

Aus der medizinischen Klinik III
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Zabel

Funktionelle Evaluation von neutrophilen Granulozyten in Sputum und Blut
von Patienten mit Pneumonie und immunsupprimierenden
Grunderkrankungen

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Arne Lüers
aus Hamburg

Bremen 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Klaus Dalhoff
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Siegfried Görg

Tag der mündlichen Prüfung:	2.11.2009
zum Druck genehmigt. Lübeck, den	2.11.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Infektionen der unteren Atemwege	1
1.2. Pneumonie	1
1.2.1. Ätiologie und Pathogenese	2
1.2.2. Diagnostik.....	3
1.2.3. Komorbidität und prädisponierende Faktoren einer Pneumonie.....	4
1.3. Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD).....	5
1.3.1. Ätiologie und Pathogenese	6
1.3.2. Systemische Wirkung der COPD	7
1.4. Neutrophile Granulozyten im Entzündungsgebiet	9
1.4.1. Cytokine, Chemokine und ihre Rezeptoren.....	12
1.4.2. Apoptose.....	15
1.5. Fragestellung und Zielsetzung.....	19
2. Untersuchungskollektive und Studiendesign	20
2.1. Untersuchungskollektive	20
2.1.1. Untersuchungskollektiv 1	20
2.1.2. Untersuchungskollektiv 2	20
2.1.3. Absolute Zellzahlen im Sputum	22
2.2. Studienablauf.....	23
2.3. Gewinnung induzierten Sputums.....	23
2.4. Definition und Diagnose der ambulant erworbenen Pneumonie.....	24
2.5. Ein- und Ausschlusskriterien zur Aufnahme in die Studie.....	24
2.6. Ethik	25
3. Material.....	26
3.1. Geräte	26
3.2. Zellseparation	26
3.3. Färbung der Cytospin-Präparate.....	27
3.4. Durchflußzytometrie.....	27
3.5. ELISA.....	28
3.6. Zellinkubation.....	28
4. Methodik.....	29

4.1. Isolierung neutrophiler Granulozyten aus dem Vollblut	29
4.2. Aufarbeitung des Sputums	30
4.3. Durchflusszytometrie	31
4.3.1. Vorbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie	37
4.4. ELISA	38
4.5. Objektträger TUNEL System	39
4.6. Zellinkubation	43
4.6.1. Inkubation mit Fas CD 95	43
4.6.2. Vergleich zwischen Flowzytometrie und Objektträger test	44
4.7. Statistische Auswertung	46
5. Ergebnisse	47
5.1. Akute Entzündungsphase	47
5.1.1. Apoptose	47
5.1.2. Zellaktivierungsmarker CD11b und CD66b	49
5.1.3. CXCL-8 und die Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2	51
5.2. Entzündungsrückbildung	54
5.2.1. Apoptose	54
5.2.2. Zellaktivierungsmarker CD11b und CD66b	55
5.2.3. CXCL-8 und die Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2	58
5.2.4. Cytokinkonzentrationen von IL-1 β , FasL und IL-10	62
5.3. Schwere des klinischen Verlaufes	64
5.3.1. Apoptose	64
5.3.2. Zellaktivierungsmarker CD11b und CD66b	64
5.3.3. CXCL-8 und die Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2	65
5.4. Nachweis eines pathogenen Erregers im Sputum	66
5.4.1. Apoptose	66
5.4.2. Zellaktivierungsmarker CD11b und CD66b	66
5.4.3. CXCL-8 und die Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2	67
5.5. Glukokortikoidtherapie	68
6. Diskussion	69
7. Zusammenfassung	80
9. Anhang	94
9.1. Danksagung	94
9.2. Lebenslauf	95

9.3. Publikationsverzeichnis	96
------------------------------------	----

Verzeichnis der Abkürzungen

ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
Bid	BH3 interacting domain
BSA	Bovine Serum Albumine
C	Komplementfaktor
CAP	Community Acquired Pneumonia
CD	Cluster of Differentiation
CEA	Carcino Embryonaler Antikörper
CINC	Cytokine Induced Chemoattractant
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-Desoxyuridine-5'-Triphosphat
ENA	Epithelial cell-derived Neutrophil Activator
ECP	Eosinophil Cationic Protein
EPO	Eosinophil Peroxidase
FACSscan	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCV	Vitalkapazität
FcγR	Fc-Bereich von Immunglobulinen bindender Rezeptor
FEV1	Forcierte Einsekundenkapazität
FICS	Fluorescein-Isothiocyanat
fMLP	n-formyl-Methionyl-Leucyl Phenylalanine
FSC	Vorwärtsstreulicht
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GRO	Growth Related Oncogene
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HLA	Histokompatibilitätskomplex
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin like Growth Factor
IL	Interleukin
ITAM	Immunorezeptor Tyrosine-based Activation Motif
kDa	Kilodalton
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	bakterielles Lipopolysaccharid
MCP	Macrophage Chemoattractant Protein
MIP	Monocyte Infiltrating Protein
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAP	Neutrophil Activating Peptide
NF-KB	Nuclear Factor-KB
PAF	Platelet Activating Factor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
rMFI	relative Mittelwertfluoreszenzintensität
RSV	Respiratory Syncytical Virus
SSC	Seitwärtsstreulicht
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinasen
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TUNEL	TDT-vermittelte Bindung fluoreszierender Nukleotide an DNA-Fragmente
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Einleitung

1.1. Infektionen der unteren Atemwege

Das Bronchialsystem des Menschen verzweigt sich vom Abgang der Luftröhre über die großen Bronchien bis in die respiratorischen Bronchiolen, von denen die Luft den Alveolen und damit dem Lungenkreislauf zugeführt wird. Es ergibt sich eine bis zu 100m² große Austauschfläche, über die der Mensch mit seiner Umwelt in direkten Kontakt tritt. Diese Kontaktfläche bedarf besonderer Schutzmechanismen, um das Eindringen pathogener Krankheitserreger zu verhindern. Diese Mechanismen bestehen einerseits aus den anatomischen Verhältnissen, wie der mukoziliaren Clearance und dem Hustenreflex, andererseits spielen Faktoren der angeborenen Immunität, wie das Komplementsystem, eine wichtige Rolle. Das Komplementsystem und hier insbesondere der Faktor C3 sind für die Opsonisierung und damit für die Aktivierung der alternativen Komplementkaskade als Reaktion auf bakterielle Lipoproteine von entscheidender Bedeutung (Winkelstein *et al.*, 1980).

Als zelluläre Akteure der angeborenen Immunität sind Makrophagen und neutrophile Granulozyten zu nennen, die unspezifisch ihre Abwehrfunktion gegenüber körperfremden Organismen wahrnehmen. Unerlässlich für eine wirksame Immunantwort ist jedoch auch das erworbene Immunsystem. Im Laufe einer Immunreaktion kommt es zu einem komplexen Zusammenspiel zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem und den zellulären und humoralen Akteuren. So hat sich gezeigt, dass Patienten mit kongenitalem IgA-Mangel bei normalen IgG- und IgM-Serumkonzentrationen nicht in der Lage sind, eine effektive Antikörperantwort auf bakterielle Polysaccharide von *Streptococcus pneumoniae*, dem wichtigsten Krankheitserreger der Pneumonie, zu induzieren.

1.2. Pneumonie

Die Pneumonie ist eine entzündliche Erkrankung des Lungenparenchyms. Die klassische Einteilung erfolgt nach radiologischen und morphologischen Gesichtspunkten in lobäre, bronchopneumonische und interstitielle Formen. Neuere Einteilungen orientieren sich

verstärkt an der Ätiologie, betreffend ambulant und nosokomial erworbener Pneumonien, Komorbiditäten und dem chronischen oder akuten Verlauf einer Entzündung. Unter einer ambulant erworbenen Pneumonie (CAP) versteht man eine Entzündung, die außerhalb einer Klinik oder innerhalb der ersten 48 Stunden nach Aufnahme in ein Krankenhaus manifest wird. Der Hauptrisikofaktor für das Auftreten einer nosokomialen Pneumonie ist die maschinelle Beatmung bei endotrachealer Intubation.

Die Pneumonie stellt weltweit die dritthäufigste Todesursache dar und ist in den Industrieländern die am häufigsten zum Tode führende Infektionskrankheit. In Deutschland beträgt die Mortalität der ambulant erworbenen Pneumonie 0,5%. Sie steigt bei nosokomialer Pneumonie auf bis zu 30% an. Die Inzidenz der ambulant erworbenen Pneumonie wird auf 1-11 Fälle pro 1000 Einwohner geschätzt. Bei Altenheimbewohnern geht man von einer jährlichen Neuerkrankungsrate von 68-114 pro 1000 Personen aus. Mehr als 30% der Patienten müssen hospitalisiert werden, von denen wiederum 10% intensivmedizinische Behandlung benötigen (Capnetz, 2004). Historisch gesehen hat die Entwicklung von Antibiotika dazu beigetragen, die Sterblichkeit bei jungen Patienten von 95% Anfang des 19. Jahrhunderts auf 0,5% zu senken und die Entwicklung neuer Pneumokokkenimpfstoffe könnte die Mortalität bei Kindern weiter senken. Jedoch hat die Gesamtmortalität durch eine erhöhte Sterblichkeit von Patienten älter als 60 Jahre nicht abgenommen. Durch Antibiotikaresistenzen und häufigere immunsuppressive Therapieformen ergeben sich neue Herausforderungen für die Behandlung. Während die Ursachen für die Entstehung einer Pneumonie im 19. Jahrhundert in Europa noch in Mangelernährung und den feuchtkalten Wohnungssituationen begründet lagen, gibt es heute in erster Linie eine Reihe anderer Risikofaktoren, die in den folgenden Kapiteln näher erörtert werden.

1.2.1. Ätiologie und Pathogenese

Etwa 90% aller ambulant erworbenen Pneumonien (CAP) sind durch Bakterien verursacht. Das Erregerspektrum differiert nach Patientenalter, Infektionsweg und Begleiterkrankungen. Häufigster Erreger einer ambulant erworbenen bakteriellen Pneumonie in allen Altersgruppen ist *Streptococcus pneumoniae* mit 25-45% aller Fälle weltweit, gefolgt von *Hämophilus influenzae* und *Mycobacterium influenzae* (Capnetz, 2004). Als virale Pneumonieerreger sind in erster Linie Influenzaviren, RSV, Adeno- und Coronaviren zu nennen.

Die Erreger erreichen auf unterschiedlichen Wegen die Alveolen der Lunge. Durch Tröpfcheninhalation kann es beispielsweise zur Besiedlung des Nasopharynx und dann über Aspiration zu einem Befall der Lunge kommen. In seltenen Fällen erfolgt die Aussaat der Erreger über das Blut oder angrenzendes Gewebe.

Im Falle einer Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* hängt es nach Kolonisation des Nasopharynx von der Bildung spezifischer Antikörper gegen den jeweiligen Serotyp des Bakteriums ab, ob sich eine Pneumonie entwickelt (Musher *et al.*, 1997).

Damit es zur Ausbreitung der Infektion kommt, müssen Abwehrmechanismen wie mukoziliäre Clearance, Hustenreflex, Komplementsystem, Surfactant und die Akteure der humoralen und zellulären Immunität überwunden werden. Dafür benutzen Erreger wie *Streptococcus pneumoniae* verschiedenste Mechanismen. Mit Hilfe von Oberflächenstrukturen wie Pneumolysin, welches toxisch auf den Ziliarapparat wirkt und bei Freisetzung Epithelzellverbindungen zerstört, kommt es zum Fortschreiten der Entzündung (Rayner *et al.*, 1995). Die Polysaccharidkapsel schützt die Erreger vor Phagozytose und ist entscheidend für die Virulenz. Als wichtige Stimulanzen für die körpereigene inflammatorische Reaktion gelten die Polysaccharide der Zellwand, wie beispielsweise Lipoteichonsäure. Als weitere Faktoren, die zur Virulenz der Bakterien beitragen, deren Stellenwert im einzelnen aber noch unklar ist, sind unter anderem die Freisetzung von Enzymen, die menschliches IgA spalten (Kilian *et al.*, 1979) oder die Produktion von Inhibitoren des „respiratory burst“ neutrophiler Granulozyten (Perry *et al.*, 1994) zu nennen.

1.2.2. Diagnostik

Pneumonien können klinisch in typische und atypische Verläufe eingeteilt werden. Dabei zeichnet sich ein typischer Verlauf durch einen plötzlichen Beginn mit Fieber, einem stark herabgesetzten Allgemeinbefinden und Husten mit mukopurulentem Sputum aus. Hinzukommen können Thoraxschmerzen, Dyspnoe und Schüttelfrost. Atypische Verläufe gehen mit einem langsameren Beginn, trockenem Reizhusten und leichtem Fieber einher. Erreger atypischer Pneumonien sind vor allem *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* und *Legionellen*. Eine klare Kategorisierung nach Erregern ist jedoch nicht möglich, da es vielfach Überschneidungen gibt.

Der Erregernachweis aus dem Sputum oder der bronchoalveolären Lavage kann sich besonders bei rezidivierenden oder therapierefraktären Pneumonien als hilfreich für eine gezielte Therapie erweisen. Die Sputumdiagnostik unterliegt jedoch Einschränkungen. Es

ist darauf zu achten, dass das gewonnene Material aus tieferen Atemwegen stammt, was durch die Anzahl von Plattenepithelien in der Probe verifiziert werden kann. Bei verwertbarer Sputumprobe ergibt sich ein kulturell positiver Befund in etwa 50% der Fälle. Durch Induktion des Sputums unter standardisierten Bedingungen und schnellem Anlegen einer Kultur vor geplanter antibiotischer Therapie lassen sich bei Pneumokokkeninfektion diese in bis zu 80% der angelegten Kulturen nachweisen (Musher *et al.*, 2004).

Die Indikation zur bronchoalveolären Lavage besteht bei differentialdiagnostischen Gesichtspunkten wie dem Verdacht auf tumorassoziierte Stenosierungen oder dem Versagen der initialen Antibiotikatherapie.

1.2.3. Komorbidität und prädisponierende Faktoren einer Pneumonie

Es existieren zahlreiche pulmonale und extrapulmonale Faktoren, die die Entwicklung einer Pneumonie begünstigen und die Prognose verschlechtern. Zu den wichtigsten zählen auf der einen Seite Faktoren, die mit einer Funktionseinschränkung der adaptiven und angeborenen Immunität einhergehen. Auf der anderen Seite sind Faktoren zu nennen, die durch eine Schädigung des Lungengewebes die Entstehung einer Infektion begünstigen, wie beispielsweise die Aspiration von Mageninhalt oder Süßwasser, Sekretstau durch Bronchusverlegungen, Hypoventilation durch Schonatmung oder lange Bettlägerigkeit. Mit Zunahme des Alters nehmen Komorbidität und das Risiko für auslösende Ereignisse einer Pneumonie, wie zum Beispiel Aspiration, stark zu.

Ein erhöhtes Risiko stellt unter anderem ein chronischer Alkoholabusus dar. Alkohol führt zur Schädigung zellulärer und humoraler Abwehrmechanismen. Dazu gehört die Störung der Ziliarfunktion, Verminderung der Surfactantproduktion von Pneumozyten und der Cytokinproduktion von Alveolarmakrophagen (Nelson *et al.*, 1991). Zudem beeinträchtigt Alkohol die Neutrophilenfunktion der Bakterienabtötung und Chemotaxis (Lang *et al.*, 1993). Dalhoff *et al.* konnten zeigen, dass Alkoholingestion zu erhöhter Apoptose und zur verminderten Expression des komplementregulierenden Proteins CD 55 bei peripheren neutrophilen Granulozyten führt (Dalhoff *et al.*, 1998).

Insbesondere chronische Grunderkrankungen prädisponieren eine akute Infektion der unteren Atemwege. Ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus beispielsweise geht mit Neutrophilendysfunktion und erhöhtem Pneumonierisiko einher.

Während bei gesunden Menschen das untere Bronchialsystem keimfrei ist, lassen sich bei Patienten mit chronischer Bronchitis auch zwischen den Phasen einer Infektexazerbation Keime nachweisen (Murphy *et al.*, 1992). Diese stellen ein zusätzliches Reservoir für die

Entwicklung einer Entzündung dar. Die chronisch-obstruktive Atemwegserkrankung gilt als Hauptrisikofaktor der Pneumonie. Auch Patienten mit Bronchiektasen und Lungenfibrosen weisen ein erhöhtes Risiko auf.

1.3. Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

In den letzten Jahren ist ein Krankheitssyndrom verstärkt in den Mittelpunkt der Diskussion gerückt, das eng mit dem inhalativen Zigarettenrauchen assoziiert ist. Es zeichnet sich durch chronische Inflammation und obstruktive Lungenfunktionsstörungen aus. Mittlerweile wird die COPD weltweit mit zunehmender Tendenz als die vierthäufigste Todesursache angesehen (WHO, 2000). Die COPD kann durch Grundkrankheiten wie die chronische Bronchitis oder das Lungenemphysem verursacht sein. Beim Emphysem liegt eine irreversible Erweiterung der Atemwege distal der Bronchioli terminalis vor. Man unterscheidet je nach Lokalisation ein zentroazinäres, panazinäres und zentrolobuläres Emphysem. Eine chronische Bronchitis liegt per definitionem vor, wenn an den meisten Tagen von drei Monaten zweier aufeinander folgender Jahre ein produktiver Husten vorhanden ist.

Das Asthma bronchiale zeichnet sich bei ähnlichen Symptomen vor allem durch eine reversible Atemwegswiderstandserhöhung aus. Es besteht eine bronchiale Hyperreaktivität auf allergisierende Stoffe oder auch respiratorische Infekte, durch die es zu anfallsartiger Luftnot kommen kann. Die endobronchiale Obstruktion beim allergischen Asthma beruht auf einer IgE vermittelten Reaktion vom Soforttyp, die durch Mastzellmediatoren wie Histamin, Leukotriene und Bradykinin vermittelt wird. Mit zunehmender Erkrankungsdauer kommt es zur Hyperreaktivität auf eine Vielzahl von Reizen. Im Verlauf von Exazerbationen gibt es jedoch Überschneidungen zur COPD im klinischen Erscheinungsbild.

Eine COPD liegt vor, wenn die Lungenfunktionsdiagnostik eine irreversible Einschränkung der Einsekundenkapazität bezogen auf die Vitalkapazität zeigt (Tiffeneau-Quotient), die unter 70% des Sollwertes liegt. Der Schweregrad wird anhand der Klassifikation durch die „Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease“ (GOLD) vorgenommen, in der Lungenfunktionseinschränkungen klinischen Symptomen gegenüber gestellt werden (Tabelle 1). Es ist jedoch einschränkend zu sagen, dass diese Befundkonstellationen nicht zwingend zusammentreffen müssen.

Die Exazerbationsfrequenz hat sich als ein eigenständiger Prognosefaktor herausgestellt (Soler *et al.*, 2005). Donaldson *et al.*, konnten zeigen, dass es mit zunehmender Anzahl der Exazerbationen zu einer verzögerten Erholung der Lungenfunktion in Richtung des FEV1-Ausgangswertes kommt und dass mit dem Fortschreiten der Erkrankung vor allem längere Exazerbationsintervalle verbunden sind (Donaldson *et al.*, 2003).

Tabelle 1: COPD-Klassifikation nach GOLD

GOLD	Lungenfunktion	häufige Begleitsymptomatik
0: Risikostadium	Normal	chronisch-produktiver Husten
I: leicht	FEV1/FCV < 70% FEV1 ≥ 80%	mit oder ohne chronisch-produktiven Husten
II: mittelschwer	FEV1/FCV < 70% 30% ≤ FEV1 < 80%	mit oder ohne chronisch-produktiven Husten oder Dyspnoe
III: schwer	FEV1/FCV < 70% FEV1 < 30%	mögliche Rechtsherzbelastung, respiratorische Partial/Globalinsuffizienz

1.3.1. Ätiologie und Pathogenese

Etwa 90% aller Patienten mit chronischer Bronchitis sind Raucher oder Exraucher. Jeder zweite Raucher im Alter über 40 Jahren leidet an chronischer Bronchitis. Allerdings entwickelt nicht jeder Raucher eine COPD. Dies lässt vermuten, dass genetische Faktoren eine Rolle spielen. Ein bekannter genetischer Einfluss ist der α 1-Antitrypsinmangel, der mit einer vom Rauchen unabhängigen Entstehung eines panlobulären Emphysems einhergeht. Andere Risikofaktoren sind das IgA-Mangelsyndrom, Mukoviszidose und die Exposition gegenüber Luftverschmutzung insbesondere Feinstaubbelastungen. Auch eine Hyperreagibilität der Luftwege, durch Asthma bronchiale oder durch Tabakrauch induziert, stellt einen prädisponierenden Faktor für die Entstehung einer COPD dar.

Pathogenetisch liegen der Erkrankung verschiedene Mechanismen zugrunde, die zu einem verstärkten oxidativen Stress im Gewebe führen. Zum einen führt die direkte Einwirkung von Zigarettenrauch zur Entstehung oxidativer Radikale, die wiederum redoxsensitive Rezeptoren wie den nukleären Faktor κ B aktivieren und so die Gentranskription für proinflammatorische Cytokine wie Interleukin-8 (CXCL-8) und Tumor Necrose Factor- α (TNF- α) in Gang setzen (Yang *et al.*, 2006). Tabakrauch stimuliert außerdem

Makrophagen, die ihrerseits Chemokine freisetzen und neutrophile Granulozyten anlocken. Während einer Exazerbation kommt es darüber hinaus zu einer signifikanten Erhöhung des oxidativen Stresses durch gesteigerte Neutrophilenzahl und CXCL-8 Konzentration in den Atemwegen der COPD-Patienten (Drost *et al.*, 2005).

Zum anderen führt ein Ungleichgewicht im Proteasen-/Antiproteasensystem zu einer verstärkten Schädigung der elastischen Lungenfasern. Die reaktiven Sauerstoffprodukte im Tabakrauch inaktivieren Antiproteasen wie das hepatisch gebildete $\alpha 1$ -Antitrypsin sowie lokal gebildete Antiproteasen (TIMPs). Eingewanderte Granulozyten sezernieren Elastase und Metalloproteinasen, die zu einer Schädigung von Elastinfasern führen. Auf diesem Wege wird die zentrilobuläre Emphysementstehung gefördert, die mit Dilatation und Zerstörung respiratorischer Bronchiolen einhergeht. Die Bedingungen für rezidivierende Entzündungen werden zudem durch Hypersekretion zähen Schleimes und Lähmungen der Zilienfunktion begünstigt.

1.3.2. Systemische Wirkung der COPD

Zunehmend werden auch systemische Komplikationen und Begleiterscheinungen der Erkrankung diskutiert, wie etwa Gewichtsverlust, Skelettmuskeldysfunktion und systemische Inflammation.

Gewichtsverlust, der bei etwa 50% der Patienten im Stadium III nach GOLD auftritt, stellt einen wichtigen Parameter für eine schlechtere Prognose dar (Schols *et al.*, 1998). Als Ursache des Gewichtverlustes wird eine multifaktorielle Genese diskutiert, bei der eine negative Energiebilanz im Vordergrund steht. Hervorgerufen wird diese unter anderen durch hormonelle und neurohormonelle Faktoren. Es gibt Hinweise für ein Ungleichgewicht katabol und anabol wirksamer Hormone bei Patienten mit COPD. Van Vliet *et al.* wiesen erniedrigte Testosteronserumspiegel bei männlichen Patienten mit COPD nach (Van Vliet *et al.*, 2005). Während Exazerbationen der Erkrankung wurden erhöhte Leptinkonzentrationen im Zusammenhang mit einer katabolen Stoffwechsellage gemessen (Creutzberg *et al.*, 2000). COPD-Patienten mit Gewichtsverlust weisen eine erhöhte Apoptoserate von Skelettmuskelzellen auf (Agusti *et al.*, 2002). Dies ist möglicherweise durch erhöhte systemische TNF α -Konzentrationen erklärbar. *In vitro*-Versuche zeigten, dass TNF α die Myoblastendifferenzierung hemmt (Langen *et al.*, 2002). Eine vermehrte Zirkulation reaktiver Sauerstoffspezies, wie sie bei Patienten mit COPD beschrieben wird, trägt zur Muskelatrophie bei (Agusti *et al.*, 2004).

Der Verlust an Muskelmasse geht mit der Umwandlung von myoglobinreichen Muskelfasern (Typ I) in myoglobinarmer Typ II-Fasern einher (Gosker *et al.*, 2003). Dies ist ein Hinweis für die Umstellung des Muskelmetabolismus auf anaerobe Glykolyse. Bei Patienten mit schwerer COPD wird eine reduzierte körperliche Belastbarkeit bei verfrüht ansteigenden Laktatserumkonzentrationen beschrieben (Casaburi *et al.*, 1991). Prognostisch bedeutsam ist die Beeinflussung der Atemmechanik. *Air trapping* führt zu Lungenüberblähung und damit zur Verlängerung der diaphragmalen Muskelfasern mit Einschränkung der kontraktiven Eigenschaften (Zocchi *et al.*, 1987).

So wie sich in der Lunge erhöhte Konzentrationen an proinflammatorischen Cytokinen nachweisen lassen, sind auch systemische Konzentrationen von CXCL-8, TNF α und Interleukin-6 (IL-6) bei Patienten mit COPD während Exazerbationen, aber auch in infektfreien Phasen erhöht (Schols *et al.*, 1996). So ließ sich zeigen, dass Makrophagen von Patienten mit COPD bei *in vitro*-Stimulation gegenüber Zellen gesunder Probanden vermehrt TNF α produzieren (Di Francia *et al.*, 1994). Auch zeigten neutrophile Granulozyten aus dem Blut von COPD-Patienten eine verstärkte Chemotaxis (Burnett *et al.*, 1987) und eine erhöhte Fähigkeit, Sauerstoffradikale zu synthetisieren (Noguera *et al.*, 2001). Strassburg *et al.* konnten zeigen, dass aus dem Blut isolierte Neutrophile von COPD-Patienten während einer Pneumonie eine stärkere chemotaktische Aktivität im Vergleich zu Patienten ohne COPD aufweisen und dass die erhöhte chemotaktische Aktivität mit einem höheren „Pneumonia Severity Index“ (PSI) und damit einer schlechteren Prognose einhergeht (Strassburg *et al.*, 2004).

Als Marker für systemische Inflammation ist C-reaktives Protein (CRP) in der Diskussion, dessen Serumspiegel bei Patienten mit COPD unabhängig von anderen Faktoren erhöht ist (Pinto-Plata *et al.*, 2006). In einer prospektiven Kohortenstudie wurde CRP als eigenständiger prognostischer Faktor für Hospitalisation und Mortalität beschrieben (Dahl *et al.*, 2007).

Systemische Inflammation kann einerseits durch die Einwirkung von Tabakrauch alleine bedingt sein. Andererseits kann auch eine Ausschüttung von Cytokinen durch Leukozyten der Lunge in den Kreislauf der Patienten für verstärkte Inflammation und damit mögliche systemische Komplikationen verantwortlich sein.

1.4. Neutrophile Granulozyten im Entzündungsgebiet

Bei der Bekämpfung einer bakteriellen Infektion der unteren Atemwege kommt es zunächst zur Aktivierung der angeborenen Immunität. Dabei spielt die rasche Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Infektionsgebiet eine entscheidende Rolle.

Bakterien, die bei einer Infektion durch die Mukosa wandern, treffen dort auf gewebsständige Makrophagen, die die bakteriellen Kohlenhydrate erkennen und daraufhin eine Cytokinkaskade mit lokaler und systemischer Wirkung in Gang setzen. Umliegende Endothelzellen werden durch den von Makrophagen sezernierten $\text{TNF}\alpha$ aktiviert und produzieren proinflammatorische Cytokine, wie zum Beispiel CXCL-8, welches als chemotaktischer Faktor und Aktivator auf neutrophile Granulozyten wirkt. Die individuelle Proteoglykanexpression der Erregeroberfläche bestimmt über die Aktivierung von Toll-Rezeptoren der Makrophagen die Cytokinproduktion und damit den Ablauf der adaptiven Immunantwort.

Die im Gewebe vorhandenen proinflammatorischen Cytokine stimulieren Endothelzellen, Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1 zu exprimieren, an dem Granulozyten über CD11b-Integrine Verbindungen herstellen können. Dadurch wird eine Extravasation der Zellen ins Gewebe ermöglicht. Von den Granulozyten sezernierte Matrixmetalloproteinasen dienen dabei dem Durchtritt durch die Basalmembran. MMP-8 und MMP-9 sind in der Lage, Kollagen I, beziehungsweise Kollagen V zu spalten. Endothelzellen und Fibroblasten produzieren die natürlichen Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2, die den Metalloproteinasen entgegenwirken und für ein Gleichgewicht sorgen (Cawston *et al.*, 2001).

Im Gewebe folgen neutrophile Granulozyten einem Interleukin-8-Konzentrationsgradienten zum Entzündungsherd hin. Dort findet die Phagozytose mikrobieller Erreger überwiegend vermittelt durch Opsonisine, wie Immunglobuline und Komplementfaktoren statt. Zu den G-Protein gekoppelten Komplementrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten zählen der CR1-Rezeptor (CD35) und der CR3-Rezeptor (CD11b), welche eine Spezifität für den Komplementfaktor C3b aufweisen. C3b hat eine zentrale Bedeutung für die Infektionsabwehr extrazellulärer Bakterien. Allerdings ist die Phagozytose von opsonisierten Partikeln abhängig von weiteren Co-Faktoren, wie Laminin oder Fibronectin (Wright *et al.*, 1985). Die über Immunglobulinrezeptoren für IgG, $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ (CD32) und $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$ (CD16), stattfindende Phagozytose ist abhängig von der Phosphorylierung sogenannter zytoplasmatischer ITAMS („immunorezeptor tyrosine-

based activation motifs“). Dabei kommt es zur Interaktion zwischen beiden Rezeptorsystemen. So interagiert der Fc γ RIIIB-Rezeptor bei der Phagozytose auch mit den Komplementrezeptoren (Daëron M, 1997).

Es zeigen sich jedoch auch Unterschiede in der Funktion beider Rezeptorsysteme. Eine Aktivierung der Immunglobulinrezeptoren bei Makrophagen resultiert in der Ausschüttung von Cytokinen, Sauerstoffradikalen („respiratory burst“) und in der Produktion von Arachidonsäuremetaboliten, während dies bei komplementrezeptorabhängiger Phagozytose nicht vorkommt (Yamamoto *et al.*, 1984).

