrument, Tokio, Japan). Zur Überwachung der Stoffwechselfparameter wurden der pH- sowie die Werte für Sauerstoff und Kohlendioxid im zuführenden und abführenden Schenkel aller 30min gemessen. Die Abbildung 3.3. zeigt einen gespülten Kotyledo nach sechs Stunden Perfusionsdauer mit sich gut vom übrigen Gewebe abgrenzender hellerer Färbung.



Abb. 3.3.: Gespültes Kotyledo (hell) nach sechs Stunden Perfusionsdauer.

#### 3.5. Auswahl der zu ermittelnden Zytokine

Ausgehend von den immunologischen Grundlagen der allergischen Reaktionen, planten wir, diese Stoffwechseleränderungen im Sinne geänderter Zytokinfreisetzung aufzuzeichnen. Als zu analysierende Mediatoren wählten wir Histamin, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 sowie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , deren Nachweismethoden in den folgenden Unterkapiteln beschrieben werden.

Um eine Vorstellung der größtmöglichen Histaminfreisetzung im Plazentagewebe zu erhalten, verwendeten wir zusätzlich statt eines Allergens den Mastzelldegranulator Compound 48/80, ein Kondensationsprodukt aus p-Methoxyphenyläthylmethylamin mit Formaldehyd, das Mastzellen zur Degranulation und damit zur Freisetzung von Histamin anregt [Rothschild 1970, Goth et al. 1975].

##### 3.5.1. Fluoreszenzphotometrische Histaminbestimmung mit o-Phtaldialdehyd

Um die Histaminkonzentration messen zu können, zeigte sich zuerst die Histaminextraktion aus der Perfusionslösung und anschließend die Markierung mit fluoreszierendem o-Phtaldialdehyd (OPT) als notwendig. Im folgenden Schritt konnte in einem Durchflußzytometer nach Messung der Fluoreszenz die Histaminkonzentration ermittelt werden [Friemel et al. 1991]. Das ursprüngliche Verfahren von Friemel wurde eingesetzt zur Bestimmung der Histaminausschüttung durch Mastzellen aus Serumproben von Laborratten. Wir verwendeten diese

Vorgehensweise zur Bestimmung der Histaminkonzentration des Überstandes aus den Perfusionsproben.

#### 3.5.1.1. Durchführung

Je 0,5ml 0.9% NaCl-Lösung und 2,5ml n-Butanol wurden vermengt. Nach Zugabe von 0.5ml des abzentrifugierten zellfreien Überstandes der gewonnenen Perfusionsproben und 0,2ml 3M NaOH erfolgte die Inkubation für drei Minuten auf dem Schüttler. Dadurch ging das Histamin in die Butanolphase über. Nach Zentrifugation über 20 Minuten bei 900g und damit erreichter Trennung der Schichten, wurden 2ml der abzentrifugierten Butanolschicht mit 1,2ml 0,12M HCl und 3,8ml n-Heptan vermischt und wiederum eine Minute geschüttelt. Im nächsten Schritt wurde nach erneuter Zentrifugation für fünf Minuten bei 600g die Heptanschicht abgesaugt. Aus der verbliebenen Lösung wurde 1ml im Eisbad abgekühlt.

Nun erfolgte die rasche Zugabe von 0,4ml 0,75M NaOH und 0,12ml methanolische OPT-Lösung, anschließend die Inkubation für vier Minuten. Danach wurde durch Zugabe von 0.2ml 2M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> im Eisbad (20 Minuten) die Reaktion beendet.

Die Fluoreszenz wurde an einem als Durchflußzytometer genutzten Fluorescence-HPLC-Monitor RF\_551 (Shimadzu, Duisburg) mit den Wellenlängen  $\lambda_{Ex}=355\text{nm}$  und  $\lambda_{Em}=440\text{nm}$  und mit 40%MeOH/Aqua dest. als Eluent gemessen, die Fluoreszenzdaten mit der Chromeleon-Software (Dionex, Germering) errechnet und ausgewertet und die Histaminkonzentration der Perfusionsdaten mittels eines mitgeführten Standards analysiert.

#### 3.5.2. Quantitative Zytokinbestimmung mittels Cytometric Bead Array

Zur Analyse der verschiedenen Zytokine in der gewonnenen Perfusionsproben wurde ein Cytometric Bead Array der Firma BD Bioscience (Heidelberg) für humane TH1/TH2-Zytokine benutzt. Dies ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung verschiedener Zytokine aus einer Probe mit hoher Sensitivität. Wir konzentrierten uns dabei auf die Interleukine IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 sowie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ .

Die einzelnen Zytokine werden dabei an spezifische, auf Zytokine Capture Beads gebundene Antikörper und an fluoreszierende Detektions-Antikörper gebunden und durch unterschiedlich stark ermittelte Fluoreszenzen analysiert.

Ein Waschriff entfernt die ungebundenen Antikörper. Im Durchflußzytometer wird dann die Fluoreszenz-Intensität der Komplexe aus Zytokinen, den Capture-Beads und den Detektionsantikörpern bestimmt.

#### 3.5.2.1. Durchführung

Die gewonnen Proben wurden (1:1:1) mit den fluoreszierenden Human Cytokine Capture Beads ( $\lambda_{Em}=670\text{nm}$ ) und den fluoreszierenden R-Phycoerythrin-konjugierten Detektionsantikörpern ( $\lambda_{Em}=575\text{nm}$ ) gemixt. Anschließend erfolgte die Inkubation für 180 min abgedunkelt bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Als Standard wurden rekombinante Proteine (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ ; enthalten im Kit) im Puffermedium gelöst und nacheinander verdünnt (1:1) von 5000 auf 20 pg/ml für jedes Zytokin. Danach wurden die Proben mit 200 $\mu$ l Waschpuffer bei 200g für fünf Minuten zentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes durch das Flow-Cytometer (FACS Calibur; BD Bioscience) gemessen und mittels beigefügter Software (FCAP-Array v1.0.1. Kit-Software mit 5-Parameter-Kurven-Darstellung) ausgewertet.

Die Nachweisgrenzen lagen bei 2.6 pg/ml für IL-2, 2.6 pg/ml für IL-4, 3 pg/ml für IL-6, 2.8 pg/ml für IL-10, 2.8 pg/ml für TNF- $\alpha$  und 7.1 pg/ml für IFN- $\gamma$ .

#### 3.6. Dünnschnitttechnik und Zytokinanfärbung der perfundierten Plazentagewebeproben mit TNF- $\alpha$ - Antikörpern

Um einen zusätzlichen Überblick über die Verteilung der Zytokinfreisetzung im placentaren Gewebe zu erhalten, wurden zunächst Proben aus den verwendeten Kotyledonen in Epon, einem Kunstharz fixiert, um eine hohe Haltbarkeit des Gewebes zu erreichen. Aus diesen Proben wurden anschließend Ultradünnschnitte angefertigt und mit Antikörpern für TNF- $\alpha$  markiert um sie einer histologischen Untersuchung zugänglich zu machen.

Diese Arbeiten fanden im Institut für Anatomie II unter der Leitung von Prof. Dr. Jirikowski statt.

#### 3.6.1. Eponeinbettung der Plazentagewebebeurproben

Aus der maternalen Seite der Plazenta wurden Gewebeprouben (max. 3 x 3 mm) herausgeschnitten und in Formalin eingelegt (Gewebe vor/während Perfusion). Die gewonnenen Proben wurden zunächst in mit PBS-Puffer gefüllte Glasröhrchen gegeben, für einige Stunden inkubiert und nach Wechsel des PBS-Puffers für 12 Stunden im Kühlschrank gelagert. Der PBS-Puffer wurde entfernt und die Proben in Alkohol aufsteigender Konzentration (ca 2 ml) in mehreren Schritten ausgewaschen: für zwei bis vier Stunden in 50%igen Alkohol, für 12 Stunden in 70%igem Alkohol, für eine Stunde in 90%igen Alkohol und dann für zwei Stunden in absolutem Alkohol auf dem Vortexer gemischt. Nach Entfernung des Alkohols und Zugabe von Propylenoxid für zwei Stunden, erfolgte die Inkubation der Plazentaschnitte in Epongernisch und Propylenoxid im Verhältnis 1:5 auf dem Vortexer für eine Stunde bis zur vollständigen Lösung des Epongernisches, danach erneut im Verhältnis 1:3 für eine Stunde auf dem Vortex und im Verhältnis 1:2 für 12 Stunden im Kühlschrank. Nun wurden die zur Einbettung vorgesehenen Plastikförmchen mit frisch angesetzten Epongernisch ausgegossen und die Proben dazugegeben, eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen und nachfolgend im Wärmeschrank (60°C) über zwei Tage ausgehärtet und nochmals für drei bis fünf Tage bei Raumtemperatur weiter getrocknet.

Die weitere Verarbeitung und Anfertigung der Ultradünnschnitte sowie die immunhistochemische Färbung mit polyklonalen TNF- $\alpha$ -Antikörpern und die fotografische Dokumentation der Verteilung von TNF- $\alpha$  im Plazentagewebe erfolgte durch die Mitarbeiter des Instituts für Anatomie II, weswegen hier auf eine genauere Beschreibung verzichtet wird.

#### 3.7. Ergebnisdarstellung und Fehlerberechnung

Um die Ergebnisse graphisch präsentieren zu können, bildeten wir die Mittelwerte der jeweiligen einzelnen Datensätze und stellten diese nach Einbeziehung des Standardfehlers in Diagrammen dar. Die Einheiten der ermittelten Konzentrationen der Zytokine und des Histamins wurden berechnet als pg/ml\*kg (d.h. als pg Histamin bzw. analysiertes Zytokin pro ml Perfusat pro kg Plazentagewebe).

Auf eine genaue statistische Analyse verzichteten wir bei insgesamt geringer Versuchszahl. Hierzu wurde eine ausführliche und sinnvolle Statistik durch weitere Versuche nachfolgender Arbeitsgruppen erstellt, in der die Ergebnisse dieser Dissertation mitverwendet wurden (s. Anhang: Ergänzung zur statistischen Auswertung Seite XIV-XV).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Vorbetrachtung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein neues Modellsystem entwickelt, das die Auswirkungen eines Allergenkontaktes auf den Stoffwechsel der Plazenta durch geänderte Zytokinfreisetzungen aufzeigen kann.

Als Allergene verwendeten wir zum einen isoliertes Apfelallergen, passend dazu wählten wir als Probandinnen Apfelallergikerinnen aus. Hier erwies es sich allerdings als schwierig, in dem Zeitraum, dem diese Dissertation zugrunde lag, eine ausreichend große Anzahl an getesteten Apfelallergikerinnen zu rekrutieren. Deswegen nahmen wir zusätzlich auch Schwangere mit anderen Allergien (Hausstaub, Milcheiweiß) in die Versuche auf und verwendeten die entsprechenden Allergene (Hausstaubmilbenallergen, Milcheiweiß).

Stand zum Zeitpunkt der Versuche eine RAST- Allergietestung aus, wurde diese im Nachhinein durch Analyse des mütterlichen Serums nachgeholt. Schwangere mit nur fraglicher Allergie wurden ausgeschlossen. Die Allergene oder der Mastzelldegranulator Compound 48/80 wurden der Perfusion hinzugefügt und die Freisetzung von Histamin und der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6 und IL-10 gemessen.

### 4.2. Entwicklung des Modells der einseitig offenen Perfusion

Wie schon im Kapitel 3.3 erwähnt, zeigte sich aufgrund der hohen Fehlerquote und damit bedingten Ausschussrate im Verfahren der doppelseitigen Plazentaperfusion die Notwendigkeit für ein Modellsystem, das deutlich erfolgreicher durchzuführen ist und weiterhin Einflüsse auf den plazentaren Stoffwechsel untersuchen lässt.

Dieses gelang mit der Entwicklung des Modells der einseitig offenen Perfusion, bei dem die maternalen Seiten zweier verschiedener Kotelydone unabhängig voneinander perfundiert werden konnten: ein Kotelydo mit Zufuhr von Allergen oder Compound 48/80, der andere nur mit reiner Perfusionslösung. Letzteres ermöglichte den Vorteil eines internen Standards. So wiederum konnte eine bessere

Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchen erzielt werden, da die allergischen Schwangeren sich sowohl in ihren Allergietypen als auch in den jeweiligen Sensibilisierungsgraden unterscheiden.

### 4.3. Analyse der Histaminfreisetzung im Plazentagewebe

Die Analyse der Histaminkonzentration erfolgte mittels Fluoreszenzspektroskopie. Im Vorfeld musste allerdings die ursprüngliche Methode nach Friemel (Messung der Histaminkonzentration nach Mastzelldegranulation im Rattenserum) geändert werden, um sie an die Bedingungen der Perfusionslösung anzupassen, da hier deutliche Unterschiede zum Rattenserum bestanden.

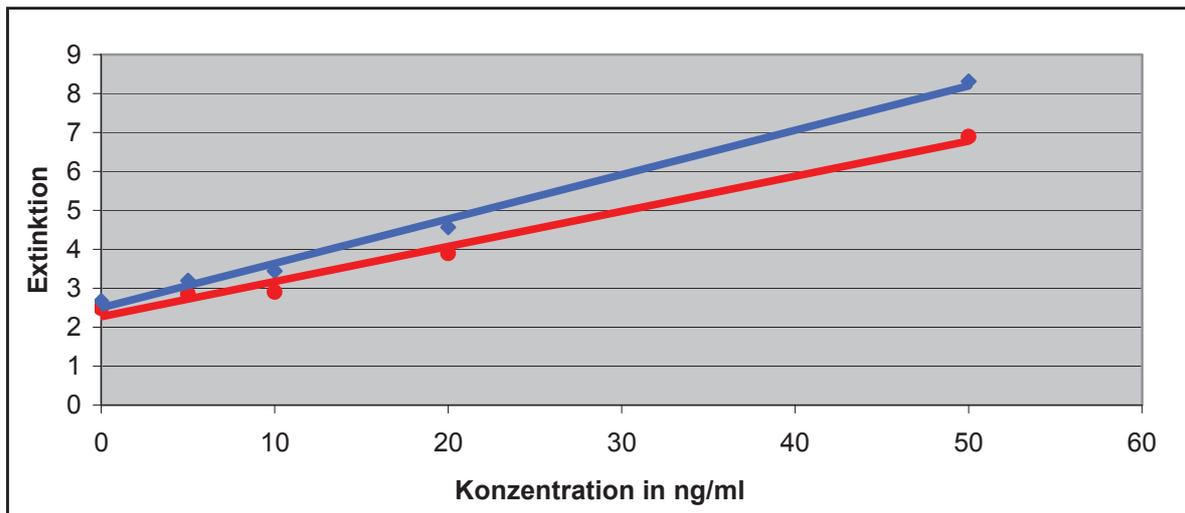
#### 4.3.1. Adaptation der ursprünglichen Histaminextraktionsvorlage an das Perfusionsmedium

Zum einen wurde die Anregungs- u. Emissionswellenlänge alteriert, um eine optimale Detektion des Histamin-o-Phtaldialdehyd-Derivat zu erzielen. Unter Mithilfe der Mitarbeiter des Instituts für Physikalische Chemie der Friedrich Schiller Universität Jena wurde eine Anregungs- u. Emissionswellenlänge ( $\lambda_{Ex}=355\text{nm}$ ,  $\lambda_{EM}=440\text{nm}$ ) ermittelt, die sich ideal an die Versuchsbedingungen adaptiert zeigte. Damit konnte eine wesentlich genauere Histaminanalyse erzielt werden, da die veränderten Wellenlängen zu einem steileren Anstieg der ermittelten Eichkurve führten (s. Abb. 4.1). Die Originalvorlage von Friemel verwendete hierfür eine Wellenlänge von 365nm und ein Fluoreszenzmaximum von 450nm.

