

Untersuchungen zur Rolle des Zytokins RANTES bei interstitiellen Lungenerkrankungen

Claudia Gertrud Schultes



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Untersuchungen zur Rolle des Zytokins RANTES
bei interstitiellen Lungenerkrankungen**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Claudia Gertrud Schultes

aus Düsseldorf

Gießen 2012

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der
Medizinische Klinik II und Poliklinik
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

Gutachter: Prof. Dr. J. Lohmeyer

Gutachter: Prof. Dr. H. Sauer

Tag der Disputation: 11.12.2012

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	METHODEN UND MATERIALIEN	5
2.1	DEFINITION DER PATIENTENKOLLEKTIVE.....	5
2.1.1	Normalpersonen	5
2.1.2	Pneumonie	6
2.1.3	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung	7
2.1.4	Sarkoidose	7
2.1.5	Idiopathische Lungenfibrose	8
2.1.6	Interstitielle Lungenerkrankung bei Kollagenose / Vaskulitis.....	9
2.1.7	Exogen allergische Alveolitis.....	10
2.2	GEWINNUNG DES ZELLMATERIALS.....	13
2.2.1	Bronchoskopie, bronchoalveoläre Lavage, Lungenbiopsie	13
2.3	AUFBEREITUNG DER BAL-ZELLEN	14
2.3.1	Zytozentrifugenpräparate	15
2.4	IMMUNFLUORESCENZMARKIERUNG.....	19
2.5	FLOWZYTOMETRISCHE ANALYSE.....	19
2.6	QUANTIFIZIERUNG DER RANTES-KONZENTRATION IN DER BALF.....	21
2.6.1	ELISA.....	21
2.7	LUNGENFUNKTIONSDIAGNOSTIK.....	23
2.8	MESSUNG DER GASAUSTAUSCHFUNKTION	23
2.9	STATISTISCHE ANALYSE	24
2.10	MATERIALIEN UND VERWENDETE LÖSUNGEN	25
2.10.1	Material und Bezugsquellen.....	25
2.10.2	Verwendete Lösungen.....	27
2.10.3	Herstellernachweis verwendeter Geräte.....	29
3	ERGEBNISSE	30
3.1	LUNGENFUNKTIONSANALYTIK UND BAL-ZYTOLOGIE DER UNTERSUCHTEN NORMALPERSONEN UND PATIENTENKOLLEKTIVE	30
3.1.1	Lungenfunktions- und BGA- Daten.....	30

3.1.2	BAL-Differentialzellbild.....	31
3.1.3	Expression von Oberflächenantigenen auf BALF Lymphozyten	35
3.1.3.1	Proportionen von CD4- und CD8-Lymphozyten in der BALF.....	35
3.1.3.2	Expression von CD103 auf T-Lymphozyten in BALF	37
3.2	RANTES PROTEINKONZENTRATION IN BALF.....	40
3.2.1	Korrelation zwischen der RANTES Proteinkonzentration in der BALF und der BAL-Zytologie.....	42
3.3	KORRELATION ZWISCHEN RANTES PROTEINKONZENTRATIONEN IN DER BALF UND LUNGENFUNKTIONSPARAMETERN	45
4	DISKUSSION	46
5	ZUSAMMENFASSUNG	51
6	SUMMARY.....	53
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	54
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	56
9	TABELLENVERZEICHNIS	57
10	LITERATURVERZEICHNIS	58
11	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	71
12	DANKSAGUNG	72

1 Einleitung

Die Pathologie interstitieller Lungenerkrankungen (ILE) ist durch eine alveoläre und interstitielle Entzündung, das progressive Rearrangement der Alveolararchitektur und die Deposition extrazellulärer Matrixkomponenten charakterisiert. Die Erkrankung wird meist ausgelöst durch einen alveolären Insult, gefolgt von einem Influx inflammatorischer Zellen in die Lunge. Diese Rekrutierungsphase führt zu einer vielfachen Erhöhung aller Leukozytenpopulationen, insbesondere von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten im Lungenparenchym. Diese alveoläre und interstitielle Entzündung ist für die Entwicklung des Lungenschadens und letztlich der Lungenfibrose essentiell (24, 48, 55).