Lange Zeit hat man die Rolle dieser Zellen nur darin gesehen, als Effektorzellen durch Phagozytose und Degranulation für das Abtöten von Bakterien zuständig zu sein. Darüber hinaus konnte aber gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten ein weites Spektrum an Cytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren produzieren (Tabelle 2) und so an der Entzündungsregulation sowohl parakrin, als auch autokrin aktiv Teil nehmen. Die produzierte Menge durch die Granulozyten ist zwar vielfach niedriger als die Ausschüttung von Cytokinen durch Makrophagen, allerdings übertrifft die Konzentration der Granulozyten die der Makrophagen in einem Entzündungsgebiet um ein Vielfaches (Cassatella M, 1995). Dabei unterliegt die Cytokin-Produktion immunmodulatorischen Mediatoren, wie dem durch T- Helferlymphozyten gebildeten Interleukin-10 (IL-10), Interferon- γ (IFN- γ) oder Interleukin-4 (IL-4) (Romagnani S, 1994).

Neutrophile Granulozyten helfen aber nicht nur bei der Bekämpfung pathogener Keime, sondern sie können das körpereigene Gewebe auch unkontrolliert schädigen. Für die Schädigung körpereigenen Gewebes durch neutrophile Granulozyten gibt es zahlreiche klinische Beispiele, wie Rheumatoide Arthritis, Cystische Fibrose oder „Acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Neutrophile können nicht effizient in ihrer Immunantwort zwischen Selbst- und Nichtselbst unterscheiden und sind dabei auf die Hilfe von löslichen Komponenten des Immunsystems wie Komplement, Antikörpern und Cytokinen angewiesen.

Begrenzt wird die schädigende Funktion in erster Linie durch eine Eliminierung des pathogenen Agens und damit der Unterbrechung der proinflammatorischen Cytokinkaskade. Auch Tachyphylaxie gegenüber Cytokinen spielt eine gewisse Rolle, damit es zur Rückbildung des Entzündungsgeschehens kommen kann. Die Apoptose von in das Entzündungsgebiet eingewanderten Neutrophilen mit folgender Phagozytose durch Makrophagen stellt den begrenzenden Faktor der Immunreaktion dar.

Tabelle 2: Cytokinsynthese neutrophiler Granulozyten

Exprimierte Cytokine <i>in vitro</i>	
<u>Proinflammatorische Cytokine</u> TNF- α IL-1- α , IL-1- β IL-12	<u>Chemokine</u> CXCL-8 Growth- related gene product- α (GRO- α) Macrophage infiltrating protein-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β Cytokine induced chemoattractants (CINC)
<u>Antiinflammatorische Cytokine</u> IL-1 Ra (Rezeptorantagonist)	<u>Wachstumsfaktoren und Andere</u> IFN- α , IFN- β Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) Fas Ligand CD30 Ligand Vascular endothelial growth factor (VEGF) Hepatocyte growth factor (HGF)

Quelle: modifiziert nach Cassatella, 1999

1.4.1. Cytokine, Chemokine und ihre Rezeptoren

Neutrophile Granulozyten sind Quelle und Empfänger verschiedenster Cytokine. Es sind kleine, etwa 25 kDa große Moleküle, die an spezifische Rezeptoren binden. Gelangen sie in den Blutkreislauf, können sie je nach Halbwertszeit auch systemische Wirkung entfalten. Man unterteilt sie in unterschiedliche Subgruppen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Beispiele von Cytokinen mit Einfluss auf die Neutrophilenfunktion

	Cytokin	Wirkung
Hämatopoetine	G-CSF	Entwicklung und Proliferation
	GM-CSF	Entwicklung und Proliferation, Steigerung von Superoxidproduktion, Chemotaxis, Phagozytose und Degranulation
TNF-Familie	TNF α	Steigerung der Superoxidproduktion, Oberflächenrezeptorhochregulation
	Fas-Ligand	Induktion von Apoptose
nicht zugeordnete Cytokine	IL-1 α	Steigerung der Superoxidproduktion
	IL-1 β	Steigerung der Superoxidproduktion, Elastaseproduktion und Phospholipase D-Aktivität
	IL-1 RA	keine intrinsische Aktivität am Rezeptor, natürlicher Rezeptorantagonist
	IL-2	Steigerung der Superoxidproduktion
	IL-5	Gesteigerte Chemotaxis
	IGF I	Gesteigerte Phagozytose, Degranulation
	PAF	Steigerung der Superoxidproduktion, Aktin-Polymerisation und Elastasefreisetzung

GM-CSF: “granulocyte-macrophage-colony stimulating factor”, IL-1 RA: Interleukin-1 Rezeptorantagonist, IGF I: “insulin like growth factor I”, PAF: “platelet activating factor”

Als Chemokine bezeichnet man eine Klasse von Cytokinen, die in der Lage sind, Zellen mit einem passenden Rezeptor dazu anzuregen, zur Quelle des jeweiligen Chemokins zu wandern. Dabei erfüllen die Chemokine zwei verschiedene Funktionen. Zum einen werden die Zielzellen über einen zum Infektionsherd hin zunehmenden Konzentrationsgradienten angelockt, dabei sind die Chemokine unter anderem an Proteoglykanen auf der Oberfläche von Gefäßendothelien gebunden. Zum anderen bewirken sie die schon angesprochene

Hochregulation von Leukozyten-Integrinen. Des Weiteren kommt es zur Formänderung der Neutrophilen, was eine Aktivierung des Zytoskeletts widerspiegelt und im Zusammenhang mit der Bewegungsfähigkeit von Bedeutung ist (Omann *et al.*, 1987). Ferner bewirkt CXCL-8 die Freisetzung intrazellulär gespeicherter Vesikel sowie die Aktivierung des „respiratory burst“ (Baggiolini M und Wymann MP, 1990). *In vitro*-Versuche zeigten, dass CXCL-8 eine antiapoptotische Wirkung auf Neutrophile entfaltet (Goodman *et al.*, 1998). Grundsätzlich lassen sich die Chemokine anhand ihrer molekularen Struktur in zwei Gruppen unterteilen:

- In CC-Chemokine, die an ihrem aminoterminalen Ende zwei direkt nebeneinander liegende Cysteinreste tragen und in einem Bereich auf Chromosom 4 codiert sind.
- In CXC-Chemokine, die zwischen diesen beiden Cysteinresten eine weitere Aminosäure tragen und in einem Bereich von Chromosom 17 codiert sind. Diese Gruppe lässt sich noch dahingehend weiter unterteilen, dass es eine bestimmte Gruppe von CXC-Chemokinen gibt, die vor dem ersten dieser konstanten Cysteine eine bestimmte Abfolge von drei Aminosäuren trägt (Glutaminsäure-Leucin-Arginin).

CXC-Chemokine, die dieses Aminosäuretriplekt enthalten, wie zum Beispiel CXCL-8, stellen ein „Chemoattractant“ für neutrophile Granulozyten dar. CXCL-8 ist das von Neutrophilen am meisten produzierte Chemokin mit der größten Potenz (Gainet *et al.*, 1998). Jedoch auch andere Zellen wie Makrophagen, T-Lymphozyten, Bronchialepithelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten sind in der Lage, CXCL-8 zu bilden. CC-Chemokine, wie zum Beispiel MCP-1 oder MIP-1 α , stimulieren die Wanderung von Monozyten in ein Entzündungsgebiet und lösen damit die Entwicklung zu Gewebsmakrophagen aus.

Chemokinrezeptoren gehören zur Gruppe der Siebentransmembran-Rezeptoren, die mit G-Proteinen gekoppelt sind. CXC-Chemokine binden an CXC-Rezeptoren, von denen fünf verschiedene bekannt sind.

Tabelle 4: CXC-Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokin	Rezeptor
CXCL-8	CXCR1 CXCR2
Growth Related Cytokine α,β,γ (GRO α,β,γ)	CXCR2
Neutrophil Activating Peptide (NAP-2)	CXCR2

GRO α , - β , - γ und NAP-2 wirken zwar auch auf neutrophile Granulozyten, entfalten aber eine sehr viel geringere Wirkung auf die Zellen als CXCL-8. Sie binden im Gegensatz zu CXCL-8 nur an den CXCR2- Rezeptor.

CXCR1 und CXCR2 werden bei hohen Konzentrationen ihrer Agonisten innerhalb von fünf bis zehn Minuten bis zu 90% von der Zelloberfläche herunterreguliert und internalisiert. Das gebundene CXCL-8 wird intrazellulär durch lysosomale Proteasen abgebaut (Chuntharapai A und Kim KJ, 1995). Die Rezeptoren werden recycelt und auf der Zelloberfläche wieder reexprimiert (Oppenheim *et al.*, 1991).

In niedrigeren Konzentrationen, die ausreichend für die Induzierung von Chemotaxis Neutrophiler sind, ist eine Reaktivierung beider Rezeptoren auch bei wiederholter Gabe des Agonisten möglich. Dabei ist die erforderliche CXCL-8-Konzentration für die Rezeptor-Internalisation etwa zehnmal höher, als sie für die maximale Aktivierung der neutrophilen Granulozyten notwendig wäre (Rose *et al.*, 2004). Die Autoren schließen daraus, dass die Clathrin-abhängige Endozytose des Rezeptors nicht für die Aktivierung der Zellen durch CXCL-8 verantwortlich ist. Die Rezeptorendozytose könnte als eine Art Stopp-Signal im Zentrum einer Entzündung interpretiert werden (Rose *et al.*, 2004). Der CXCR1- Rezeptor wird bei sinkender CXCL-8-Konzentration sehr viel schneller innerhalb von Minuten wieder reexprimiert, während der CXCR2-Rezeptor länger herunterreguliert bleibt. Im Gegensatz dazu reichen wesentlich geringere CXCL-8-Konzentrationen aus, um den CXCR2-Rezeptor zu internalisieren (Chuntharapai A und Kim K, 1995).

Die chemotaktische Wirkung auf Neutrophile kommt durch beide Rezeptoren zustande. Es wird vermutet, dass eine Rollenteilung zwischen den Rezeptoren je nach CXCL-8-Konzentration stattfindet. Peripher wird das geringe CXCL-8-Signal durch CXCR2 vermittelt. Im Zentrum der Entzündung übernimmt CXCR1 die Haupteffektorfunktion (Zeilhofer HU und Schorr W, 2000). Inwiefern die ligandeninduzierte Internalisation der Rezeptoren Einfluss auf die zielgerichtete Wanderung der Zellen nimmt, bleibt bisher ungeklärt.

Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Rezeptoren in ihrer Funktion bezüglich der Zellaktivierung. So wird der „respiratory burst“ nur durch den CXCR1-Rezeptor vermittelt. Auch die Synthese des Superoxidanions, vermittelt durch die Aktivierung der Phospholipase D und eine NADPH-abhängige Sauerstoffoxidase, erfolgt über den CXCR1-Rezeptor (Jones *et al.*, 1996).

Zusätzlich gibt es ligandenunabhängige Faktoren, die die Oberflächenexpression von CXCR1 und CXCR2 beeinflussen. Es zeigt sich, dass Neutrophile nach Phagozytose eine

geringere chemotaktische Aktivität aufweisen und dass dies mit der niedrigeren Expression von CXCR- Rezeptoren nach Phagozytose zusammenhängt (Doroshenko *et al.*, 2002). Auch konnte gezeigt werden, dass bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) und TNF α eine CXCL-8-unabhängige Herunterregulierung der CXCR-Rezeptoren bewirken. Mittels konfokaler Mikroskopie ließ sich jedoch nachweisen, dass es im Gegensatz zur Wirkung des CXCL-8 nicht zu einer Internalisation der Rezeptoren kommt. Der durch LPS und TNF α induzierte Effekt auf die CXCR-Rezeptoren ist durch Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren inhibierbar. Dies lässt darauf schließen, dass es zu proteolytischen Prozessen mit Abspaltung der CXCR-Rezeptoren durch LPS und TNF α kommt (Khandaker *et al.*, 1999).

1.4.2. Apoptose

Schließlich gilt der programmierte Zelltod neutrophiler Granulozyten und die daraufhin folgende Phagozytose durch Makrophagen als Hauptmechanismus für die Entfernung der Zellen aus dem Entzündungsgebiet.

Neutrophile Granulozyten haben ohne zellspezifische Stimulation eine Lebensdauer von sechs bis acht Stunden (Jones J und Morgan BP, 1995). Danach vollführen die Zellen den programmierten Zelltod, der sich im Gegensatz zur Zellnekrose durch einen kontrollierten Zellabbau auszeichnet. Morphologisch geht die Apoptose mit einer koordinierten Zellmembranschrumpfung bis zur Bildung so genannter apoptotischer Körperchen einher. Es kommt zur Chromatinkondensation und zur Spaltung der DNA durch Endonukleasen. Typischerweise wird die DNA dabei in Fragmente von 180 bis 200 Basenpaaren geschnitten. Diesem Vorgang geht eine Aktivierung einer intrazellulären Caspase voraus, was zur Aktivierung von Effektor-Caspasen mit proteolytischer Aktivität führt, deren Zielsubstrate Zellstrukturproteine, nukleäre Laminine und DNA-Reparaturenzyme sind. Effektor-Caspasen können über verschiedene Wege aktiviert werden. Die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien, die von Bcl-2-Proteinen kontrolliert wird, führt auf diesem Wege ebenfalls zur Aktivierung proteolytischer Caspasen (siehe Abb. 1).

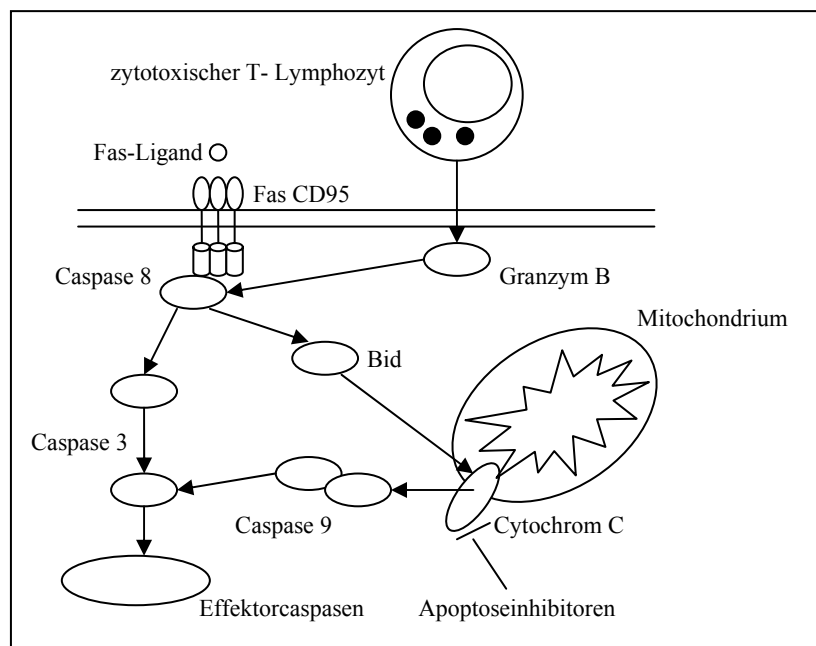


Abb.1: Apoptoseinduktion und Effekte von Caspasen (nach Trends Biochemistry, 2001)

Sowie die natürliche Lebensdauer der Zellen begrenzt ist, gibt es auch andere Mechanismen, die Apoptose steuern. Zum einen können Makrophagen und zytotoxische T-Lymphozyten aktiv Todessignale über den Fas-Liganden am Fas CD95-Rezeptor induzieren, um auf diesem Wege Caspase 8 zu aktivieren. Auch TNF α kann über Bindung an Oberflächenrezeptoren den programmierten Zelltod induzieren (Marshall J und Watson R, 1997). Die Phagozytose von Neutrophilen führt bei Makrophagen zur Ausschüttung von löslichem Fas-Ligand und damit im Sinne einer negativen Verstärkung zu einer weiteren Rückbildung der Entzündung (Brown und Savill, 1999).

Apoptotische Granulozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche Phosphatidylserin, das Makrophagen für die Erkennung apoptotischer Zellen benötigen. Die phosphatidylserinabhängige Phagozytose führt bei Makrophagen zur Ausschüttung antiinflammatorischer Cytokine wie „transforming growth factor - β -1“ (TGF- β -1) (Huynh *et al.*, 2002).

Proinflammatorische Cytokine wie GM-CSF und LPS verzögern hingegen die Apoptose, indem sie die Genexpression von proapoptotischen Proteinen der Bcl2-Familie herunterregulieren und die mitochondriale Stabilität erhöhen (Watson *et al.*, 1999). CXCL-8 ist in der Lage, über einen Bcl-unabhängigen Effekt die Apoptose Neutrophiler zu verzögern. Dies betrifft sowohl spontane Apoptose, als auch TNF α -induzierte Apoptose und ist vermutlich CXCR2 vermittelt (Kettritz *et al.*, 1998).

Auch Glukokortikoide haben lebensverlängernde Wirkung auf Neutrophile. In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass bei Dexamethasonkonzentrationen, die bei einer Glukokortikoithérapie erreicht werden, ein lebensverlängernder Effekt von mehr als 50% zu erwarten ist. Allerdings war die antiapoptotische Wirkung auf 24 Stunden begrenzt (Cox G, 1995).

Im Gegensatz dazu beschleunigt IL-10 die Apoptose bei LPS stimulierten neutrophilen Granulozyten, während es auf nicht stimulierten Zellen diesen Effekt nicht zeigte (Cox G, 1996). Die Phagozytose von bakteriellen Erregern wie *Escherichia coli*, aber auch typischen Erregern von nosokomialen Infektionen wie *Candida albicans* führt ebenso zu einer Beschleunigung des programmierten Zelltodes (Rotstein *et al.*, 2000). Es kommt dabei zu einer Änderung der Genexpression Neutrophiler im Sinne einer Hochregulierung proapoptotischer Faktoren und einer Herunterregulierung antiapoptotischer Faktoren (Kobayashi *et al.*, 2003).

Während viele pathogene Erreger bei neutrophilen Granulozyten eine Beschleunigung der Apoptose induzieren, zeigte die intrazelluläre Infektion Neutrophiler mit *Chlamydia pneumoniae*, einem wichtigen Erreger akuter Infektionen des Respirationstraktes, dass die Lebensdauer der Granulozyten um ein Vielfaches erhöht wird. Neutrophile dienen vermutlich in den ersten Tagen einer Infektion als Wirtszellen und fördern das Überleben und die Vermehrung der Bakterien (van Zandbergen *et al.*, 2004).

Wichtig für die Induktion von Apoptose ist außerdem die intrazelluläre Gluthation-Konzentration. Watson *et al.* konnten zeigen, dass eine Aktivierung des CD11b-Adhäsionsrezeptors oder eine Stimulation von Neutrophilen mit LPS zur Zunahme des intrazellulären Gluthationspiegels führt und somit eine antiapoptotische Wirkung bei Fas-Ligand induzierter Apoptose erzeugt (Watson *et al.*, 1997).

Die Regulation des programmierten Zelltodes von neutrophilen Granulozyten in einem Entzündungsgebiet unterliegt somit vielfältigen stimulierenden und selbstlimitierenden Einflüssen und ist letztendlich an die Elimination des auslösenden Pathogens gekoppelt. Tabelle 5 soll einen Überblick über pro- und antiapoptotische Faktoren geben.

Tabelle 5: Faktoren mit Einfluss auf die Apoptose neutrophiler Granulozyten (Marshall J und Watson R, 1997)

Antiapoptotische Mechanismen		Proapoptotische Mechanismen
- IL-1 β	- Glukokortikoide	- IL-6*
- IL-2	- β_2 -Integrin Adhäsion	- IL-10
- IL-6*	- erhöhte intrazelluläre	- TNF*
-IL-8	Kalziumkonzentration	- Fas-Ligand
- Gro- α		
- G-CSF		
- GM-CSF		
- INF γ		
- TNF*		
- C 5a		- Phagozytose von <i>Escherichia coli</i>
- bakterielles Endotoxin LPS		- Reduziertes intrazelluläres Gluthation

* Mediatoren mit widersprüchlicher Datenlage

1.5. Fragestellung und Zielsetzung

Für die Entstehung, den Verlauf und die Prognose einer bakteriellen Pneumonie stellen prädisponierende Faktoren und hier insbesondere die COPD eine entscheidende Rolle dar. Wir stellten uns die Frage, auf welchem pathologischen Mechanismus die insuffiziente Immunantwort auf eine Infektion bei COPD, im Vergleich zu einer akut aufgetretenen Pneumonie ohne zugrunde liegende COPD beruht. Ziel der Untersuchungen war, die Unterschiede im Verlauf einer pulmonalen Infektion darzustellen, um mehr über mögliche Zusammenhänge während der Entzündungsrückbildung zu erfahren.

Im Vordergrund stand die Apoptose neutrophiler Granulozyten im pulmonalen Kompartiment. Von Interesse war in diesem Zusammenhang auch, ob im Vergleich mit vorherigen Arbeiten Unterschiede oder Parallelen zwischen bronchoalveolärer Lavage und Sputum zu finden sein würden.

Eine hohe Apoptoserate kann als unzureichende Aktivierung der Abwehrzellen gedeutet werden. Damit verbunden ist eine mögliche unzureichende Eliminierung der Zellen und Zellfragmente durch Makrophagen und eine sich dadurch aufrechterhaltende Inflammation mit daraus resultierender zusätzlicher Schädigung des umgebenden Lungengewebes.

Hieraus ergibt sich die Arbeitshypothese, in der wir annehmen, dass eine sich fortlaufend unterstützende Inflammation mit unzureichender Neutrophilenelimination im Lungenkompartiment bei Patienten mit COPD und akuter Infektion der unteren Atemwege als Ursache der chronischen Destruktion des Lungengewebes verantwortlich zu machen ist. Hierzu untersuchten wir vergleichend COPD-Patienten mit CAP und zuvor lungengesunde CAP-Patienten hinsichtlich des Aktivierungsstatus neutrophiler Granulozyten anhand der Oberflächen-Rezeptorenexpression im pulmonalen Kompartiment aus Sputum und systemischer Neutrophiler aus Blut. Cytokinkonzentrationen wurden im Sputumüberstand gemessen.

Schließlich sollte ein objektträgergebundener TUNEL-Test einen Vergleich zu den Ergebnissen des Fluoreszenzzytometers bezüglich der Apoptoserate neutrophiler Granulozyten ermöglichen. Mögliche Unterschiede beider Verfahren werden dabei in Vorversuchen anhand induzierter Apoptose exemplarisch dargestellt.

Wir stellten folgende Fragen:

- Inwieweit unterscheiden sich pulmonale und periphervenöse neutrophile Granulozyten in Aktivierungsgrad und Apoptoserate von Patienten mit und ohne COPD und ambulant erworbener Pneumonie (CAP)?
- Wie entwickeln sich Aktivierungsgrad und Apoptoserate der Zellen im Verlauf der Entzündung unter antibiotischer Therapie in der Klinik?

2. Untersuchungskollektive und Studiendesign

2.1. Untersuchungskollektive

2.1.1. *Untersuchungskollektiv 1*

Patienten mit COPD und ambulant erworbener Pneumonie:

Im Untersuchungskollektiv 1 befanden sich 15 Patienten, die wegen einer ambulant erworbenen Pneumonie bei vorher bekannter COPD stationär aufgenommen wurden. Bis 30 Tage vor Einschluss in die Studie befanden sie sich in keiner vorangegangenen stationären Krankenhausbehandlung. 5 dieser 15 Patienten wurden mit systemischen Glukokortikoiden behandelt. Die mittlere FEV1 betrug in diesem Patientenkollektiv $46,42 \pm 16,89$, damit waren 11 der 15 Patienten lungenfunktionell dem Stadium II nach Gold ($30\% \leq \text{FEV1} < 80\%$) oder schlechter zuzuordnen.

2.1.2. *Untersuchungskollektiv 2*

Patienten ohne COPD mit ambulant erworbener Pneumonie:

Das zweite Patientenkollektiv bestand aus 13 Patienten, die aufgrund einer ambulant erworbenen Pneumonie stationär behandelt werden mussten, ohne dass bei einem der Patienten eine chronisch-obstruktive Lungenerkrankung vorlag. Keiner dieser Patienten wurde immunsuppressiv mit Glukokortikoiden behandelt. Die demografischen Daten beider Untersuchungskollektive sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Demografische Daten beider Untersuchungskollektive (die Werte sind als Median $\pm$ Standardabweichung angegeben)

Parameter	CAP + COPD (n=15)	CAP – COPD (n=13)	P
Alter	67,93 $\pm$ 13,37	60,69 $\pm$ 14,48	0,12
Geschlecht (m/w)	10/5	7/6	0,59
Raucher/Nichtraucher	12/2	9/4	0,49
Gerauchte Zigaretten (in packyears)	24,44 $\pm$ 22,97	21,67 $\pm$ 25,08	0,7
“New simplified acute Physiology Score” (SAPS II) *	21,86 $\pm$ 6,36	19,23 $\pm$ 4,89	0,13
“Pneumonia Severity Index” (Fine Score)*	88,0 $\pm$ 27,51	74,31 $\pm$ 23,4	0,16
Schwerer Verlauf nach SAPSII	6/8	3/10	0,4
Intensivmedizinische Behandlung	1	2	0,72
PMN ($\times 1000/\mu\text{L}$)	13,06 $\pm$ 4,49	15,38 $\pm$ 4,48	0,24
C-Reaktives Protein (mg/ml)	149,95 $\pm$ 74,82	183,33 $\pm$ 129,97	0,55
Mikrobiologie	1 $\times$ <i>C. pneumoniae</i> 1 $\times$ <i>H. influenzae</i> 1 $\times$ <i>Staph. aureus</i> 1 $\times$ <i>B. catarrhalis</i> 2 $\times$ <i>E. coli</i>	1 $\times$ <i>S. pneumoniae</i> 2 $\times$ <i>H. influenzae</i> 1 $\times$ <i>H. parainfluenzae</i> 1 $\times$ <i>P. buccae</i> 1 $\times$ <i>Enterobacter</i> 1 $\times$ <i>E. coli</i>	
Antibiotikatherapie vor stationärer Aufnahme	2	4	0,49
Systemische Glukokortikoidtherapie vor Einschluss in die Studie	5	0	0,12
Stationäre Verweildauer (Tage)	10,77 $\pm$ 4,73	12,83 $\pm$ 6,63	0,3

* SAPS II Score: (Le Gall JR, 1993), * Fine Score (PSI): (Fine MJ, 1997)

2.1.3. Absolute Zellzahlen im Sputum

Hinsichtlich der Gesamtzellzahl im Sputum zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven. Zum Zeitpunkt T2 wiesen COPD- Patienten mit Pneumonie signifikant geringere Zahlen an Makrophagen im Sputum auf, während sich bezüglich der absoluten Zellzahl an nekrotischen Neutrophilen keine signifikanten Unterschiede nachweisen ließen.

Tabelle 24: Absolute Zellzahlen im Sputum, COPD vs. ohne COPD. Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

Zellzahl	CAP + COPD	CAP - COPD	P
Gesamtzellzahl T1 $\cdot 10^6 \cdot g^{-1}$	21,05 $\pm$ 26,51 n= 15	24,38 $\pm$ 31,42 n= 13	n.s.
Gesamtzellzahl T2 $\cdot 10^6 \cdot g^{-1}$	9,63 $\pm$ 21,62 n= 11	10,81 $\pm$ 13,61 n= 8	n.s.
PMN T1 $\cdot 10^6 \cdot g^{-1}$	19,21 $\pm$ 22,57 n= 13	21,43 $\pm$ 30,48 n= 13	n.s.
PMN T2 $\cdot 10^6 \cdot g^{-1}$	13,35 $\pm$ 24,41 n= 8	12,34 $\pm$ 13,62 n= 6	n.s.
nekrotische PMN T1 $\cdot 10^6 \cdot g^{-1}$	3,42 $\pm$ 6,14 n= 13	2,02 $\pm$ 2,17 n= 13	n.s.
nekrotische PMN T2 $\cdot 10^6 \cdot g^{-1}$	0,64 $\pm$ 0,94 n= 12	1,47 $\pm$ 1,59 n= 8	n.s.
Makrophagen T1 $\cdot 10^6 \cdot g^{-1}$	1,73 $\pm$ 2,26 n= 13	3,37 $\pm$ 5,35 n= 13	n.s.
Makrophagen T2 $\cdot 10^6 \cdot g^{-1}$	0,32 $\pm$ 0,14 n= 8	4,9 $\pm$ 7,91 n= 6	< 0,03

2.2. Studienablauf

Die Patienten mit neu aufgetretener ambulant erworbener Pneumonie wurden innerhalb der ersten 24 Stunden nach stationärer Aufnahme in die Patientenstudie eingeschlossen. Neben einer venösen Blutentnahme für die Durchflusszytometrie wurde von allen Patienten frühmorgendlich induziertes Sputum gewonnen (siehe hierzu auch Kapitel 2.3.).

Die neutrophilen Granulozyten wurden dann aus Sputum und Blut isoliert und der Messung im Durchflusszytometer zugeführt (siehe hierzu auch Kapitel 4). Sputumüberstand wurde für die Cytokinbestimmungen bei -70°C eingefroren. Zudem wurden Cytospins für die Apoptosebestimmung mit dem objektträgergebundenen TUNEL-Test hergestellt (siehe hierzu auch Kapitel 4.5). Die Messungen erfolgten jeweils am 1. und 5. bis 7. Tag nach stationärer Aufnahme.

2.3. Gewinnung induzierten Sputums

Für die Gewinnung induzierten Sputums nutzten wir ein vorgegebenes Protokoll, nach dem die Patienten angehalten waren, frühmorgens nach dem Spülen des Mundes mit Wasser für 10 Minuten mit 3%iger Kochsalzlösung zu inhalieren.

Als Mechanismen, die der erleichterten Sputumproduktion zu Grunde liegen, werden unter anderem eine direkte Stimulation der Hustenrezeptoren, der mukziliaren Clearance sowie ein vermehrter Wasserfluss entlang der Schleimhäute diskutiert (Daviskas *et al.*, 1996).

Die Inhalation mit Kochsalzlösung kann bei Patienten mit Asthma bronchiale zur Bronchokonstriktion führen. Ryttilä *et al.* nahmen ein Monitoring der FEV1 bei Sputuminduktion vor und wiesen bei 11% der in die Studie eingeschlossenen Patienten mit COPD einen Abfall der FEV1 um mehr als 20% nach. Dies betraf in erster Linie Patienten mit teilreversibler Bronchokonstriktion (Ryttilä *et al.*, 2000). Daher wurde bei allen Patienten auf Hinweise für auftretende Dyspnoe geachtet und bei Bedarf ein kurzwirksames β 2-Mimetikum appliziert.