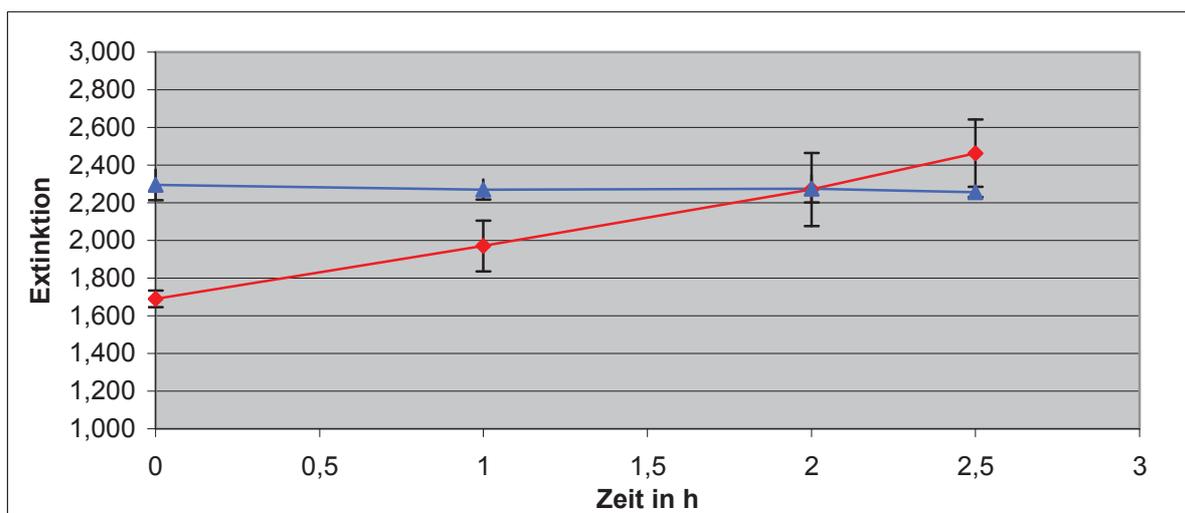
Zum anderen veränderten wir die Extraktionsbedingungen des Histamins, da bei Anwendung des Verfahrens nach Friemel, bedingt durch die Zusammensetzung der Perfusionslösung, die einzelnen Phasen schlechter zu trennen waren und die Stabilität des Histamin-o-Phtaldialdehyd- Derivates herabgesetzt wurde. Dafür änderten wir die Extraktionslösung und das Extraktionsschema so, dass das Histamin besser aus der Perfusionslösung extrahiert werden konnte. Zusätzlich wurde um die Bildungsreaktion des Histamin-o-Phtaldialdehyd- Derivates zu beenden, eine stärkere Säure, 2M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , statt 1,25M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , verwendet, da durch die niedriger konzentrierte Säure die Messwerte im Verlauf weiter anstiegen. Damit

erreichten wir ein stabileres Derivat, resultierend in zeitunabhängigen und konstanten Histaminanalysen (s. Abb. 4.2).

Diese Adaptationen führten zu einer guten Analysemöglichkeit des Histamins und einer guten Reproduzierbarkeit der Messwerte. Die Nachweisgrenze des Histamins lag dabei bei 5 ng/ml Histamin.



**Abbildung 4.1:** Eichgeraden der Histaminbestimmung in Perfusionslösung  
Wellenlängen für Histaminanalyse nach der Originalvorlage nach Friemel (rot), neu adaptiert für humanes Perfusionsmedium (blau)  
Rot: ursprüngliche Wellenlängen →  $\lambda_{EX}=365\text{nm}$ ,  $\lambda_{EM}=450\text{nm}$   
Blau: veränderte Wellenlängen →  $\lambda_{EX}=355\text{nm}$ ,  $\lambda_{EM}=440\text{nm}$

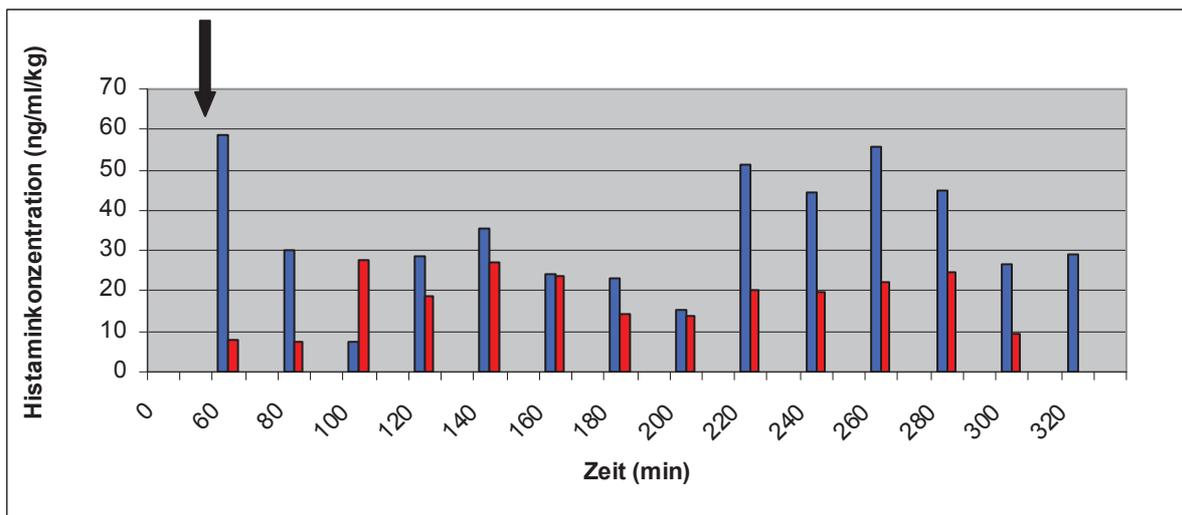


**Abbildung 4.2:** Histaminkonzentration in Abhängigkeit der Säuremolarität und der Zeit (n=4), (Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)  
Rot: Säurekonzentration der Originalvorlage (1,25M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ )  
Blau: veränderte Säurekonzentration (2M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ )

#### 4.3.2. Histaminfreisetzung nach Zugabe des Mastzelldegranulators Compound 48/80

Wie bereits erwähnt, verwendeten wir den Mastzelldegranulator Compound 48/80 als Maß der größtmöglichen Histaminfreisetzung durch die Mastzellen der Plazenta. Die Gabe erfolgte als Bolus nach 60 min zur Perfusionslösung eines Kotyledos einer Plazenta von einer nichtallergischen Patientin zur, wie bereits in Kapitel 3.4.2. erwähnten, offenen Perfusion.

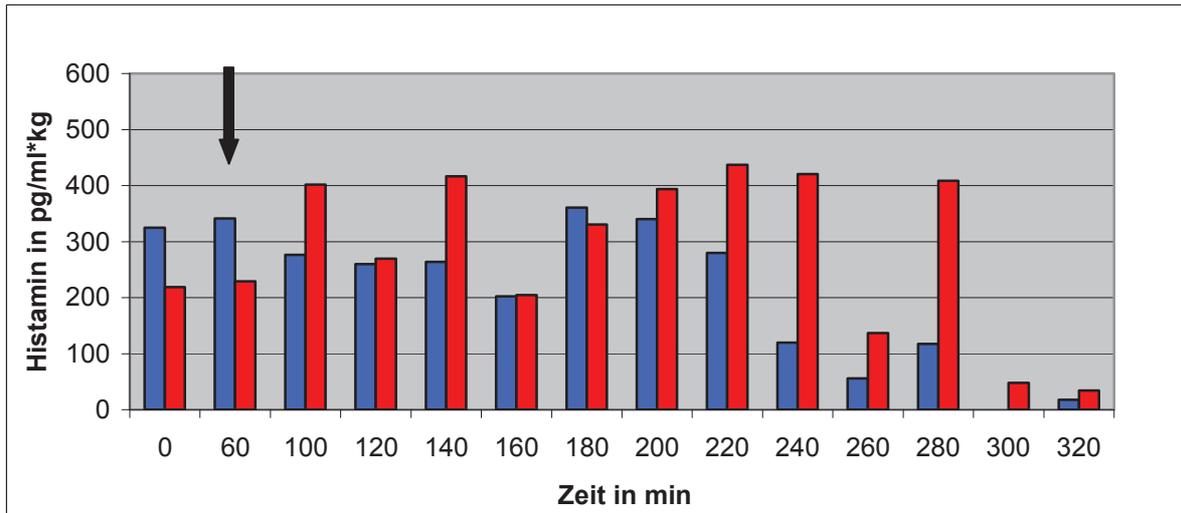
Hierbei zeigte sich ein plötzlicher starker Anstieg der Histaminfreisetzung im Plazentagewebe unmittelbar nach Bolusgabe. Danach sank die Konzentration des Histamins auf basale Werte, um drei Stunden nach Bolusapplikation erneut anzusteigen, ohne dass eine weitere Zugabe von Compound erfolgte. Der Vergleich zum Kontrollkotyledo, der ausschließlich mit Perfusionslösung gespült wurde zeigte, dass hier die Histaminkonzentration weitgehend auf basalem Niveau blieb ohne ähnliche Schwankungen (s. Abb. 4.3.).



**Abbildung 4.3:** Histaminfreisetzung aus perfundiertem Kotyledo einer nichtallergischen Schwangeren nach Bolusgabe von Compound 48/80 nach 60 min (Pfeil) zur offenen Perfusion; Histaminkonzentration in ng Histamin pro ml Perfusat pro kg Plazentagewebe (n=1)  
 Blau: Compound 48/80 Zugabe  
 Rot: Kontrolle (Kotyledo derselben Plazenta nur mit Perfusionslösung gespült)

#### 4.3.3. Histaminfreisetzung nach Zugabe von Allergenen

Nach Allergenzugabe zum Plazentagewebe sowohl bei Perfusion mit Apfelallergenen als auch mit den übrigen Allergenen (Hausstaub, Milcheiweiß), konnte keine Erhöhung der Histaminfreisetzung im Vergleich zum Kontrollkotyledo erzielt werden und sämtliche dieser Versuche wiesen große Schwankungen in den freigesetzten Histaminkonzentrationen auf (s. Abb. 4.4.).



**Abbildung 4.4:** Mittelwerte der Histaminfreisetzung aus Plazenten von Apfelallergikerinnen nach Apfelallergenzugabe  
 Die Einheit der Histaminkonzentration wurde berechnet als pg Histamin pro ml Perfusat pro kg Plazentagewebe  
 Blau: Apfelallergenzugabe (nach 60min/Pfeil)  $c = 4 \mu\text{g/ml}$  ( $n=2$ )  
 Rot: Kontrollkotyledo mit reiner Perfusionslösung gespült

#### 4.4. Bestimmung der Zytokinfreisetzung

Die Bestimmung der Freisetzung der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL4, IL-6 und IL-10 erfolgte unter Verwendung des bereits beschriebenen Cytometric Bead Array der Firma BD Bioscience.

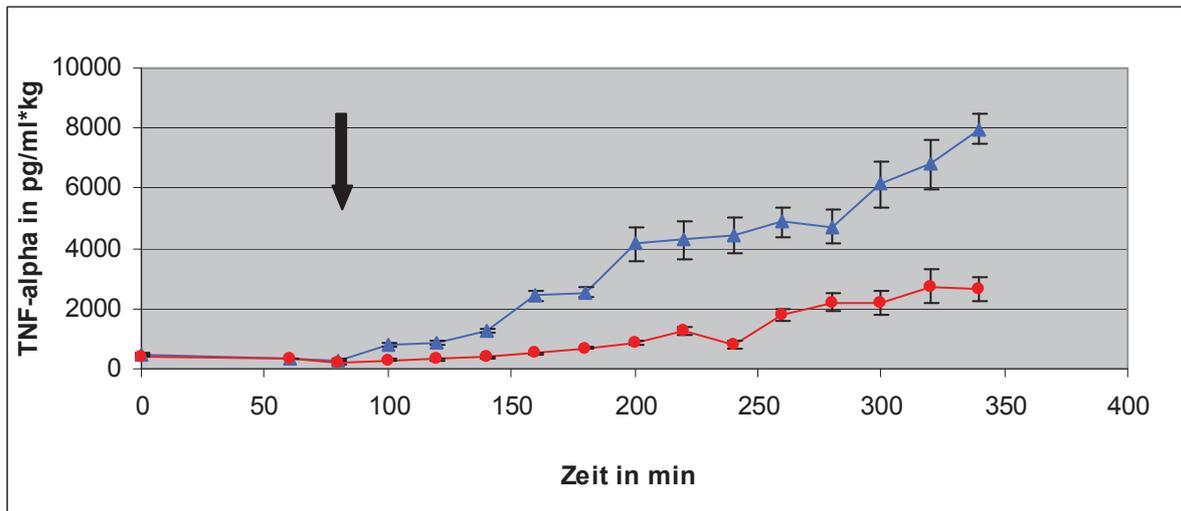
##### 4.4.1. Zytokinanalyse nach Zugabe von Apfelallergen

###### 4.4.1.1. Analyse von TNF- $\alpha$ nach Zugabe von Apfelallergen

Hierbei zeigte nach Zugabe des Apfelallergens Mald-1 ( $c = 4 \mu\text{g/ml}$ ) zu Plazenten apfelallergischer Schwangerer mit fortlaufender Zeit eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Freisetzung. Wie in der Abbildung 4.5 zu sehen, vollzog sich nach Allergenzugabe ein circa 21-facher Anstieg der TNF- $\alpha$ -Konzentration (von durchschnittlich  $367 \text{ pg/ml*kg}$  auf  $7980 \text{ pg/ml*kg}$ ) über insgesamt 360 Minuten Perfusionsdauer, während im Kontrollkotyledo ohne Allergenzugabe ein geringerer Anstieg der TNF- $\alpha$  Konzentration zu verzeichnen war.