Die idiopathische Lungenfibrose ist eine interstitielle Lungenerkrankung unbekannter Ätiologie. Beteiligt am pathophysiologischen Geschehen sind die Alveolarmakrophagen, die chemotaktische Faktoren für neutrophile Granulozyten (36, 45), unter anderem IL8 (12, 84) und LTB4 (84) freisetzen. Eosinophile Granulozyten, welche neben den Polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) vermehrt in der bronchoalveolären Lavage vorkommen, tragen vermutlich durch ihre Proteasenfreesetzung und Oxidantienproduktion ebenfalls zur Schädigung der Alveolarepithelien und der interstitiellen Matrix bei (24, 39, 69, 26). Eine Begleitlymphozytose kann beobachtet werden (39).

Interstitielle Lungenerkrankungen bei Kollagenose/Vaskulitis gehören zu einer heterogenen Gruppe von chronisch entzündlichen Immunerkrankungen. Bei der Lungenbeteiligung handelt es sich meist um Veränderungen im Sinne einer interstitiellen Lungenerkrankung, z.T. mit Fibrose. Die alveoläre Infiltration ist durch neutrophile Granulozyten und häufiger als bei der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) durch Lymphozytenakkumulation charakterisiert (124, 56, 123).

Die Sarkoidose ist eine granulomatöse Systemerkrankung unbekannter Ätiologie, die sich in der Regel in der Lunge manifestiert. Die lokale Akkumulation von T-Helfer-Lymphozyten führt über die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine zur Makrophagenrekrutierung und – aktivierung mit konsekutiver Granulombildung (55, 21, 23). Die Alveolarmakrophagen sind vermutlich an der T-Helfer-Zellaktivierung beteiligt. Sie zeigen verstärkte Antigenpräsentation und IL-1 Sekretion. Es kommt zu einer IL-2 getriggerten T-Zellproliferation und einer über γ -Interferon und IL-1

regulierten Fusion der Alveolarmakrophagen zu Riesenzellen (50, 103). Die lymphozytäre Alveolitis zeigt eine typische Verschiebung des T-Helfer/T-Suppressor-Quotienten zugunsten der CD4⁺ Zellen (91, 1).

Die exogen-allergische Alveolitis ist eine interstitielle Lungenerkrankung, die durch wiederholte Inhalation organischer Antigene bei entsprechend sensibilisierten Personen hervorgerufen wird. In der Immunpathogenese finden sich sowohl Hinweise auf eine humorale, durch Antikörper vermittelte Typ-III-Reaktion als auch auf eine zellvermittelte Typ-IV-Reaktion (mit Granulombildung einhergehend) (112, 109). Die lymphozytäre Alveolitis ist im akuten Stadium durch eine Dominanz der CD8⁺ T-Zellen charakterisiert (112, 109, 22).

Die beschriebenen Interaktionen inflammatorischer Zellen und ihre Mediatorliberation induzieren oder verstärken den parenchymalen Zellschaden und die Bindegewebsvermehrung, woraus in der Endstufe eine Lungenfibrose resultiert (48). Es wurden bereits eine Reihe leukozytenchemotaktischer Faktoren, unter anderem PDGF (3, 72), Fibronectin (100) und TGF- β (9, 51) in der Lunge von Patienten mit ILE identifiziert.

Im Laufe der Evolution wurden verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt, um die Lunge vor schwerwiegenden Schädigungen zu schützen und ihre funktionelle Integrität als Atmungsorgan zu gewährleisten (93, 94). Gelingt es nicht, ein Pathogen aus dem Alveolarraum zu entfernen, erfolgt durch Sekretion inflammatorischer Mediatoren (Lipidmediatoren, Komplementspaltprodukte und Zytokine) eine Aktivierung von ortsständigen Immunzellen oder eine Rekrutierung von Monozyten, Granulozyten oder Lymphozyten aus dem Blut in die Alveole.

Leukozyten-Lockstoffe aus der Familie der chemotaktischen und aktivierenden Zytokine gehören zu drei eng verwandten Polypeptidfamilien, den C-X-C, C-C und C Chemokinen (116, 5). Diese Chemokine gelten als wichtige Kandidaten für die inflammatorische Zellmigration aus dem Gefäßsystem in das alveoläre und interstitielle Kompartiment der Lunge bei ILE (48).

