

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte das von LEE et al. 1997 beschriebene, standardisierte Mausmodell für die *H. pylori* Infektion am Institut für Versuchstierkunde der Medizinischen Hochschule Hannover etabliert und verifiziert werden. Weiterhin sollte überprüft werden, ob genetisch determinierte Unterschiede in der Suszeptibilität für eine experimentelle *H. pylori* Infektion bei verschiedenen Inzuchtmäusen vorliegen

Zu diesem Zweck wurden 196 Mäuse der Inzuchtstämme BALB/cJ, C3H/HeJ, C3H/HeN, C57BL/6J, C57BL/6J-*Il10*<sup>tm1Cgn</sup>, C B-17-*Prkdc*<sup>tm1</sup>, DBA/2J und FVB/N intragastral mit dem *H. pylori* Stamm Sydney (SS) experimentell infiziert. Als nicht infizierte Kontrolltiere dienten 86 Mäuse dieser Stämme. Die Haltung der Tiere erfolgte unter keimfreien bzw. unter keimbesiedelten Bedingungen. Einen Monat, vier Monate und sechs Monate nach der Inokulation mit *H. pylori* SS wurden die Mäuse euthanasiert. Eine Magenhälfte wurde bakteriologisch (Urease-Test, Kultur, PCR) auf das Vorhandensein von *H. pylori* untersucht, die andere Magenhälfte wurde histologisch mit Hilfe von semiquantitativen Scores zur Bestimmung des Kolonisationsgrades der Magenschleimhaut mit *H. pylori* (Giemsa Färbung) und des Schweregrades der leukozytären Infiltrationen (H E. Färbung) untersucht.

Die bakteriologische Untersuchung mit dem Urease-Test ergab bei 67 % der infizierten Mäuse und bei 9 % der Kontrollmäuse eine positive Reaktion. Verglichen mit dem Urease-Test stellte die bakterielle Kultur die spezifischere Methode zum Nachweis einer *H. pylori* Infektion dar. Mit der bakteriellen Kultur wurde bei 66 % der infizierten Mäuse und bei keinem Kontrolltier eine *H. pylori* Infektion nachgewiesen. Mit Hilfe der PCR zum Nachweis des *s2/m2* Genotypen des *uaxA* Gens von *H. pylori* SS konnte gezeigt werden, daß es sich bei den *H. pylori* Reisolaten um den applizierten *H. pylori* SS handelte.

Histologisch war bei 64 % der infizierten Mäuse und bei keiner Kontrollmaus eine *H. pylori* Infektion nachweisbar. Dabei besiedelte *H. pylori* besonders den Bereich der Fundus- und Pylorusdrüsen im oberen Drittel der Magengrübchen. Es konnte statistisch signifikant gesichert werden, daß keimbesiedelte Mäuse des Stammes C3H/HeJ nach einem Infektions-

monat in der Fundus- und Pylorusdrüsenregion stärker mit *H. pylori* besiedelt waren als keimfreie Mäuse dieses Stammes. Unter keimbesiedelten Haltungsbedingungen zeigten die infizierten Mäuse an den drei Tötungszeitpunkten signifikante Stammesunterschiede im Kolonisationsgrad mit *H. pylori* in den drei Schleimhautdrüsenregionen. Zu allen drei Zeitpunkten wiesen die Stämme C3H/HeJ und C3H/HeN die stärkste Besiedlung mit *H. pylori* auf. Die geringste Besiedlung mit *H. pylori* wies nach einem Monat der Stamm C.B-17-Prkdc<sup>scid</sup> auf, nach vier Monaten zeigten die Stämme C57BL/6J-III<sup>g<sup>msk</sup>z<sup>n</sup></sup> und FVB/N und nach sechs Monaten die Stämme C57BL/6J und FVB/N die geringste Besiedlung.

Der Vergleich von bakterieller Kultur und Histologie zum Nachweis der *H. pylori* Infektion bei der Maus zeigte, daß die bakterielle Kultur (Sensitivität von 88 %) geringfügig sensitiver war als die Histologie (Sensitivität von 85 %) Hinsichtlich der Spezifität (100 %) unterschieden sich beide Methoden nicht