2.4. Definition und Diagnose der ambulant erworbenen Pneumonie

Die Diagnose der Pneumonie wurde nach den Kriterien des Robert-Koch-Institutes gestellt:

Hauptkriterium: (mindestens ein radiologisches Zeichen)

- ein neues oder progressives Infiltrat im Röntgenbild (obligat)
- Verdichtung
- Kavernenbildung

Nebenkriterien: (allgemeine Klinik, mindestens zwei Zeichen)

- Fieber über 38°C ohne andere Ursache
- Leukozyten >12000/nL oder < 4000/nL
- Verwirrtheit ohne andere Ursache bei Patienten ≥ 70 Jahre

Nebenkriterien: (pneumologische Klinik, mindestens zwei Zeichen)

- purulentes Sputum, Sekretveränderung (bezüglich Farbe oder Konsistenz) oder vermehrtes Absaugen, vermehrte Sekretmenge
- neuer oder zunehmender Husten, Dyspnoe oder Tachypnoe
- Rasselgeräusche oder bronchiale Atemgeräusche
- Verschlechterung des Gasaustausches

Der Schweregrad der ambulant erworbenen Pneumonie wurde mittels des „New simplified acute Physiology Score (SAPS II)“ ermittelt. Das Risiko, an einer Komplikation zu erkranken oder an der Pneumonie zu versterben konnte anhand des „Pneumonia Severity Index (Fine Score)“ abgeschätzt werden.

2.5. Ein- und Ausschlusskriterien zur Aufnahme in die Studie

Einschlusskriterien:

- ambulant erworbene Pneumonie
- eine oder mehrere der folgenden Grunderkrankungen: chronische Bronchitis, interstitielle Lungenerkrankung, Niereninsuffizienz, Herzinsuffizienz, Diabetes mellitus (Typ I und Typ II)

Ausschlusskriterien:

- septischer Schock
- ARDS
- Beatmungspneumonie
- nosokomiale Pneumonie
- definierte Immundefizienz (HIV, Neutropenie, zytotoxische Chemotherapie)
- Anhalt für maligne hämatologische Erkrankung
- Alter < 18 Jahre
- Schwangerschaft
- Transfusionspflichtige Anämie

2.6. Ethik

Von den Patienten wurde eine Einverständniserklärung unterschrieben. Die Studie wurde vom Ethikkomitee der Universität zu Lübeck gebilligt.

3. Material

3.1. Geräte:

- Inhalator PARI MASTER (PARI, Starnberg)
- Mikroskop Axioskop mit Kamera (Zeiss, Oberkochen)
- Zentrifuge Cytospin-2 (Shandon, Frankfurt)
- Zentrifuge LabofugeM (Heraeus Instruments, Hanau)
- Durchflusszytometer FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Macintosh Power PC 7300 (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Software Lysis 2, Cell Quest (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Sterile Werkbank Hera Safe mit UV Beleuchtung (Heraeus, Frankfurt)
- Vortexer Vibrofix VF1 (Janke und Kunkel, Staufen)
- Laborwaage Delta Range (Hassa, Lübeck)
- ELISA-Reader SLT 340ATTC (SLT Instruments, Crailsheim)
- Inkubat (Melag, Berlin)
- Brutschrank Cell House 200 (Heto)
- Eismaschine Icematic F90 Compact (Hauschild, Lübeck)
- Gefriertruhe Nuaire -85°C (Zapf Instrumente, Sarstedt)

3.2. Zellseparation

3.2.1. *Blut:*

- Histopaque 1119 (Sigma, Deisenhofen)
- Percoll (Amersham Pharma, Freiburg)
- RPMI 1640-Medium (Biochrom, Berlin)
- PP-Röhrchen 50 ml (Greiner, Nürtingen)

3.2.2. *Sputum:*

- DTT gelöst in Aqua destilatum (Sigma, Deisenhofen)
- RPMI 1640 Biochrom (Seromed Bioform, Berlin)
- PBS Phosphatpuffer (Gibco, Karlsruhe)
- Nylonnetzfilter 11 µm, 20 µm, 41 µm (Millipore, Irland)

- Filterhalter Millipore Swinnex (Millipore, Irland)

3.3. Färbung der Cytospin-Präparate:

- May-Grünwald-Färbung (Merck, Darmstadt)
- Hämatoxylin-Färbung (Division Chroma, Münster)
- Nekrosefärbung Trypan Blau, 0,4% (Sigma, Deisenhofen)
- Apoptosefärbung DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega, USA)

3.4. Durchflußzytometrie:

Antikörper und Reagenzien

- Isotypenkontrolle-PE IgG1 (PharMingen, Heidelberg)
- Isotypenkontrolle-PE IgG2a (PharMingen, Heidelberg)
- Isotypenkontrolle-FITC IgG2b (PharMingen, Heidelberg)
- CD66b-FITC (PharMingen, Heidelberg)
- CD66b-PE (PharMingen, Heidelberg)
- CD11b-PE (PharMingen, Heidelberg)
- CXCR1-FITC (PharMingen, Heidelberg)
- CXCR2-PE (PharMingen, Heidelberg)
- TLR2-PE (PharMingen, Heidelberg)
- GCSF-PE (PharMingen, Heidelberg)
- APO-Direct™ -Kit (PharMingen, Heidelberg)
- Propium Iodid-PE (PharMingen, Heidelberg)
- PBS-Phosphatpuffer (GIBCO, Karlsruhe)
- Paraformaldehyd (Merck, Hohenbrunn)
- Foetales Kälberserum (GIBCO, Karlsruhe)
- Absolut Ethanol (Merck, Darmstadt)
- Bovines Serumalbumin (Sigma, Deisenhofen)
- Falcon Röhrchen 2053 (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Monovetten, EDTA-Kalium 10 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
- PP-Röhrchen 15 ml (Greiner, Nürtingen)

3.5. ELISA:

- ELISA Testkit Quantikine® für die Messung von Fas Ligand, IL-1 β und IL-10 (R&D Systems, Mineapolis USA)
- ELISA Testkit DuoSet® für die Messung von IL-8 (R&D Systems, Mineapolis USA)

3.6. Zellinkubation:

- 6er Wellplatten (TPP, Schweiz)
- RPMI 1640 Medium ohne FCS (Biochrom, Berlin)
- Fas CD95 Antikörper (Immunotech, Marseille)

4. Methodik

4.1. Isolierung neutrophiler Granulozyten aus dem Vollblut

Um die Granulozyten aus venösem Vollblut zu gewinnen, wählten wir die Methode nach van Zandbergen *et al.*, die ein Lysieren der Erythrozyten überflüssig macht. Andere Methoden erfordern die Lyse von Erythrozyten, was zur ungewünschten Stimulation der Granulozyten und zur Hochregulation von Aktivitätsmarkern wie CD11b und CD66b führt (van Zandbergen *et al.*, 2002).

Die im Folgenden genauer erläuterte Methode nach van Zandbergen besteht in der Erstellung eines Percoll-Dichtegradienten, in dem sich die Zellen der Größe nach auftrennen lassen. Dazu wurden 6-7 ml venöses EDTA-Vollblut vorsichtig auf die gleiche Menge Histopaque 1119 geschichtet und mit 430 g für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Mit der Pasteurpipette wurde daraufhin der Überstand mit Serum, Lymphozytenfraktion und der Monozytenfraktion abpipettiert und verworfen. Der darunter liegende Granulozytenring konnte bis zum Erythrozytenpellet abgenommen und in ein PP-Röhrchen überführt werden. Die Granulozyten wurden in 2 ml RPMI 1640-Medium aufgenommen.

Zuvor war es nötig, den Percollgradienten in verschiedenen Konzentrationen von 65% bis 85% zu erstellen und in einem Röhrchen in aufsteigender Konzentration von unten nach oben aufzuschichten. Als letztes erfolgte die Überführung der Granulozytensuspension auf den Percollgradienten und die erneute Zentrifugation mit 430 g für 20 Minuten ohne Bremse. Im 2. und 3. Ring befanden sich die von Serum und Lymphozyten getrennten Granulozyten, die abgenommen wurden, um sie in farblosem RPMI-Medium aufzunehmen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in der Neubauer-Zählkammer. Die Konzentration wurde für die durchflusszytometrische Messung auf 10^6 Zellen pro 0,5 ml eingestellt. Zudem erfolgte eine Pappenheim-Färbung zur Differenzierung der Zellen und eine Vitalitätskontrolle mittels Trypan-Blau-Färbung. Der Anteil der nekrotischen Zellen durfte 2% nicht übersteigen.

4.2. Aufarbeitung des Sputums

In einer Reihe von Vorversuchen wurde in unserer Arbeitsgruppe untersucht, inwieweit eine Optimierung der Sputumaufbearbeitung bei akuten pulmonalen Infektionen möglich ist. Ziel dabei war es, eine möglichst gute Qualität (*Sputum Slide Quality*) bei geringem Zellverlust und möglichst niedriger *in vitro*-Stimulation zu erhalten. Die *Sputum Slide Quality* ergibt sich aus dem Anteil der vorhandenen Plattenepithelien, der Qualität der Zellhüllen und dem Grad der Speichel-Kontamination, also Faktoren, die alle einen Einfluss auf die Messungen haben können (Ronchi *et al.*, 2002). Um durchflusszytometrische Messungen aus induziertem Sputum durchführen zu können, ist es erforderlich, die muzinösen Anteile zu lösen. Hierfür kommt Dithiothreitol (DTT) zur Anwendung. Es zeigte sich, dass eine Konzentration von 0,1% DTT zu besserer Zellausbeute führte und dass sich durch die Fixierung mit 3%igem Paraformaldehyd eine *in vitro*-Aktivierung der Expression von Oberflächenmarkern um 30-70% verhindern lässt. Außerdem ließ sich so ein enzymatischer Abbau von Oberflächenrezeptoren *in vitro* um bis zu 300% senken (A. Niederfahrenheit, H. Kothe, K. Dalhoff, 2003).

Tabelle 7: Einfluss der DTT-Konzentration auf die Zellausbeute (n=3)

DTT Konzentration	Zellausbeute ($\times 10^6$) (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)
0,1%	16,14 $\pm$ 28,49
0,05%	14,38 $\pm$ 25,18
0,01%	12,12 $\pm$ 21,49

Ronchi *et al.* konnten zeigen, dass zusätzlich zur Behandlung mit DTT eine mehrfache Filterung des Sputums zur Verbesserung der *Sputum Slide Quality* beitragen kann. So konnte der Anteil von Plattenepithelien und Zelltrümmern von 47% auf 15% signifikant gesenkt werden (Ronchi *et al.*, 2002). In unseren Vorversuchen ließ sich die *Sputum Slide Quality* bei tolerablem Zellverlust durch Mehrfachfilterung um 9,5% steigern.

Insgesamt zeigte sich, dass die Messung von Oberflächenantigenen im Sputum stark von der jeweiligen Methode abhängt und strikte standardisierte Untersuchungsbedingungen erfordert. Für die Aufarbeitung des Sputums nutzten wir zwei unterschiedliche Protokolle, die je nach Qualität des gewonnenen Materials angewendet wurden. Dem ersten Protokoll nach wurde das gesamte Sputum in RPMI-Medium aufgenommen. Das zweite Protokoll

sah vor, den zellreichen Anteil mit einem Skalpell zu separieren und den Rest des Sputums, bestehend aus Muzin und Zelltrümmern, zu verwerfen.

Bevor eine Aufarbeitung der Zellen mit DTT erfolgen konnte, musste zunächst der Sputumüberstand durch Zentrifugation mit 110 g für 10 Minuten gewonnen werden. Nach erneuter Zentrifugation konnte der Überstand in Eppis überführt werden und bei -70°C eingefroren werden.

Das verbliebene Material wurde mit der äquivalenten Menge 0,1% DTT versetzt und bei 37°C für 15 Minuten im Wasserbad inkubiert. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation und Resuspension in farblosem RPMI-Medium. Die Zelllösung wurde daraufhin auf Nylonfilter absteigender Porengröße (41 µm, 20 µm bis 11 µm) gegeben.

Des Weiteren wurden eine Zellzahlbestimmung, eine Pappenheimfärbung und eine Kontrolle der Vitalität der gewonnenen Zellen mittels Trypan-Blau-Färbung durchgeführt. Zudem wurden Cytospin-Präparate für die objektträgergebundene Apoptosebestimmung mit dem DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System hergestellt. Die verbliebene Zellsuspension wurde für die Durchflusszytometrie auf 10⁶ Zellen pro 0,5 ml eingestellt.

4.3. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde mit einem so genannten FACScan der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen fluoreszenzaktivierten Zellsorter, mit dem man in der Lage ist, Zellpopulationen in Lösungen zu charakterisieren. Ein FACScan besteht aus drei Komponenten, einem Flusssystem, einem optischen System und einem Detektionssystem. Das Flusssystem sorgt über eine trichterartige Verengung für die Beschleunigung der Zellsuspension. Es kommt zu einer perlschnurartigen Anordnung der Zellen, die daraufhin einzeln vom optischen System des Gerätes erfasst werden. Dieses besteht aus einem Argon-Laser, der monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm abgibt. Das von den Zellen emittierte Licht wird über mehrere Spiegel, Filter und Linsen so aufgetrennt, dass mit dem vorhandenen Gerät fünf verschiedene Parameter detektiert werden können. Diese Signale werden dann von dem angeschlossenen Computer ausgewertet.

Anhand der Lichtstreuung lassen sich verschiedene Eigenschaften der Zellen charakterisieren. Durch das Vorwärtstreulicht (FSC) konnte die Zellgröße gemessen

werden. Mittels Seitwärtsstreulicht (SSC) ließen sich Zelldichte und Granulation bestimmen.

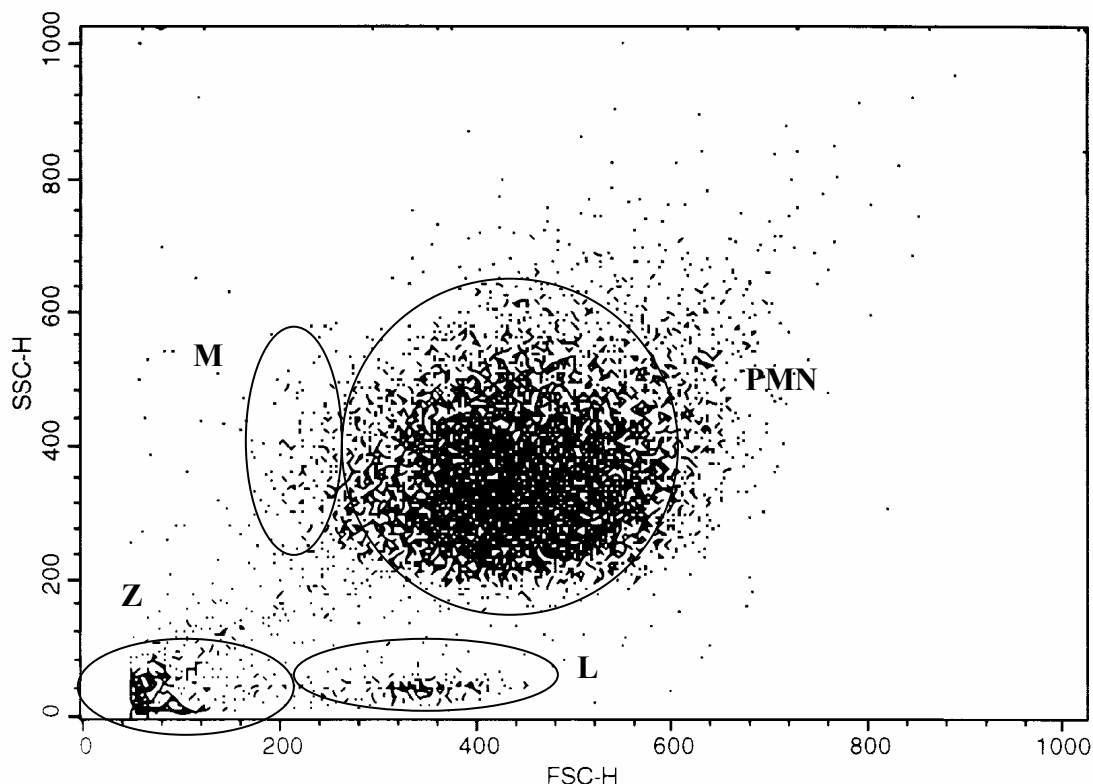


Abb.2: Dot-Plot(Punktwolken)-Darstellung einer aus Vollblut isolierten Leukozytenfraktion. Zellen sind im Vorwärts (FSC)- und Seitwärtsstreulicht (SSC) aufgetragen. Punktwolke bestehend aus: neutrophilen Granulozyten (PMN), Monozyten (M), Lymphozyten (L) und Zelltrümmern (Z).

Zur weiteren Differenzierung der Zellen wurden diese mit an Antikörpern gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Der Laserstrahl regte Fluorochrome an, so dass diese beim Zurückfallen auf das energetische Grundniveau, für den jeweiligen Marker elektromagnetische Strahlung mit spezifischem Wellenlängenmaximum emittierten. So ließen sich bis zu drei verschieden markierte Antikörper auf den Zelloberflächen bestimmen. Als Fluorochrome kamen Fluorescein-Isothiocyanat (FICS) mit einem Emmisionsmaximum bei 530 nm und Phycoerythrin (PE) mit einem Maximum bei 575 nm zum Einsatz. Bei der Auswertung wurden für jede Zelle vier verschiedene Parameter (FCS, SSC und zwei Fluoreszenzen) bestimmt. Zusätzlich wäre es möglich gewesen, mit Phycoerythrin-Cyanine 5 (PE-Cy5), mit einem Maximum bei 670 nm, einen weiteren so genannten kombinierten Farbstoff zur Antikörpermarkierung zu verwenden.

Die Granulozytenzellpopulation kann anhand verschiedener Oberflächenmarker genauer eingegrenzt werden. Das Transmembranprotein CD 45 wird als allgemeines Leukozytenantigen von allen Leukozyten auf der Zelloberfläche exprimiert. Nicht vorhanden ist es auf Erythrozyten und Thrombozyten. CD 14 ist vor allem auf Makrophagen exprimiert und bindet dort mit LBP gebundenes bakterielles Lipopolysaccharid (LPS). Nicht vorhanden ist es auf Granulozyten. Humanes Klasse-2 Antigen, des Histokompatibilitätskomplexes (HLA-DR) ist ebenfalls nicht auf Granulozyten exprimiert. Somit sind Granulozyten CD 45 positiv und HLA-DR sowie CD 14 negativ.

In unserem Fall verwendeten wir CD66b als spezifischen Oberflächenmarker für neutrophile Granulozyten. CD66b gehört zu den Carcino Embryonalen Antikörpern (CEA) verwandten Glykoproteinen, die ausschließlich auf Neutrophilen exprimiert werden und denen verschiedene Funktionen zugewiesen werden. CD66b spielt eine Rolle bei der Interaktion mit E-Selectin und als Rezeptor für bakterielle Typ-1 Fimbrien (Stocks *et al.*, 1996).

Für die Messung im Durchflusszytometer wurden die Granulozyten in jedem Ansatz zusätzlich mit einem Antikörper gegen CD66b markiert. Es erfolgte demnach eine doppelte Markierung mit einem FITC und einem PE gebundenen Antikörper.

Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurde vorab eine Isotypenkontrolle für den jeweiligen Antikörper gemessen. Dabei kamen die PE-markierten Antikörper IgG1 und IgG2a sowie der FITC-markierte Antikörper IgG2b zur Anwendung. Im Folgenden sind beispielhaft Punktwolkendarstellungen sowie Histogramme dargestellt.

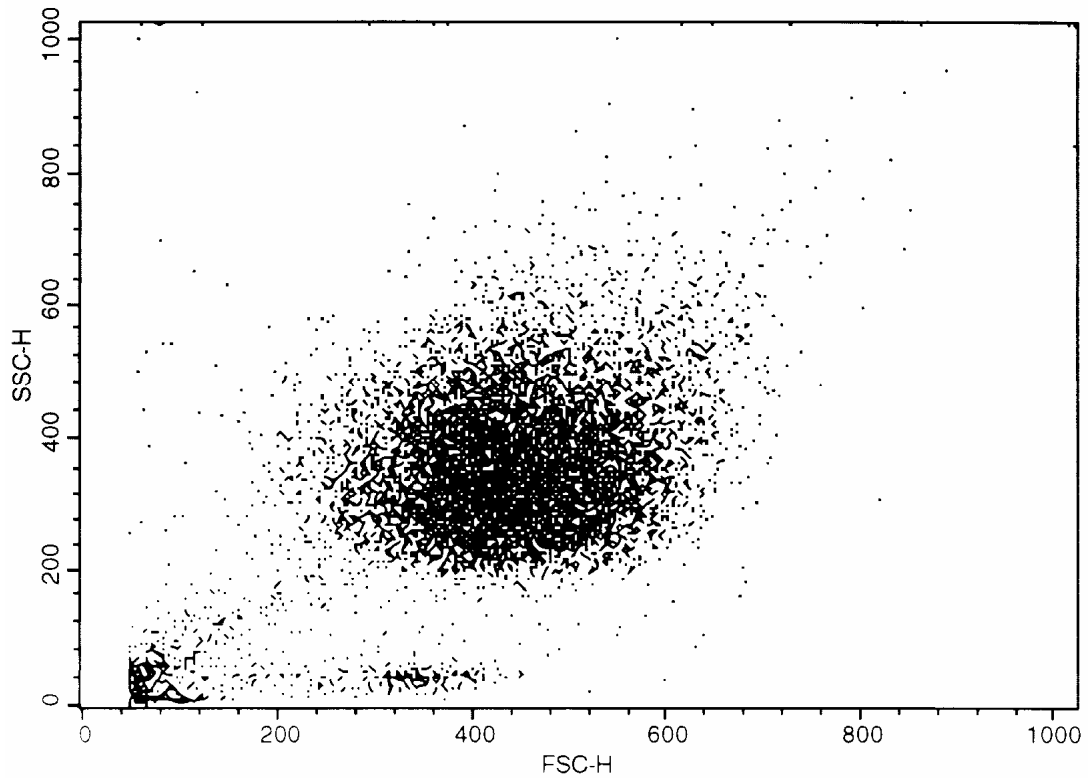


Abb.3: Repräsentatives Beispiel einer Punktwolkendarstellung isolierter peripherenöser Leukozyten im Vorwärts (FSC)- und Seitwärtsstreulicht (SSC).

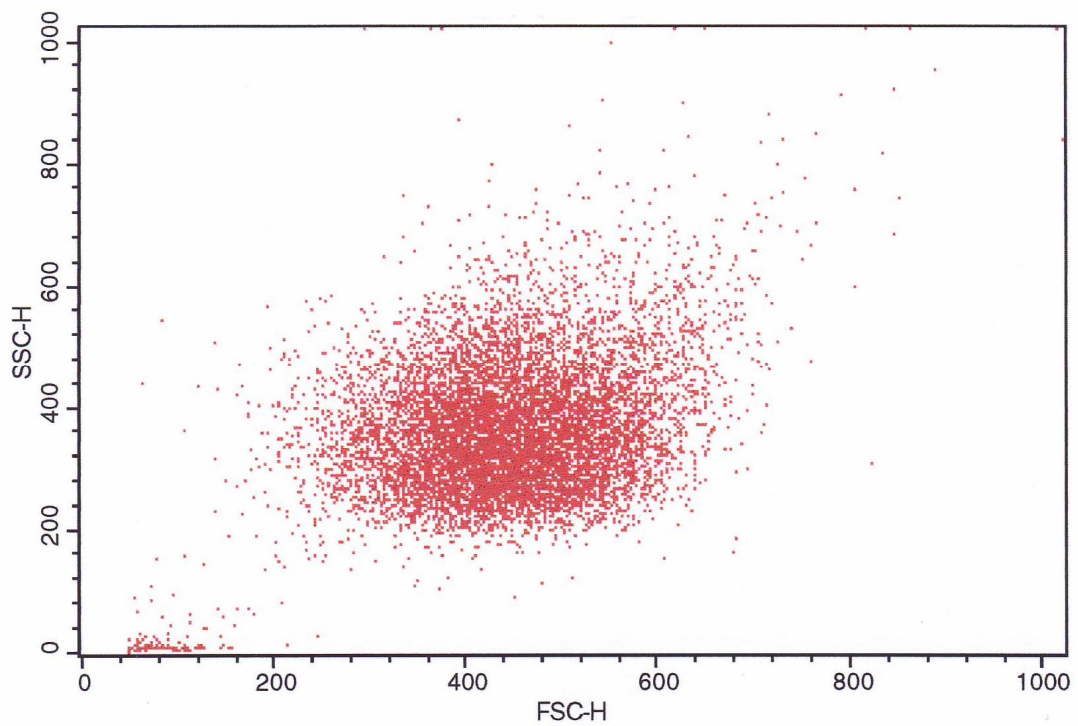


Abb.4: CD66b-positive Subpopulation dieser Zellen im Vorwärts (FSC)- und Seitwärtsstreulicht (SSC).

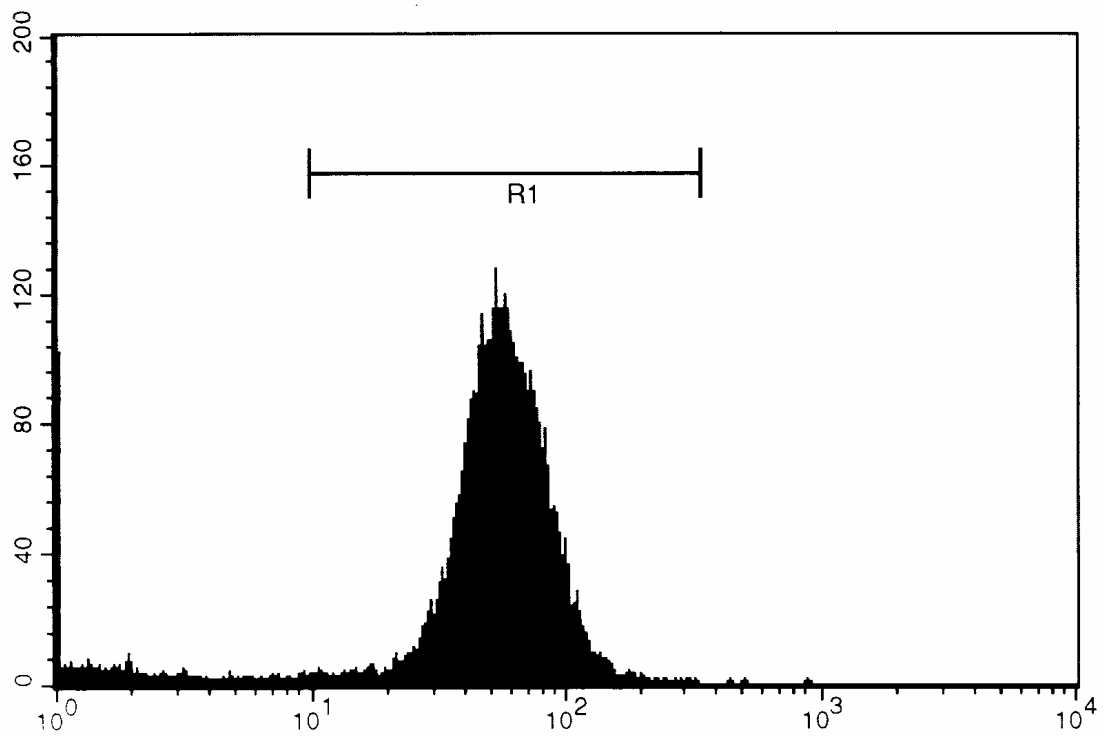


Abb.5: Histogramm der durchflusszytometrischen Messung von CD66b peripherenöser Leukozyten.

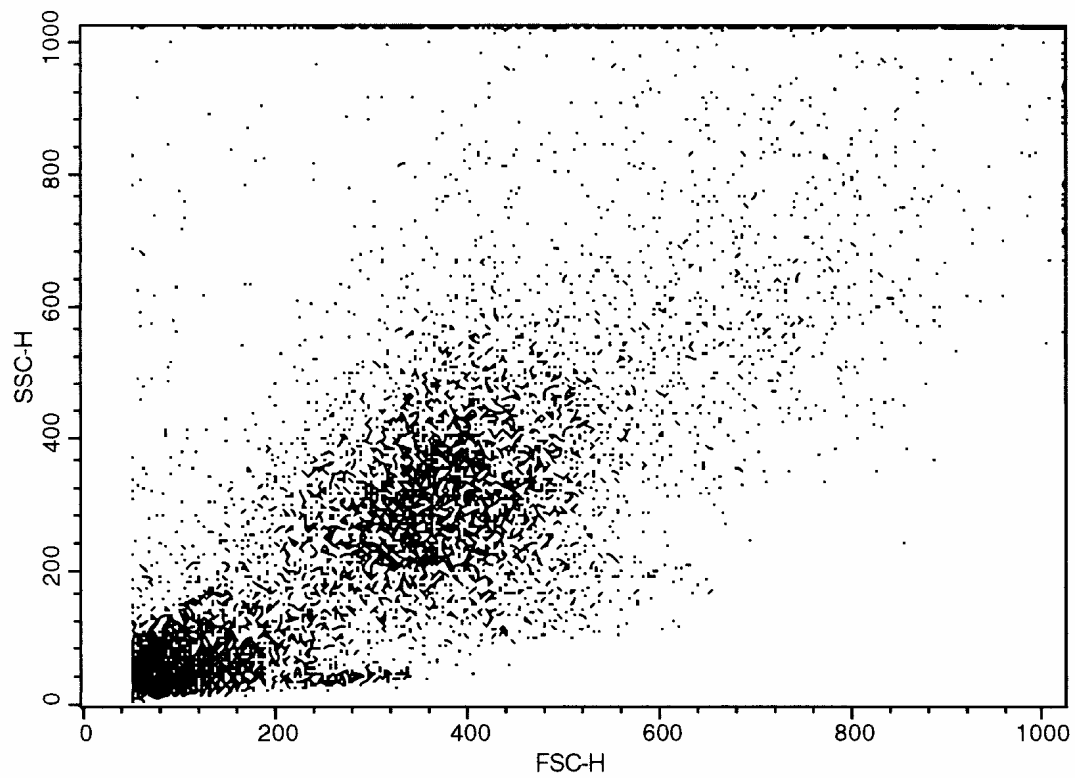


Abb.6: Repräsentatives Beispiel einer Punktwolkendarstellung von pulmonalen Leukozyten aus dem Sputum im Vorwärts (FSC)- und Seitwärtsstreulicht (SSC).