Unter den C-C Chemokinen nimmt RANTES eine wichtige Rolle als potenter chemotaktischer Faktor für mononukleäre Zellen ein (55, 89, 83). RANTES wurde ursprünglich als cDNA während eines Gen-Screenings identifiziert und wird von funktionell reifen zytotoxischen T-Lymphozyten sezerniert (106). Daher erhielt RANTES seinen Namen: *regulated upon activation normal T cell expressed and*

secreted. Das RANTES Gen ist auf dem Chromosom 17q11.2-q12 lokalisiert (30). Das RANTES Protein, bestehend aus 91 Aminosäuren, ist ein hochbasisches Polypeptid (pH 9,5) mit einem Molekulargewicht von 7847 Dalton (110). Eine Vielzahl von Zelltypen kann RANTES exprimieren. Dazu gehören T-Zellen, Monozyten, basophile und eosinophile Granulozyten, Mesangiumzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen und Megakaryozyten (122, 105, 107). Einige Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass RANTES als Chemotaktin für T-Lymphozyten fungiert. Es induziert eine signifikante Migration von $CD4^+$, $CD45RO^+$ Zellen (107) und $CD8^+$ Zellen (114, 60). Desweiteren ist RANTES in der Lage eosinophile und basophile Granulozyten sowie natürliche Killerzellen zu rekrutieren (89, 115, 107, 25, 68).

Weiterhin wirkt RANTES als haptotaktischer Stoff auf Monozyten (126), vermittelt die T-Zelladhäsion an rekombinantes ICAM-1 und VCAM-1 über β_1 und β_2 Integrine (60) und erhöht die Adhärenz von Monozyten auf aktivierten Endothelzellen (120). Zudem ist gezeigt worden, daß RANTES eine Degranulation von basophilen Granulozyten (57), einen respiratorischen Burst in eosinophilen Granulozyten (2) und eine Stimulation der T-Zellproliferation auslösen kann (4).

Chemokine vermitteln ihre biologischen Effekte über verschiedene Klassen von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (75). Dazu gehören die Chemokin-Rezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5, an die RANTES binden kann. Sie gehören zur Gruppe der „shared“ Rezeptoren. Desweiteren kann RANTES von DARC (Duffy Antigen receptor for chemokines) und durch das US28 Genprodukt, welches im Cytomegalievirus-Genom gefunden wurde, gebunden werden (80, 77). Zusätzlich zu den spezifischen hochaffinen Rezeptoren auf Leukozyten und Erythrozyten bindet RANTES auch an Proteoglykane auf Endothelien, wodurch es für zirkulierende Leukozyten zugänglich wird (128).

In vivo wird RANTES bei Erkrankungen ausgeschüttet, die durch mononukleäre Zellinfiltration charakterisiert sind. Beschrieben sind die renale Abstoßungsreaktion (87), verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (28), HIV-Nephropathie (53), Atherosklerose (88), rheumatoide Arthritis (97), Endometriose (52), bestimmte Lymphome und Nierentumoren (122), sowie inflammatorische Lungenerkrankungen (65). Die verschiedenen Aktivitäten deuten darauf hin, dass RANTES eine wichtige Rolle in akuten und chronischen Phasen der Entzündung spielen kann.

Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersucht die potenzielle Assoziation des Zytokins RANTES mit dem zellulären Entzündungsmuster in der bronchoalveolären Lavage und mit dem klinischen Verlauf bei interstitiellen Lungenerkrankungen. Hierzu wurden RANTES Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) bei Patienten mit ILE, COPD – und Pneumoniepatienten sowie Normalpersonen vergleichend analysiert.

Ausgehend von Befunden von Kodama et al (55), die zeigten, dass RANTES in der Bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) von Patienten mit Sarkoidose, ILE-K/V und IPF erhöht ist, sollte in der vorliegenden Arbeit, die auch Patienten mit exogen allergischer Alveolitis (EAA) einschliesst, geklärt werden, ob die erhöhten RANTES Spiegel in der BALF mit dem Einstrom von Lymphozytensubpopulationen in das alveoläre Kompartiment korrelieren.