Vergleicht man die TNF- $\alpha$  Sekretion nach Apfelallergenzugabe zwischen apfelallergischen und gesunden Probandinnen, so zeigt sich eine deutlich früher

einsetzende (bereits eine Stunde nach Allergenzufuhr) und auch wesentlich höhere Freisetzung von TNF- $\alpha$  in Plazenten allergischer Mütter als im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Bei letzteren konnte erst nach 280 min, also nach über drei Stunden nach Allergenzugabe ein Anstieg der Zytokinkonzentration verzeichnet werden, die Unterschiede im Vergleich zur Perfusion mit reiner Perfusionslösung fielen gering aus (s. Abb. 4.6).



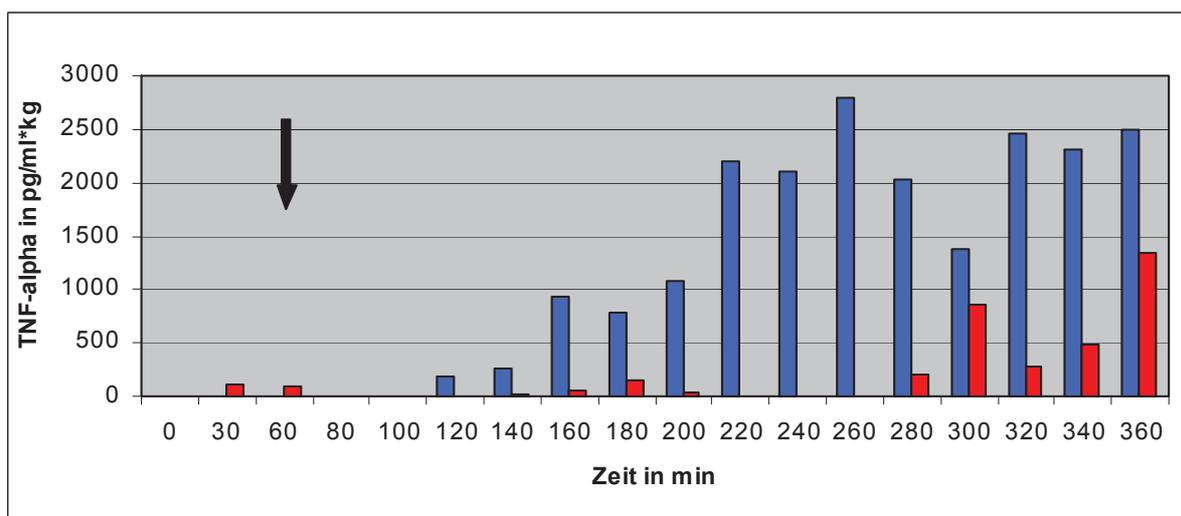
**Abbildung 4.5:** Mittelwerte der TNF- $\alpha$  Freisetzung in Plazenten von Apfelallergikerinnen (n=3) nach Apfelallergenzugabe

TNF- $\alpha$  Konzentration berechnet als pg TNF- $\alpha$  pro ml Perfusat pro kg Plazentagewebe

Fehlerbalken zeigen den Standardfehler

Blau: Apfelallergenzugabe (nach 60min/Pfeil) c=4 $\mu$ g/ml

Rot: Kontrollkotyledo mit reiner Perfusionslösung



**Abbildung 4.6:** Differenz der TNF- $\alpha$  Freisetzung (Mittelwerte) in Plazenten von Apfelallergikerinnen und gesunden Schwangeren nach Zugabe von Apfelallergen (nach 60min/ Pfeil)

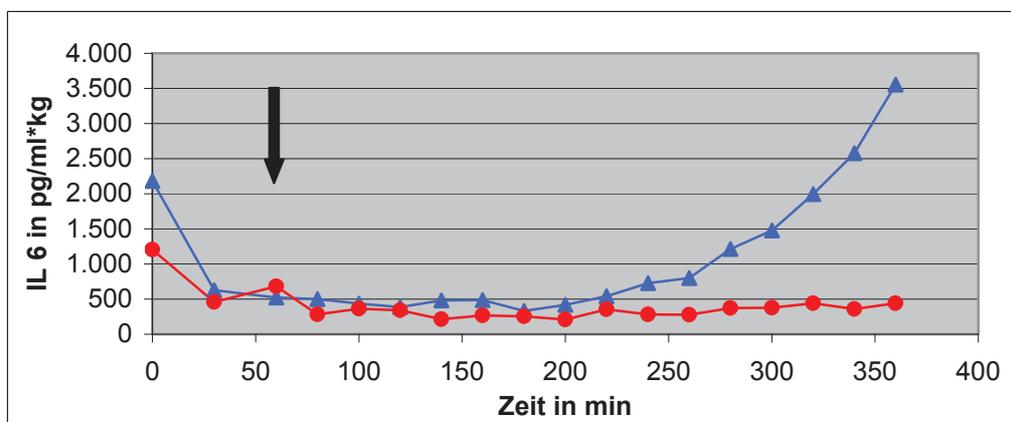
Blau: Kotyledone von Pat. mit Apfelallergie (n=3)

Rot: Kotyledone von Pat. ohne Allergie (n=1)

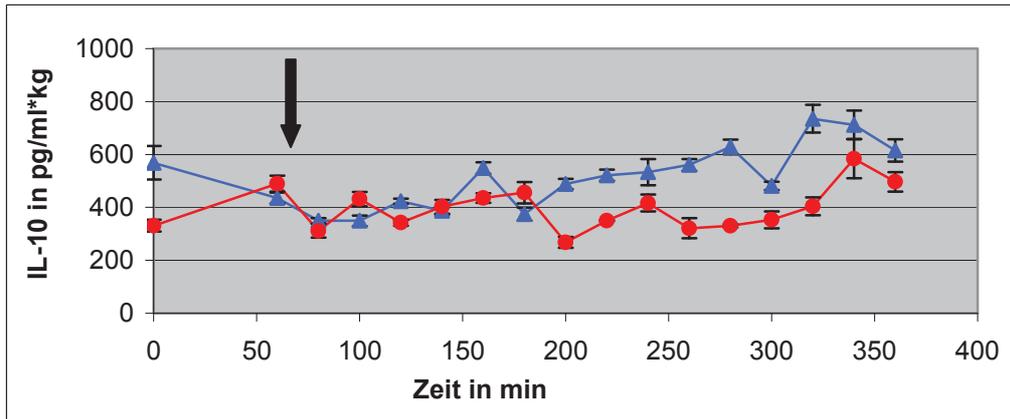
#### 4.4.1.2. Analyse von IL-6 und IL-10 nach Zugabe von Apfelallergen

Auch bei der Analyse dieser Zytokine konnte festgestellt werden, dass eine Apfelallergenzugabe nach 60 Minuten Perfusionsdauer sich in einem vermehrten Anstieg der IL-6 Konzentration und in geringerem Maße auch der IL-10-Konzentration äußerte, als im Vergleich zu Plazentagewebe, das mit reinem Perfusionsmedium gespült wurde. Allerdings fielen diese Unterschiede, insbesondere bei IL-10, wesentlich geringer aus, als bei der Freisetzung von TNF- $\alpha$ . Es zeigte sich auch eine zeitliche Abhängigkeit, da erst ab 200 Minuten Perfusionsdauer, also über zwei Stunden nach Allergenzugabe, sich ein Anstieg der IL-10 und ab 300 Minuten sich ein noch deutlicherer Anstieg der IL-6 Konzentration darstellen ließ (s. Abb. 4.7. und 4.8).

Die Bestimmung von IL-6 blieb aus finanziellen Gründen (unterschiedliche Cytometric Bead Array-Kits) im Rahmen meiner Dissertation begrenzt (n=1), nachfolgende Arbeitsgruppen unseres Labors führten diese Versuche fort mit weiteren Bestimmungen von IL-6 und ähnlichen Ergebnissen (s. Anhang S.XIV-XV).



**Abbildung. 4.7:** IL-6 Freisetzung bei Apfelallergikerinnen nach Apfelallergenzugabe (n=1)  
 (IL-6 Konzentration berechnet in pg IL-6 pro ml Perfusat pro kg Plazentagewebe)  
 Blau: Kotyledo mit Allergenzugabe, Allergenzugabe erfolgte nach 60 min (Pfeil)  
 Rot: Kontrollkotyledo derselben Probandin ohne Allergenzugabe



**Abbildung 4.8:** Mittelwerte der IL-10 Freisetzung bei Apfelallergikerinnen nach Apfelallergenzugabe (n=3); IL-10 Konzentration berechnet als pg IL-10 pro ml Perfusat pro kg Plazentagewebe (Fehlerbalken zeigen den Standardfehler)  
 Blau: Kotyledo mit Allergenzugabe, Allergenzugabe erfolgte nach 60 min (Pfeil),  
 Rot: Kontrollkotyledo derselben Probandin ohne Allergenzugabe

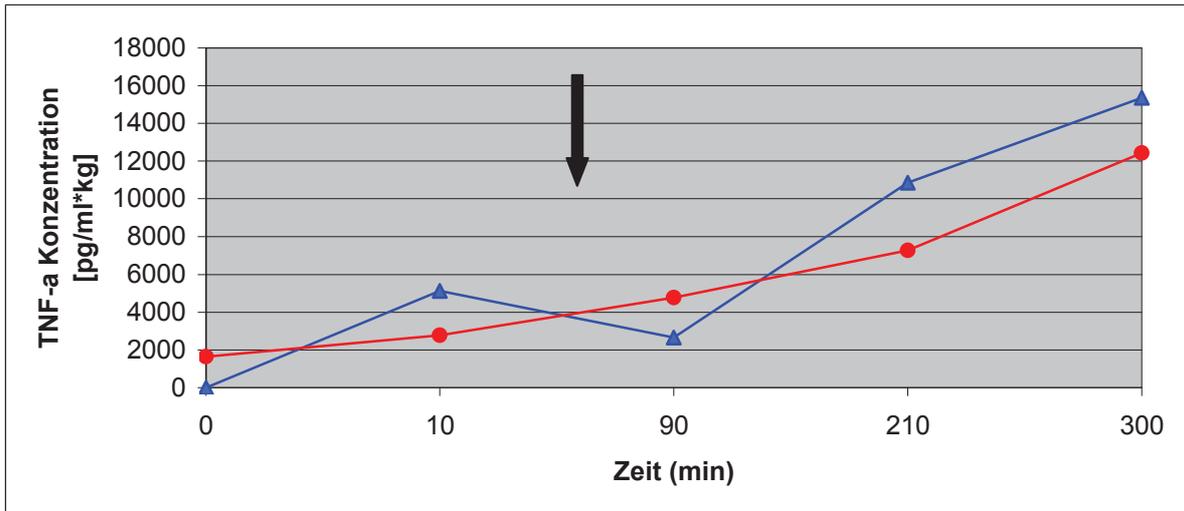
#### 4.4.1.3. Analyse von IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 nach Zugabe von Apfelallergen

Hierbei zeigten sich nachweisbare Mengen dieser Interleukine in unseren Perfusionen, jedoch keine wesentlichen Änderungen in der Freisetzung bei allergischen und nichtallergischen Schwangeren sowie auch nicht bei allergenhaltiger und allergenfreier Perfusion. Ebenso beliefen sich die Schwankungen zwischen den einzelnen Plazenten auf ein beträchtliches Maß, so dass hier keine vergleichenden Rückschlüsse gezogen werden können.

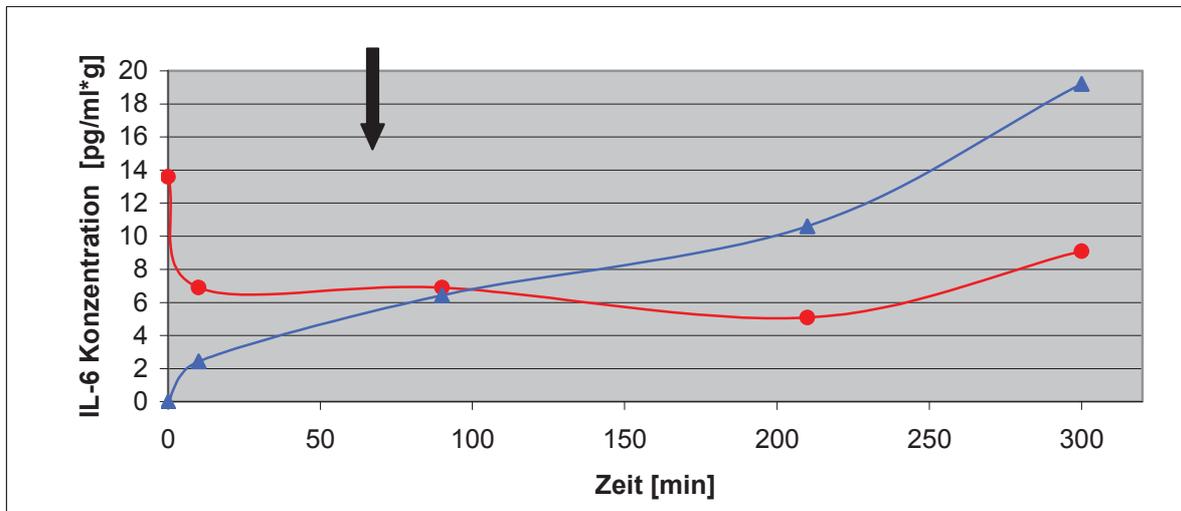
#### 4.4.2. Zytokinfreisetzung nach Zugabe von Hausstaubmilbenallergen

Nach Zugabe von Hausstaubmilbenallergen zur Plazentaperfusion einer Hausstaubmilbenallergikerin zeigten sich bezüglich der Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-6 geringe Erhöhungen der Konzentration im Vergleich zur Spülung mit reiner Perfusionslösung (s. Abb. 4.9 bis 4.11).

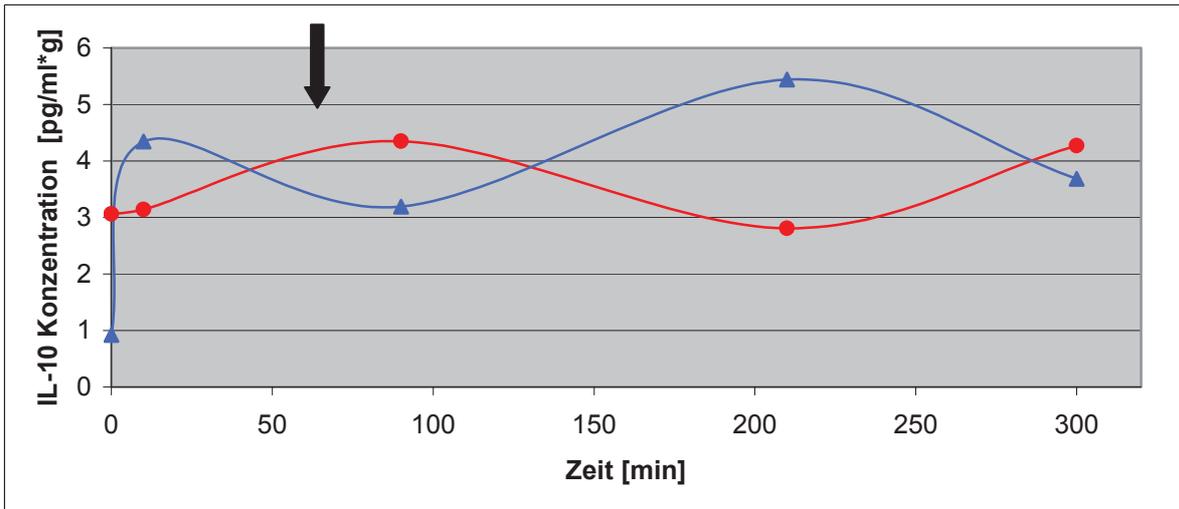
Ein Anstieg von IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-2 ließ sich auch hier nach Allergenzugabe nicht verzeichnen (Ergebnisse nicht graphisch dargestellt).