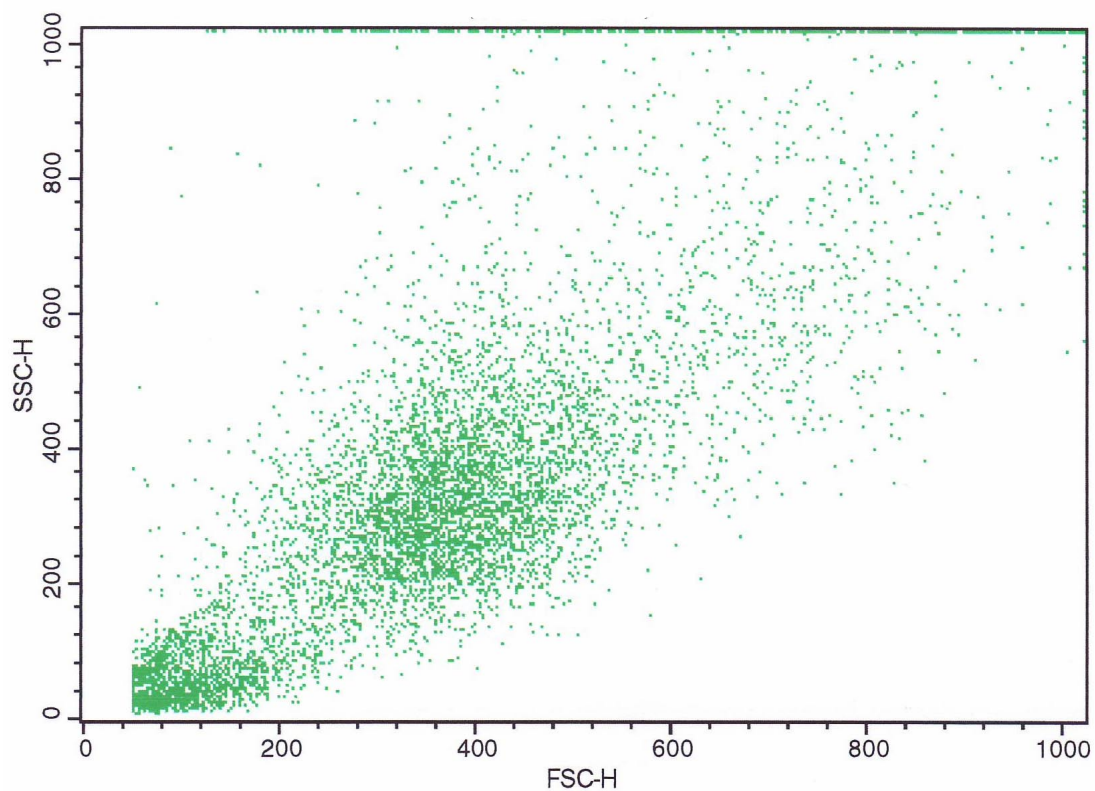


Abb.7: CD66b-positive Subpopulation pulmonaler Leukozyten aus vorangegangenen Beispiel im Vorwärts (FSC)- und Seitwärtsstreulicht (SSC).

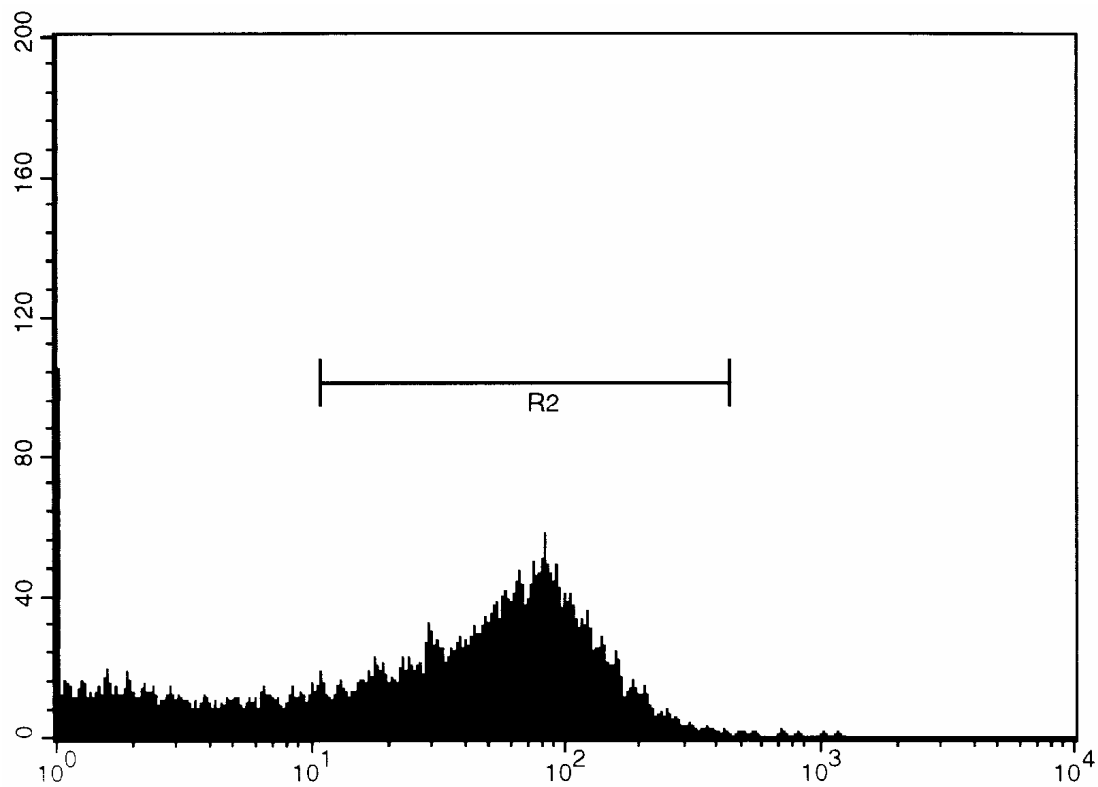


Abb.8: Histogramm der durchflusszytometrischen Messung von CD66b pulmonaler Leukozyten aus dem Sputum.

4.3.1. Vorbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Um die Zellen aus Sputum und Blut für die Durchflusszytometrie möglichst gleichmäßig in der Lösung zu verteilen, wurden sie in FACS-Puffer, bestehend aus 1% BSA (bovine serum albumine) und 0,01% NaN₃ gelöst und in PBS-Phosphatpuffer aufgenommen. Dabei wurde die Lösung auf jeweils 500.000 Zellen pro 100 µL FACS-Puffer eingestellt.

Es standen eine direkte und eine indirekte Oberflächenantikörpermarkierung zur Verfügung. Bei der indirekten Markierung war es nötig, einen Brückenantikörper hinzu zu pipettieren. Als Fluorochrome dienten dabei FITC für die Antikörpermarkierung von CD66b und PE für die Markierung anderer Oberflächenmarker.

Zu jedem Ansatz wurden 5 µL der entsprechenden Antikörper hinzugefügt. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 150 g mit Bremse bei 37°C zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Es erfolgte ein weiterer Waschvorgang mit PBS. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen daraufhin in FACS-Puffer aufgenommen und in Falcon FACS-Röhrchen überführt, um sie der Messung im Durchflusszytometer zuzuführen.

Für die Markierung apoptotischer Zellen mittels TdT-vermittelter Bindung fluoreszierender Nukleotide (TUNEL) an DNA-Fragmente wurde ein TUNEL-Kit der Firma PharMingen® (APO- Direkt™) verwendet.

Grundsätzlich wurden die Zellen wie oben beschrieben mit dem gegen CD66b gerichteten Antikörper gefärbt und dann für 35 Minuten mit eiskaltem 70%igen Ethanol inkubiert, um die Zellmembran für die TUNEL-Reagenzien zu permeabilisieren. Vor Zugabe der Reaktionslösung zu einem Reaktionspuffer, dem TdT-Enzym und FITC gebundenem dUTP-Nukleotid, war es notwendig, das Ethanol durch einen weiteren Waschvorgang zu entfernen.

Die Zellen wurden für 60 Minuten in der Reaktionslösung im Wasserbad bei 37°C inkubiert und dann erneut zentrifugiert, um das Zellpellet in FACS-Puffer aufzunehmen. Die Messung am Durchflusszytometer musste dann innerhalb von drei Stunden geschehen. Bei Messung am nächsten Tag war es erforderlich, die Zellen mit 4%igen Paraformaldehyd (PFA) zu fixieren.

4.4. ELISA

Die Bestimmung der Cytokinkonzentrationen von IL-10, IL-1 β , Fas-Ligand und CXCL-8 erfolgte aus den Sputumüberständen mittels Sandwich-Enzym-Immunoassays. Dazu wurden die bei -70°C eingefrorenen Sputumüberstände aufgetaut und bei Raumtemperatur für die Messungen der verschiedenen Cytokine eingesetzt. Das Prinzip des Testes war dabei für alle gemessenen ELISA das gleiche. Die zu messende Probe wurde gegebenenfalls vorher verdünnt und auf eine mit einem monoklonalen Antikörper gegen das zu messende Cytokin beschichtete Mikrowellplatte gegeben. Ein Waschvorgang sorgte dafür, dass nicht gebundenes Substrat entfernt wurde. Durch Zugabe eines enzymgebundenen Antikörpers gegen das jeweilige Cytokin wurde dieses markiert. Nach einem weiteren Waschvorgang erfolgte die Zugabe von Tetramethylbenzidin als Farbsubstrat, welches vom antikörpergebundenen Enzym umgesetzt wird.

Die darauf folgende Farbreaktion war direkt proportional zur Konzentration des im Sputumüberstand vorhandenen Cytokins.

Sensitivität der Tests:

- IL-10: 3,9 pg/ml
- IL-1 β : <1,0 pg/ml
- Fas Ligand: 2,66 pg/ml
- CXCL-8: 3,5 pg/ml

4.5. Objektträger TUNEL System

Das Dead End TM Colorimetric TUNEL Detection System stellt eine Möglichkeit der Darstellung apoptotischer Zellen am Objektträger mittels per Cytospin aufgetragener Zellen dar. Vandivier *et al.* verglichen die Apoptoseraten neutrophiler Granulozyten aus dem Sputum von Patienten mit chronischer Bronchitis, zytischer Fibrose und Bronchiektasen mit dem objektträgergebundenen TUNEL-System. Dabei ergaben sich bei Patienten mit chronischer Bronchitis Apoptoseraten neutrophiler Granulozyten im Sputum von bis zu 10%. Mittels Elektronenmikroskopie bestätigten sich diese Apoptoseraten und konnten weiter in frühe und späte Apoptosestadien unterteilt werden (Vandivier *et al.*, 2002).

In einem Fas-Ligand-Antikörper induzierten Apoptosemodell mit Jurkatzellen konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der Apoptoserate, die mit dem objektträgergebundenen TUNEL System bestimmt wurde, mit der Abnahme von Markern der lebenden Zelle wie Tetrazolium-Salz korrelierte. Des Weiteren kam es zur verstärkten Freisetzung von LDH als Zeichen des Abbaus von Zellmembranen (O'Brien, Okragly; Dead End Colorimetric TUNEL System, Applications in Pathology, 1998).

Das Prinzip dieser Methode bestand im Nachweis fragmentierter DNA apoptotischer Zellen. Biotinylierte Nukleotide wurden durch die terminale Desoxynukleotid Transferase (TdT) an die freien 3'-OH DNA-Enden gebunden, welche dann mit einer Farbreaktion nachgewiesen werden konnten.

Es war zunächst erforderlich, geeignete Cytospin Präparate mit ausreichender Zelldichte herzustellen. Um die Zellen auf dem Objektträger zu fixieren, wurden sie mit Paraformaldehyd behandelt. Eine Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran wurde mittels Andauung mit Proteinase K erreicht. Die erforderliche Zeit für diesen Vorgang differierte mit der Zelldichte der gefärbten Präparate. Objektträger mit entsprechend niedrigerer Zelldichte wurden kürzer mit Proteinase K inkubiert, um eine Auflösung der Zellstrukturen zu verhindern.

Für die Farbreaktion wurde Streptavidin als Kopplungsmolekül an die mit Biotin markierten Nukleotide gebunden. Streptavidin wurde dann mit einer Reaktion aus einem Peroxidase Substrat und Diaminobenzidin nachgewiesen. Kerne mit fragmentierter DNA von Zellen, die in Apoptose gegangen sind, stellten sich so unter dem Lichtmikroskop dunkelbraun dar. Anschließend folgte für 20 Minuten eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, nicht positive Zellen stellten sich daraufhin blau dar. Die Auswertung erfolgte am

Auflichtmikroskop unter 63-facher Vergrößerung mit Ölimmersionstechnik und dem Auszählen von jeweils 300 Zellen pro Objektträger.

Mittels dieses Testes war es möglich, apoptotische Zellen auf dem Objektträger lichtmikroskopisch nachzuweisen. Ausgangspunkt für den Test waren die hergestellten Cytospin-Präparate aus dem Sputum oder den *in vitro*-Granulozyteninkubationen.

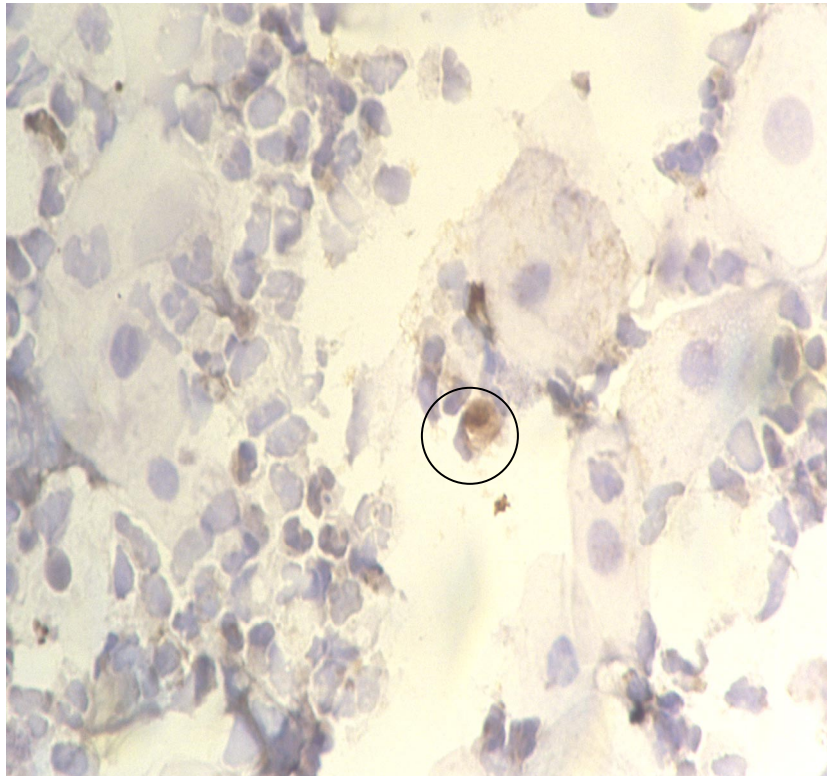


Abb.9: Markierter apoptotischer Granulozyt aus einem Sputumcytospinpräparat (63-fache Vergrößerung mit Auflichtmikroskopie).

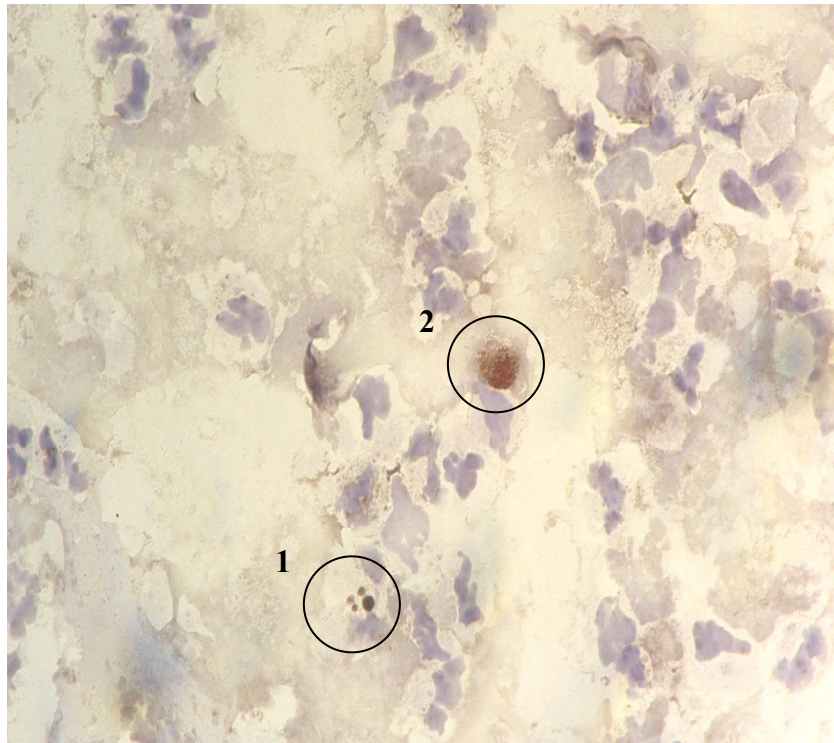


Abb.10: Cytospinpräparat von aus dem Blut isolierten Granulozyten. 1= angefärbter apoptotischer Granulozyt, 2= eosinophile Granula (63-fache Vergrößerung).

Negativkontrolle

Bei jedem Test wurde zusätzlich eine Negativkontrolle durchgeführt. Diese wurde genauso behandelt wie die restlichen Objektträger, mit dem Unterschied, dass anstelle der terminalen Desoxynukleotid Transferase (TdT) die äquivalente Menge an destilliertem Wasser hinzu gegeben wurde.

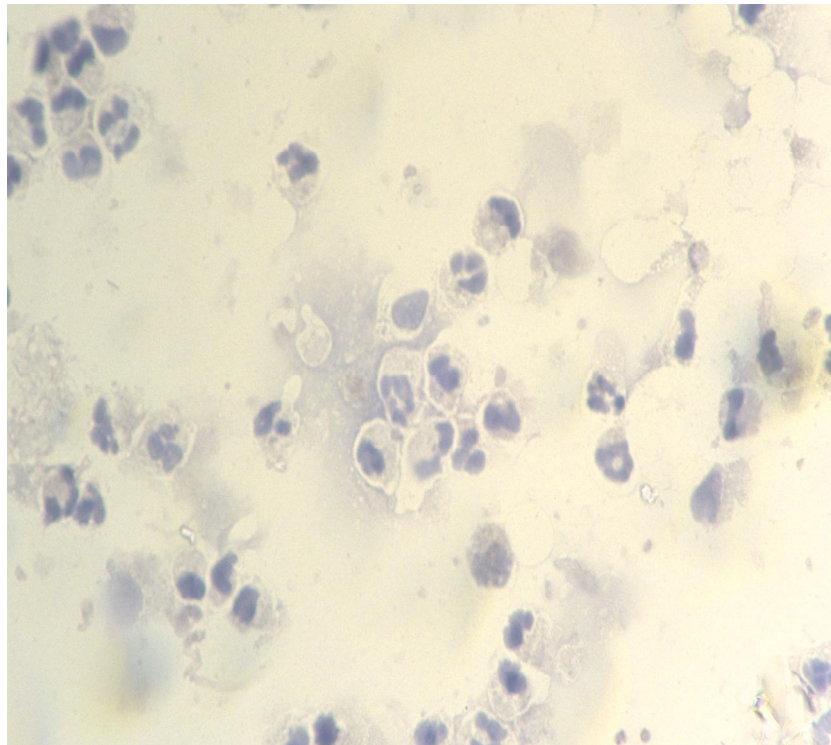


Abb.11: Negativkontrolle eines Cytospinpräparates aus dem Blut isolierter Neutrophiler (63-fache Vergrößerung).

Positivkontrolle

Bei jeder Färbung erfolgte eine Positivkontrolle mit neutrophilen Granulozyten, die zuvor für mehr als 6 Stunden mit dem monoklonalen Antikörper Fas CD 95 inkubiert wurden. Hier zeigten sich schon bei nicht gefärbten Präparaten lichtmikroskopisch hohe Apoptoseraten. Exemplarisch erfolgte die Färbung einer Positivkontrolle mit dem DNA spaltenden Enzym DNase 1. Dazu wurden die Objektträgerpräparate nach der Fixierung mit Paraformaldehyd mit DNase 1 inkubiert. Dadurch wurde sämtliche chromosomale DNA im Präparat fragmentiert und es entstanden multiple offene 3'OH-Enden, an die biotungebundene Nukleotide binden konnten.

Es zeigte sich jedoch eine ausgeprägte Zellschädigung der Granulozyten durch die Behandlung mit DNase, so dass eine Abgrenzung einzelner Zellen und damit eine quantitative Auswertung der Präparate am Lichtmikroskop nicht mehr möglich war. Folglich wurde die Positivkontrolle mit DNase 1 als für unsere Zwecke nicht geeignet befunden.

4.6. Zellinkubation

Im Rahmen mehrerer Vorversuche erfolgte die Induktion von Apoptose neutrophiler Granulozyten durch verschiedene proapoptotische Ansätze. Ziel dieser Versuche war es, den objektträgergebundenen TUNEL-Test als Verfahren zum Nachweis apoptotischer Zellen zu etablieren. Dazu wurden von zuvor aus dem Vollblut gesunder Probanden isolierte Granulozyten mit Fas CD 95 Antikörper und RPMI-Medium inkubiert. In einem anderen Ansatz erfolgte eine Bestrahlung mit UV-Licht und die simultane Messung der Apoptoserate mit dem Objektträger-Test und der Durchflusszytometrie nach dem TUNEL-Prinzip.

4.6.1. Inkubation mit Fas CD 95

In einem Ansatz wurden die Zellen mit einer Konzentration von 150 ng pro 10^6 Zellen des Fas CD 95 Antikörpers für 24 Stunden inkubiert. Zum Vergleich wurde ein Teil der Zellen nur mit RPMI-Medium für die gleiche Zeit bei 37°C inkubiert. Der monoklonale Antikörper der IgM Klasse ist *in vitro* in der Lage Apoptose zu induzieren (Liles *et al.*, 1996).

Die eingesetzte Konzentration reicht wie in Vorversuchen gezeigt aus, um in der Durchflusszytometrie gemessene Anteile apoptotischer Neutrophiler nach 24 Stunden von bis zu 30 % zu erreichen (Drömann D, 2001).

Die Isolierung der Zellen erfolgte nach dem eingangs beschriebenen Verfahren nach van Zandbergen. Zudem wurde eine Bestimmung der Spontanapoptose durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Mit dem Objektträger-Test gemessene Apoptoseraten neutrophiler Granulozyten.

	Anteil apoptotischer Zellen im Objektträger-Test (%)
Medium 0h (Spontan)	5
Medium 24h	25
Fas CD 95 6h	38
Fas CD 95 24h	90

Die Ergebnisse zeigten eine deutlich erhöhte Apoptoserate neutrophiler Granulozyten bei Inkubation mit dem Antikörper schon nach 6 Stunden Inkubationszeit. Auch die Nativkontrolle mit Medium zeigte nach 24h, dass 25% der Zellen apoptotisch wurden.

4.6.2. Vergleich zwischen Flowzytometrie und Objektträgertest

Um einen direkten Vergleich zwischen den beiden zur Verfügung stehenden Methoden zu erhalten, führten wir zeitgleiche Messungen des programmierten Zelltodes mit beiden Verfahren durch. Dabei bestrahlten wir die zuvor isolierten Zellen in RPMI-Medium für 4, 8 und 24 Stunden mit UV-Licht. UV-Licht führt zu einer zunehmenden Schädigung der DNA, Störungen der mitochondrialen Hülle mit Freisetzung von Carboxylasen und Spaltprodukten. Zudem kommt es zu erhöhter Aktivität der Caspase 3 und damit zur Induktion von Apoptose (Peters *et al.*, 2002). Auch hier erfolgte die Bestimmung der Spontanapoptose mit beiden Verfahren.



Abb.12: Apoptoseinduktion aus dem Blut isolierter neutrophiler Granulozyten mittels UV-Licht. 63-fache Vergrößerung mit Auflichtmikroskopie. Apoptotische Granulozyten stellen sich braun gefärbt dar.

Zwischen den beiden Verfahren zeigten sich deutliche Unterschiede nach 4, beziehungsweise nach 8 Stunden Inkubationszeit. Während bei den Messungen im Durchflusszytometer ein kontinuierlicher Anstieg der Apoptoserate von der Spontanapoptose bis zur Messung nach 24h zu verzeichnen war, ließ sich im objektträgergebundenen Test erst nach 24 Stunden eine signifikant erhöhte Apoptoserate feststellen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Apoptoseraten im objektträgergebundenem TUNEL-Test und TUNEL-Messwerte aus der Durchflusszytometrie (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung).

	Anteil apoptotischer Zellen im Objektträgertest (%) (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung) (n=5)	Anteil apoptotischer Zellen in der Durchflusszytometrie (%) (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung) (n=4)	P
Medium 0h (Spontan)	1,0 $\pm$ 0,71	1,88 $\pm$ 1,03	0,27
Medium 4h UV-Licht	1,0 $\pm$ 1,41	13,77 $\pm$ 7,14	0,07
Medium 8h UV-Licht	2,2 $\pm$ 3,82	15,19 $\pm$ 10,42	0,14
Medium 24h UV-Licht	41,2 $\pm$ 20,97	44,61 $\pm$ 27,72	0,59

Für die unterschiedlichen Ergebnisse sind zwei Eigenschaften des Objektträgertests in Betracht zu ziehen. Zum einen können sich Differenzen durch die unterschiedliche Anzahl detektierter Zellen ergeben. Während auf dem Objektträger 300 Zellen ausgezählt wurden, konnten in der Durchflusszytometrie in einem Ansatz 10.000 Zellen detektiert werden. Zudem war der Objektträgertest subjektiven Gesichtspunkten des Betrachters unterworfen und eine Auswertung war nur bei guter Cytospinququalität durchführbar. Zum anderen stellt sich die Frage, inwieweit frühe Apoptosestadien im Objektträgertest mit der Lichtmikroskopie erfasst werden können. Hier konnte sich die Durchflusszytometrie als die sensitivere Methode herausstellen, die dem Objektträgertest in der quantitativen Bestimmung der Apoptoserate überlegen ist.

4.7. Statistische Auswertung

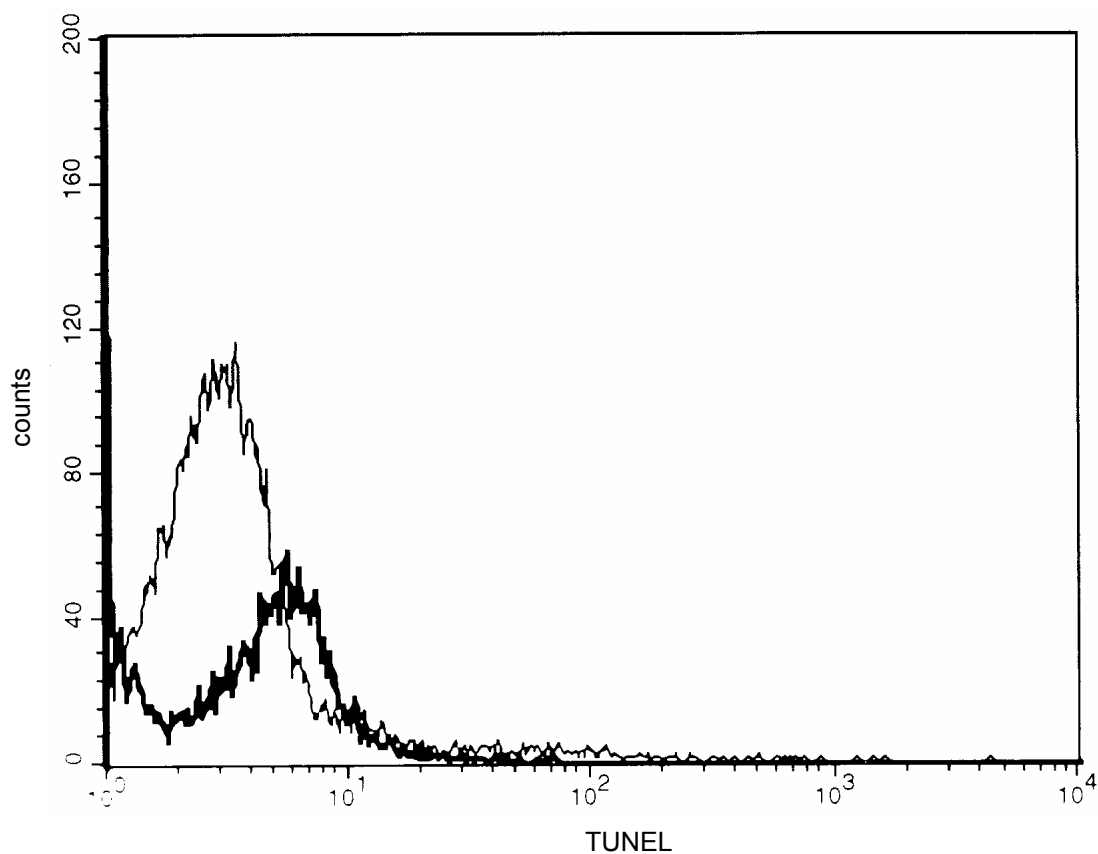
Die Ergebnisse in den Abbildungen wurden jeweils als Mittelwert $\pm$ einfacher Standardabweichung dargestellt. Die Prüfung der Signifikanz für gepaarte, nicht parametrische Stichproben erfolgte anhand des Wilcoxon-Tests. Die Signifikanzprüfung für nicht gepaarte, nicht parametrische Stichproben wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Rangkorrelationen erfolgten anhand der Rangkorrelation nach Spearman.

5. Ergebnisse

5.1. Akute Entzündungsphase

5.1.1. Apoptose

Zum ersten Messzeitpunkt zeigte sich im Gesamtkollektiv ein signifikant größerer Anteil apoptotischer Neutrophiler im Sputum gegenüber dem Blut. Bei T1 betrug die pulmonale Apoptoserate $5,31 \pm 5,39\%$, während die Apoptoserate periphervenöser Neutrophiler $1,94 \pm 1,22\%$ betrug ($n = 22$; $P < 0,05$) (repräsentatives Histogramm siehe Abbildung 13, Gegenüberstellung der Ergebnisse zu T2 siehe 5.2.1.).