Folgende Fragen wurden adressiert:

- 1.** Ist die Höhe der RANTES Spiegel in der BALF mit dem Lymphozytenanteil an den lavagierten Zellen assoziiert und korrelieren RANTES Spiegel in der BALF mit dem Anteil von CD4 oder CD8 Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenpopulation in der BALF? Dazu wurden Patienten mit ILE auf Unterschiede bezüglich der RANTES Konzentrationen und der Zellzusammensetzung in der bronchoalveolären Lavage untersucht.
- 2.** Korrelieren die RANTES Konzentrationen in der BALF mit der Expression von CD103 auf Lymphozyten der bronchoalveolären Lavage? Das Integrin CD103 ist vermehrt auf Lymphozyten in der BALF bei ILE exprimiert (63).
- 3.** Besteht ein Zusammenhang zwischen den RANTES Konzentrationen in der BALF und der Lungenfunktion bei ILE Patienten? Hierzu wurden RANTES Spiegel in der bronchoalveolären Lavage mit Lungenfunktionsdaten von ILE Patienten korreliert.

2 Methoden und Materialien

2.1 Definition der Patientenkollektive

Jeder der retrospektiv untersuchten Probanden/Patienten wurde einer der folgenden sieben Hauptkategorien zugeteilt:

- 1) Normalperson
- 2) Pneumonie
- 3) Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
- 4) Sarkoidose
- 5) Idiopathische Lungenfibrose
- 6) Interstitielle Lungenerkrankung bei Kollagenose /Vaskulitis
- 7) Exogen allergische Alveolitis

Die nachfolgenden Daten zum Alter, Raucherstatus, Applikation inhalativer Steroide und Lungenfunktionsdiagnostik beziehen sich jeweils auf den Zeitpunkt der Durchführung der bronchoalveolären Lavage (BAL). Es wurde bei allen Patienten im Rahmen der klinischen Abklärung ihrer Lungenerkrankung eine Lungenfunktionsdiagnostik und BAL mit Differentialzytologie durchgeführt, auf die in der Beschreibung der Patientenkollektive eingegangen wird.

2.1.1 Normalpersonen

Die Gruppe der Normal- bzw. Kontrollpersonen umfasste 34 gesunde Freiwillige, die keine klinischen oder radiologischen Zeichen einer Lungen- oder Herzerkrankung aufwiesen und deren Differentialzellbild der bronchoalveolären Lavage im Normbereich lag. Insgesamt bestand das Kollektiv aus 20 Personen männlichen und 14 weiblichen Geschlechts, mit einem medianen Alter von 40 (22-75) Jahren. Sechs Personen waren Raucher und 28 Nichtraucher.

2.1.2 Pneumonie

Die diagnostischen Kriterien der Zuordnung zur Gruppe der Pneumonie waren neben Fieber, Tachykardie, Dyspnoe und einem typischen auskultatorischem Befund ein charakteristisches Röntgenbild der Lunge. Der Nachweis pulmonaler Infiltrate war durch folgende Thorax-Röntgenbilder charakterisiert (33):

- a) Lobärpneumonie: großflächige Verschattung im Bereich von Lungenlappen mit positivem Bronchopneumogramm (sog. „air bronchogram“)
- b) Bronchopneumonie: segmentale Verschattung ohne „air bronchogram“
- c) Interstitielle Pneumonie: fleckig-netzartige (retikuläre) Verdichtungen

Desweiteren erfolgte der Nachweis einer infektiösen Genese durch mikroskopischen oder kulturellen Erregernachweis entweder aus dem Sputum, oder aus bronchoskopisch entnommenem Material. Bei 32 Patienten konnten die in Tabelle 1 aufgeführten Keime nachgewiesen werden, während bei den restlichen fünf Patienten kein Keim gefunden wurde.

Tabelle 1: Erregerspektrum der untersuchten Pneumonien

Patientenzahl	Erreger
5	<i>Staphylokokkus aureus</i>
3	<i>Haemophilus influenzae</i>
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1	<i>Escherichia coli</i>
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	<i>Serratia marcescens</i>
8	<i>Streptokokkus pneumoniae</i>

Insgesamt wurden 37 Patienten der Kategorie Pneumonie zugeordnet, von denen 15 weiblichen und 22 männlichen Geschlechts waren.

Das Alter betrug im Median 58 (26-75) Jahre. Insgesamt waren 15 Patienten Nichtraucher und neun Patienten Raucher. Bei zehn Patienten konnte der Raucherstatus aufgrund des fulminanten Krankheitsverlaufes mit intensivmedizinischer Behandlung und Beatmungstherapie nicht exakt ermittelt werden. Ein Patient wurde mit inhalativen Steroiden behandelt.