**Abbildung 4.9:** TNF- $\alpha$  Freisetzung bei hausstaubmilbenallergischer Probandin nach Hausstaubmilbenallergenzugabe (n=1)  
 TNF- $\alpha$  Konzentration berechnet als pg TNF- $\alpha$  pro ml Perfusat pro kg Plazentagewebe  
 Blau: Kotyledo mit Allergenzugabe (erfolgte nach 60 Minuten/Pfeil)  
 Hausstaubmilbenallergenkonzentration: c = Der I: 4 $\mu$ g/ml, Der II: 2 $\mu$ g/ml  
 Rot: Kotyledo ohne Allergenzugabe

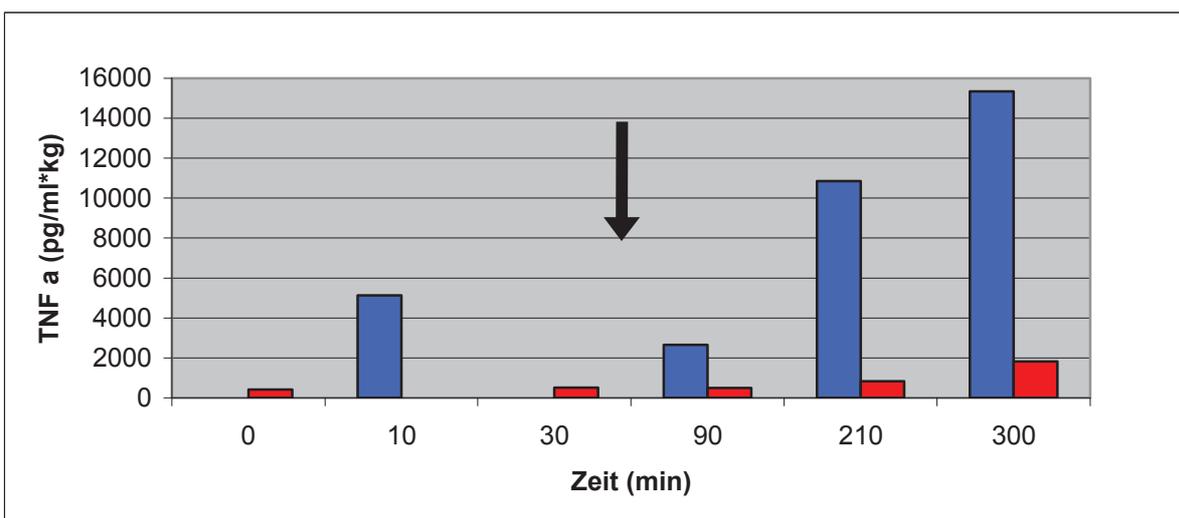


**Abbildung 4.10:** IL-6-Freisetzung bei hausstaubmilbenallergischer Probandin nach Hausstaubmilbenallergenzugabe (n=1)  
 IL-6 Konzentration berechnet als pg IL-6 pro ml Perfusat pro kg Plazentagewebe  
 Blau: Kotyledo mit Allergenzugabe (erfolgte nach 60 Minuten /Pfeil),  
 Hausstaubmilbenallergenkonzentration c = Der I: 4 $\mu$ g/ml, Der II: 2 $\mu$ g/ml  
 Rot: Kotyledo ohne Allergenzugabe

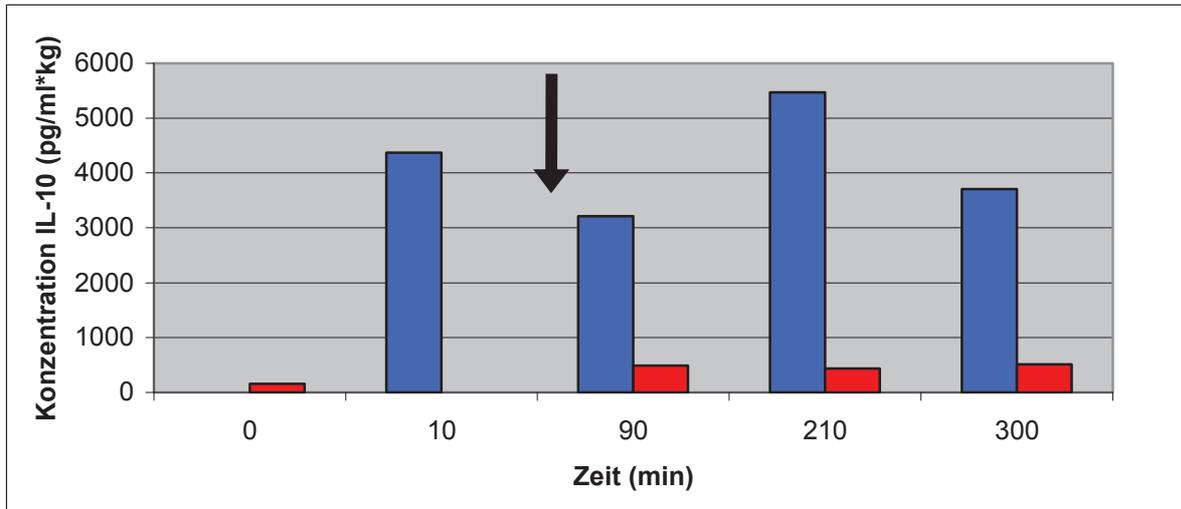


**Abbildung 4.11:** IL-10 Freisetzung bei hausstaubmilbenallergischer Probandin nach Hausstaubmilbenallergenzugabe (n=1)  
 IL-10 Konzentration berechnet als pg IL-6 pro ml Perfusat pro kg Plazentagewebe  
 Blau: Kotyledo mit Allergenzugabe (erfolgte nach 60 Minuten/Pfeil) c = Der I: 4 $\mu$ g/ml, Der II: 2 $\mu$ g/ml  
 Rot: Kotyledo ohne Allergenzugabe

Beim Vergleich der Reaktion auf Hausstaubmilbenallergenzugabe zeigt sich bei fast allen ermittelten Interleukinen eine deutliche höhere Sekretion im Plazentagewebe der diesbezüglich allergischen Schwangeren im Vergleich zur nichtallergischen Schwangeren (s. Abb. 4-12 bis 4-13).



**Abbildung 4.12:** TNF- $\alpha$  Sekretion unter Hausstaubmilbenallergenzugabe (c= DerI: 4 $\mu$ g/ml, Der II: 2 $\mu$ g/ml) zur Plazentaperfusion einer Hausstaubmilbenallergikerin im Vergleich zur Plazenta einer gesunden Schwangeren (n=2), Allergenzugabe nach 1 Stunde (Pfeil)  
 Blau: Hausstaubmilbenallergikerin  
 Rot: Gesunde Kontrollschwangere  
 Anm.: fehlende Balken resultieren aus nicht bestimmten Werten

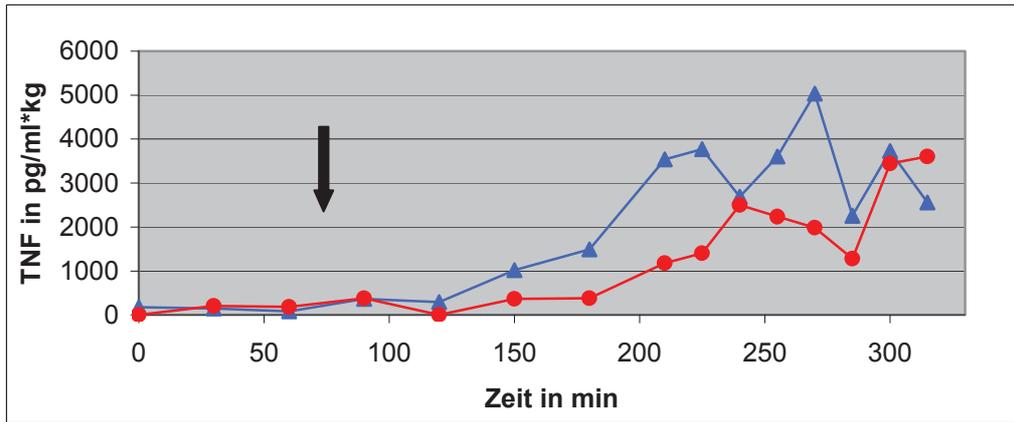


**Abbildung. 4-13:** IL-10 Sekretion unter Hausstaubmilbenallergenzugabe (Hausstaubmilbenallergenkonzentration c= Der I: 4 $\mu$ g/ml, Der II: 2 $\mu$ g/ml) zur Plazentaperfusion einer Hausstaubmilbenallergikerin im Vergleich zur Plazenta einer gesunden Schwangeren (n=2), Allergenzugabe nach 1 Stunde (Pfeil)  
 Konzentration IL-10 berechnet aus pg IL-10 pro ml Perfusat pro kg Plazentagewebe  
 Blau: Hausstaubmilbenallergikerin  
 Rot: Gesunde Kontrollschwangere  
 Anm.: fehlende Balken resultieren aus nicht bestimmten Werten

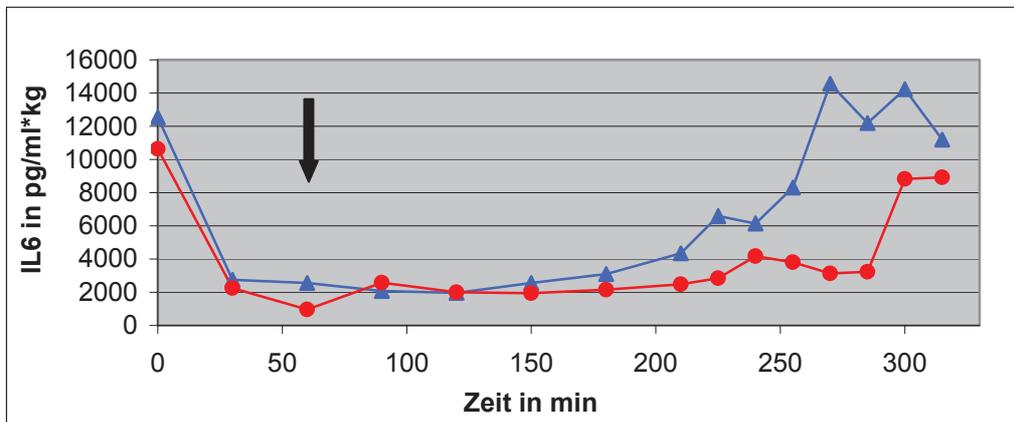
Allerdings ist diese erhöhte Freisetzung auch ohne Allergenzugabe nachweisbar, d.h. auch bei reiner Perfusionslösung analysierten wir bei der allergischen Patientin eine meist von Beginn höhere Konzentration an IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-10, IL-4 und IL-2, die einzelnen Werte lagen aber unter den Konzentrationsfreisetzungen nach Allergenkontakt.

#### 4.4.3. Interleukinfreisetzung nach Milcheiweißallergenzugabe bei Milcheiweißallergikerin

Bei diesen Versuchen zeigte sich nach Milcheiweißallergenzugabe in den Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-6 deutliche Erhöhungen nach Allergenzugabe als bei den Plazentagewebsperfusionsen, die nur mit reinem Perfusionsmedium gespült wurden. Diese Konzentrationsunterschiede ließen sich erst nach zwei Stunden nach Allergenzugabe bei TNF- $\alpha$  und nach ungefähr drei Stunden bei IL-10 feststellen (s. Abbildung 4.14. und 4.15).



**Abbildung 4-14:** TNF- $\alpha$  Sekretion während Plazentaperfusion einer Pat. mit Milcheiweißallergie (n=1)  
 TNF- $\alpha$ -Konzentration berechnet als pgTNF- $\alpha$  pro ml Perfusat pro kg Plazentagewebe  
 Blau: Milcheiweißallergenzugabe (nach einer Stunde/Pfeil, Konz. des Milcheiweißallergens 2,78 mg/ml)  
 Rot: ohne Allergenzugabe



**Abbildung 4-15:** IL-6 Sekretion während Plazentaperfusion einer Pat. mit Milcheiweißallergie (n=1)  
 Konzentration IL-6 berechnet als pg IL-6 pro ml Perfusat pro kg Plazentagewebe  
 Blau: Milcheiweißallergenzugabe (nach einer Stunde/Pfeil, Milcheiweißallergenkonzentration 2,78 mg/ml)  
 Rot: ohne Allergenzugabe

#### 4.4.4. Interleukinfreisetzung nach Zugabe von Compound 48/80

Nach Bolusapplikation von Compound 48/80 zum Perfusionsmedium des Kotyledos einer Nichtallergikerin konnte keine signifikante Erhöhung der Interleukine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, IL-4 und IL-2 beobachtet werden, es fanden sich ebenfalls keine Unterschiede zum Kontrollkotyledo, der nicht mit Compound 48/80 gespült wurde. (Daten nicht graphisch dargestellt).

4.5. Zytokinanfärbung (TNF- $\alpha$ ) in Plazentagewebebeobachten

Die folgende Abbildung (Abb. 4-16 a-d) zeigt die Verteilung von TNF- $\alpha$  nach Anfärbung durch einen entsprechenden polyklonalen Antikörper in perfundierten Gewebeschnitten der Plazenta. Diese Schnitte beinhalten zum größten Teil Zottengewebe.

Die vermehrte TNF- $\alpha$ -Sekretion tritt deutlich durch eine Braunanfärbung hervor.