*Abb.13: Repräsentatives Histogramm der Apoptoserate neutrophiler Granulozyten bei T1.
Dicke Linie: pulmonale Neutrophile, dünne Linie: periphervenöse Neutrophile.*

Im Kollektivvergleich wiesen COPD-Patienten im Vergleich zu Patienten ohne COPD eine geringere Apoptoserate im Sputum bei T1 auf (CAP + COPD: $3,19 \pm 2,04\%$, $n=11$; CAP - COPD: $7,42 \pm 6,85\%$, $n=12$; $P < 0,05$). Im Blut war die Apoptoserate von COPD-Patienten gegenüber Patienten ohne COPD bei T1 erhöht (CAP + COPD: $2,52 \pm 1,36\%$; CAP - COPD: $1,41 \pm 0,81\%$; $n=11$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 14, repräsentatives Histogramm T1 siehe Abbildung 15).

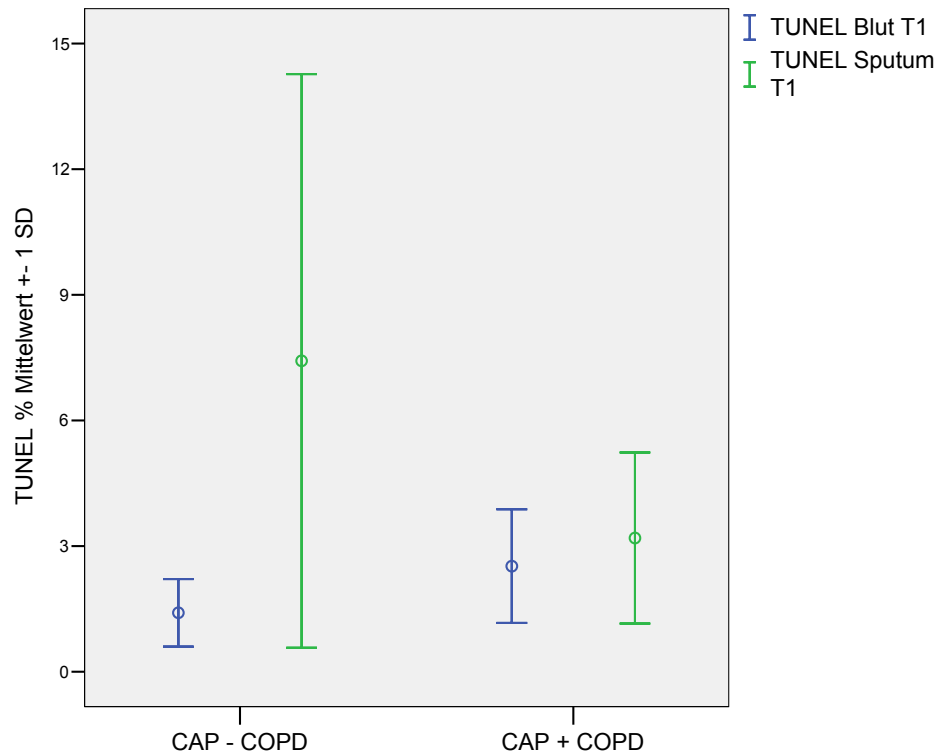


Abb.14: Apoptoseraten peripherenöser und pulmonaler Neutrophiler im Kollektivvergleich zum Zeitpunkt T1, Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

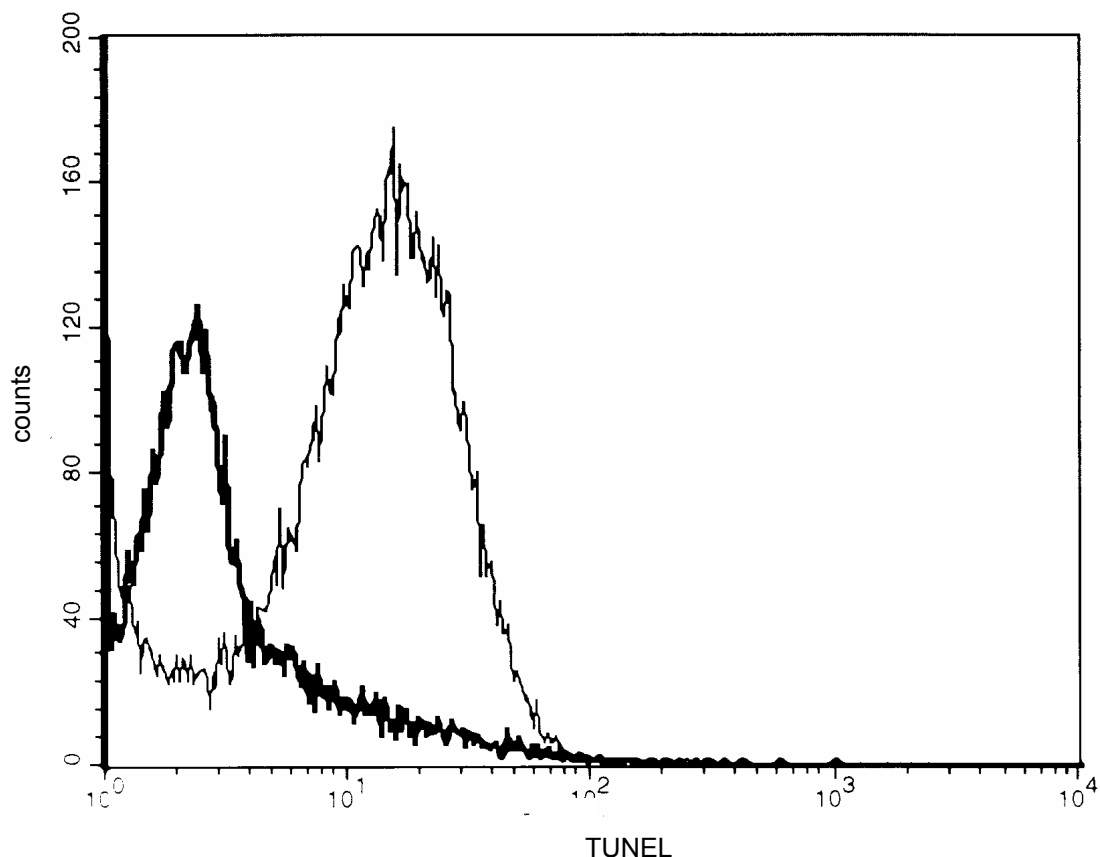


Abb.15: Repräsentatives Histogramm der Apoptoserate pulmonaler Neutrophiler bei T1. Dicke Linie: CAP + COPD, dünne Linie: CAP - COPD.

5.1.2. Zellaktivierungsmarker CD11b und CD66b

Die im Durchflusszytometer gemessene Oberflächenexpression der Zelladhäsionsmoleküle CD11b und CD66b ergab im Gesamtkollektiv annähernd gleich hohe Messwerte für periphervenöse neutrophile Granulozyten und Neutrophile, die aus dem Sputum isoliert wurden. Während sich beim CD11b-Rezeptor tendenziell eine höhere pulmonale Expression zeigte (CD11b-Sputum: $29,8 \pm 36,07$ vs. CD11b-Blut: $24,76 \pm 10,86$; $n = 24$; $P =$ nicht signifikant), konnten wir beim CD66b-Rezeptor eine höhere periphervenöse Expression messen (CD66b-Sputum: $10,98 \pm 8,21$ vs. CD66b-Blut: $16,90 \pm 7,83$; $n = 27$; $P =$ nicht signifikant) (repräsentative Histogramme siehe Abbildung 16 und Abbildung 17).

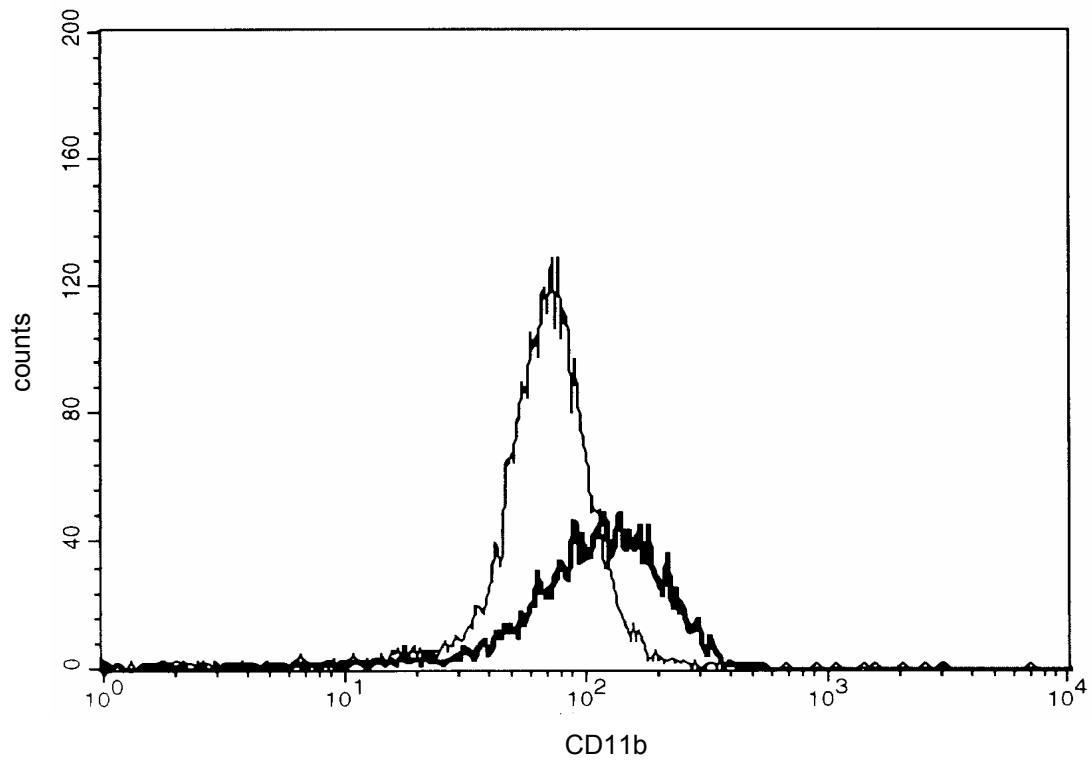


Abb.16: Repräsentatives Histogramm der CD11b-Expression neutrophiler Granulozyten bei T1. Dicke Linie: Zellen aus dem Sputum, dünne Linie: periphervenöse Zellen.

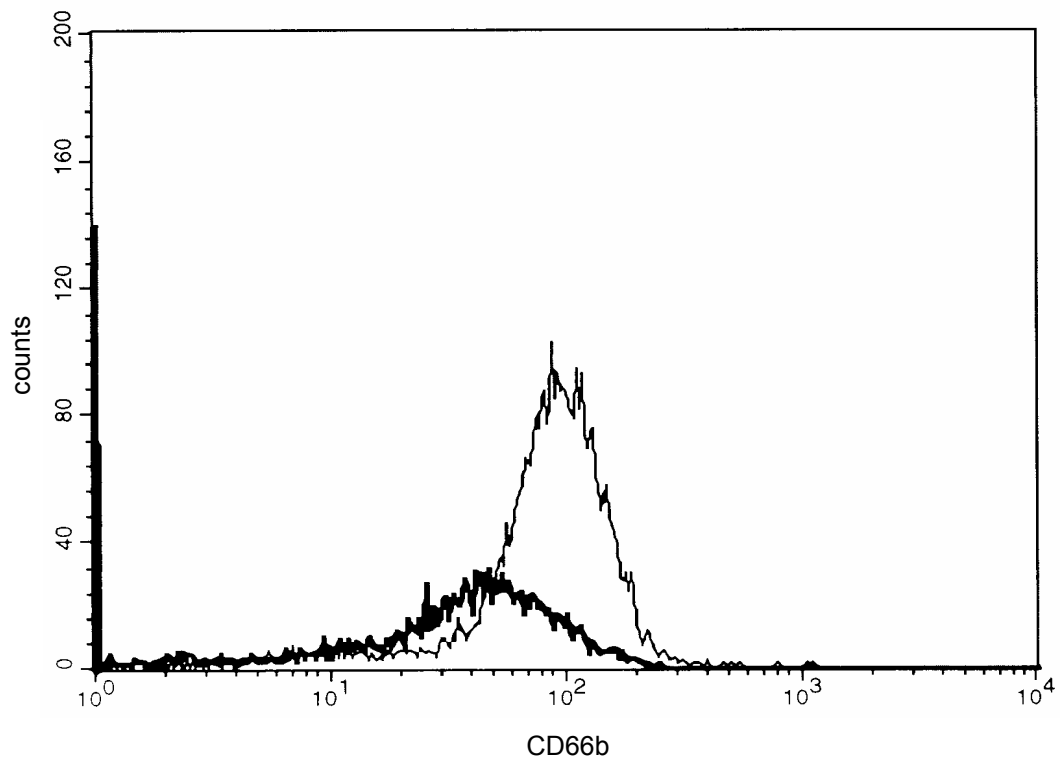


Abb.17: Repräsentatives Histogramm der CD66b-Expression neutrophiler Granulozyten bei T1. Dicke Linie: Zellen aus dem Sputum, dünne Linie: periphervenöse Zellen.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Aktivierungsmarkerexpression pulmonaler und periphervenöser Neutrophiler im Kollektivvergleich zum Zeitpunkt T1 (Darstellung der Ergebnisse siehe 5.2.2.).

5.1.3. CXCL-8 und die Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2

Im Gesamtkollektiv konnten wir eine CXCL-8-Konzentration von $57.842,0 \pm 67.194,37$ pg/ml im Sputum messen (T1), dabei zeigten sich im Kollektivvergleich tendenziell geringere Konzentrationen bei Patienten mit COPD (CXCL-8: CAP + COPD: $35.706,83 \pm 39156,98$; n= 12; CAP - COPD: $81.989,6 \pm 83.768,8$; n= 11; P= nicht signifikant).

Im Gesamtkollektiv waren die pulmonalen CXCL-8-Rezeptoren, CXCR-1 und CXCR-2 zum Zeitpunkt T1 gegenüber periphervenöser Rezeptoren signifikant herunterreguliert (repräsentative Histogramme siehe Abbildung 18 und Abbildung 19, Darstellung der Ergebnisse siehe 5.2.3.).

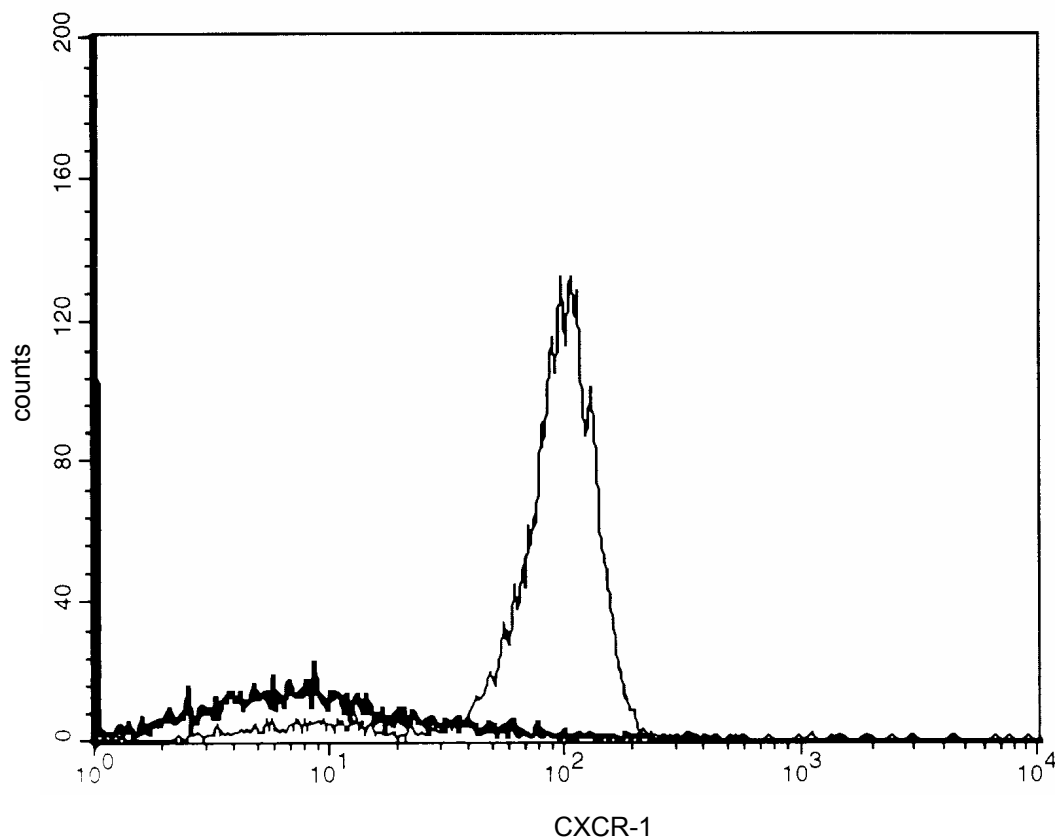


Abb.18: Repräsentatives Histogramm der CXCR-1-Expression neutrophiler Granulozyten bei T1. Dicke Linie: pulmonale Neutrophile, dünne Linie: periphervenöse Neutrophile.

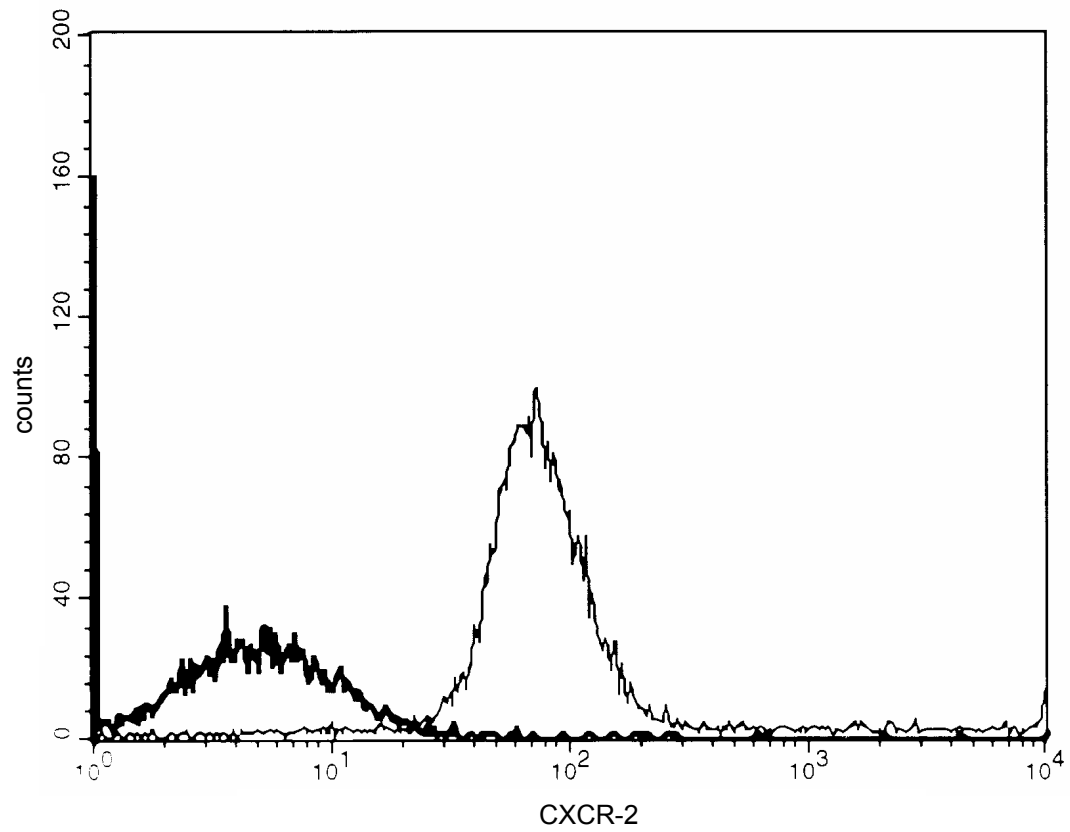


Abb.19: Repräsentatives Histogramm der CXCR-2-Expression neutrophiler Granulozyten bei T1. Dicke Linie: Zellen aus dem Sputum, dünne Linie: periphervenöse Zellen.

Im Gesamtkollektiv ließ sich ein negativer Zusammenhang zwischen der pulmonalen CXCR-1-Rezeptorexpression und dem Entzündungsparameter CRP im Blut nachweisen (Korrelation nach Spearman: $r = -0,49$; $n = 26$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 20).

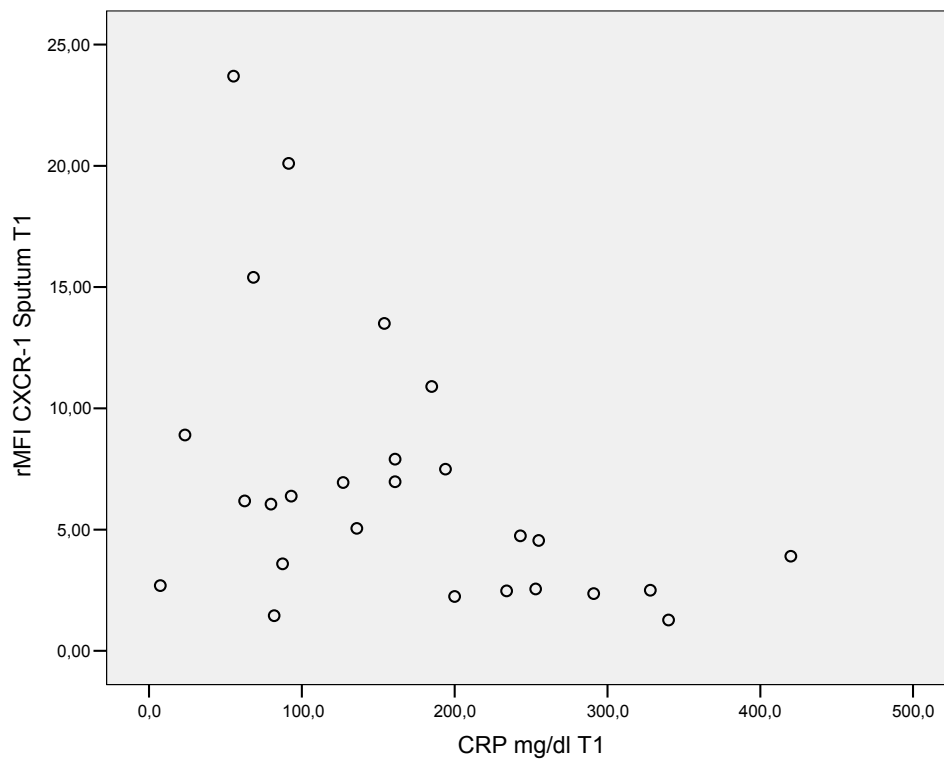


Abb.20: Korrelation der CXCR-1-Rezeptorexpression im Sputum mit dem C-reaktiven Protein (CRP) im Blut zu T1.

5.2. Entzündungsrückbildung

5.2.1. Apoptose

Im Gesamtkollektiv nahm die Apoptoserate mit rückläufigem Entzündungsgeschehen im pulmonalen Kompartiment zum Messzeitpunkt T2 von $5,31 \pm 5,39\%$ auf $3,14 \pm 2,9\%$ ab ($n= 8$; $P=$ nicht signifikant), während sich bei peripheren Neutrophilen ein signifikanter Anstieg von $1,94 \pm 1,22\%$ auf $3,26 \pm 2,04\%$ nachweisen ließ ($n= 8$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 21).

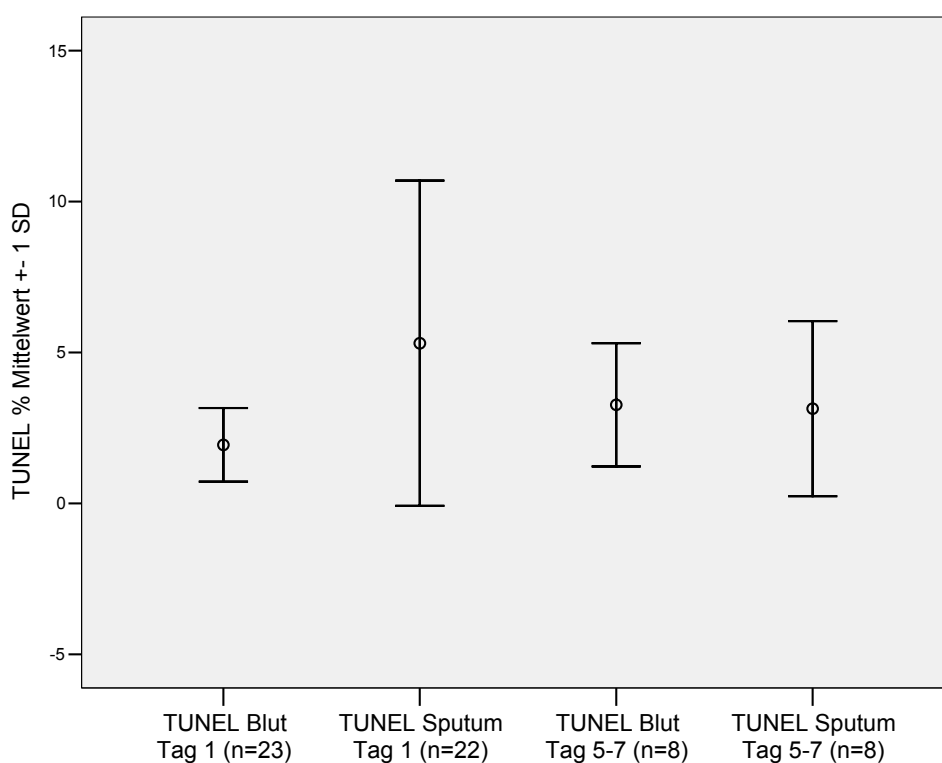


Abb.21: Apoptoseraten peripherenöser und pulmonaler neutrophiler Granulozyten im Gesamtkollektiv, T1, T2, Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

Bei T2 war der Anteil apoptotischer pulmonaler Neutrophiler in beiden Kollektiven gegenüber T1 leicht rückläufig (T2: CAP + COPD: $2,84 \pm 1,83\%$; CAP - COPD: $3,32 \pm 3,6\%$; $n= 3$; $P=$ nicht signifikant), wohingegen die Apoptoserate peripherenöser Neutrophiler mit der Zeit tendenziell zunahm (T2: CAP + COPD: $3,76 \pm 2,69\%$; CAP - COPD: $2,97 \pm 1,83\%$; $n= 5$; $P=$ nicht signifikant). Man beachte die geringe Anzahl an Patienten in der Verlaufsmessung für den Kollektivvergleich (hier nicht dargestellt).

5.2.2. Zellaktivierungsmarker CD11b und CD66b

In der Verlaufsmessung war im Gesamtkollektiv bei beiden Aktivitätsmarkern tendenziell eine Abnahme der Expression im Sputum festzustellen. Bei aus dem Blut gewonnenen Neutrophilen zeigte der CD66b-Rezeptor eine Abnahme der Expression, während beim CD11b-Rezeptor ein leichter Anstieg zu verzeichnen war (siehe Tabelle 11 und Tabelle 12/ P= nicht signifikant).

Tabelle 11: CD11b-Expression periphervenöser und pulmonaler Neutrophiler innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme und nach 5-7 Tagen im Gesamtkollektiv. Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

	T1	T2	P
CD11b Blut	24,76 $\pm$ 10,86 (n= 24)	28,52 $\pm$ 10,92 (n= 12)	n.s.
CD11b Sputum	29,80 $\pm$ 36,07 (n= 24)	22,99 $\pm$ 17,13 (n= 14)	n.s.
P	n.s.	n.s.	

Tabelle 12: CD66b-Expression periphervenöser und pulmonaler Neutrophiler innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme und nach 5-7 Tagen im Gesamtkollektiv. Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

	T1	T2	P
CD66b Blut	16,90 $\pm$ 7,83 (n= 27)	14,52 $\pm$ 5,02 (n= 19)	n.s.
CD66b Sputum	10,98 $\pm$ 8,21 (n= 27)	9,56 $\pm$ 10,86 (n= 20)	n.s.
P	n.s.	n.s.	

Während die Messungen für Patienten ohne COPD einen Abfall der pulmonalen Aktivitätsmarker im Entzündungsverlauf aufwiesen, zeigte sich im Kollektivvergleich bei Patienten mit COPD als Grunderkrankung ein Anstieg der CD66b-Oberflächenexpression und ein geringerer Abfall der CD11b-Rezeptorexpression (siehe Tabelle 13/ P= nicht signifikant).

Tabelle 13: Expression der Aktivitätsmarker CD11b und CD66b pulmonaler Neutrophiler in der Verlaufsmessung bei Patienten ohne COPD als Grunderkrankung und bei Patienten mit COPD. Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

	T1	T2	P
CD11b Sputum – COPD	32,94 $\pm$ 46,84 (n= 12)	21,38 $\pm$ 13,48 (n= 6)	n.s.
CD11b Sputum + COPD	26,67 $\pm$ 22,5 (n= 12),	24,20 $\pm$ 20,28 (n= 8),	n.s.
P	n.s.	n.s.	
	T1	T2	
CD66b Sputum – COPD	12,53 $\pm$ 9,93 (n= 13)	6,59 $\pm$ 3,67 (n= 8)	n.s.
CD66b Sputum + COPD	9,53 $\pm$ 6,26 (n= 14)	11,53 $\pm$ 13,59 (n= 12)	n.s.
P	n.s.	n.s.	

Patienten ohne COPD wiesen eine annähernd gleich hohe CD11b-Rezeptorexpression periphervenöser Neutrophiler zu beiden Messzeitpunkten auf. Bei Patienten mit COPD war eine ansteigende Oberflächenrezeptorexpression von CD11b im Entzündungsverlauf zu verzeichnen. Bezüglich des CD66b-Rezeptors waren keine Unterschiede zwischen beiden Kollektiven nachweisbar (siehe Tabelle 14/ P= nicht signifikant).