2.1.3 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung

Die Patientengruppe mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) umfasste 51 Patienten, 18 weiblichen und 33 männlichen Geschlechts. Das Alter lag im Median bei 57 (35-74) Jahren. 38 Patienten waren der Gruppe Nichtraucher und 13 Patienten der Rauchergruppe zuzuordnen. Insgesamt sind sechs Patienten mit inhalativen Steroiden behandelt worden.

Die Diagnose der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung wurde nach der WHO-Definition gestellt, wenn bei einem Patienten in zwei aufeinanderfolgenden Jahren während mindestens drei Monaten pro Jahr Husten und Auswurf bestanden und eine messbare Obstruktion der Atemwege vorlag.

Die Lungenfunktionsdiagnostik wurde zum Nachweis einer obstruktiven Ventilationsstörung durchgeführt und umfasste die Messung der Vitalkapazität und einer nicht reversiblen Minderung der FEV₁. Die arterielle Blutgasanalyse mit Bestimmung des pO₂ und pCO₂ wurde zur Erkennung einer Partial- oder Globalinsuffizienz durchgeführt. Die Bronchoskopie erfolgte mit Bakteriologie, Histologie und Zytologie. Die Histologie zeigte bei der chronisch katarrhalischen Bronchitis ein ödematös aufgelockertes Schleimhautstroma mit unterschiedlich ausgeprägter hyperplastisch verdickter Bronchialmuskulatur. Bei der chronisch-atrophischen Bronchitis waren die Bronchialdrüsen und -knorpel im Rahmen der chronischen Entzündung durch narbiges Bindegewebe ersetzt.

2.1.4 Sarkoidose

Die Sarkoidose ist eine granulomatöse Systemerkrankung mit noch unbekannter Ätiologie, die sich in über 90% der Fälle an der Lunge manifestiert, aber auch andere Organe befallen kann.

Die verschiedenen Stadien der Lungensarkoidose wurden nach dem Thorax-Röntgenbefund eingeteilt. Stadium I zeigte eine bilaterale Lymphadenopathie, die im Stadium II von einer retikulonodulären Zeichnungsvermehrung begleitet war. Das Stadium III zeigte einen Lungenbefall (retikulonoduläre Zeichnungsvermehrung) ohne hiläre Lymphadenopathie. Das Stadium IV war durch eine Lungenfibrose mit irreversibler Lungenfunktionsminderung charakterisiert.

Weiterhin wurde die BAL-Zytologie zur Diagnosestellung herangezogen. Typisch ist eine lymphozytäre Alveolitis mit Verschiebung des T-Helfer-/T-Suppressor-Quotienten

zugunsten der T-Helferzellen. Der CD4/CD8 Quotient war erhöht (91, 1). Die Diagnosesicherung erfolgte durch den histologischen Nachweis nichtverkäsender Epitheloidzellgranulome durch transbronchiale Biopsie. Zusätzlich wurde das Angiotensin converting enzyme (ACE) und der lösliche IL2-Rezeptor (S-IL-2R) bestimmt, die bei erhöhten Konzentrationen Rückschlüsse auf den Aktivitätsgrad der Erkrankung erlauben. Hinzu kamen klinische und lungenfunktionsdiagnostische Untersuchungen.

Untersucht wurden 48 Patienten, 20 weibliche und 28 männliche. Zehn Patienten des Kollektivs waren Raucher und 38 Nichtraucher. Ihr Alter lag im Median bei 36 (21-72) Jahren. Elf Patienten wurden zum Zeitpunkt der BAL mit inhalativen Steroiden behandelt.

2.1.5 Idiopathische Lungenfibrose

Die Gruppe der Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose, kurz IPF, ist definitionsgemäß durch eine interstitielle Lungenerkrankung unbekannter Ätiologie charakterisiert, die zum bindegewebigen Umbau des Lungengewebes (Fibrose) führt und in der Regel chronisch progredient verläuft.