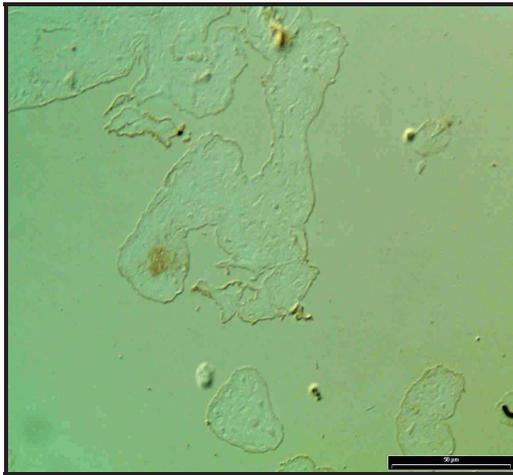


Abb. 4-16a.:

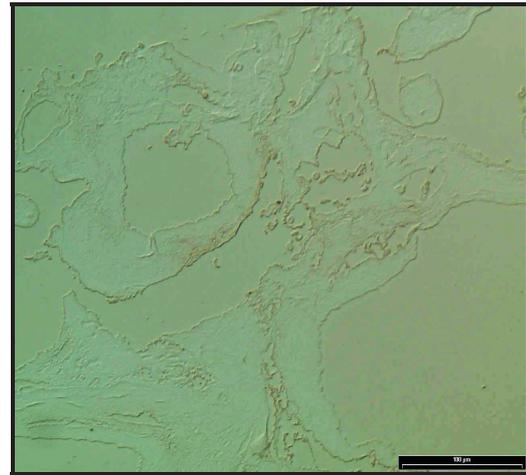


Abb. 4-16b.:

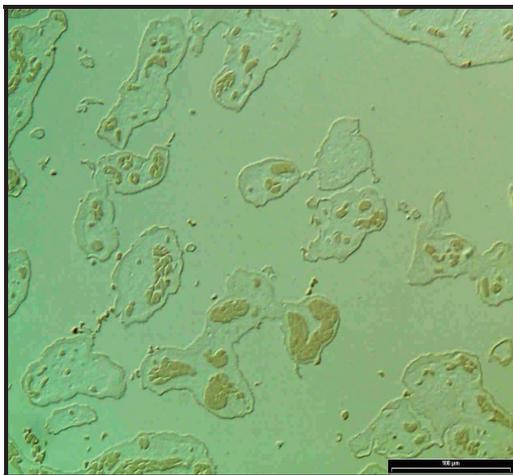


Abb. 4-16c.:

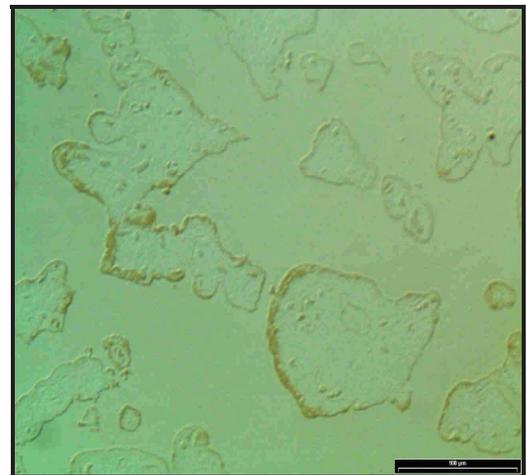


Abb. 4-16d.:

**Abb. 4-16 a-d**

- a - Plazentagewebe einer Apfelallergikerin mit Apfelallergen gespült
  - b - Plazentagewebe einer Apfelallergikerin ohne Apfelallergen gespült
  - c - Plazentagewebe einer Nichtallergikerin nach Spülung mit Apfelallergen
  - d - Plazentagewebe einer Nichtallergikerin ohne Apfelallergen gespült
- Vergrößerungen jeweils 20t fach

## 5. Diskussion

Das Ziel dieser Dissertation bestand darin, die Einflüsse eines Allergenkontaktes auf die Zytokinfreisetzung in der ex vivo perfundierten menschlichen Plazenta von allergischen und gesunden Patientinnen zu untersuchen.

Ausgangspunkt bildete die Hypothese des „Fetal Programming“, die bezogen auf allergische Erkrankungen, eine epigenetische Form der Allergieübertragung von der Mutter auf das Kind durch veränderte Einflüsse in utero vermutet. Diese durch Allergenkontakt veränderten Muster der Mediatorensekretion in der Plazenta wollten wir mit unseren Untersuchungen darstellen.

Als Allergen hierfür, das diese Veränderungen provozieren sollte, wählten wir zum einen das Apfelallergen Mal d1 aus, ein häufiges Nahrungsmittelallergen mit erheblicher Kreuzreaktivität zum inhalativen Birkenpollenallergen Bet v1. Dieses Allergen wurde durch Mitarbeiter unseres Plazentalabores und in Zusammenarbeit mit Kollegen des Instituts für Klinische Immunologie der Friedrich Schiller Universität hergestellt [Heinzelmann 2005]. Den Einfluss dieses Allergens testeten wir an Plazenten apfelallergischer Schwangerer im Vergleich zu nichtallergischen Kontrollpersonen. Die insgesamt Anzahl der Plazenten apfelallergischer Schwangerer fiel gering aus. Deshalb verwendeten wir weiterhin das Nahrungsmittelallergen  $\beta$ -Lactoglobulin und das häufig vorkommende Hausstaubmilbenallergen als inhalatives Allergen.

Da die Möglichkeit der Verwendung von Plazenten der für diese Versuche geeigneten allergischen Schwangeren auf ein geringes Maß begrenzt blieb, zeigte es sich notwendig, ein Perfusionsmodell mit möglichst geringer Ausschussrate zu generieren. Um dies zu ermöglichen, entwickelten wir das Modell der offenen einseitigen Plazentaperfusion. Dies gestattete die getrennte Perfusion zweier Kotyledonen einer Plazenta, der eine wurde unter Zugabe der gewünschten Allergene oder Compound 48/80, der andere nur mit reinem Perfusionsmedium perfundiert.

Die erwähnte Ausschussrate blieb minimal. Zusätzlich konnte damit eine interne Kontrolle ohne weitere notwendige neue Versuche eingerichtet werden. Beides erwies sich als Vorteil der neu entwickelten Methode. Desweiteren erhofften wir uns

durch die Kanülierung der dezidualen Seite der Plazenta mit dünnen Kanülen ein Erreichen des intervillösen Raumes unter Erhalt der fetomaternalen Grenzschicht. Die ermittelte Zytokinfreisetzung als Reaktion auf die Allergen Zugabe ließ allerdings keine Aussage zu, ob diese Sekretion von Immunzellen der fetalen oder der maternalen Seite stammte.

Die insgesamt Anzahl unserer verwendeten Plazenten allergischer Schwangerer blieb aus den bereits o.g. Gründen begrenzt. Zudem gestalten sich unsere Versuche sehr aufwendig bei langer Versuchsdauer und unterschiedlichen Versuchszeitpunkten (tags/nachts/Wochenende) je nach verfügbaren Plazenten. Außerdem waren die finanziellen Verhältnisse unseres Laborbudgets gerade bei preisintensiven Nachweisverfahren wie dem Cytometric Bead Array zur Analyse der Zytokine begrenzt, so dass wir uns auf eine geringe Anzahl auch an Kontrollplazenten beschränkt haben. Weitere Versuche hierzu wurden durch nachfolgende Arbeitsgruppen unseres Labors durchgeführt (Plazentaperfusion mit Plazenten von Apfelallergikerinnen und gesunden Schwangeren) und zeigten hier auch ähnliche Ergebnisse (s. Ergänzung zur statistischen Auswertung mit beschreibenden Auszügen aus der Publikation von Uta Enke [Enke et al 2014] im Anhang Seite XIV-XV).

Um das sezernierte Histamin in unseren gesammelten Perfusionsproben messen zu können, verwendeten wir die Methode der fluoreszenzphotometrischen Analyse des Histamins nach Friemel [Friemel et al 1991]. Hierzu nahmen wir vorab Änderungen vor, die diese Methode an die Bedingungen unserer Versuche (Perfusionsmedium) anpassten. So wurde die Extraktion des Histamins aus dem Perfusionsmedium verfeinert, ebenso konnte das Histamin-OPT-Derivat durch eine höher molekulare Säure gefestigt und die Sensitivität des gesamten Verfahrens durch Anpassung der Wellenlänge erhöht werden.

Histamin selbst spielt eine zentrale Rolle bei allergischen aber auch inflammatorischen Erkrankungen und wird hierbei durch Immunzellen wie Mastzellen über den IgE-Rezeptor FcεRI in großer Menge sezerniert [Menzies et al 2011, Metcalfe et al 1997]. Eine hohe Histaminfreisetzung aus placentaren Mastzellen wiesen wir in unserer Studie durch Zugabe des Mastzelldegranulators Compound 48/80 zur Perfusion nach.

Die Sekretion von Botenstoffen aus Mastzellen wurde bereits durch einige Forschergruppen beschrieben, so wies eine Studie indirekt die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen der Plazenta nach, indem hier ein Abfall der Histaminkonzentration in plazentarem Gewebe nach 90-minütiger Perfusion mit ANP (Atriales Natriuretisches Peptid) beobachtet wurde [Szukiewicz et al 2001]. Eine andere Arbeitsgruppe beschrieb Mastzelldegranulation in Plazenten von Mäusen durch vermehrten stressbedingten Anstieg von Substanz P [Markert et al 1997]. Weiterhin ist bekannt dass isolierte uterine Mastzellen nach IgE-Stimulation über ihren Rezeptor FcεRI Histamin sezernieren können [Massey et al 1991].

Histamin ist ebenfalls im Schwangerschaftsverlauf ein bedeutender Stoffwechselmediator, unter anderem sub partu durch Induktion von Myometriumkontraktionen, indem es die Synthese von Prostaglandinen fördert [Garfield et al 2006]. Allerdings finden sich in der aktuellen Literatur keine Hinweise auf einen Zusammenhang von Frühgeburtlichkeit und Allergien durch Histaminsekretion. Somit wird wahrscheinlich die Aktivität der Mastzellen bzw. auch des Histamins in uterinen und plazentaren Zellen genau gesteuert [Menzies et al 2001, Bytautiene et al 2008, Woidacki et al 2014]. Es wurde festgestellt, dass das Vorliegen einer mütterlichen Allergie während der Schwangerschaft mit längerer Schwangerschaftsdauer, höheren Geburtsgewichten [Somoskovi et al 2007] und vermindertem Risiko von Frühgeburtlichkeit einhergeht [Savilahti et al 2004]. Diese Erkenntnisse sprechen demnach eher für eine günstige Auswirkung auf den Schwangerschaftsverlauf, welchen Einfluss dabei jedoch Histamin innehat bleibt unklar. Maternales IgE wurde bereits in der Plazenta vornehmlich im Bereich der fetalen Hofbauerzellen (Makrophagen) in den Zotten beschrieben, man weiß allerdings noch nicht viel über die mögliche Bindung an Mastzellen [Rindsjo et al 2010].

Im weiteren Verlauf unserer Experimente erwarteten wir auch eine Erhöhung der Histaminsekretion nach Zugabe der verschiedenen Allergene zu den Plazenten der Allergikerinnen. Dieses konnten wir allerdings nicht bestätigen, es fanden sich nur geringe Konzentrationen an Histamin in der Analyse. Zusätzlich wiesen die Messwerte erhebliche Schwankungen und keine wesentlichen Unterschiede zu den Kontrollversuchen ohne Allergenzugabe auf.

Als mögliche Ursache hierfür könnte sprechen, dass zu wenig bioaktives Allergen die Mastzellen in unseren Versuchsplazenten erreichte, sei es aufgrund zu geringer

Allergenkonzentration durch Verdünnung oder durch Transporthindernisse der plazentaren Gewebeschränken. Ebenfalls könnte eine eingeschränkte Stabilität der Allergene, durch lokale Gewebefaktoren oder durch Bedingungen im Perfusionsmedium verursacht, eine Rolle spielen [Rudeschko et al 1995, Enke et al 2014]. Als weitere mögliche Erklärung hierfür auf zellulärer Ebene könnte sprechen, dass sezerniertes Histamin zügig an Histaminrezeptoren der Zielzellen gebunden wird und damit nicht mehr in unseren Versuchproben als freier Mediator nachzuweisen war. Solche Rezeptoren sind zum Beispiel der Histaminrezeptortyp HR1, der auf Zellen der Synzytiotrophoblasten nachgewiesen wurde [Matsuyama et al 2006]. Die Zugabe von Compound 48/80 führt zu einer raschen Freisetzung einer erheblichen Menge an Histamin, welches womöglich nicht schnell genug an die Zielrezeptoren gebunden werden kann und demnach noch ausreichend in den Perfusionsproben nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu führt eine Allergenzugabe möglicherweise nur zu einer geringeren Sekretion von Histamin, welches durch Bindung schneller aus dem Medium entfernt und deswegen durch unsere Analyse nicht ausreichend bestimmt werden konnte. Eine weitere Erklärung für die aufgetretenen Schwankungen bei der Histaminanalyse nach Allergenkontakt kann in der Methode des Nachweisverfahrens gesehen werden mit dafür wahrscheinlich zur geringer Sensitivität ( $< 5\text{ng/ml}$ ). Weiterhin lässt sich auch die sehr aufwendige Methode der Histaminextraktion aus der Perfusionslösung, als womöglich ebenfalls ursächlich für solche Anfälligkeiten der Messergebnisse anführen.

Zusätzlich zum Histamin erfolgte die Analyse weiterer Zytokine. Als Methode hierfür wählten wir für unsere Bestimmungen einen Cytometric Bead Array der Firma BD Bioscience. Wir konzentrierten uns dabei auf die Analyse der TH1- Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 sowie IL-4, IL-6 und IL-10 als Zytokine vom TH2-Typ. Dabei zeigte sich bezüglich der Bestimmung von TNF- $\alpha$  eine deutliche Sekretionserhöhung nach Apfelallergen zugabe bei Apfelallergikerinnen schon nach 60 Minuten, bei Nichtallergikerinnen erst nach 200 Minuten und in geringerem Ausmaße. Diese Beobachtungen konnten wir auch nach Hausstaubmilbenallergen zugabe zur Perfusionsanordnung bei einer entsprechenden Allergikerin feststellen, allerdings nicht in der gleichen Intensität.

TNF- $\alpha$  ist eines der bedeutendsten proinflammatorischen Zytokine, welches hauptsächlich von Makrophagen/Monozyten, TH1-Zellen und einigen TH2-Zellen

gebildet wird. Bekannt ist, dass es aus Mastzellen der Plazenta sezerniert werden kann [Markert et al. 1997]. Weiterhin wurde untersucht, dass dieses Zytokin auch in anderen Geweben während einer Schwangerschaft produziert wird, wie den Eierstöcken [Roby et al 1990], im Endometrium [Hunt et al 1992], in der Plazenta [Yelavarthi et al 1991] und im Fetus selbst [Zolti et al 1991].