Pathohistologisch manifestierte sich die *H. pylori* Infektion an der Magenschleimhaut als milde bis moderate, multifokale bis diffuse, chronische oder chronisch-aktive Gastritis. Die leukozytären Infiltrate (Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten) waren in der Lamina propria aller drei Schleimhautdrüsenregionen zu finden. Histologisch konnten bei 89 % der infizierten Mäuse und bei 70 % der Kontrollmäuse leukozytäre Infiltrationen diagnostiziert werden. Der Schweregrad der leukozytären Infiltrationen nahm in allen drei Schleimhautdrüsenregionen bei den infizierten Mäusen und den Kontrollmäusen fast aller Stämme über den gesamten Untersuchungszeitraum zu. Bei den infizierten Mäusen ergaben sich zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikante Unterschiede im Schweregrad der leukozytären Infiltrationen zwischen den verschiedenen Schleimhautdrüsenregionen. Dabei wurden die stärksten Infiltrationen in den Drüsenregionen des Fundus und Pylorus gefunden. Es konnte statistisch signifikant gesichert werden, daß keimfreie Mäuse des Stammes C.B-17-Prkdc<sup>scid</sup> nach einem Infektionsmonat in der Pylorusdrüsenregion stärkere leukozytäre Infiltrationen aufwiesen als keimbesiedelte Mäuse dieses Stammes. Unter keimbesiedelten Haltungsbedingungen zeigten die infizierten Mäuse nach einem Infektionsmonat und nach sechs Infektionsmonaten signifikante Stammesunterschiede im Schweregrad der leukozytären Infiltrationen in der Pylorusdrüsenregion. Nach vier Infektionsmonaten bestanden solche

Stammesunterschiede in allen drei Schleimhautdrüsenregionen. Einen Monat nach der Infektion wiesen Mäuse des Stammes C3H/HeN die stärksten leukozytären Infiltrationen in der Pylorusdrüsenregion auf und Mäuse des Stammes C B-17-Prkdc<sup>scid</sup> die geringsten. Nach vier Infektionsmonaten wiesen Mäuse des Stammes C57BL/6J-III0<sup>msC3H</sup> die stärksten und Mäuse des Stammes FVB/N die geringsten (signifikant bis hochsignifikant) leukozytären Infiltrationen in allen drei Schleimhautdrüsenregionen auf. C3H/HeN-Mäuse entwickelten die stärksten und DBA/2J-Mäuse die geringsten leukozytären Infiltrationen in der Pylorusdrüsenregion nach sechs Infektionsmonaten. Signifikante Unterschiede im Grad der leukozytären Infiltrationen zwischen infizierten Mäusen und Kontrollmäusen ergaben sich nur nach vier Infektionsmonaten in der Kardial-, Fundus- und Pylorusdrüsenregion des Mäusestammes C57BL/6J-III0<sup>msC3H</sup> und in der Pylorusdrüsenregion des Mäusestammes DBA/2J.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß das von LEE et al. 1997 beschriebene Mausmodell für die *H. pylori* Infektion am Institut für Versuchstierkunde der Medizinischen Hochschule Hannover etabliert wurde. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen allerdings, daß *H. pylori* SS bei den eingesetzten Mäuseinzuchtstämmen nur eine gering- bis mittelgradige chronische Gastritis induzierte. Aus diesem Grunde ist das *H. pylori* SS Mausmodell für Genkartierungsstudien zur Suszeptibilität für *H. pylori* induzierte Erkrankungen nur mit Einschränkungen zu empfehlen. Weitere Untersuchungen sollten die Entwicklung eines *H. pylori* Mausmodells zum Ziel haben, welches deutlichere pathologische Läsionen in der Magenschleimhaut anderer Mäuselinien verursacht.

## 7 SUMMARY

Claudia Janke:

**"Establishment and characterization of a mouse model for the *H. pylori* infection"**

In the present study the standardized mouse model for the *H. pylori* infection described by LEE et al. 1997 should be established and verified at the Institute of Laboratory Animal Science of the Medical School of Hannover. Further it should be proved if there are genetically determined differences in susceptibility for an experimental *H. pylori* infection by different inbred strains of mice

196 mice of the inbred strains BALB/cJ, C3H/HeJ, C3H/HeN, C57BL/6J, C57BL/6J-*II10<sup>tm1Cgn</sup>*, C.B-17-*Prkdc<sup>lck</sup>*, DBA/2J und FVB/N were intragastrically infected by *H. pylori* Strain Sydney (SS). 86 mice were taken as noninfected controls. The animals were kept under germfree and conventional conditions and they were sacrificed after one month, four and six months of the infection. One part of the stomach was investigated for the presence of a *H. pylori* infection by bacteriological techniques (urease-test, bacterial culture, PCR), the other part was examined histologically by semiquantitative scores to determine the colonisation level of the *H. pylori* infection (Giemsa staining) and the degree of the infiltration by leucocytes (H.E. staining).