Tabelle 14: Expression der Aktivitätsmarker CD11b und CD66b periphervenöser Neutrophiler in der Verlaufsmessung bei Patienten ohne COPD als Grunderkrankung und bei Patienten mit COPD. Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

	T1	T2	P
CD11b Blut – COPD	26,38 $\pm$ 11,37 (n= 12)	26,33 $\pm$ 12,51 (n= 6)	n.s.
CD11b Blut + COPD	23,15 $\pm$ 10,56 (n= 12)	30,72 $\pm$ 9,72 (n= 6)	n.s.
P	n.s.	n.s.	
	T1	T2	
CD66b Blut – COPD	16,32 $\pm$ 4,82 (n= 13)	13,56 $\pm$ 5,92 (n= 8)	n.s.
CD66b Blut + COPD	17,45 $\pm$ 10,03 (n= 14)	15,22 $\pm$ 4,42 (n= 11)	n.s.
P	n.s.	n.s.	

Im Gesamtkollektiv zeigte sich 5-7 Tage nach stationärer Aufnahme (T2) eine positive Korrelation des Anteils apoptotischer pulmonaler Neutrophiler gegenüber der pulmonalen CD66b-Oberflächenexpression (Korrelation nach Spearman: $r = 0,93$, $n = 8$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 22).

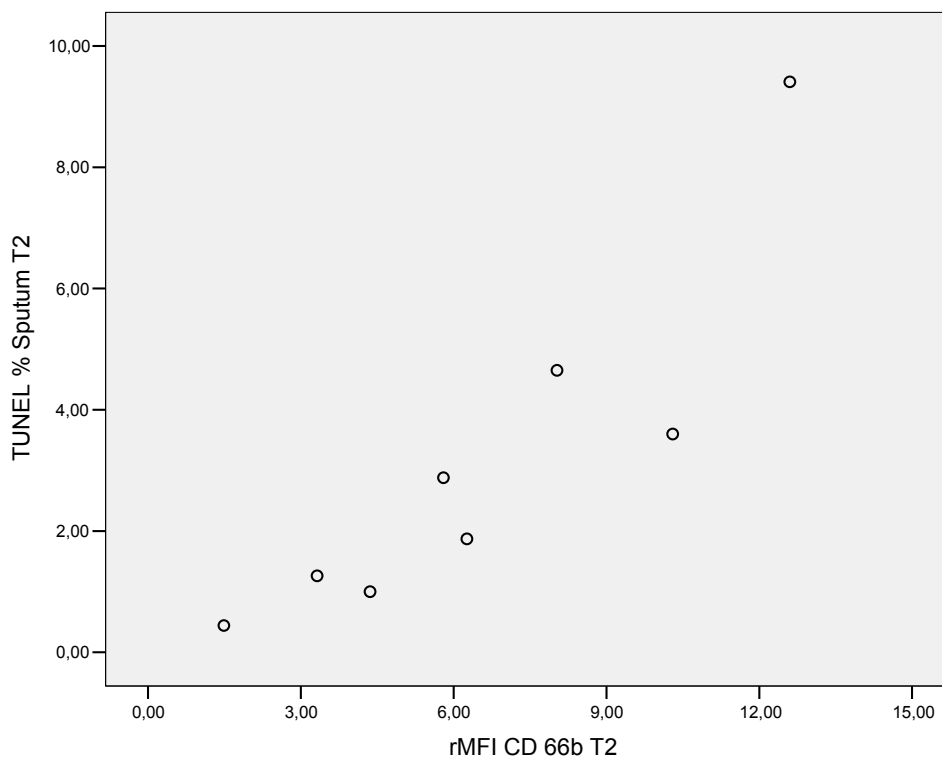


Abb.22: Korrelation der Apoptoserate mit der Oberflächenexpression von CD66b, pulmonale Neutrophile, T2.

5.2.3. CXCL-8 und die Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2

Zum Zeitpunkt T1 zeigte sich im Gesamtkollektiv eine hohe Konzentration von CXCL-8 im Sputum von $57842,0 \pm 67194,37$ pg/ml ($n = 23$), die im Verlauf bei T2 auf $16145,17 \pm 18059,99$ pg/ml ($n = 16$) signifikant abnahm ($P < 0,05$) (siehe Abbildung 23).

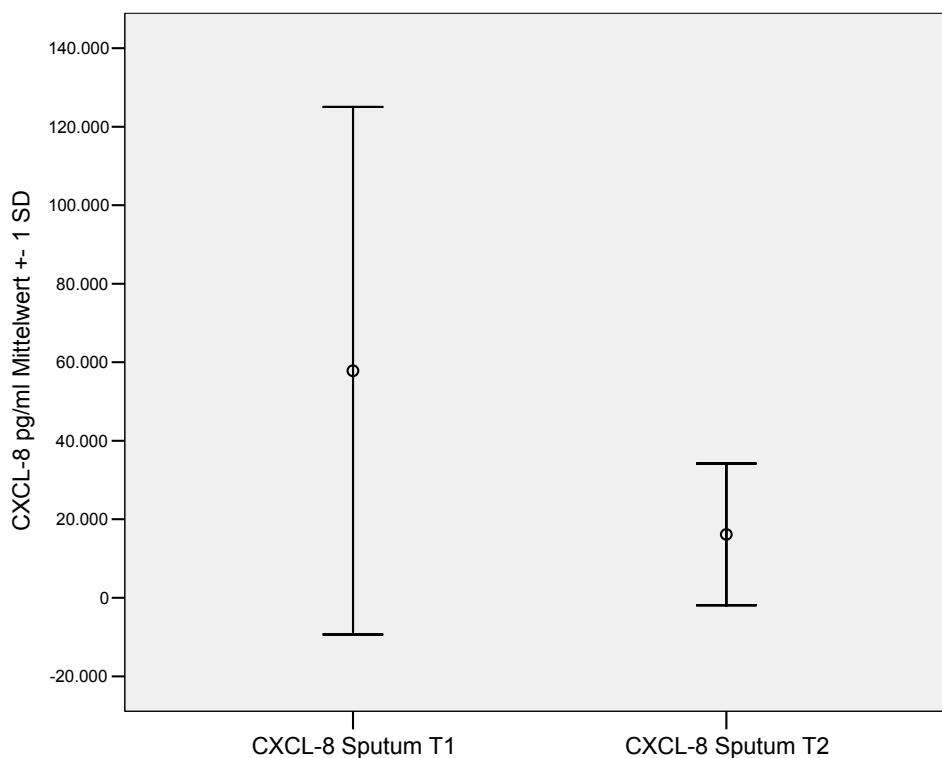


Abb.23: CXCL-8-Konzentration im Sputum innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme (T1) und nach 5-7 Tagen nach Aufnahme (T2), Gesamtkollektiv. Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

Im Kollektivvergleich konnten wir bei Patienten mit COPD zu beiden Zeitpunkten niedrigere Konzentrationen von CXCL-8 im Sputum nachweisen. Bezüglich der Messung T2 nach 5-7 Tagen war eine signifikant niedrigere Konzentration von CXCL-8 im COPD-Kollektiv gegenüber Patienten ohne COPD messbar. Dabei zeigte sich gegenüber Nicht-COPD-Patienten eine signifikante Abnahme im Entzündungsverlauf (siehe Tabelle 15 sowie Abbildung 24).

Tabelle 15: CXCL-8-Gehalt des Sputums bei Patienten mit COPD und Patienten ohne COPD im Entzündungsverlauf. Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

	CAP+ COPD	CAP- COPD	P
CXCL-8 T1 (pg/ml)	35706,83 $\pm$ 39156,98 (n= 12)	81989,6 $\pm$ 83768,8 (n= 11)	n.s.
CXCL-8 T2 (pg/ml)	7325,18 $\pm$ 8586,17 (n= 10)	30845,15 $\pm$ 20758,08 (n= 6)	< 0,05
P	< 0,05	n.s.	

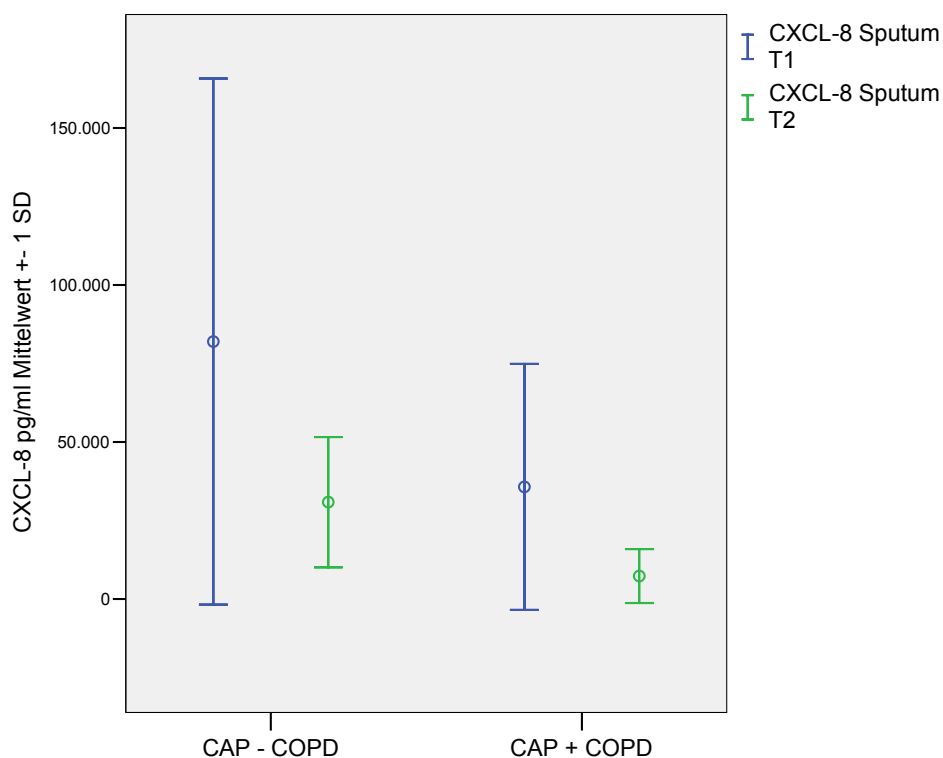


Abb.24: CXCL-8 Konzentration im Sputum in Abhängigkeit einer zugrunde liegenden COPD, T1, T2, Messwerte im Sputum. Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

Im Gesamtkollektiv waren die CXCL-8-Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2 im Sputum gegenüber peripheren Neutrophilen sowohl zum ersten, als auch zum zweiten Messzeitpunkt anhaltend herunterreguliert. Es war eine signifikante Abnahme der CXCR-1-Rezeptorexpression peripheren Neutrophiler im Verlauf zu verzeichnen (siehe Tabellen 16 und 17).

Tabelle 16: Oberflächenexpression von CXCR-1, 24h nach stationärer Aufnahme und 5-7 Tage später (rMFI). Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

	T1	T2	P
CXCR-1 Blut	26,21 $\pm$ 11,88 (n= 27)	19,38 $\pm$ 12,69 (n= 19)	0,05
CXCR-1 Sputum	6,83 $\pm$ 5,59 (n= 27)	5,27 $\pm$ 3,95 (n= 20)	n.s.
P	< 0,05	< 0,05	

Tabelle 17: Oberflächenexpression von CXCR-2 einen Tag nach Aufnahme und im Verlauf nach 5-7 Tagen (rMFI). Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

	T1	T2	P
CXCR-2 Blut	38,16 $\pm$ 28,46 (n= 23)	27,52 $\pm$ 12,13 (n= 16)	n.s.
CXCR-2 Sputum	4,14 $\pm$ 3,48 (n= 24)	7,05 $\pm$ 7,08 (n= 17)	n.s.
P	< 0,05	< 0,05	

Im Kollektivvergleich waren keine signifikanten Unterschiede in der CXCR-1 und CXCR-2 Expression pulmonaler Neutrophiler messbar. Zum Zeitpunkt T2 zeigte sich bei COPD-Patienten eine höhere Expression von CXCR-2 peripherenöser Neutrophiler gegenüber Patienten ohne COPD (T1: CAP + COPD: 35,87 $\pm$ 19,3 rMFI; n= 12; CAP - COPD: 40,66 $\pm$ 36,87 rMFI; n= 11; P= nicht signifikant; T2: CAP + COPD: 32,56 $\pm$ 10,6 rMFI; n= 8; CAP - COPD: 22,47 $\pm$ 12,03 rMFI; n= 8; P= 0,05) (siehe Abbildung 25).

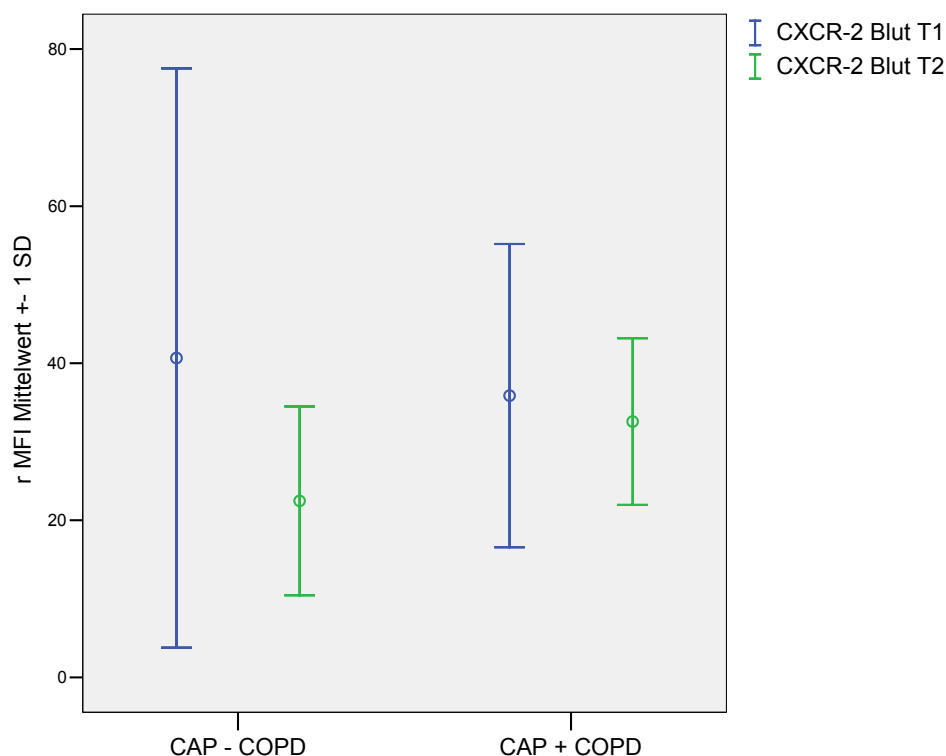


Abb.25: CXCR-2-Rezeptoroberflächenexpression peripherenöser Neutrophiler bei T1 und T2 im Kollektivvergleich, Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

5.2.4. Cytokinkonzentrationen von IL-1 β , FasL und IL-10

Im Sputum von Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie (Gesamtkollektiv) fanden sich initial hohe Konzentrationen von IL-1 β , die im Verlauf rückgängig waren (P= nicht signifikant). Auch der Gehalt an antiinflammatorischen Cytokinen, wie FasL und IL-10, nahm von T1 zu T2 ab (siehe Tabelle 18/ P= nicht signifikant).

Tabelle 18: Konzentrationen (pg/ml) von IL-1 β , FasL und IL-10 im Sputum, Gesamtkollektiv, T1 und T2. Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

	T1	T2	P
IL-1 β	7591,14 $\pm$ 14329,95 (n= 24)	1349,94 $\pm$ 3557,59 (n= 15)	n.s.
FasL	13,25 $\pm$ 41,07 (n= 24)	9,05 $\pm$ 28,63 (n= 16)	n.s.
IL-10	150,27 $\pm$ 275,97 (n= 24)	19,71 $\pm$ 48,13 (n= 13)	n.s.

Im Kollektivvergleich zeigten sich geringe Unterschiede zwischen beiden Patientenkollektiven in den Cytokinkonzentrationen, die nicht signifikant waren (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Konzentrationen (pg/ml) von IL-1 β , FasL und IL-10 im Sputum, COPD vs. ohne COPD, T1, T2. Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

	CAP + COPD	CAP – COPD	P
IL-1 β T1	8508,64 $\pm$ 18097,41 (n= 13)	6506,82 $\pm$ 8768,8 (n= 11)	n.s.
IL-1 β T2	1825,37 $\pm$ 4622,27 (n= 9)	636,78 $\pm$ 486,01 (n= 6)	n.s.
FasL T1	19,65 $\pm$ 54,05 (n= 13)	5,69 $\pm$ 16,08 (n= 11)	n.s.
FasL T2	11,83 $\pm$ 35,67 (n= 10)	4,43 $\pm$ 10,84 (n= 6)	n.s.
IL-10 T1	135,59 $\pm$ 268,03 (n= 13)	167,63 $\pm$ 297,23 (n= 11)	n.s.
IL-10 T2	25,62 $\pm$ 54,04 (n= 10)	0,0 (n= 3)	n.s.

5.3. Schwere des klinischen Verlaufes

5.3.1. Apoptose

Hinsichtlich der Apoptoserate zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Schwere des klinischen Verlaufes gemessen mittels des SAPS II-Score (Ergebnisse hier nicht dargestellt).

5.3.2. Zellaktivierungsmarker *CD11b* und *CD66b*

Patienten mit schwerem klinischem Verlauf, die zum Zeitpunkt T1 einen SAPS II-Score größer 23 aufwiesen, hatten mit $21,82 \pm 10,95$ rMFI ($n= 9$) eine signifikant höhere Expression von CD66b peripherenöser Neutrophiler, im Vergleich zu Patienten mit weniger schwerem Verlauf ($14,44 \pm 4,2$ rMFI; $n= 18$; $P= 0,05$) (siehe [Abbildung 26](#)).

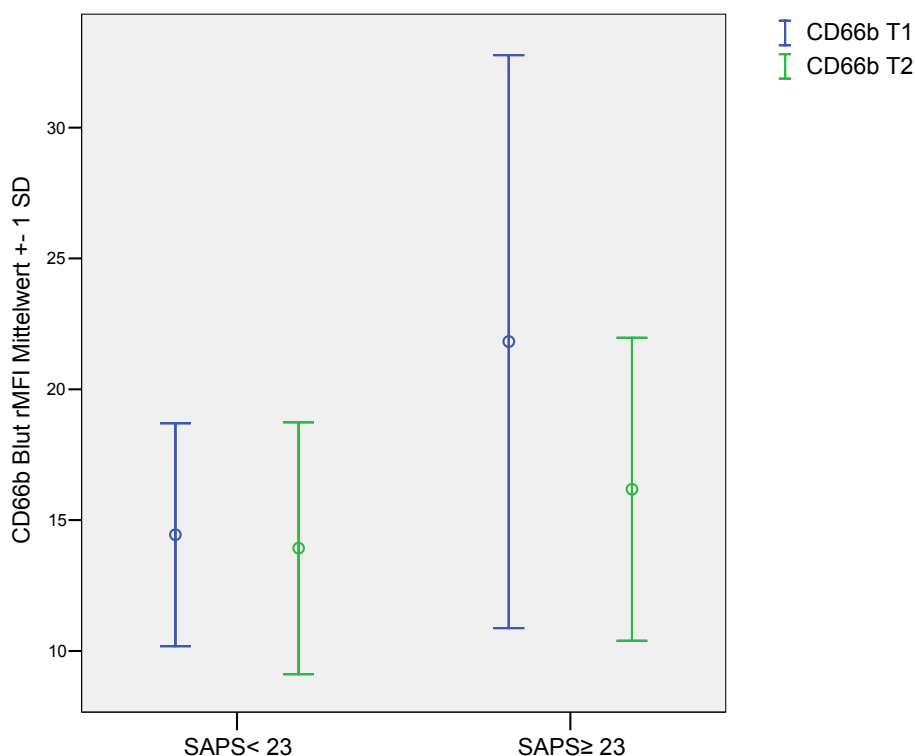


Abb.26: CD66b-Oberflächenexpression peripherenöser neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit der Schwere des klinischen Verlaufes zu beiden Messzeitpunkten. Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

5.3.3. CXCL-8 und die Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2

Patienten, die einen schwereren klinischen Verlauf aufwiesen (SAPS II-Score > 23), zeigten eine höhere CXCR-1 und CXCR-2-Expression peripherenöser Neutrophiler zum Zeitpunkt T1 (T1: CXCR-1: $34,01 \pm 12,04$ rMFI; n= 9 vs. $22,31 \pm 9,97$ rMFI; n= 18; $P < 0,05$; CXCR-2: $64,5 \pm 35,04$ rMFI; n= 7 vs. $27,29 \pm 15,52$ rMFI; n= 15; $P < 0,05$; T2: CXCR-1: $27,6 \pm 16,6$ rMFI; n= 5 vs. $16,45 \pm 10,15$ rMFI; n= 14; $P =$ nicht signifikant; CXCR-2: $32,45 \pm 9,78$ rMFI; n= 4 vs. $25,87 \pm 12,75$ rMFI; n= 12; $P =$ nicht signifikant) (siehe Abbildung 27).

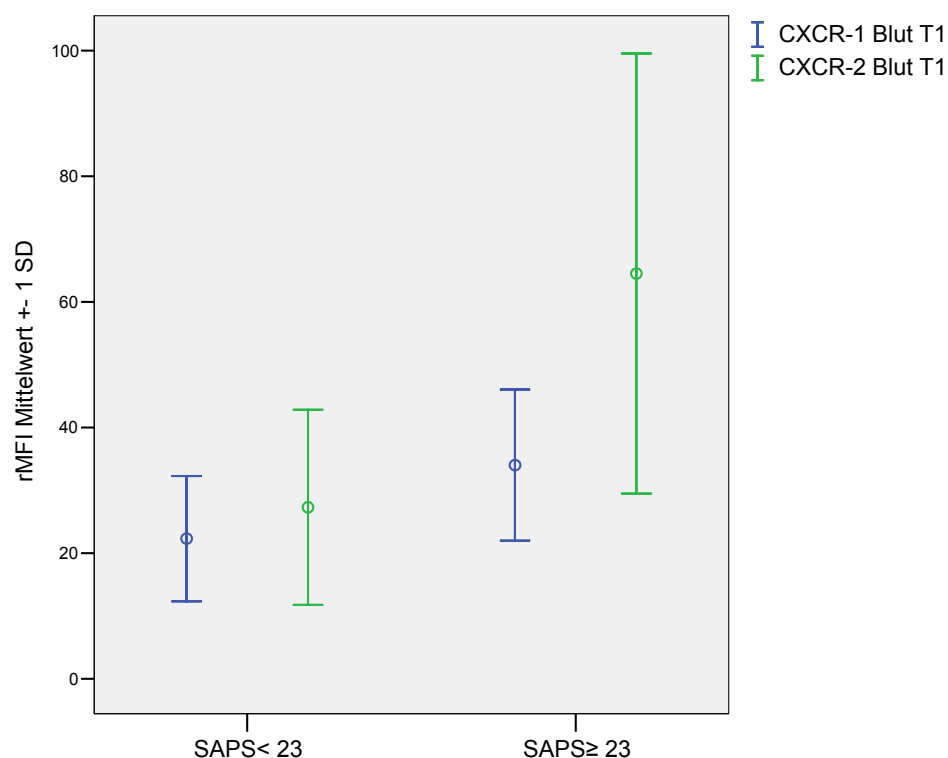


Abb.27: CXCL-8-Rezeptorexpression peripherenöser Neutrophiler bei T1 in Abhängigkeit der Schwere des klinischen Verlaufes, Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

5.4. Nachweis eines pathogenen Erregers im Sputum

5.4.1. Apoptose

Hinsichtlich der Apoptoserate zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Erregernachweis im Sputum (Ergebnisse hier nicht dargestellt).

5.4.2. Zellaktivierungsmarker *CD11b* und *CD66b*

Patienten, bei denen im Rahmen einer mikrobiologischen Diagnostik in Sputum, bronchoalveolärer Lavage oder Absaugung ein pathogener Erreger isoliert werden konnte, zeigten wesentlich höhere Expressionen des CD66b-Rezeptors im Sputum bei T1 (rMFI: $14,12 \pm 9,01$, $n = 14$) gegenüber Patienten, bei denen kein Erreger nachgewiesen werden konnte (rMFI: $7,59 \pm 5,86$, $n = 13$) ($P < 0,05$) (siehe Abbildung 28).

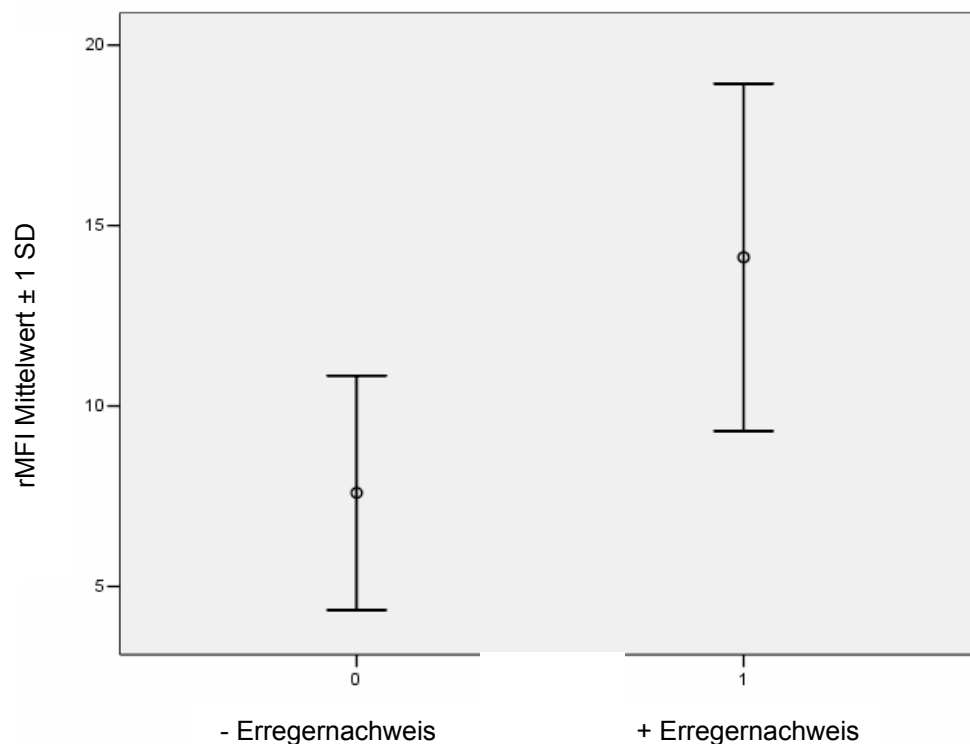


Abb.28: CD66b-Rezeptorexpression pulmonaler Neutrophiler in Abhängigkeit eines Erregernachweises aus dem Sputum, T1, Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

5.4.3. CXCL-8 und die Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2

Patienten, bei denen ein pathogener Erreger isoliert werden konnte, zeigten bei T1 eine geringere Oberflächenexpression von CXCR-1 im Sputum, während die Rezeptorexpression peripherenöser Neutrophiler leicht erhöht war (Sputum mit Erregernachweis: $4,59 \pm 2,72$ rMFI; $n = 14$; Sputum ohne Erregernachweis: $9,24 \pm 6,9$ rMFI; $n = 13$; $P < 0,05$) (siehe Abbildung 29). Bezüglich der CXCL-8-Konzentration im Sputum und der CXCR-2-Rezeptorexpression pulmonaler Neutrophiler konnten in Abhängigkeit eines Erregernachweises keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

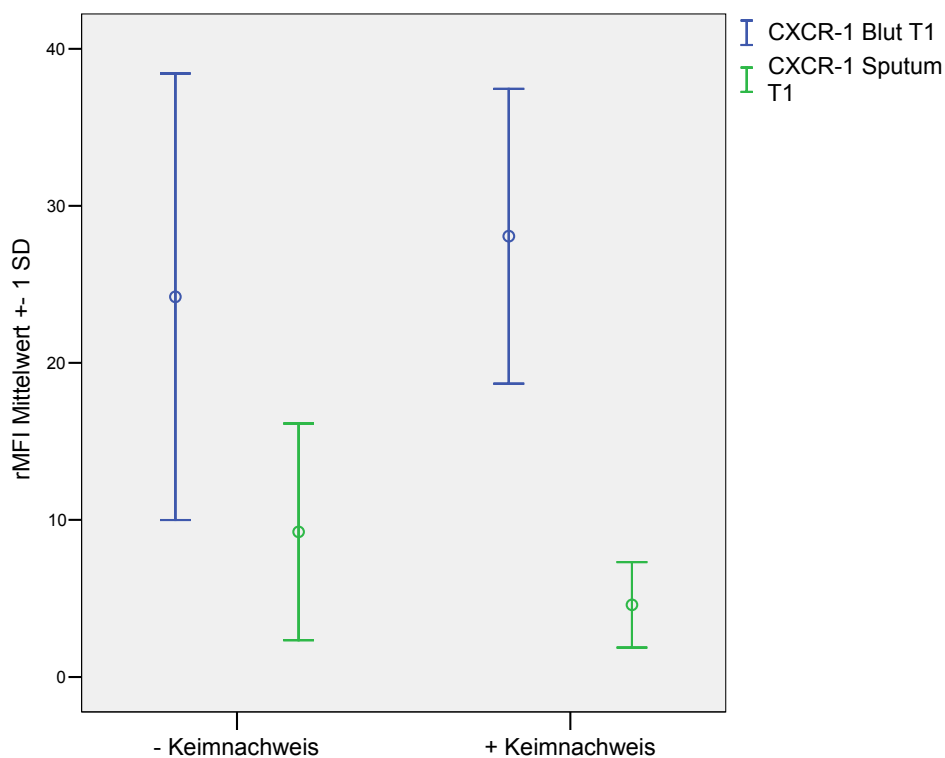


Abb.29: CXCR-1-Rezeptoroberflächenexpression bei Patienten mit Erregernachweis aus Sputum, bronchoalveolärer Lavage oder Spülung im Vergleich zu Patienten ohne Erregernachweis zu den Zeitpunkten T1, T2, Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

5.5. Glukokortikoidtherapie

Hinsichtlich der Apoptoserate, der Zellaktivierungsmarker CD11b und CD66b, der CXCR-1- und CXCR-2-Rezeptorexpression sowie der CXCL-8-Konzentration zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf eine zuvor begonnene systemische Glukokortikoidtherapie (Ergebnisse hier nicht dargestellt). Patienten, die zuvor keine Glukokortikoidtherapie erhielten wiesen eine signifikante Abnahme der CXCL-8-Konzentration im Sputum auf (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: CXCL-8-Gehalt des Sputums bei Patienten mit und ohne vor Messung durchgeführter Glukokortikoidbehandlung (GK). Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

	mit GK	ohne GK	P
CXCL-8 T1 (pg/ml)	40902,1 $\pm$ 51484,04 (n= 5)	62547,61 $\pm$ 71494,98 (n= 18)	n.s.
CXCL-8 T2 (pg/ml)	10555,42 $\pm$ 13069,43 (n= 4)	18008,42 $\pm$ 19571,26 (n= 12)	n.s.
P	n.s.	< 0,05	

6. Diskussion

Um die Vorgänge der angeborenen Immunität im Rahmen von Pneumonien charakterisieren zu können, war es uns von Bedeutung, den zeitlichen Verlauf der inflammatorischen Reaktion zu verfolgen. Dabei galt unser Interesse dem Aktivierungsstatus, der CXCL-8-Rezeptorexpression und der Apoptoserate neutrophiler Granulozyten im Sputum und periphervenösen Neutrophilen von Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie (CAP). Wir stellten uns die Frage, inwieweit sich Unterschiede zwischen Patienten mit zugrunde liegender COPD gegenüber Patienten ohne chronisch-obstruktive Lungenerkrankung finden lassen.