TNF- $\alpha$  bewirkt unter anderem die Aktivierung von B- u. T-Lymphozyten, sowie von Makrophagen und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Auslösung von Entzündungsreaktionen und in der Freisetzung weiterer Zytokine. Desweiteren besitzt TNF- $\alpha$  auch eine unterstützend pathogene Wirkung bei allergischen Erkrankungen wie Asthma und anderen Hypersensibilitätserkrankungen [Berry et al 2007, Thomas et al 1995, Li Kam Wa et al 1999]. Weiterhin spielt TNF- $\alpha$  eine bedeutende Rolle bei Vorgängen des programmierten Zelltodes (Apoptose) in der Plazenta [Dealtry et al 2000]. In vitro Versuche zeigten auch, dass bei längerem Einfluss von Hypoxie die Produktion von TNF- $\alpha$  sowie IL-1 durch die Chorionzotten der Plazenta gesteigert wird [Benyo et al 2001, Wang et al 1996]. Durch verschiedene Studien wurde nachgewiesen, dass TNF- $\alpha$  bei normalen Schwangerschaftsverläufen erhöht im Plazentagewebe und im Fruchtwasser vorkommt [Maymon et al 1999, Kharfi et al 2006, Haider et al 2009], welches sich auch in unseren Ergebnissen zeigte.

Für den signifikanten Anstieg von TNF- $\alpha$  nach Allergenzugabe in den Perfusionsproben aus Plazenten allergischer Mütter lässt sich keine genaue Erklärung finden. Die Vermutung liegt zwar nahe, dass dies durch allergische Reaktionen mit TNF- $\alpha$  Freisetzung vermittelt sein kann, einen Beweis dafür können wir mit unseren Untersuchungen nicht liefern. Möglich wäre auch eine Art Stressreaktion auf die Allergenzufuhr, die sich in einer Konzentrationserhöhung von TNF- $\alpha$  äußern kann. Diese These wird in den Studien von Argiles et al. untersucht, die aufzeigten, dass eine erhöhte Belastung durch Stress zu einer vermehrten Sekretion von TNF- $\alpha$  in der Plazenta führt [Argiles et al 1997]. Weiterhin ist auch bekannt dass risikoreiche Schwangerschaftsverläufe wie Aborte, Frühgeburtlichkeit und Präeklampsie mit verstärkter TNF- $\alpha$  Sekretion in u.a. der Plazenta und im Fruchtwasser einhergehen [Brogin Moreli et al 2012, Calleja-Agius et al 2012].

Es könnte sich auch um eine Abwehrreaktion auf ein fremdes Antigen handeln im Sinne eine Entzündungsreaktion, da auch bei Nichtallergikerinnen nach

Allergenkontakt die TNF- $\alpha$  Sekretion zwar später und in geringerem Maße, aber doch deutlich vernehmbar gesteigert wurde.

Unsere Versuche wiesen ebenfalls nach, dass auch die andere Zytokine, wie IL-10 und IL-6 einen Anstieg nach Allergenkontakt ähnlich wie TNF- $\alpha$ , allerdings nach längerer Zeit und nicht in derselben Intensität, aufwiesen.

IL-10 wird vornehmlich von Makrophagen, TH1- sowie TH2-Zellen gebildet und wirkt antiinflammatorisch, da es die Zytokinsekretion von Monozyten/Makrophagen und TH1-Zellen und damit auch die Freisetzung von TNF- $\alpha$  supprimiert. Desweiteren unterdrückt es die TH1-Zellen und fördert die Bildung der TH2-Zellen [Janeway 2005]. In Versuchen mit isolierten Plazentazellkulturen aus terminnahen Kaiserschnitten konnte gezeigt werden, dass IL-10 und IL-4 antiinflammatorisch durch Hemmung u.a. der TNF- $\alpha$  Sekretion wirken. [Goodwin et al 1998, Roth et al 1996].

Warum IL-10 in unseren Versuchen erst nach deutlicher Zeitverzögerung zum TNF- $\alpha$  sezerniert wurde, lässt sich allerdings nicht erklären.

IL-6 wird ebenfalls wie IL-10 von Makrophagen und auch TH2-Zellen produziert. Letztere stimulieren so eine humorale Infektabwehr oder eben eine allergische Reaktion auf ein auslösendes Antigen. IL-6 wirkt positiv auf die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Antikörper produzierenden Plasmazellen sowie co-stimulierend auf die Entwicklung der T-Zellen [Janeway 2005].

Eine erhöhte Sekretion dieser beiden Interleukine in unseren Versuchen bei Plazenten allergischer Mütter kann im Zusammenhang mit einer allergietypischen TH2-Zell betonten Reaktion gesehen werden. Einen weiteren Beweis für eine allergenvermittelte Reaktion liefert eine andere Arbeitsgruppe, die die Bedeutung von IL-6 im Zusammenhang mit allergischen Reaktionen untersuchte. Hier wurde die Reaktion von T-Zellkulturlinien in vitro nach Stimulation mit einem Modellallergen getestet. Nach Allergenkontakt wurde eine stark erhöhte Produktion von IL-6 festgestellt und nach einiger Zeit auch die von IL-4, welches sich supprimierend auf die IL-6-Sekretion auswirkte [Liebers et al 2000].

Betrachtet man nur die vermehrte Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 nach allergener Stimulation in Plazenten allergischer Mütter, lässt

dies den Schluss zu, dass es sich hierbei generell um gesteigerte inflammatorische Reaktionen handelt [Enke et al 2014].

So wurde durch inhalative Allergene eine erhöhte Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-6 aus Epithelzellen der Atemwege, Alveolarmakrophagen und Monozyten sowie Makrophagen beobachtet. Dies deutet an, dass Allergene als Frühreaktion proinflammatorische Immunreaktionen hervorrufen [Vroiling et al 2007, Chen et al 2003, Andersson Lundell et al 2005]. IL-6 und TNF- $\alpha$  gelten zwar nicht als die Zytokine, die starke TH2-basierte Immunreaktionen hervorrufen, aber in Versuchen mit Mäusen wurde nachgewiesen, dass Alveolarmakrophagen, die durch Hausstaubmilbenallergen angeregt wurden, T-Zellproliferation und TH2-Zellentwicklung durch u.a. Sekretion von IL-6 und TNF- $\alpha$  fördern. Dies deutet eine mögliche bedeutende Funktion dieser Zytokine in allergischen Reaktionen an [Chen et al 2003, Enke et al 2014].

Eine andere Studie wies eine erhöhte Sekretion von IL-6 im Nabelschnurblut bei Geburtsverläufen nach, bei denen sich histologisch Zeichen für inflammatorische Prozesse wie Chorioamnionitis fanden [Duncombe et al 2010].

Unsere Versuche allerdings zeigten auch, dass wir in keinem der Experimente eine signifikante Erhöhung von IL-4, weder nach Allergenkontakt bei Plazenten allergischer Mütter noch im Vergleich zum Kontrollkötyledo ohne Allergenzufuhr, feststellen konnten. IL-4 stellt einen der wichtigsten Mediatoren bei allergischen Erkrankungen dar und wird hauptsächlich durch TH2-Zellen und Mastzellen produziert. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass dieses Zytokin erst zeitverzögert nach der Sekretion anderer Interleukine freigesetzt wird und dass unsere Perfusionen über 300 min Dauer dafür keinen ausreichend langen Zeitraum bildeten. Weiterhin möglich ist auch, dass schlicht die Sensitivität unserer eingesetzten Nachweismethode zu gering ausfiel zur Feststellung von signifikanten Konzentrationsunterschieden. Ebenfalls könnte eine rasche Bindung von IL-4 an Zielzellen als ursächlich für eine unzureichende Analyse anzusehen sein.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte in Analysen von plazentarem Gewebe in Terminnähe von komplikationslosen Schwangerschaftsverläufen keine signifikante Expression von IL-4 mittels ELISA oder immunhistochemische Untersuchungen feststellen [Hanna et al 2000]. Jones et al konnten ebenfalls kein IL-4, dafür aber IL-10 und IFN- $\gamma$  aus deziduaem Gewebe fortgeschrittenen Schwangerschaftsalters detektieren [Jones et al 1997].

Bezüglich IL-2 und IFN- $\gamma$  fanden sich keine relevanten Konzentrationsunterschiede nach Allergenkontakt. Zu erwarten gewesen wäre eine verminderte Ausschüttung, da es sich um TH1-Zytokine handelt. Dass eine Allergenstimulation zu einer TH2-basierten Zytokinexpression führt, ist durch viele bereits erwähnte Arbeitsgruppen nachgewiesen worden, u.a. auch in Experimenten mit allergenstimulierten schwangeren Mäusen, welches zu einer erniedrigten IFN- $\gamma$ -Produktion führte [Uthoff et al 2003].

Desweiteren analysierten wir die Freisetzung der o.g. Interleukine nach Bolusapplikation von Compound 48/80 in der Plazenta einer Nichtallergikerin. Hier zeigten sich weder eine Erhöhung in der Freisetzung von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4 und IL-2, noch ein Unterschied zum Kontrollkötyledo ohne Zusatz von Compound 48/80, ganz im Gegensatz zur deutlich gesteigerten Histaminfreisetzung in diesem Versuch. Dies könnte dafür sprechen, dass in diesem Falle die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-6 nicht durch Mastzellen freigesetzt werden, obwohl in anderen Studien bewiesen wurde, dass Mastzellen generell TNF- $\alpha$  und IL-6 nach Stimulation mit Compound 48/80 ausschütten können [Kruger-Krasagakes et al 1999, Kulka et al 2008, Gibbs et al 2001, Kim et al 2007]. Damit lässt sich durch unsere Versuche allein nicht die These aufstellen, dass Mastzellen der Plazenta kein TNF- $\alpha$  oder IL-6 ausschütten können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass allergeninduzierte Mastzelldegranulation und Zytokinfreisetzung in der Plazenta stattfinden können. Die erhöhten Konzentrationen von IL-6 und TNF- $\alpha$  nach Allergenkontakt in Plazenten allergischer Mütter im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen bei Nichtallergikerinnen deuten eine gesteigerte proinflammatorische Immunreaktion gegenüber unseren gewählten Allergenen, insbesondere dem Apfelallergen an.

Diese Vorgänge könnten an der Prägung der fetalen Immunantwort gegenüber Allergenen beteiligt sein.

**6. Literaturverzeichnis**

- Aberg N et al. 1995. Increase of asthma, allergic rhinitis and eczema in Swedish schoolchildren between 1979 and 1991.  
Clin Exp Allergy, 25(9): p. 815-9
- Andersson Lundell AC et al. 2005. Cat allergen induces proinflammatory responses by human monocyte-derived macrophages but not by dendritic cells.  
Allergy, 60(9): p. 1184-91
- Argiles JM, Carbo N, Lopez-Soriano FJ. 1997. TNF and pregnancy: the paradigm of a complex interaction. Cytokine and Growth Factor Reviews 8: 181-188
- Asher MI et al. 2006. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys.  
Lancet, 368(9537): p. 733-43
- AWMF- Leitlinien-Register. Stand 8/2009. In-vitro-Allergiediagnostik. Nr. 061/017
- Baban B, Chandler P, McCool D, Marshall B, Munn DH, Mellor AL. 2004. Indoleamine 2,3 dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. J Reprod Immunol; 61: 67-77
- Barker DJ. 1998. In utero programming of chronic disease.  
Clin Science; 95:115-128
- Barker DJ et al. 1993. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life.  
Br Med J; 306:422-426

- Bauer TM. 2011. Inhibition der allogenen T-Zell Antwort durch Indoleamine 2,3-Dioxygenase-exprimierende dendritische Zellen: Tryptophan Metaboliten als Ursache der Suppression und deren Wirkung „in vivo“, Diplomarbeit Biotechnologie: FH Mannheim
- Beinder E. 2002. Fetal programming- Folgen intrauteriner Einflüsse auf die spätere Gesundheit. Aus: Plazenta-Physiologie und Klinik, Hrsg. Schleußner E, Seewald HJ
- Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. 2001. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* Jun;86(6):2505-12
- Berry M, Brightling C, Pavord I, Wardlaw A. 2007. University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham B15 2TT, UK: TNF-alpha in asthma. *Curr Opin Pharmacol.* Jun;7(3):279-82. Epub 2007 May 1
- Billington WD. 2003. The immunological problem of pregnancy: 50 years with the hope of progress. A tribute to Peter Medawar. In: *J. Reprod. Immunol.* 60, Nr. 1, Oktober, S. 1–11
- Björkstén B. 1994. Risk factors in early childhood for the development of atopic diseases. *Allergy* 49: 400-407
- Boyd JD, Hamilton W: *The human placenta.* Heffers, Cambridge 1970; Kaufmann P, Castellucci MD: Extravillous trophoblast in the human placenta. *Troph Res* 10(1997) 21
- Brogini Moreli J, Ana Maria Cirino Ruocco AM, Joice Monaliza Vernini JM, Marilza Vieira Cunha Rudge MV and Iracema Mattos Paranhos Calderon IM. 2012. Interleukin 10 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in Pregnancy: Aspects of Interest in Clinical Obstetrics; *ISRN Obstetrics and Gynecology*, vol. 2012, Article ID 230742, 5 pages.