The bacterial examination with the urease-test showed a positive reaction in 67 % of the infected mice and in 9 % of the noninfected mice. The bacterial culture is the more specific method for the detection of the *H. pylori* infection in comparison with the urease-test. The bacterial culture detected a *H. pylori* infection in 66 % of the infected mice and in none of the noninfected mice. The PCR for the detection of the genotyp *s2/m2* of the *vacA* gene of *H. pylori* showed that the reisolated *H. pylori* organisms are identical to the inoculated *H. pylori* organisms.

Histologically, the *H. pylori* infection was shown in 64 % of the infected mice, and in none of noninfected controls. After one month of infection *H. pylori* colonised particularly the body

and antrum region of the stomach mucosa in the upper third of the gastric pits. It was statistically proven that conventional C3H/HeJ-mice are colonised faster by *H. pylori* in the body and the antrum region of the mucosa after one month of infection than germfree C3H/HeJ-mice. Under conventional conditions all infected mice showed at the three different points of sacrifice significant histological strain differences in the level of the *H. pylori* colonisation in the whole gastric mucosa. The mice strains C3H/HeJ and C3H/HeN showed the strongest colonisation with *H. pylori* at the three different points of sacrifice. The lowest colonisation was shown one month *post infection* in the strain C.B-17-Prkdc<sup>scid</sup>, four months *post infection* in the strains C57BL/6J-1110<sup>mic<sup>g</sup></sup> and FVB/N and six months *post infection* in the strains C57BL/6J and FVB/N.

Comparison between bacterial culture and histology in the detection of the *H. pylori* infection in mice showed a bacterial culture (sensitivity of 88 %) which was more sensitive than histology (sensitivity of 85 %). Both methods did not differ in specificity (100 %).

Pathohistologically, the *H. pylori* infection manifested itself in the gastric mucosa as a mild to moderate, multifocal-diffuse, chronic or chronic-activ gastritis. The infiltration of leucocytes (lymphocytes, macrophages, granulocytes) was observed in the lamina propria of the whole glandular stomach. Infiltration of leucocytes could be observed in 89 % of the infected mice, and in 70 % of the noninfected controls. The severity of infiltration of leucocytes increased within the whole glandular stomach throughout the six months of infection. Significant strain differences in the level of severity of the infiltration of leucocytes between the different regions of the mucosa were apparent in all infected mice at the different points of sacrifice. The highest infiltration took place in the body and the antrum region. It was statistically proven that germfree C.B-17-Prkdc<sup>scid</sup>-mice showed a more severe infiltration of leucocytes in the antrum region of the mucosa after one month of infection than conventional C.B-17-Prkdc<sup>scid</sup>-mice. Significant strain differences in the level of the infiltration of leucocytes in the antrum region were found in all infected mice under conventional conditions, after one month or six months of infection. These significant differences were seen in all infected mice after four months of infection in the whole gastric mucosa. One month after infection the C3H/HeN-mice showed the highest infiltration of leucocytes in the

antrum region, the C.B-17-*Prkdc<sup>scid</sup>*-mice showed the lowest (weak significant). After four months of infection these strain differences existed in the whole gastric mucosa. One month after infection, C3H/HeN-mice showed the highest infiltration of leucocytes in the antrum region and C.B-17-*Prkdc<sup>scid</sup>*-mice showed the lowest. After four months of infection, C57BL/6J-*Il10<sup>tm1.1Cgn</sup>*-mice showed the highest and FVB/N-mice showed the lowest (significant - high significant) infiltration of leucocytes in the entire glandular stomach. The highest infiltration of leucocytes could be observed in C3H/HeN-mice in the antrum region after six months of infection, the lowest in DBA/2J-mice. Significant differences in the level of the infiltration of leucocytes between infected and noninfected mice took place after only four months of infection in the cardia-like, the body and the antrum regions of the C57BL/6J-*Il10<sup>tm1.1Cgn</sup>*-mice and in the antrum region of the DBA/2J-mice.

In conclusion, it should be noted that the standardized mouse model for the *H. pylori* infection described by LEE et al. 1997 was established at the Institute of Laboratory Animal Science of the Medical Highschool of Hannover. The results of the present studies showed that *H. pylori* SS induced only a low to moderate chronic gastritis in the inbred strains of mice used in this study. Therefore, it is recommended to use this *H. pylori* SS mouse model with caution in genome analyses for susceptibility genes of *H. pylori* induced diseases. Further studies should be aimed to develop a *H. pylori* mouse model that causes much better pathological lesions in the gastric mucosa of other strains of mice.