Induziertes Sputum stellt gegenüber der bronchoalveolären Lavage eine weniger invasive diagnostische Methode der Erregerdiagnostik dar. Ziel unserer Studie war es zu untersuchen, inwieweit sich induziertes Sputum als Methode für die durchflusszytometrische Messung von Oberflächenmarkern und Apoptose neutrophiler Granulozyten nutzen lässt. Als Vergleichsgrundlage dienten uns dabei Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, in denen bronchoalveoläre Lavage die Methode der Materialgewinnung für die Erfassung inflammatorischer Vorgänge im Lungenkompartiment war (Strassburg *et al.*, 2004; Droemann *et al.*, 2000).

In Anbetracht der Tatsache, dass die frühesten pathomorphologischen Veränderungen bei der Entstehung der COPD in den kleinen Atemwegen zu suchen sind, stellte sich die Frage, inwieweit hierbei induziertes Sputum als diagnostische Methode geeignet ist. Saetta *et al.* analysierten Lungenresektate von asymptomatischen Rauchern und Rauchern mit Symptomen einer chronischen Bronchitis und Atemwegsobstruktion. Es stellte sich heraus, dass der Gehalt an CD8-positiven T-Lymphozyten sowie der Durchmesser der glatten Muskulatur der Bronchioli bei symptomatischen Patienten erhöht war, während sich kein Unterschied bezüglich der Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zeigen ließ (Saetta *et al.*, 1998). Demgegenüber lassen sich lösliche Mediatoren im Sputum in frühen Erkrankungsstadien nachweisen. Als Marker für den in der Pathogenese der COPD bedeutsamen oxidativen Stress zeigten sich unter anderem Hinweise für eine erhöhte Myeloperoxidaseaktivität (Rytilä *et al.*, 2006).

Es ist davon auszugehen, dass aus dem Sputum gewonnene Zellen nicht dasselbe Lungenkompartiment repräsentieren wie Zellen, die aus bronchoalveolärer Lavage (BAL) isoliert werden. Maestrelli *et al.* haben bei der Sputumanalyse von COPD-Patienten gezeigt, dass sich im Sputum höhere Anteile neutrophiler Granulozyten und niedrigere

Anteile von Makrophagen und Lymphozyten finden lassen als in der BAL (Maestrelli *et al.*, 1995). Analog dazu konnte in neueren Studien gezeigt werden, dass die Zellzusammensetzung im Sputum bei Gesunden und COPD-Patienten nicht mit den Ergebnissen der BAL oder den entnommenen bronchialen Biopsien korreliert, während sich eine positive Korrelation von Cytokinen wie CXCL-8 in Sputum und BAL nachweisen ließ. Die Autoren vermuten, dass sich Zellen im Sputum aus den größeren Luftwegen rekrutieren, während die Gewinnung von Entzündungszellen bei bronchoalveolärer Lavage aus den peripheren Atemwegen erfolgt und vom jeweilig bronchoskopierten Lungenabschnitt abhängig ist. Im Gegensatz dazu seien lösliche Faktoren wie CXCL-8 nicht ortsgebunden und diffundierten leichter in die verschiedenen Lungenkompartimente (Rutgers *et al.*, 2000). Für die Gewinnung induzierten Sputums ist von Bedeutung, dass es mit zunehmender Inhalationsdauer und fraktionierter Sputumgewinnung zu einer Abnahme des Anteils an neutrophilen Granulozyten und einer Zunahme des Makrophagenanteils kommt, was auf eine zunehmende Materialgewinnung aus peripheren Atemwegen schließen lässt (Gershman *et al.*, 1999). Sputumdiagnostik hat sich bei Asthmapatienten als zuverlässige diagnostische Methode bewährt, die auch bei wiederholter Anwendung vergleichbare Ergebnisse im Hinblick auf Zellzahlen und lösliche Aktivierungsmarker liefert (in 't Veen *et al.*, 1996; Pizzichini *et al.*, 1996). Bhowmik *et al.* konnten in einer Studie mit COPD-Patienten zeigen, dass induziertes Sputum gegenüber dem expektorierten Sputum den Vorteil der größeren Vitalität der Zellen birgt. Zudem zeichnet es sich durch eine größere Zuverlässigkeit bei Zellzahl- und Mediatorenbestimmung aus (Bhowmik *et al.*, 1998). Dabei scheint eine Begrenzung der Methode darin zu bestehen, dass die wiederholte Inhalation mit 3,5% NaCl innerhalb von 24 Stunden zu einer vorübergehenden Entzündungsreaktion mit nachweisbar ansteigender Zellzahl an neutrophilen Granulozyten führt (Nightingale *et al.*, 1998).

Die entzündliche Reaktion im Lungenparenchym führt zu einem sprunghaften Anstieg der Anzahl neutrophiler Granulozyten in den Atemwegen. Im Stadium der „roten Hepatisation“ der Lobärpneumonie kommt es zum massiven Austritt von neutrophilen Granulozyten sowie eines entzündlichen proteinreichen Exudates. In einem Hasenmodell der Lobärpneumonie konnte gezeigt werden, dass die Einwanderung Neutrophiler schon nach 6 Stunden beendet ist, obwohl die histologischen Veränderungen noch bis zu weitere 96 Stunden nachweisbar sind (Jones *et al.*, 1994). Trotz des Ausmaßes der entzündlichen Veränderungen kommt es in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle zum narbenfreien

Abheilen der Entzündung. Apoptotische neutrophile Granulozyten werden dabei umgehend von Makrophagen und anderen zur Phagozytose befähigten Zellen aus dem Gewebe entfernt, bevor es zur Akkumulation der apoptotischen Zellen kommt.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigten eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate pulmonaler neutrophiler Granulozyten im Stadium der akuten Entzündung, gegenüber periphervenösen Neutrophilen von Pneumoniepatienten. Dabei wiesen Patienten mit COPD niedrigere Apoptoseraten pulmonaler Neutrophiler auf als Patienten ohne COPD. Mit dem Entzündungsrückgang unter antibiotischer Therapie kam es zu einer Abnahme apoptotischer Neutrophiler im Sputum, während sich ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate periphervenöser Neutrophiler nachweisen ließ.

Die niedrigere Apoptoserate in der Gruppe der COPD-Patienten war nicht mit einer höheren Konzentration von CXCL-8 im pulmonalen Kompartiment assoziiert. Die CXCL-8-Konzentration im Sputum der COPD-Patienten könnte durch eine vorher stattgefundene systemische Glukokortikoidtherapie dieses Patientenkollektives beeinflusst worden sein. Allerdings konnten wir keinen signifikanten Einfluss einer systemischen Glukokortikoidtherapie auf Apoptoserate oder CXCL-8-Konzentration nachweisen.

Bei Patienten mit Bronchiektasen und akuter Exazerbation wurden im Sputum ebenfalls erniedrigte Apoptoseraten neutrophiler Granulozyten nachgewiesen, wobei erhöhte CXCL-8-Konzentrationen im Sputum gemessen werden konnten (Watt *et al.*, 2004). Strassburg *et al.* konnten zeigen, dass periphervenöse neutrophile Granulozyten von Patienten mit Pneumonie und chronischer Bronchitis eine erhöhte chemotaktische Aktivität mit verlängerter Lebensdauer aufwiesen. Dabei korrelierte die chemotaktische Aktivität auf CXCL-8 mit dem „Pneumonia severity index“ (PSI), was auf eine schlechtere Prognose für dieses Patientenkollektiv hindeutet (Strassburg *et al.*, 2004).

Im Differentialzellbild unserer Studie wiesen COPD-Patienten zum Zeitpunkt T2 signifikant geringere Anteile an Makrophagen im Sputum auf. Eine insuffiziente Phagozytose birgt das Risiko der sekundären Nekrose von Granulozyten und damit der Freisetzung potentiell gewebstoxischer Substanzen, wie sie auch bei der primären Nekrose der Zellen freigesetzt werden. Inwieweit dieser Mechanismus für die Lungenparenchymschädigung der COPD von Bedeutung ist bleibt aufzuklären, da sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl nekrotischer Neutrophiler zwischen beiden Patientenkollektiven nachweisen ließ, welcher im Sinne einer verstärkten sekundären Nekrose Neutrophiler von Patienten mit COPD hätte gewertet werden können. *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass es bei apoptotischen Neutrophilen in der

Abwesenheit von Makrophagen zur sekundären Nekrose der Zellen kommt (Kar *et al.*, 1995). Bronchialepithelzellen, die apoptotische eosinophile Granulozyten phagozytieren können, nehmen an der Phagozytose apoptotischer Neutrophiler offensichtlich nicht teil (Sexton *et al.*, 2004).

Es gibt Hinweise darauf, dass die Fähigkeit zur Phagozytose von Makrophagen bestimmten Einflüssen unterliegt. Vandivier *et al.* analysierten Sputum von Patienten mit Bronchiektasen und chronischer Bronchitis. Neben einer hohen Apoptoserate von neutrophilen Granulozyten zeigte sich, dass es zu einer direkten Schädigung des Phosphatidylserinrezeptors der Makrophagen durch die von neutrophilen Granulozyten sezernierte Elastase kommt. Die Autoren sehen darin den möglichen Mechanismus einer verzögerten Abräumung neutrophiler Granulozyten bei chronischen Lungenerkrankungen (Vandivier *et al.*, 2002).

Liu *et al.* konnten zeigen, dass Neutrophile in frühen Apoptosestadien sowie sekundär nekrotische Neutrophile verstärkt Elastase produzieren. Im *in vitro* Versuch korrelierte die Umwandlung von der apoptotischen zur nekrotischen Zelle positiv mit der Elastaseproduktion (Liu *et al.*, 2003).

Neben dem Phosphatidylserinrezeptor sind andere Rezeptoren wie der Vitronektinrezeptor und der Thrombospondinrezeptor CD36 bekannt, die eine Rolle bei der Erkennung alternder Neutrophiler durch Makrophagen spielen. Es stellte sich heraus, dass die Erkennung apoptotischer Neutrophiler abhängig vom pH-Wert ist (Savill *et al.*, 1992). In chronisch entzündetem Gewebe mit niedrigem pH-Wert und hohen Anteilen an kationischen Molekülen kommt es so zu einer möglichen Einschränkung der Phagozytose neutrophiler Granulozyten durch Makrophagen. Folglich zeigen sich verschiedene Erklärungsansätze für eine insuffiziente Phagozytose apoptotischer Neutrophiler im chronisch entzündeten Gewebe. Bei apoptotischen Zellen, die initial der Entfernung aus dem Gewebe entgangen sind, kommen weitere Mechanismen zum Tragen. Hierbei spielt auch das Komplementsystem eine Rolle. Sekundär nekrotische Neutrophile und Zellen in späten Apoptosestadien werden bevorzugt durch die Faktoren C1q, C3 und C4 gebunden. Während Makrophagen eine erhöhte Affinität zu komplementmarkierten apoptotischen Zellen aufweisen, kann es dabei auch zu einer inflammationsverstärkenden Wirkung durch das Komplementsystem kommen (Gaipf *et al.*, 2001; Mevorach *et al.*, 1998).

Die Apoptose neutrophiler Granulozyten bewirkt die Umstellung der adaptiven Immunantwort im Sinne einer Entzündungsrückbildung. Die Phagozytose Neutrophiler geht bei Makrophagen mit der zunehmenden Produktion antiinflammatorischer Cytokine

wie „transforming growth factor β “ (TGF β) und Prostaglandin E₂ einher (Fadok *et al.*, 1998). Lucas *et al.* inkubierten Makrophagen mit apoptotischen Neutrophilen und zusätzlichen Stimuli wie LPS und TLR-Liganden. Die Kombination apoptotischer Zellen mit TLR-Ligand bewirkte initial eine komplette Blockierung der Produktion antiinflammatorischer Cytokine, wie IL-10 im *in vitro*-Versuch. Bei Inkubation apoptotischer Neutrophiler mit LPS kam es zur verstärkten Freisetzung von TNF α durch Makrophagen. Der frühen proinflammatorischen Reaktion folgte eine späte ausgeprägte antiinflammatorische Reaktion mit erhöhter Produktion von TGF β (Lucas *et al.*, 2003). Apoptotische neutrophile Granulozyten haben folglich je nach zusätzlichem Stimulus einen regulatorischen Einfluss auf die weitere Immunantwort. Im Hinblick auf die von uns gemessene hohe Apoptoserate pulmonaler Neutrophiler sind die genannten Mechanismen von Bedeutung für die Entzündungsrückbildung.

Es ist bekannt, dass es mit Eintritt des programmierten Zelltodes bei Neutrophilen zu definierten Änderungen in der Oberflächenrezeptorenexpression kommt. Kobayashi *et al.* konnten zeigen, dass im Rahmen induzierter Apoptose eine Herunterregulierung der Genexpression proinflammatorischer Marker in neutrophilen Granulozyten erfolgt. Dies wurde ebenfalls für den CXCR-2-Rezeptor nachgewiesen (Kobayashi *et al.*, 2003). Droemann *et al.* beschreiben einen zur Apoptoserate signifikant korrelierenden Abfall der CD16-Expression (Fc γ III) (Droemann *et al.*, 2006). CD16 ist für die Bindung des Fc-Teils von IgG von Bedeutung. Andere Autoren zeigten, dass es zum Verlust des n-formyl-methionyl-leucyl phenylalanine-(fMLP)-Rezeptors kommt, der für die Erkennung von fMLP, einem Nebenprodukt der Bakterienproteinsynthese, wichtig ist. Apoptotische Neutrophile waren nicht zur Degranulation auf externe Stimulation hin befähigt und verloren die Fähigkeit zur Phagozytose (Whyte *et al.*, 1993). Zudem wird eine verminderte Affinität zu Adhäsionsfaktoren wie L-Selektin und Fibrinogen beschrieben, welche die eingeschränkte Adhäsionskapazität von apoptotischen Neutrophilen in *in vitro* Versuchen erklären kann (Dransfield *et al.*, 1995).

Rezeptoren wie L-Selektin, CD16 oder auch der TNF α -Rezeptor werden über proteolytische Abspaltung („Shedding“) von stimulierten Granulozyten entfernt. Dies lässt vermuten, dass der frühe Rezeptorenverlust bei apoptotischen Zellen im entzündeten Gewebe auf ähnliche Mechanismen zurückzuführen ist (Haslett C, 1999).

Es gibt Hinweise dafür, dass die Herunterregulierung der Adhäsionsrezeptoren von apoptotischen neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit COPD verzögert ist. Noguera *et al.* verglichen die Expression von Zellaktivierungsmarkern apoptotischer

periphervenöser Neutrophiler von Patienten mit COPD mit einem Patientenkollektiv gesunder Raucher und stellten fest, dass CD11b bei den Patienten mit COPD stärker exprimiert wird (Noguera *et al.*, 2004).

Unsere Ergebnisse zeigten unabhängig von der Vitalität der Zellen einen in der Entzündungsrückbildung fehlenden Rückgang der Aktivitätsmarkerexpression von CD11b und CD66b pulmonaler sowie periphervenöser Neutrophiler bei Patienten mit COPD im Vergleich zu der Patientengruppe ohne pulmonale Grunderkrankung. Dies kann als Hinweis für eine prolongierte, möglicherweise inadäquate Aktivierung der Zellen gewertet werden.

In unserer Studie erhielten 5 von 15 Patienten mit COPD eine systemische Glukokortikoidtherapie vor Messung von Zellaktivierungsmarkern, Apoptoserate sowie des CXCL-8-Gehaltes im Sputumüberstand. Ein Einfluss auf die niedrigen CXCL-8-Konzentrationen im Sputum von Patienten mit COPD lässt sich vermuten. Bei glukokortikoidvorbehandelten Patienten konnten wir geringere CXCL-8-Konzentrationen messen, die in der Verlaufsmessung im Gegensatz zu nicht vorbehandelten Patienten nicht signifikant rückläufig waren.

Glukokortikoide binden an Glukokortikoidrezeptoren im Cytoplasma und wirken auf die Genexpression inflammatorischer Mediatoren von Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität. Dabei werden proinflammatorische Mediatoren in erster Linie über die direkte Hemmung von Transkriptionsfaktoren, wie „nuclear factor kappa B“ (NF- κ B), geringer exprimiert (Adcock *et al.*, 1995). Dem gegenüber kommt es zur vermehrten Transkription antiinflammatorischer Cytokine, wie beispielsweise IL-10, über die Aktivierung glukokortikoidbindender Gene (Barnes P, 1998).

Inwieweit systemische Glukokortikoide Einfluss auf den klinischen Verlauf und inflammatorische Marker bei der COPD haben, wird zurzeit kontrovers diskutiert. Es gibt verschiedene Beispiele für Glukokortikoideffekte auf die Neutrophilenfunktion *in vitro*. So konnte gezeigt werden, dass inhaliertes Budenosid® in Kombination mit Salbutamol® inhibierende Wirkung auf die Neutrophilenmigration entfaltet (Sadowska *et al.*, 2005). Glukokortikoide haben Einfluss auf die Apoptose von Granulozyten. Während es bei Eosinophilen zur Apoptoseinduktion kommt, steht bei Neutrophilen die lebensverlängernde Wirkung im Vordergrund (Meagher *et al.*, 1996). Dies spielt auch in Bezug auf den begrenzten therapeutischen Effekt der Glukokortikoidtherapie bei der Behandlung der COPD im Vergleich zum Asthma bronchiale eine Rolle. Wir konnten

keinen signifikanten Einfluss einer Glukokortikoidtherapie auf die Apoptoserate periphervenöser oder pulmonaler Neutrophiler nachweisen, was unter anderem auch durch die niedrige mittlere orale Glukokortikoiddosis von $35,5 \pm 18,03$ mg Prednisolon bedingt sein kann.

Des Weiteren zeigten sich auch Glukokortikoideffekte im Hinblick auf die Phagozytose Neutrophiler durch Makrophagen. Liu *et al.* beschreiben eine gesteigerte Fähigkeit zur Phagozytose durch Makrophagen unter Glukokortikoidwirkung *in vitro* (Liu *et al.*, 1999). Keatings *et al.* untersuchten Sputum von Patienten mit COPD und Asthma bronchiale und zeigten, dass eine orale Glukokortikoidgabe bei COPD-Patienten zu keiner signifikanten Verbesserung der obstruktiven Flusslimitation führt. Während Asthma bronchiale-Patienten niedrigere Eosinophilenanteile im Sputum aufwiesen und auch deren Aktivitätsmarker „eosinophil cationic proteine“ (ECP) und „eosinophil peroxidase“ (EPO) reduziert messbar waren, zeigte sich dieser Effekt bei COPD-Patienten nicht. Zudem vermuten die Autoren eine geringere Sensitivität von CXCL-8 und TNF α hinsichtlich der Hemmung der Gentranskription durch Glukokortikoide, im Vergleich zu denen für die Chemotaxis von eosinophilen Granulozyten bedeutsamen Cytokinen (Keatings *et al.*, 1997). Barczyk *et al.* untersuchten den Effekt einer zweiwöchigen oralen Glukokortikoidtherapie bei Patienten mit COPD und stellten keine signifikante Abnahme der CXCL-8-Konzentration im Sputum fest, während Myeloperoxidase (MPO) in geringerer Konzentration im Sputumüberstand messbar war. Die Autoren sehen darin einen möglichen Mechanismus der Wirksamkeit einer oraler Glukokortikoidtherapie bei exazerbierter COPD (Barczyk *et al.*, 2004).

Insgesamt werden verschiedene Ursachen für die unzureichende Wirksamkeit von Glukokortikoiden bei der COPD gegenüber dem Asthma bronchiale diskutiert. Einige Autoren sehen den schädigenden Einfluss oxidativen Stresses auf glukokortikoidresponsive Proteine inflammatorischer Zellen als Ursache. Glukokortikoide führen zur vermehrten Bildung von Histon-Deacetylase 2, welche einer Freilegung proinflammatorischer Gene durch die Histon-Acetyltransferase entgegenwirkt. Dieser Effekt spielt vor allem bei der Therapie chronischer Entzündungserkrankungen eine große Rolle. Es wird vermutet, dass oxidativer Stress unter anderem die Histon-Deacetylase 2 schädigt und dass auf diesem Wege die Hemmung der proinflammatorischen Gentranskription durch Glukokortikoide bei der COPD beeinträchtigt ist (Barnes *et al.*, 2004). Culpitt *et al.* analysierten Makrophagen von COPD-Patienten auf die Freisetzung von Chemokinen unter Dexamethasoneinfluss. Es zeigte sich, dass Makrophagen von

COPD-Patienten im Gegensatz zu Makrophagen von Rauchern nicht durch Dexamethason in ihrer CXCL-8-Produktion inhibierbar waren (Culpitt *et al.*, 2003). Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle für die Pathogenese der COPD bezüglich der Rekrutierung Neutrophiler in die Atemwege.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die chronische Bronchitis mit erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren einhergeht. Dabei ist die Inhalation toxischer Gase beim Zigarettenrauchen an der Auslösung einer chronischen pulmonalen Entzündung ursächlich beteiligt. Wie eingangs diskutiert, führt die Sauerstoffradikalbildung zur Aktivierung der Gentranskription proinflammatorischer Cytokine wie TNF α und CXCL-8. Des Weiteren lassen sich bei gesunden Rauchern Veränderungen der alveolären Cytokine finden. McCrea *et al.* beschreiben erhöhte CXCL-8-Konzentrationen und erniedrigte Konzentrationen von IL-6 in der bronchoalveolären Lavage (McCrea *et al.*, 1994). Über eine direkt schleimhautschädigende Wirkung des Nikotins wird die mukoziliäre Clearance beeinträchtigt und die bakterielle Kolonisierung des unteren Respirationstraktes begünstigt, welche zur anhaltenden Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe führt. Aoshiba *et al.* konnten zudem einen konzentrationsabhängigen Effekt von Nikotin über noncholinerge Rezeptoren auf neutrophile Granulozyten nachweisen, der sich durch eine Unterdrückung der Zellapoptose *in vitro* äußerte (Aoshiba *et al.*, 1996).

Das Patientenkollektiv unserer Studie war durch keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Rauchgewohnheiten bei Patienten mit oder ohne COPD gekennzeichnet. Folglich lassen sich Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven im Hinblick auf die Zellapoptose und die Cytokinkonzentrationen nicht auf das inhalative Zigarettenrauchen zurückführen.

Während wir eine signifikant erniedrigte Konzentration von CXCL-8 im Sputum bei Patienten mit exazerbierter COPD nachwiesen, werden in anderen Studien erhöhte Konzentrationen an CXCL-8 im Sputum beschrieben (Keatings *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu unserem Patientenkollektiv waren glukokortikoidbehandelte Patienten von der Studie ausgeschlossen. Bhowmik *et al.* konnten einen Zusammenhang zwischen Exazerbationsfrequenz und IL-6, respektive CXCL-8-Konzentration im Sputum nachweisen. Dabei waren die IL-6-Konzentrationen während einer Exazerbation gegenüber Intervallphasen signifikant erhöht, während die CXCL-8-Konzentrationen deutlich mehr variierten und insbesondere im Zusammenhang mit Neutrophilie im Sputum

erhöht messbar waren (Bhowmik *et al.*, 2000). IL-6 wird in erster Linie von Bronchialepithelien und Makrophagen produziert.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass das antiinflammatorische Cytokin IL-10 im Sputum von Patienten mit COPD tendenziell niedriger messbar war. Takanashi *et al.* beschreiben signifikant erniedrigte IL-10-Konzentrationen im Sputum von Patienten mit COPD und sehen darin einen möglichen Mechanismus für chronische Inflammation (Takanashi *et al.*, 1999). Aufgrund der begrenzten Menge an Sputumüberstand war es uns nicht möglich, weitere Cytokine zu bestimmen, welche die verzögerte Apoptose pulmonaler Neutrophiler bei Patienten mit COPD erklären könnten. Diesbezüglich seien in erster Linie IL-6, „granulocyte colony stimulating factor“ (G-CSF), „granulocyte- macrophage stimulating factor“ (GM-CSF) und Leukotrien B4 zu nennen.

Analog zu vorherigen Studien konnten wir im Vergleich zur peripheren Oberflächenexpression eine deutlich reduzierte pulmonale Expression von CXC-Rezeptoren nachweisen. Es ließen sich auch bei Gesunden im Sputum niedrigere pulmonale Expressionsraten gegenüber peripheren neutrophilen Granulozyten finden (Pignatti *et al.*, 2005). Die Herunterregulierung beider Rezeptoren war über den Zeitverlauf konstant. Im Sputum von Patienten mit nachgewiesenem pathogenem Erreger zeigte sich darüber hinaus eine signifikant erniedrigte Oberflächenexpression des CXCR1-Rezeptors gegenüber Patienten ohne Erregernachweis. Hier könnte ein erregerbedingter Einfluss auf die Rezeptorexpression eine Rolle spielen.

Wie zuvor bereits erwähnt, kommt es neben einer ligandenabhängigen Herunterregulierung der Rezeptoren auch zur ligandenunabhängigen Herunterregulierung durch Faktoren wie TNF α und bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS). Die *in vitro*-Inkubation von Neutrophilen mit TLR2- und TLR4-Rezeptoragonisten führte dabei zur verminderten Expression von CXCR1 und CXCR2, wobei die Veränderungen im CXCR2-Rezeptorstatus schneller erfolgen und von Co-Faktoren wie CD14 abhängig sind. Dabei sind neutrophile Granulozyten weiter in der Lage, suffizient auf CXCL-8-Stimulation zu reagieren (Sabroe *et al.*, 2005).

Cummings *et al.* untersuchten den CXC-Rezeptorstatus von Patienten mit Sepsis und konnten eine um 50% reduzierte Expression des CXCR2-Rezeptors nachweisen. Diese war im Sinne einer reduzierten Chemotaxis auf Chemokine wie „growth-related oncogen“ (Gro- α , - β , - γ) und „epithelial cell-derived neutrophil activator“ (ENA-78) hin funktionell wirksam (Cummings *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse unserer Studie eine höhere Expression beider CXC-Rezeptoren peripheren neutrophiler

Granulozyten bei Patienten mit schwerem klinischem Verlauf. Dies lässt sich vermutlich durch die unterschiedliche Pathogenese erklären. Im Gegensatz zur Sepsis kommt es bei der Pneumonie weniger häufig zu einer ausgeprägten systemischen Inflammation.

Patienten, bei denen im Rahmen der mikrobiologischen Diagnostik aus Sputum, BAL, oder Absaugung ein pathogener Erreger isoliert wurde, wiesen eine signifikant erhöhte Expression des CD66b-Rezeptors pulmonaler Neutrophiler auf. CD66b, welches Bestandteil gelatinasehaltiger Vesikel ist, spielt bei der Initiierung des „respiratory burst“ und der Adhäsion Neutrophiler an Gefäßwänden eine Rolle. Sowohl fMLP als auch erhöhte Konzentrationen an Peptidoglykan (PG) bewirkten in *in vitro*-Versuchen eine erhöhte Mobilisation von CD66b aus den Vesikeln an die Zelloberfläche (Mattsson *et al.*, 2003). Wie eingangs erwähnt, stellt die bakterielle Kolonisation der unteren Atemwege bei COPD-Patienten ein Erregerreservoir für Exazerbationen dar. Inwieweit Spezies und Anzahl koloniebildender Keime Einfluss auf Schwere und Frequenz der Exazerbationen haben, ist Gegenstand der Diskussion. Sethi *et al.* untersuchten Sputum von COPD-Patienten im symptomarmen Intervall und während Phasen der Exazerbation und konnten nur marginale Unterschiede in der Bakterienkonzentration nachweisen. Dagegen war das Auftreten neuer Bakterienstämme mit dem Exazerbationsrisiko assoziiert (Sethi *et al.*, 2007).

Andere Autoren sehen in der Bakterienkolonisation der unteren Atemwege bei Patienten mit COPD einen wichtigen Prognosefaktor für die Erkrankung. Wilkinson *et al.* beschreiben eine signifikante Abnahme der FEV1 mit Zunahme der Anzahl an isolierten Keimen und dem Auftreten neuer Bakterienspezies (Wilkinson *et al.*, 2003).

Die Ursachen bakterieller Exazerbationen und anhaltender bakterieller Kolonisation bei der COPD können auch in der Interaktion des Immunsystems mit den Erregern zu suchen sein. Berenson *et al.* analysierten die Phagozytose von *Hämophilus influenzae* durch alveoläre Makrophagen. Es stellte sich heraus, dass diese bei Patienten mit COPD gegenüber lungengesunden Patienten signifikant eingeschränkt war (Berenson *et al.*, 2006).

Zusammenfassend weisen unsere Ergebnisse auf eine prolongierte Stimulation neutrophiler Granulozyten im Sputum von Patienten mit Pneumonie und COPD hin. Während bei Patienten ohne zugrunde liegende chronische Bronchitis eine rückläufige Zellaktivierungsmarkerexpression nachweisbar war, zeigten sich bei Patienten mit COPD anhaltend hohe Werte. Die gegenüber der Vergleichsgruppe erniedrigte Apoptoserate im

Sputum bei initialer Messung weist auf eine verstärkte inflammatorische Reaktion bei Patienten mit COPD hin, ohne dass hierfür erhöhte proinflammatorische Cytokinkonzentrationen nachweisbar waren. Die Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven lassen sich nicht durch andere Faktoren, wie das inhalative Zigarettenrauchen oder die Schwere des Verlaufes erklären, während eine Therapie mit Glukokortikoiden bei einem Teil der COPD-Patienten die Ergebnisse beeinflussen könnte. Im Gesamtkollektiv waren im longitudinalen Verlauf bei abnehmender Gesamtzellzahl im Sputum neben einer signifikant rückläufigen CXCL-8-Konzentration auch die IL-1 β -Konzentration sowie die Konzentrationen der antiinflammatorischen Cytokine FasL und IL-10 niedriger messbar. COPD-Patienten mit Pneumonie wiesen im Verlauf eine geringere Anzahl Makrophagen im Sputum auf. Dies könnte zu verstärkter sekundärer Nekrose der Neutrophilen führen, da die Kapazität zur Phagozytose apoptotischer Zellen vermindert ist.