- Bufe A. Abwehr aus dem Gleichgewicht: Allergie durch Grippeviren. 2001.  
Medrubin: 11-15
- Bühling KJ, Lepenies J, Witt K. 2000. Allgemeine und spezielle Pathologie.  
2. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München
- Bullens DM, Van den Keybus C, Dilissen E, Kasran A, Ceuppens JL. 2004. Allergen-specific T cells from birch-pollen-allergic patients and healthy controls differ in T helper 2 cytokine and in interleukin-10 production.  
Clin Exp Allergy 34: 879-887
- Burr ML, Butland BK, King S, Vaughan-Williams E. 1989. Changes in asthma prevalence: two surveys 15 years apart.  
Arch. Dis. Child. 64: 1452 - 1456
- Bytautiene E, Vedernikov YP, Saade GR, Romero R, Garfield RE. 2008  
IgE-independent mast cell activation augments contractility of nonpregnant and pregnant guinea pig myometrium. Int Arch Allergy Immunol 147(2):140–610
- Calleja-Agius J, Muttukrishna S, Jauniaux E. 2012. The role of tumor necrosis factor-receptors in pregnancy with normal and adverse outcome. International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research 2012:4 1–15
- Chen CL et al. 2003. House dust mite *Dermatophagoides farinae* augments proinflammatory mediator productions and accessory function of alveolar macrophages: implications for allergic sensitization and inflammation. J Immunol. 170(1): p. 528-36.
- Clark DA, Arck PC, Chaouat G. 1999. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. Am J Reprod Immunol 41: 5-22

- Coombs RRA, Gell PGH. 1963. Clinical Aspects of Immunology. Blackwell, London
- Croner S, Kjellman N.-J.M. 1990. Development of allergic disease in relation to family history and cord blood IgE levels. Eleven years follow up in 1654 children. *Pediatr Allergy Immunol* 1: 14-20
- Croy BA et al. 1997. Histological studies of geneablated mice support important functional roles for natural killer cells in the uterus during pregnancy. *J REprod Immunol*; 35:111-133
- Dealtry GB, O'Farrell MK, Fernandez N. 2000. The TH2 Cytokine Enviroment of the Placenta, *Int Arch Allergy Immunol* 123: 107-119
- Denison FC, Kelly RW, Calder AA, Riley SC. 1998. Cytokine secretion by human fetal membranes, deciduas and placenta at term. *Hum Reprod*; vol 13 no 12, 3560-3565
- Douwes J et al. 2008. Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema. *Eur Respir J.* 32(3): p. 603-11
- Dudenhausen W, Obladen M. 2008. *Praktische Geburtshilfe*, 20.Auflage.  
Walter de Gruyter Verlag
- Duncombe G, Veldhuizen RA, Gratton RJ, Han VK, Richardson BS. 2010.  
IL-6 and TNF alpha across the umbilical circulation in term pregnancies: relationship with labour events.  
*Early Hum Dev*;86:113-7
- Edelbauer M et al. 2004. Maternally delivered nutritive allergens in cord blood and in placental tissue of term and preterm neonates.  
*Clin Exp Allergy* 34(2):189-193
- Edelbauer M et al. 2003. Dose dependent and preterm-accentuated diaplacental transport of nutritive allergens in vitro.  
*Int Arch Allergy Immunol* 130(1): 25-32

- Edenharter G, Bergmann RL, Bergmann KE et al. 1998. Cord blood-IgE as risk factor and predictor for atopic diseases. *Clin Exp Allergy*; 28:671-678
- Ege MJ et al. 2006. Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol.* 117(4): p. 817-23
- Enke U Abelius M, Varosi F, Hoyer H, Schleussner E, Jenmalm M and Markert UR. 2014. Placental immune response to apple allergen in allergic mothers. *Journal of Reproductive Immunology*, (106),100-109
- Fournel S et al. 2000. Comparative reactivity of different HLA-G monoclonal antibodies to soluble HLA-G molecules. *Tissue Antigens*; 55:510-518
- Friemel H. 1991: *Immunologische Arbeitsmethoden*: 392-397
- Garfield RE, Irani AM, Schwartz LB, Bytautiene E, Romero R. 2006. Structural and functional comparison of mast cells in the pregnant versus nonpregnant human uterus. *Am J Obstet Gynecol.* Jan; 194(1):261-7
- Gibbs, BF et al. 2001. Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF-alpha and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues. *Exp Dermatol.* 10(5): p. 312-20
- Goodwin VJ, Sato TA, Mitchell MD, Keelan JA. 1998. Anti-inflammatory Effects of Interleukin-4, Interleukin-10, and Transforming Growth Factor- $\beta$  on Human Placental Cells In Vitro. *American Journal of Reproductive Immunology*. Volume 40, Issue 5: pages 319–325
- Goth A. 1975. Effect of drugs on mast cells. Selective release of histamine from rat mast cells by compound 48-80 and antigen/ Goth A. 1967. Effect of drugs on mast cells. *Adv Pharmacol.* 5:47–78

- Grüber C et al. 2002. Zehn Jahre Multizentrische Allergiestudie MAS-90. Pädiatrische Allergologie 3: 6-10
- Haider S, Knöfler M. 2009. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. Placenta Feb; 30(2):111-23. Epub 2008 Nov 22
- Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, Padbury J and Sharma S. 2000. Gestational Age-Dependent Expression of IL-10 and Its Receptor in Human Placental Tissues and Isolated Cytotrophoblasts. J Immunol; 164;5721-5728
- Heinzelmann J. 2005. Allergenstimulierte Mediatorfreisetzung in humanen Plazenten, Diplomarbeit: FSU Jena
- Herz U, Renz H. 2003 Die immunologische Basis der frühkindlichen Immundelevation. Monatsschr Kinderheilkd 151: 5-9
- Herz U, Joachim R, Ahrens B, Scheffold A, Radbruch A Renz H. 2001. Allergic sensitization and allergen exposure during pregnancy favor the development of atopy in the neonate. Int Arch Allergy Immunol 124 (1-3): 193-196
- Herz U et al. 2000. The influence of infections on the development and severity of allergic disorders. Curr Opin Immunol.12/ 2000: 632-640
- Holloway JA et al. 2000. Detection of house-dust-mite allergen in amniotic fluid and umbilical-cord blood. Lancet 356(9245): p. 1900-2
- Holmes CH et al. 1990. Preferential expression of the complement regulatory protein decay accelerating factor at the fetomaternal interface during human pregnancy. J Immunol;144:3099-3105

- Holt PG, Jones CA. 2000. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy* 55: 688-697
- Holt PG et al. 1995. Environmental factors and priming T-cell sensitisation to inhalant allergens in infancy: reappraisal of the role of infections and air pollution. *Pediatr Allergy Immunol* 6: 1-10
- Hunt JS, Chen HL, Hu XL, Tabibtadeh S. 1992. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA and protein in human endometrium. *Hum Biol Reprod*; 47: 141-147
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2005. *Immunobiology, the immune system in health and disease*. 6<sup>th</sup> edition. Published by Garland Science publishing.
- Jenmalm MC, Bjorksten B, 1998. Development of the immune system in atopic children. *Pediatr Allergy Immunol*. 9(11 Suppl): p. 5-12
- Johnson CC, Ownby DR and Peterson EL. 1996. Parental history of atopic disease and concentration of cord blood IgE. *Clin Exp Allergy*, 26(6): p. 624-9
- Jones CA, Finlay-Jones JJ, Hart PH. 1997. Type-1 and Type-2 Cytokines in Human Late-Gestation Decidual Tissue'. *Biology of Reproduction* 57, 303-311
- Kharfi A, Bureau M, Giguère Y, Moutquin JM, Forest JC. 2006. Dissociation between increased apoptosis and expression of the tumor necrosis factor-alpha system in term placental villi with preeclampsia. *Clin Biochem*. Jun;39(6):646-51. Epub 2006 Feb 23
- Kim EK et al. 2007. Lithospermi radix extract inhibits histamine release and production of inflammatory cytokine in mast cells. *Biosci Biotechnol Biochem*,. 71(12): p. 2886-92
- King A et al. 2000. Recognition of trophoblast HLA Class I molecules by decidual NK Cell receptor- A review. *Placenta*; 21:81-85

- Kondo N et al. 1998. Reduced interferon gamma production by antigen-stimulated cord blood mononuclear cells is a risk factor of allergic disorders--6-year follow-up study. *Clin Exp Allergy*. 28(11): p. 1340-4
- Kruger-Krasagakes S et al. 1999. Adhesion of human mast cells to extracellular matrix provides a co-stimulatory signal for cytokine production. *Immunology*, 98(2): p. 253-7
- Kulka M et al. 2008. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology*.123(3): p. 398-410
- Lampi, J et al. 2011. Farming environment and prevalence of atopy at age 31: prospective birth cohort study in Finland. *Clinical & Experimental Allergy*. Volume 41, Issue 7, pages 987–993
- Leber A 2011. Untersuchungen zur Generierung, Migration und Funktion von Regulatorischen T-Zellen in der Schwangerschaft. Dissertation, Fachbereich Biologie: Humboldt-Universität Berlin
- Le Bouteiller et al. 2000. HLA-G in the human placenta: expression and potential functions. *Biochem Soc Trans*;28:208-212
- Lehtovirta M, Kaprio J, Forsblom C, Eriksson J, Tuomilehto J, Groop L., 2000. Insulin sensitivity and insulin secretion in monozygotic and dizygotic twins. *Diabetologia*, 43, 285-293
- Liebers V, Gellert, B. Raulf-Heimsoth M, Baur X. 2000. Zusammenhang von Zytokinrelation und T-Zell-Rezeptor-Expression bei Allergikern. *Atemw.-Lungenkrkh*. 26: S. 369-370
- Li Kam Wa TC, Mansur AH, Britton J, et al. 1999. Association between -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism and bronchial hyperreactivity in asthma. *Clin Exp Allergy*; 29:1204-1208

- Liu CA et al. 2003. Prenatal prediction of infant atopy by maternal but not paternal total IgE levels. *J Allergy Clin Immunol.* 112(5): p. 899-904
- Loibichler C, Piehler J, Gerstmayr M, Bohle B et al. 2002. Materno-fetal passage of nutritive and inhalant allergens across placenta of term and pre-tem deliveries perfused in vitro. *Clin Exp Allergy* 32:1546-1551
- Macaubas C et al. 2003. Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at the age 6 years. *Lancet* 362(9391): 1192-1197
- Magnusson CG. 1988. Cord serum IgE in relation to family history and as predictor of atopic disease in early infancy. *Allergy.* 43(4): p. 241-51
- Markert UR. 2002. Immunologie der fetomaternalen Granzfläche. *Plazenta-Physiologie und Klinik*, Hrsg. Schleußner E., Seewald HJ
- Markert UR, Arck PC, Mc Bey BA, Manuel J, Croy BA, Marshall JS, Chaouat G, Clark DA. 1997. Stress triggers abortions are associated with alterations of granulated cells in the deciduas. *AJRI* 37: 94-100
- Massey WA et al. 1991. Human uterine mast cells. Isolation, purification, characterization, ultrastructure, and pharmacology. *J Immunol.* 147(5): p. 1621-7
- Matsuyama K, Ichikawa T, Nitta Y1, Ikoma Y, Ishimura K, Horio S, Fukui H. 2006. Localized Expression of Histamine H1 Receptors in Syncytiotrophoblast Cells of Human Placenta. *J Pharmacol Sci* 102, 331 – 337
- Maymon E, Ghezzi F, Edwin SS, Mazor M, Yoon BH, Gomez R & Romero R. 1999. The tumor necrosis factor alpha and its soluble receptor profile in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 181, 1142–1148

- Medici F, Hawa M, Pyke DA, Leslie RD,, 1999. Concordance rate for type II diabetes mellitus in monozygotic twins: actuariel analysis. Diabetologia, 42, 146-150
- Menzies FM, Shepherd MC, Nibbs RJ, Nelson SM. 2011. The role of mast cells and their mediators in reproduction, pregnancy and labour. Hum Reprod Update. May-Jun;17(3):383-96
- Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. 1997. Mast cells. Physiol Rev. 77(4): p. 1033-79
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT et al. 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Science (journal). 281/ 5380: p.1191–3
- Nilsson L, Castor O, Löfman O, Magnusson A, Kjellman N-IM. 1999. Allergic disease in teenagers in relation to urban or rural residence at various stages of childhood. Allergy 54: 716-712
- Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. 2001. Implantation and the survival of early pregnancy. N Engl J Med. 345:1400-1408
- Phillips et al. 1998. Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome? J Clin Endocrinol Metab;83:757-760
- Phillips DI, Barker DJ. 1997. Association between low birthweight and high resting pulse in adult life. Diabet. Med.;14:673-677
- Piper W. 2007. Innere Medizin. 1. Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg
- Popescu M, Houzer A, Heinrich J. 1996. Wohnen in zentralbeheizten Betonplatten-Bauten ist assoziiert mit einer höheren Pollen-Sensibilisierung 22.09.2004.2S

- Prescott SL et al. 1999. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 353(9148): p. 196-200
- Rajagopalan S, Long EO. 1999. A human histocompatibility leukocyte antigen-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med*; 189:1093-11009
- Renz H, Biedermann, T., Bufe, A., Eberlein, B., Jappe, U., Ollert, M., et al. 2009. In-vitro-Allergiediagnostik. Abgerufen am 04. Oktober 2011 von Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF)
- Riedler J. et al. 2001. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey; *The Lancet* 358: 1129-1133
- Rindsjo E et al. 2010. IgE in the human placenta: why there? *Allergy*, 65(5): p. 554-60
- Ring et al. 2001. Why are allergies increasing? *Curr Opin Immunol* 13:701-708.11
- Rivest S et al. 2000. How the Blood Talks to the Brain Parenchyma and the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus During Systemic Inflammatory and Infectious Stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med*; 223(1):22-38
- Roby KF, Weed J, Lyles R, Terranova PF. 1990. Immunological evidence for a human ovarian tumor necrosis factor. *J Clin Endocrinol Metab*; 71: 1096-1102
- Roth I et al: 1996. Human placental cytotrophoblasts produce immunosuppressive cytokine IL-10. *J Exp Med* 184: p539-548

- Rothschild AM. 1970. Mechanisms of histamine release by compound 48/80.  
*Br J Pharmacol.*; 38(1): 253–262
- Rudeschko O et al. 1995. Investigation of the stability of apple allergen extracts.  
*Allergy*, 50(7): p. 575-80
- Ruiz RG, Kemeny DM, Price JF. 1992. Higher risk of infantile atopic dermatitis from maternal atopy than from paternal atopy.  
*Clin Exp Allergy*. 22(8): p. 762-6
- Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito A, Saito S. 2004. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases.  
*Mol Hum Reprod*; 10: 347-353
- Savilahti E et al. 2004. Mothers of very low birth weight infants have less atopy than mothers of full-term infants. *Clin Exp Allergy*. 34(12): p. 1851-4
- Schneider H, Huch A. 1985. Dual in vitro perfusion of an isolated lobe of human placenta: method and instrumentation.  
*Contrib Gynecol Obstet*. 13: p. 40-7
- Scholz C. 2010. Mechanismen immunologischer Toleranz. Untersuchungen am Plazenta- und Tumor-Modell. Habilitationsschrift: Ludwig-Maximilians-Universität München
- Somoskovi A et al. 2007. Population-based case-control study of allergic rhinitis during pregnancy for birth outcomes.  
*Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 131(1): p. 21-7
- Strachan DP 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *Br Med J* 299: 1259-60
- Szekeres-Bartho J, Varga P, Peltsik B. 1989. ELISA Test for the detection of an immunological blocking factor in human pregnancy serum. *J Reprod Immunol*;16:19-29

- Szukiewicz D et al. 2001. The dose-dependent release of histamine from placental mast cells after administration of atrial natriuretic peptide. *Inflamm Res.* 50 Suppl 2: p. 59-60
- Takano H, Yanagisawa R, Inoue K. 2007. Components of diesel exhaust particles diversely enhance a variety of respiratory diseases related to infection or allergy: extracted organic chemicals and the residual particles after extraction differently affect respiratory diseases. *J Clin Biochem Nutr* 40: 101-107
- Tedner, S G, A K Örtqvist, and C Almqvist. 2012. Fetal Growth and Risk of Childhood Asthma and Allergic Disease. *Clinical and Experimental Allergy* 42.10: 1430–1447.
- Thomas PS, Yates DH, Barnes PJ. 1995. Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med*;152:76-80
- Thornton CA et al. 2004. Functional maturation of CD4+CD25+CTLA4+CD45RA+ T regulatory cells in human neonatal T cell responses to environmental antigens/allergens. *J Immunol.* 173(5): p. 3084-92
- Uthoff H, Spenner A, Reckelkamm W, Ahrens B, Wölk G, Hackler R, Hardung F, Schaefer J, Scheffold A, Renz H, Herz U.: 2003. Critical role of preconceptional immunization for protective and nonpathological specific immunity in murine neonates. *Oct 1;171(7):3485-92*
- Van der Velden, V.H et al. 2001. Selective development of a strong Th2 cytokine profile in high-risk children who develop atopy: risk factors and regulatory role of IFN-gamma, IL-4 and IL-10. *Clin Exp Allergy*, 31(7): p. 997-1006
- Van Eerdewegh et al. 2002. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness, *Nature*, Jul 25; 418, 426-30