Unterschiede zu Voruntersuchungen im Hinblick auf Zellaktivierungsstatus und Apoptoserate weisen auf differente Mechanismen der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus dem Sputum gegenüber der BAL hin.

Hierbei muss davon ausgegangen werden, dass die aus induziertem Sputum gewonnenen Zellen vorwiegend aus den größeren Atemwegen stammen oder über einen längeren Zeitraum aus den Atemwegen aszendieren. Im Hinblick auf die Tatsache, dass sich die der COPD zugrunde liegenden Entzündungsmechanismen vor allem in den kleinen Atemwegen abspielen, muss die Frage, inwieweit die gewonnenen Zellen als repräsentativ für die spezifische Inflammation der chronischen Bronchitis angesehen werden können offen bleiben. Auf der anderen Seite werden mit der Anwendung induzierten Sputums aufgrund der geringen Invasivität longitudinale Messungen möglich. Induziertes Sputum hat daher trotz des erhöhten methodischen Aufwandes gute Perspektiven als diagnostische Methode des pulmonalen Entzündungsmonitorings.

7. Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der COPD. Die Vorgänge der Entzündungsrückbildung und insbesondere die Mechanismen, welche Apoptose regulieren, sind unvollständig erforscht. Eine ungenügende Elimination apoptotischer neutrophiler Granulozyten sowie die prolongierte Stimulation der Zellen unterstützen die inflammatorische Reaktion im Kompartiment Lunge. Vorangegangene Studien haben die gestörte Immunantwort bei der COPD im Rahmen der akuten Entzündung untersucht. Bislang gibt es nur wenig vergleichende Daten zur Entwicklung der lokalen und systemischen Entzündung aus longitudinalen Studien. Dies wird erst durch Nutzung induzierten Sputums ermöglicht.

Dazu haben wir die Zellaktivität und die Apoptoserate in Sputum und Blut von 28 Patienten mit Pneumonie, von denen 15 eine zugrunde liegende COPD aufwiesen, untersucht. Es wurden neutrophile Granulozyten am Tag nach stationärer Aufnahme (T1) und fünf Tage später (T2) aus Sputum und Blut isoliert. Die Apoptoserate wurde mittels TdT-vermittelter Bindung fluoreszierender Nukleotide an freie 3'-OH-Enden von DNA-Fragmenten (TUNEL) bestimmt. Die Messung der Oberflächenmarker neutrophiler Granulozyten erfolgte mit der Dreifarben-Durchflusszytometrie am FACScan-Analyzer. Die Cytokinkonzentrationen im Sputum konnten mittels ELISA gemessen werden.

Bei einer im Gesamtkollektiv signifikant erhöhten Apoptoserate im Sputum bei T1 ($5,31 \pm 5,39\%$ vs. $1,94 \pm 1,22\%$ im Blut) wiesen Patienten mit COPD eine signifikant niedrigere Apoptoserate pulmonaler Neutrophiler gegenüber Patienten ohne COPD auf ($3,19 \pm 2,04\%$ vs. $7,42 \pm 6,85\%$ ohne COPD). Die Apoptoserate im pulmonalen Kompartiment zeigte keine inverse Korrelation zur CXCL-8-Konzentration im Sputum.

Die Oberflächenexpression der Aktivitätsmarker CD66b und CD11b pulmonaler Neutrophiler war bei Patienten mit zugrunde liegender COPD in der Verlaufsmessung weniger stark rückläufig. Bei Patienten mit COPD zeigte sich ein Anstieg der CD66b-Expression im Verlauf (Pneumonie ohne COPD: T1: $12,53 \pm 9,93$ rMFI; T2: $6,59 \pm 3,67$ rMFI; Pneumonie mit COPD: T1: $9,53 \pm 6,26$ rMFI; T2: $11,53 \pm 13,59$ rMFI; $P = \text{n.s.}$). CXC-Rezeptoren pulmonaler Neutrophiler waren durch eine anhaltende Herunterregulierung charakterisiert. Patienten mit schwerem klinischem Verlauf wiesen signifikant erhöhte CXCR1- und CXCR2-Oberflächenrezeptorexpressionen peripherenöser Neutrophiler bei T1 auf (CXCR-1: $34,01 \pm 12,04$ rMFI vs. $22,31 \pm 9,97$ rMFI ohne schweren klinischen Verlauf; CXCR-2: $64,5 \pm 35,04$ rMFI vs. $27,29 \pm 15,52$

rMFI ohne schweren klinischen Verlauf). Bei Patienten mit schwerem klinischem Verlauf ließen sich signifikant erhöhte CD66b-Werte peripherenöser Neutrophiler zum Zeitpunkt T1 nachweisen ($21,82 \pm 10,95$ rMFI vs. $14,44 \pm 4,2$ rMFI pulmonaler Neutrophiler).

Patienten, bei denen ein pathogener Erreger im Sputum nachgewiesen wurde, waren durch eine signifikant erniedrigte pulmonale Expression von CXCR1 zum Zeitpunkt T1 charakterisiert ($4,59 \pm 2,72$ rMFI vs. $9,24 \pm 6,9$ rMFI bei Patienten ohne Erregernachweis). Zudem zeigte sich bei Patienten mit Erregernachweis im Sputum eine signifikant erhöhte pulmonale CD66b-Oberflächenexpression bei T1 ($14,12 \pm 9,01$ rMFI vs. $7,59 \pm 5,86$ rMFI bei Patienten ohne Erregernachweis).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine prolongierte inflammatorische Reaktion im pulmonalen Kompartiment bei COPD mit reduzierten Apoptoseraten pulmonaler Neutrophiler und verzögerter Rückbildung der Zellaktivierung. Sie liefern neue Erkenntnisse im Hinblick auf den Verlauf der Entzündungsreaktion. Parameter der Zellaktivierung im Sputum sind mit dem Nachweis pathogener Erreger assoziiert und eignen sich möglicherweise zum Entzündungsmonitoring. Inwieweit die prolongierte Immunreaktion bei der COPD mit gestörter antimikrobieller Clearance zusammenhängt, bleibt aufzuklären.

8. Literaturverzeichnis

Adcock I, Brown C, Gelder C, Shirasaki H, Peters M und Barnes P (1995). Effects of glucocorticoids on transcription factor activation in human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 268, C331-C338.

Agusti A, Morla M, Sauleda J, Saus C und Busquets X (2004). NF- κ B activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. *Thorax* 59, 483-487.

Agusti A, Sauleda J, Miralles C, Gomez C, Togores B, Sala E, Batle S und Busquets X (2002). Skeletal Muscle Apoptosis and Weight Loss in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 485-489.

Aoshiba K, Nagai A, Yasui S und Konno K (1996). Nicotine prolongs neutrophils survival by suppressing apoptosis. *J Lab Clin Med* 127, 186-194.

Baggiolini M und Wymann MP (1990). Turning on the respiratory burst. *Trends Biochem Sci* 15, 69-72.

Barczyk A, Sozanska E, Trzaska M und Pierzchala W (2004). Decreased Levels of Myeloperoxidase in Induced Sputum of Patients With COPD After Treatment With Oral Glucocorticoids. *Chest* 126, 389-393.

Barnes P (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 94(6):557-72.

Barnes P, Ito K und Adcock I (2004). Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase. *Lancet* 363(9410):731-3.

Berenson C, Garlipp M, Grove L, Malony J und Sethi S (2006). Impaired phagocytosis of nontypeable *Haemophilus influenzae* by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis* 194(10):1375-84.

Bhowmik A, Seemungal T, Sapsford R, Devalia J und Wedzicha J (1998). Comparison of spontaneous and induced sputum for investigation of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 53, 953-956.

Bhowmik A, Seemungal T, Sapsford R und Wedzicha J (2000). Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* 55, 114-120.

Brown S und Savill J (1999). Phagocytosis Triggers Macrophage Release of Fas Ligand and Induces Apoptosis of Bystander Leukocytes. *The Journal of Immunology* 162, 480-485.

Burnett D, Chamba A, Hill SL und Stockley RA (1987). Neutrophils from subjects with chronic obstructive lung disease show enhanced chemotaxis and extracellular proteolysis. *Lancet* 7, 1043-1046.

Casaburi R, Patessio A, Ioli F, Zanaboni S, Donner C und Wassermann K (1991). Reductions in exercise lactic acidosis and ventilation as a result of exercise training in patients with obstructive lung disease. *Am Rev Respir Dis* 143(1):9-18.

Cassatella M (1995). The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 16(1):21-6.

Cawston T, Carrere S, Catterall J, Duggleby R, Elliot S, Shingleton B und Rowan A (2001). Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Novartis Found Symp* 234:205-18.

Chuntharapai A und Kim KJ (1995). Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor. *J Immunol* 155, 2587-2594.

Cox G (1995). Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* 154, 4719-4725.

Cox G (1996). IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *Am J Physiol* 271, L566-L571.

Creutzberg E, Wouters E, Vanderhoven-Augustin I, Dentener M und Schols A (2000). Disturbances in Leptin Metabolism Are Related to Energy Imbalance during Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 1239-1245.

Culpitt S, Rogers D, Shah P, De Matos C, Russell R, Donnelly L und Barnes P (2003). Impaired Inhibition by Dexamethasone of Cytokine Release by Alveolar Macrophages

from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *167*, 24-31.

Cummings C, Martin T, Frevert C, Quan J, Wong V, Mongovin S, Hagen T, Steinberg K und Goodman R (1999). Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J Immunol* *162*, 2341-2346.

Daëron M (1997). Structural bases of Fc gamma R functions. *Int Rev Immunol* *16(1-2):1-27*.

Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bojesen S, Tybjaerg-Hansen A und Nordestgaard B (2007). C-reactive Protein As a Predictor of Prognosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *175*, 250-255.

Dalhoff K, Hansen F, Drömann D, Schaaf B, Aries SP und Braun J (1998). Inhibition of neutrophil apoptosis and modulation of the inflammatory response by granulocyte colony-stimulating factor in healthy and ethanol-treated human volunteers. *J Infect Dis* *178*, 891-895.

Daviskas E, Anderson SD, Gonda I, Eberl S, Meikle S, Seale J und Bautovich G (1996). Inhalation of hypertonic saline aerosol enhances mucociliary clearance in asthmatic and healthy subjects. *European Respiratory Journal* *9*, 725-732.

Di Francia M, Barbier D, Mege J und Orehek J (1994). Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *150*, 1453-1455.

Donaldson G, Seemungal T, Patel I, Lloyd-Owen S, Wilkinson T und Wedzicha (2003). Longitudinal changes in the nature, severity and frequency of COPD exacerbations. *European Respiratory Journal* *22*, 931-936.

Doroshenko T, Chaly Y, Savitskiy V, Maslakova O, Portyanko A, Gorudko I und Voitenok N (2002). Phagocytosing neutrophils down-regulate the expression of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Blood* *100*, 2668-2671.

Dransfield I, Stocks SC und Haslett C (1995). Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. *Blood* *85*, 3264-3273.

Droemann D, Aries SP, Hansen F, Moellers M, Braun J, Katus H und Dalhoff K (2000). Decreased apoptosis and increased activation of alveolar neutrophils in bacterial pneumonia. *Chest* 117, 1679-1684.

Droemann D, Hansen F, Aries S, Braun J, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B (2006). Neutrophil apoptosis, activation and anti-inflammatory cytokine response in granulocyte colony-stimulating factor-treated patients with community-acquired pneumonia. *Respiration* 73(3):340-6..

Drost E, Skwarski K, Sauleda J, Soler N, Roca J, Agusti A und MacNee W (2005). Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax* 60, 293-300.

Fadok V, Bratton D, Konowal A, Freed P, Westcott J und Henson P (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine /paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2 and PAF. *J Clin Invest* 101, 890-898.

Gainet J, Chollet-Martin S, Brion M, Hakim J, Gougerot-Pocidalo M und Elbim C (1998). Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Lab Invest* 78(6):755-62.

Gaipl U, Kuenkele S, Voll R, Beyer T, Kolowos W, Heyder P, Kalden J und Herrmann M (2001). Complement binding is an early feature of necrotic and a rather late event during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 8(4):327-34.

Gershman N, Liu H, Wong H, Liu J und Fahy J (1999). Fractional analysis of sequential induced sputum samples during sputum induction: evidence that different lung compartments are sampled at different time points. *J Allergy Clin Immunol* 104(2 Pt 1):322-8..

Goodman E, Kleinstein E, Fusco A, Quinlan D, Lavery R, Livingston D, Deitch E und Hauser C (1998). Role of Interleukin 8 and the genesis of acute respiratory distress syndrome through an effect on neutrophil apoptosis. *Arch Surg* 133, 1234-1239.

- Gosker H, Kubat B, Schaart G, van der Vusse G, Wouters E und Schols A (2003). Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* 22, 280-285.
- Haslett C (1999). Granulocyte Apoptosis and its Role in the Resolution and Control of Lung Inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, S5-S11.
- Huynh M, Fadok V und Henson P (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* 109, 41-50.
- in 't Veen J, de Gouw H, Smits H, Sont J, Hiemstra P, Sterk P und Bel E (1996). Repeatability of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma. *European Respiratory Journal* 9, 2441-2447.
- Jones H, Clark R, Rhodes C, Schofield J, Krausz T und Haslett C (1994). In vivo measurement of neutrophil activity in experimental lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 149, 1635-1639.
- Jones J und Morgan B (1995). Apoptosis is associated with reduced expression of complement regulatory molecules, adhesion molecules and other receptors on polymorphnuclear leucocytes: functional relevance and role in inflammation. *Immunology* 86, 651-660.
- Jones S, Wolf M, Qin S, Mackay C und Baggiolini M (1996). Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 and not IL-8R2. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 6682-6686.
- Kar S, Ren Y, Savill J und Haslett C (1995). Inhibition of macrophage phagocytosis *in vitro* of aged neutrophils increase release of neutrophil contents. *Clinical Science* 85, 27-31.
- Keatings V, Jatakanon A, Worsdell Y und Barnes P (1997). Effects of Inhaled and Oral Glucocorticoids on Inflammatory Indices in Asthma and COPD. *American Journal of Respiration and Critical Care Medicine* 155, 542-548.

Keatings V, Collins P, Scott D und Barnes P (1996). Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 530-534.

Kettritz R, Gaido ML, Haller H, Luft F, Jennette C und Falk R (1998). Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor- α -mediated apoptosis of human neutrophils. *Kidney Int* 53, pp. 84-91.

Khandaker M, Mitchel G, Xu L, Andrews J, Singh R, Leung H, Madrenas J, Ferguson S, Feldman R und Kelvin D (1999). Metalloproteinases are involved in lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor- α -mediated regulation of CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor expression. *Blood* 93, 2173-2185.

Kilian M, Mestecky J und Schrohenloher R (1979). Pathogenic Species of the Genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* Produce Immunoglobulin A1 Protease. *Infect. Immun.* 26, 143-149.

Kobayashi S, Voyich J, Braughton K und DeLeo F (2003). Down-regulation of proinflammatory capacity during apoptosis in human polymorphnuclear leukocytes. *J Immunol* 170, 3357-3368.

Lang C, Molina P und Adumrad N (1993). Granulocyte colony-stimulating factor prevents ethanol-induced impairment in host defense in septic rats. *Alcohol Clin Exp Res* 17(6):1268-74.

Langen R, Schols A, Kelders M, van der Velden J, Wouters E und Janssen-Heininger Y (2002). Tumor necrosis factor- α inhibits myogenesis through redox-dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C714-C721.

Liles W, Kiener P, Ledbetter J, Arutto A und Klebanoff J (1996). Different Expression of Fas (CD95) and Fas Ligand on Normal Human Phagocytes: Implications for the Regulation of Apoptosis in Neutrophils. *Journal of experimantel Medicine* 184, 429-440.

Liu C, Liu Y, Lin S, Yu C, Wang C, Lin H, Lin C und Kuo H (2003). Apoptotic neutrophils undergoing secondary necrosis induce human lung epithelial cell detachment. *J Biomed Sci* 10(6 Pt 2):746-56.

- Liu Y, Cousin J, Hughes J, Van Damme J, Seckl J, Haslett C, Dransfield I, Savill J und Rossi A (1999). Glucocorticoids Promote Nonphagocytic Phagocytosis of Apoptotic Leukocytes. *The Journal of Immunology* *162*, 3639-3646.
- Lucas M, Stuart L, Savill J und Lacy-Hulbert A (2003). Apoptotic Cells and Innate Immune Stimuli Combine to Regulate Macrophage Cytokine Secretion. *The Journal of Immunology* *171*, 2610-2615.
- Maestrelli P, Saetta M, DiStefano A, Calcagni P, Turato G, Ruggieri M, Roggeri A, Mapp C und Fabbri L (1995). Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med* *152(6 Pt 1):1926-31*.
- Marshall J und Watson R (1997). Programmed cell death (apoptosis) and the resolution of systematic inflammation. *Can J Surg* *40*, 169-174.
- Mattsson E, Persson T, Andersson P, Roloff J und Egesten A (2003). Peptidoglycan Induces Mobilization of the Surface Marker for Activation Marker CD66b in Human Neutrophils but Not in Eosinophils. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* *10*, 485-488.
- McCrea K, Ensor J, Nall K, Bleecker E und Hasday J (1994). Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* *150*, 696-703.
- Meagher L, Cousin J, Seckl J und Haslett C (1996). Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *The Journal of Immunology* *156*, 4422-4428.
- Mevorach D, Mascarenhas J, Gershov D und Elkon K (1998). Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med* *188(12):2313-20*.
- Murphy T und Sethi S (1992). Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* *146(4):1067-83*.
- Musher D, Groover J, Reichler M, Riedo F, Schwartz B, Watson D, Baughn R, Breiman R (1997). Emergence of antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* during outbreaks of pneumonia: association with nasopharyngeal colonization. *24(3):441-6*.

- Musher D, Montoya R und Wanahita A (2004). Diagnostic value of microscopic examination of Gram-stained sputum and sputum cultures in patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clinical Infectious Dis.*
- Nelson S, Bagby G, Andresen J, Nakamura C, Shellito J und Summer W (1991). The effects of ethanol, tumor necrosis factor, and granulocyte colony-stimulating factor on lung antibacterial defenses. *Adv Exp Med Biol* 288:245-53.
- Nightingale J, Rogers D und Barnes P (1998). Effect of repeated sputum induction on cell counts in normal volunteers. *Thorax* 53(2):87-90.
- Noguera A, Batle S, Miralles C, Iglesias J, Busquets X, MacNee W und Agusti A (2001). Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 56, 432-437.
- Noguera A, Sala E, Pons A, Iglesias J, MacNee W und Agusti A (2004). Expression of Adhesion Molecules During Apoptosis of Circulating Neutrophils in COPD. *Chest* 125, 1837-1842.
- Omann G, Allen R, Bokoch G, Painter R, Traynor A und Sklar L (1987). Signal transduction and cytoskeletal activation in the neutrophil. *Physiol Rev* 67, 285-322.
- Oppenheim J, Zachariae C, Mukaida N und Matsushima K (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev of Immunol* 9, 617-648.
- Perry F, Elson C, Mitchell T, Andrew P und Catterall J (1994). Characterisation of an oxidative response inhibitor produced by *Streptococcus pneumoniae*. 49(7):676-83.
- Peters D, Griffin J, Stanley J, Beck M und Zemleni J (2002). Exposure to UV- light causes increased biotinylation of Histones in Jurkat cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283(3): C878-84
- Pignatti P, Moscato G, Casarini S, Delmastro M, Poppa M, Brunetti G, Pisati P und Balbi B (2005). Downmodulation of CXCL8/IL-8 receptors on neutrophils after recruitment in the airways. *J Allergy Clin Immunol* 115(1):88-94.

- Pinto-Plata V, Mullerova H, Toso J, Feudjo-Tepie M, Soriano J, Vessey R und Celli B (2006). C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers. *Thorax* 61, 23-28.
- Pizzichini M, Popov T, Efthimiadis A und Hussack P (1996). Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 154(4 Pt 1):866-9.
- Rayner C, Jackson A, Rutman A, Dewar A, Mitchell T, Andrew P, Cole P und Wilson R (1995). Interaction of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect. Immun.* 63, 442-447.
- Romagnani S (1994). Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 12:227-57.
- Ronchi M, Galli G, Zonefrati R, Tanini A, Scano G und Duranti R (2002). Sputum processing: a new method to improve cytospin quality. *Clin Exp Allergy* 32(5):674-80.
- Rose J, Foley J, Murphy P und Venkatesan S (2004). On the Mechanism and Significance of Ligand-induced Internalization of Human Neutrophil Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2. *J. Biol. Chem.* 279, 24372-24386.
- Rotstein D, Parodo J, Taneja R und Marshall J (2000). Phagocytosis of *Candida albicans* induces apoptosis of human neutrophils. *Shock* 14(3):278-83.
- Rutgers S, Timens W, Kauffmann H, van der Mark T, Koeter G und Postma D (2000). Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in COPD. *European Respiratory Journal* 15, 109-115.
- Rytälä P, Rehn T, Ilumets H, Rouhos A, Sovijärvi A, Myllärniemi M und Kinnula V (2006). Increased oxidative stress in asymptomatic current chronic smokers and GOLD stage 0 COPD. *Respir Res* 28;7:69.
- Rytälä P, Lindqvist A und Laitinen L (2000). Safety of sputum induction in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* 15, 1116-1119.
- Sabroe I, Jones E, Whyte M und Dower S (2005). Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. *Immunology* 115(1):90-8.

- Sadowska A, Manuel B und De Backer W (2005). Inhibition of in vitro neutrophil migration through a bilayer of endothelial and epithelial cells using beta2-agonists: concomitant effects on IL-8 and elastase secretion and impact of glucocorticosteroids. *Pulm Pharmacol Ther* 18(5):354-62.
- Saetta M, DiStefano A, Turat G, Facchini F, Corbino L, Mapp C, Maestrelli P, Ciaccia P und Fabbri L (1998). CD8+ T-Lymphocytes in Peripheral Airways of Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 822-826.
- Savill J, Hogg N, Ren Y und Haslett C (1992). Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest.* 90(4):1513-22.
- Schols A, Buurman W, Staal-van den Brekel A, Dentener M und Wouters E (1996). Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 51, 819-824.
- Schols A, Slangen J, Volovics L und Wouters E (1998). Weight Loss Is a Reversible Factor in the Prognosis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 1791-1797.
- Sethi S, Sethi R, Eschberger K, Lobbins P, Cai X, Grant B und Murphy T (2007). Airway Bacterial Concentrations and Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 200703-2417OC.
- Sexton D, Al-Rabia M, Blaylock M und Walsh G (2004). Phagocytosis of apoptotic eosinophils but not neutrophils by bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 34(10):1514-24.
- Soler J, Martinez-Garcia M, Roman P, Salcedo E, Navarro M und Ochando R (2005). Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* thx.
- Stocks S, Ruchaud-Sparagano M, Kerr M, Grunert F, Haslett C und Dransfield I (1996). CD66: role in the regulation of neutrophil effector function. *European Journal of Immunology* 20, 2924-2932.

Strassburg A, Droemann D, van Zandbergen G Kothe H und Dalhoff K (2004). Enhanced PMN response in chronic bronchitis and community-acquired pneumonia. *European Respiratory Journal* 24, 772-778.

Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, Yamamoto K, Fujimoto K, Satoh K und Okamura K (1999). Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J* 14, 309-314.

Van Vliet M, Spruit M, Verleden G, Kasran A, Van Herck E, Pitta F, Bouillon R und Decramer M (2005). Hypogonadism, Quadriceps Weakness, and Exercise Intolerance in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 1105-1111.

van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W und Laskay T (2002). Leishmania promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce the interleukin-8 release but inhibit the interferon-inducible protein 10 production of neutrophil granulocytes. *Infect Immun* 70, 4177-4184.

van Zandbergen G, Gieffers J, Kothe H, Rupp J, Bollinger A, Aga E, Klinger M, Brade H, Dalhoff K, Maass M, Solbach W und Laskay T (2004). Chlamydia pneumoniae Multiply in Neutrophil Granulocytes and Delay Their Spontaneous Apoptosis. *The Journal of Immunology* 172, 1768-1776.

Vandivier R, Fadok V, Hoffmann P, Bratton D, Penvari C, Brown K, Brain J, Accurso F und Henson, P.M. (2002). Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *J. Clin. Invest.* 109, 661-670.

Watson R, Rotstein O, Nathens A, Parodo J und Marshall J (1997). Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement. *Journal of Immunology* 158, 945-953.

Watson R (1999). Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent. *FEBS Lett* 453(1-2):67-71.

Watt A, Brown V, Courtney J, Kelly M, Garske L, Elborn J und Ennis M (2004). Neutrophil apoptosis, proinflammatory mediators and cell counts in bronchiectasis. *Thorax* 59, 231-236.

- Whyte M, Meagher L, MacDermot J, und Haslett C (1993). Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol* 150, 5124-5134.
- Wilkinson T, Patel I, Wilks M, Donaldson G und Wedzicha J (2003). Airway Bacterial Load and FEV1 Decline in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 1090-1095.
- Winkelstein J, Abramovitz A und Tomasz A (1980). Activation of C3 via the alternative complement pathway results in fixation of C3b to the pneumococcal cell wall. *The Journal of Immunology* 124, 2502-2506.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Deschamp-Latscha B, Lesavre P und Halbwachs-Mecarelli L (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80(5):617-53.
- Wright S und Griffin F Jr. (1985). Activation of phagocytic cells' C3 receptors for phagocytosis. *J Leukoc Biol.* 38(2):327-39.
- Yamamoto K und Johnston R (1984). Dissociation of phagocytosis from stimulation of the oxidative metabolic burst in macrophages. *J Exp Med* 159(2):405-16.
- Yang S, Chida A, Bauter M, Shafiq N, Seweryniak K, Maggirwar S, Kilty I und Rahman I (2006). Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF- κ B and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291, L46-L57.
- Zeilhofer H und Schorr W (2000). Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. *Curr Opin Hematol* 7, 178-182.
- Zocchi L, Garzaniti N, Newman S und Macklem P (1987). Effect of hyperinflation and equalization of abdominal pressure on diaphragmatic action. *J Appl Physiol* 62, 1655-1664.

9. Anhang

9.1. Danksagung

Mein Dank gilt denjenigen, die mir bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit geholfen haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Klaus Dalhoff für die Ideengebung, die Betreuung bei der praktischen Durchführung - hier sei insbesondere die Hilfe bei der Mikroskopie erwähnt - sowie für die kontinuierliche Unterstützung und die Ermöglichung dieser Arbeit.

Insbesondere möchte ich Herrn Dr. med. Alan Strassburg für die Veröffentlichung der Ergebnisse danken, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Barbara Gogoll und Frau Heike Richarz für die Hilfe und Durchführung bei der Durchflusszytometrie sowie Frau Ute Wegener für ihre fachkundige Hilfe im Labor.

Mein Dank gilt denen, deren offene Kritik und Ratschläge eine große Hilfe gewesen sind und deren seelische Unterstützung zur Motivation beigetragen hat. Ich danke Sarah Quiring für ihre Geduld bei der Hilfe der Korrektur dieser Arbeit und meinen Eltern für ihre große Unterstützung während des Studiums und darüber hinaus.

9.2. Lebenslauf

Persönliches

Arne Lüers

geboren am 19.12.1979 in Hamburg

Hochschulbildung

10/2000 – 9/2002

vorklinisches Studium an der Philipps-Universität Marburg

10/2002 – 3/2006

klinisches Studium an der Universität zu Lübeck

4/2006 – 3/2007

Praktisches Jahr

in der viszeralchirurgischen Abteilung der Sana Kliniken Lübeck

in der Neurologie des Universitätsklinikums Lübeck

in der Abteilung für Innere Medizin des Klinikums Neustadt und im Forschungszentrum Borstel

12/2004 – 5/2007

Doktorarbeit in der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums zu Lübeck

4/2007

Abschluss des Medizinstudiums

Auslandserfahrung

7/2004 – 9/2004

Famulatur in der Inneren Medizin im Universitätsklinikum Monterrey (Mexiko)

6/2006 – 8/2006

Praktisches Jahr in der traumatologischen Abteilung im Universitätsklinikum Edinburgh (Schottland)

Berufsausbildung, praktische Tätigkeiten

7/2008

Beschäftigungsbeginn als Arzt im Klinikum Bremen-Mitte, Medizinische Klinik III

Schulbildung

1986 – 1990

Besuch der Grundschule Nettelnburg

1990 – 1999

Besuch der Gesamtschule Bergedorf

9.3. Publikationsverzeichnis

Wissenschaftliche Präsentationen:

Strassburg A, Niederfahrenhorst A, Lüers A, Dalhoff K. Eigenschaften neutrophiler Granulozyten aus induziertem Sputum im Vergleich zur bronchoalveolären Lavage bei COPD Patienten mit akuter bronchopulmonaler Infektion. *46th Congress of the German Society of Pulmonary Medicine (DGP), Berlin, 2005.*

Strassburg A, Lüers A, Dalhoff K. Reduzierte Apoptoserate pulmonaler neutrophiler Granulozyten von COPD Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie. *49th Congress of the German Society of Pulmonary Medicine (DGP), Luebeck, 2008.*

Wissenschaftliche Vorträge:

Strassburg A, Niederfahrenhorst A, Lüers A, Dalhoff K. Bacterial exacerbation of COPD: assessment of neutrophil activation in induced sputum. *14th European Respiratory Society (ERS) Annual Congress, Glasgow, 2004.*

Strassburg A, Lüers A, Dalhoff K. Airway inflammation: assessment of neutrophil apoptosis in induced sputum. *15th European Respiratory Society (ERS) Annual Congress, Copenhagen, 2005.*

Strassburg A, Lüers A, Dalhoff K. Regulation of PMN apoptosis in the airways during community acquired pneumonia in COPD patients and controls. *16th European Respiratory Society (ERS) Annual Congress, Munich, 2006.*