- Vroling AB et al. 2007. Allergen induced gene expression of airway epithelial cells shows a possible role for TNF-alpha. *Allergy*. 62(11): p. 1310-9
- Wang Y, Walsh SW. 1996. TNF alpha concentrations and mRNA expression are increased in preeclamptic placentas. *J Reprod Immunol*. Dec;32(2):157-69
- Wegman et al. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*;14:353-356
- Woidacki K, Zenclussen AC, Siebenhaar F. 2014. Mast Cell-Mediated and Associated Disorders in Pregnancy: A Risky Game with an Uncertain Outcome? *Frontiers in Immunology* 2014;5:231.
- Yelavarthi KK, Chen HL, Yang Y, Fishback JL, Cowley BD, Hunt JS. 1991. Tumor necrosis factor alpha: mRNA and protein in rat uterine and placental cells. *J Immunol*; 146:3840-3848
- Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Ritschel S, Zambon Bertoja A, Fest Ueha S, Matsushima K, Leber J, Volk HD. 2006. Regulatory T cells induce a privileged ant microenvironment at the fetal-maternal interface. *Eur J Immunol*; 36: 82-94
- Zolti M, Ben-Rafael T, Meirom R, Shemesh M, Bider D, Mashiach S, Apte RN. 1991. Cytokine involvement in oocytes and early embryos. *Fertil Steril*; 56: 265-272
- Zutavern A et al. 2005. Atopic dermatitis, extrinsic atopic dermatitis and the hygiene hypothesis: results from a cross-sectional study. *Clin Exp Allergy*. Oct;35(10):1301-8

## ANHANG

### Abbildungsverzeichnis

**Abb. 1.1.:** Überblick über die Entwicklung der Abwehrzellen

Aus: Entwicklung von Blut- und Immunzellen aus Stammzellen im Knochenmark;

© Krebsinformationsdienst Deutsches Krebsforschungszentrum

**Abb. 1.2.:** Aufbau der reifen Plazenta

Aus: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/sollwedel-andre-sascha-2007-10-24>

**Abb. 3.1.:** schematische Darstellung des RAST- Allergietestverfahrens

Aus: <http://www.allum.de/diagnostik/bestimmung-des-spezifischen-ige-im-blut.html>

**Abb. 3.2.:** Schema offene einseitige Plazentaperfusion

adaptiert nach <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/sollwedel-andre-sascha-2007-10-24>

**Abb. 3.3.:** Gespültes Kotyledo (hell) nach sechs Stunden Perfusionsdauer

Aus: Eigene Bilder / Plazentalabor Unifrauenklinik Jena

**Abb. 4.16 a-d:** Plazentagewebe

Aus: Eigene Bilder/ Plazentalabor Unifrauenklinik Jena

## **Tabellenverzeichnis**

### **Tabelle 1.1.**

Zellen des Immunsystems und ihre Aufgaben: adaptiert nach Piper 2007 und Janeway 2005

### **Tabelle 1.2.**

Überblick über die häufigsten wichtigsten Zytokine und deren Wirkungen: adaptiert nach Janeway 2005 und Bühling 2000

### **Tabelle 1.3.:**

Überblick über Immunglobuline und ihre Eigenschaften: adaptiert nach Bühling 2003

### **Tabelle 1.4.:**

Einteilung allergischer Reaktionen nach Coombs und Gell 1963: adaptiert nach Bühling 2003

### **Tabelle 1.5.**

Stoffaustausch in der Plazenta: adaptiert nach Dudenhausen 2008

## **Technische Ausrüstung**

### **Verwendete Geräte**

- Durchflusszytometer:
  - Dako Galaxy FlowCytometric System,  
Software: partec FloMax, FloMax Software, Version 2.2.0.3119
  - FACSCalibur: Becton Dickinson, Heidelberg, Software: BD FACSComp,  
BD CellQuest, BD CBA Software
- Photometer: Photometer Cary50 Bio Varian
- HPLC/Durchflusszytometer, Gynkotek HPLC
- Fluorescence-HPLC-Monitor RF\_551 (Shimadzu, Duisburg)
- Schüttler Polymax 1040 Heidolph
- Spektrofotometer Cary 50 Bio Varian
- Ultraschallbad Julabo, USR 3, Julabo Labortechnik GmbH
- Vortexer Vortex-Genie2 Scientific Industries, Inc.
- Silox-S Oxygenator, Firma Mera Senko Medical Instrument, Tokio, Japan
- Zentrifugen:
  - Biofuge 13: Heraeus Instruments
  - Labofuge T: Heraeus Sepatech
  - Micro 22R: Hettich Zentrifugen

### **Verwendete Materialien und Chemikalien**

- Cytometric Bead Array Human, TH1/TH2 cytokines, BD Biosciences Pharmingen
- Allergene:
  - Apfel Mald1 (Frucht), Heinzelmann 2005
  - Birke (Pollen), Beecham Pharmaceuticals
  - Hausstaubmilbenallergen (Abello)
  - Milcheiweißallergen (Abello)
- OPT-Lösung - 5 mg OPT in 10 ml Methanol gelöst
- Perfusionslösung:
  - NCTC –135 – Lösung
  - Earle's Puffer
  - Bovine Serum Albumin

- Dextran
  - D-Glucose
  - Amoxicillin
  - Heparin (Liquemin N 25000)
- NaOH, Baker
  - PBS, Roche Diagnostics GmbH
  - PHA, Bio Whittaker
  - H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Baker

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten:

Name: Frauke Varosi  
Geburtsdatum: 09.02.1981  
Geburtsort: Leinefelde  
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder  
Nationalität: deutsch

### Schulbildung:

09/1987 - 07/1991 Grundschule Leinefelde  
09/1991 - 07/1999 G.-W.- Leibniz- Gymnasium Leinefelde  
07/1999 Allg. Hochschulreife (Abitur)

### Studium:

10/1999 - 11/2005 Studium der Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität  
Jena

### Arbeitsverhältnisse:

01/2006 – 12/2012 Facharztausbildung für Gynäkologie und Geburtshilfe  
Ab 06/2013 Fachärztliche Tätigkeit Frauenarztpraxis Varosi,  
Leinefelde

Stand: März 2015

Frauke Varosi

## Publikationsliste im Rahmen der Dissertation

### Wissenschaftliche Arbeiten

Enke U, Abelius M, **Varosi F**, Hoyer H, Schleussner E, Jenmalm M, Markert UR.  
Placental immune response to apple allergen in allergic mothers. Journal of  
Reproductive Immunology, 2014(106),100-109

Markert U, Fitzgerald J, Seyfarth L, Heinzelmann J, **Varosi F**, Voigt S, Schleussner  
E, Seewald H.

Immunology of pregnancy.Lessons from Reproductive Immunology for Other Fields  
of Immunology and Clinical Approaches;

Market UR (ed): Immunology of Pregnancy. Chem Immunol Allergy. Basel, Karger,  
2005, vol 89, pp 169-179 (DOI: 10.1159/000087965)

### Mündliche Präsentationen:

**F. Varosi**, J. Heinzelmann, TG. Poehlmann, E. Schleussner, UR. Markert, L. Seyfarth.  
Allergeninduzierte Zytokinfreisetzung in der menschlichen Plazenta;  
6. Kolloquium "Junge forschende Reproduktionsmediziner" 29.04.-01.05.05, Bonn

**Frauke Varosi**, Joana Heinzelmann, Tobias G. Pöhlmann, Ekkehard Schleussner,  
Lydia Seyfarth, Udo R. Markert.

Cytokine Shift in Human Placentae after Allergen Challenge – A Possible Role in  
Fetal Programming of Allergies?

36th Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies of Immunology,  
21. – 24.09.2005, Kiel

**Veröffentlichte Abstracts/ Posterpräsentationen**

**F. Varosi**, J. Heinzelmann, TG. Poehlmann, E. Schleussner, U.R. Markert, L. Seyfarth.

Allergen Induced cytokine release in human placentae – A possible role in fetal programming of allergies?;

25. Annual Meeting of the American Society of Reproductive Immunology (ASRI).  
16-18.06.2005, Providence/USA

**Varosi F**, Heinzelmann J, Markert UR, Seyfarth L.

Experimental arrangement for the analysis of mast cell degranulation inducing factors in human placental tissue;

10th Congress of the International Federation of Placenta Associations, September 2004, Asilomar, USA

Heinzelmann J, **Varosi F**, Pöhlmann TG, Fahlbusch B, Schleussner E, Markert UR, Seyfarth L.

Comparative Stimulation of B and T Lymphocytes from Decidua, Cord Blood and Maternal Venous Blood from Allergic Mothers with different Allergens;

10th Congress of the International Federation of Placenta Associations, September 2004, Asilomar, USA

**Varosi F**, Heinzelmann J, Markert UR, Seyfarth L.

Entwicklung eines Modells zur Analyse von Mastzelldegranulation und damit verbundener Transmitterfreisetzung in der menschlichen Plazenta

55. Kongreß der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V.,  
14.-17.09.2004 Hamburg

Heinzelmann J, **Varosi F**, Debevc F, Poehlmann TG, Markert UR, Seyfarth L.

Stimulation der dezidualen B- und T- Lymphozyten in Plazenten allergischer Mütter durch Allergene;

55. Kongreß der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V.,  
14.-17.09.2004 Hamburg

**Varosi F**, Heinzelmann J, Markert UR, Seyfarth L.

Experimental arrangement for the analysis of mast cell degranulation inducing factors in human placental tissue;

European Congress of Reproductive Immunology, July 2004, Plzen, Czech Republic.

Am. J. Reprod. Immunol, 2004, 51: 479

Heinzelmann J, **Varosi F**, Debevc F, Poehlmann TG, Markert UR, Seyfarth L.

Inhalation of allergens stimulate decidual B and T lymphocytes dose-dependently in allergic mothers;

European Congress of Reproductive Immunology, July 2004, Plzen, Czech Republic.

Am. J. Reprod. Immunol, 2004, 51: 487-488

**Varosi F**, Heinzelmann J, Markert UR, Seyfarth L.

Assesment of mast cell histamine release in human placentae;

24th Annual Meeting of the American Society of Reproductive Immunology, June

2004, St.Louis, USA. Am. J. Reprod. Immunol, 2004, 51: 343

Heinzelmann J, **Varosi F**, Debevc F, Poehlmann TG, Markert UR, Seyfarth L.

Dose-Dependent Stimulation of Decidual B and T Lymphocytes from Allergic Mothers with Inhalation Allergenes;

24th Annual Meeting of the American Society of Reproductive Immunology, June

2004, St.Louis, USA. Am. J. Reprod. Immunol, 2004, 51: 343. Poster presentation

### **Ergänzung zur Statistischen Auswertung**

Bezugnehmend auf die Publikation:

#### **Placental immune response to apple allergen in allergic mothers**

**Uta Enke, Martina Abelius Frauke Varosi, Heike Hoyer, Ekkehard Schleussner, Maria Jenmalm and Udo R. Markert.**

**Journal of Reproductive Immunology, 2014 (106),100-109**

In diesem Rahmen dieser Publikation wurden insgesamt vier Plazenten von apfelallergischen Schwangeren und fünf Plazenten von nichtallergischen Schwangeren zur einseitig offenen Plazentaperfusion verwendet, in der die Ergebnisse meiner Dissertation mit eingeflossen sind.

In Übereinstimmung mit meiner Arbeit erfolgte die Apfelallergenzugabe nach einer Stunde zu einem Kotyledon, der andere Kotyledon wurde jeweils nur mit Perfusionsmedium gespült.

Es wurden ebenfalls über den Cytometric Bead Array die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4, IL-2 und IFN- $\gamma$  bestimmt.

Zur statistischen Beurteilung wurde das gemischte lineare Modell („mixed linear model“) mit fixen („fixed“) und zufälligen („random“) Faktoren (gemischte Effekte) verwendet, wobei Zeit, Allergen und deren Interaktion als fixe, die Versuchsobjekte (Plazentagewebe) als zufällige Faktoren gewählt wurden. Das Signifikanzniveau (Irrtumswahrscheinlichkeit) betrug 0,05. Die Analysen wurden mit SAS 9.3 Software berechnet.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen meiner Dissertation fand sich ein deutlicher zeitabhängiger Anstieg von IL-6 und TNF- $\alpha$  in den mit Apfelallergen gespülten Kotyledonen von apfelallergischen Plazenten im Vergleich zu den Kotyledonen, die ohne Apfelallergen perfundiert wurden. Dieser deutliche Anstieg nach Apfelallergenzugabe konnte durch einen signifikanten Zusammenhang zwischen Zeit und Allergen für TNF- $\alpha$  ( $F=16.6$ ,  $p<0.001$ ) und IL-6 ( $F=25.1$ ,  $p<0.001$ ) in den Analysen der gemischten Modelle nachgewiesen werden.

TNF- $\alpha$  und IL-6 konnten ebenfalls in Plazenten nichtallergischer Schwangerer nachgewiesen werden, aber ohne die deutliche Konzentrationserhöhung nach Apfelallergenzugabe. Es zeigten sich ebenfalls keine nennenswerten Änderungen in den Konzentrationen von IL-4, IL-2 und IFN- $\gamma$ .

**Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. Udo Markert, Frau Dr. rer. nat. Lydia Seyfarth,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Leinefelde, 01.03.2015

Frauke Varosi

## Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei meinen „Doktoreltern“ Herrn Prof. Dr. med. Udo Markert und Frau Dr. rer. nat. Lydia Seyfarth ganz herzlich für die exzellente und hilfreiche Unterstützung meiner Arbeit sowie die nicht selbstverständliche Betreuung im Besonderen bedanken.

Ein großes Dankeschön für das nette und unkomplizierte Laborklima geht an Susi, Sandra, Tobias, Justine, Harald, Julia, Astrid, Anne, Stefan, Uta, Luciana, Mike, Torben, Ina, Joana, Lydia und Udo.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. E. Schlußner und den Hebammen und Ärzten des Kreißsaals der Universitätsfrauenklinik Jena.

Ebenfalls großer Dank gebührt Susann Salzmann, die uns bei den Messungen des Cytometric Bead Array unterstützte, Herrn Prof. Dr. med. G. Jirikowski und Frau Kasch für die Hilfestellungen bei der Eponeinbettung und Anfärbung der Plazentagewebeproben sowie den Mitarbeitern des Instituts für Physikalische Chemie der Friedrich Schiller Universität Jena.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, für alles.