Die Zuordnungskriterien waren Dyspnoe, trockener Reizhusten, typischer auskultatorischer Befund, oberflächliche rasche Atmung mit „Door-stop-phänomen“, restriktive Ventilationsstörung und erniedrigte CO-Diffusionskapazität in der Lungenfunktionsdiagnostik. Die radiologischen Befunde zeigten verschiedene Schweregrade der Lungenfibrose mit entsprechender Beeinträchtigung der Lungenfunktion. Im HRCT fanden sich in der Regel beidseits symmetrische, basal und subpleural betonte, retikuläre Zeichnungsvermehrungen mit variablen, in der Regel aber diskreten, milchglasartigen Trübungen. Das Differentialzellbild der BAL ergab eine Vermehrung der Zahl der Neutrophilen, die mit einer Vermehrung der Lymphozyten- oder Eosinophilenzahl einhergehen konnte (124, 56, 123). Histologisch lag in der Regel das Bild einer „usual interstitial pneumonia“ (UIP) vor. Die Diagnose wurde nur dann gestellt, wenn alle sekundären Ursachen und Krankheitsbilder, die mit einer interstitiellen Lungenerkrankung assoziiert sind, ausgeschlossen waren.

Insgesamt wurden 46 Patienten, 19 weibliche und 27 männliche, dieser Kategorie zugeordnet. Ihr Alter betrug im Median 56 (19-83) Jahre. Zehn Patienten waren

Raucher und 36 Nichtraucher. Elf Patienten wurden mit inhalativen Steroiden behandelt.

2.1.6 Interstitielle Lungenerkrankung bei Kollagenose / Vaskulitis

Unter den systemischen Bindegewebserkrankungen wird eine heterogene Gruppe von chronisch entzündlichen Immunerkrankungen mit variablem Befall der Gelenke, des Bindegewebes und der Blutgefäße verschiedener Organsysteme zusammengefasst. Bei einer Lungenbeteiligung handelt es sich meist um Veränderungen im Sinne einer interstitiellen Lungenerkrankung, z. T. mit Fibrose.

Das Patientenkollektiv setzte sich zusammen aus fünf Patienten mit Sharp-Syndrom (syn.: „mixed connective tissue disease“, MCTD) und neun Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (SLE). Die Gruppe umfaßte elf weibliche und drei männliche Patienten mit einem Altersmedian von 52 (29-77) Jahren. Insgesamt war ein Patient Raucher, 13 waren Nichtraucher. Vier Patienten wurden mit inhalativen Steroiden behandelt.

Das Sharp-Syndrom ist gekennzeichnet durch eine Überlappungssymptomatik aus SLE, Sklerodermie, Polymyositis und rheumatoider Arthritis. Eine Raynaud-Symptomatik war obligat, die in Verbindung mit sklerodermieartigen Hautveränderungen, geschwollenen Händen oder Sklerodaktylie gefunden wurde. Die Diagnostik erfolgte weiter durch den Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA), die gegen das Ribonukleinprotein U1 (anti-U1RNP) gerichtet sind. Im Differentialzellbild der BAL wurde eine Vermehrung der Lymphozyten, der neutrophilen Granulozyten (124, 56, 123) und ein verminderter CD4/CD8 Quotient gefunden (8, 34).

Der systemische Lupus erythematodes ist eine Systemerkrankung der Haut und des Gefäßbindegewebes zahlreicher Organe mit Vaskulitis/Perivaskulitis der kleinen Arterien und Arteriolen, verbunden mit Ablagerungen von Immunkomplexen, die aus DNS, anti-DNS Antikörpern, Komplement und Fibrin bestehen. Die Diagnostik des SLE erfolgte nach Vorgaben des „American College of Rheumatology“ (ACR). Bei gleichzeitigem oder seriellem Nachweis von mindestens vier der nachfolgend aufgelisteten Kriterien galt die Diagnose des SLE als gesichert.

SLE-Kriterien des ACR: (40)

1. Schmetterlingserythem

2. Diskoider Lupus erythematoses
3. Photosensibilität
4. Orale oder nasale Schleimhautulzera
5. Nichterosive Arthritis von 2 oder mehr Gelenken
6. Serositis (Pleuritis, Perikarditis)
7. Nierenbeteiligung (Proteinurie > 0,5g/d oder Zylindrurie)
8. ZNS-Beteiligung
9. Hämatologische Befunde: Coombs-positive hämolytische Anämie, Thrombopenie, Leukopenie
10. Immunologische Befunde: Anti-ds DNS, Anti-Sm, positives LE-Zellphänomen, Phospholipidantikörper
11. Antinukleäre Antikörper (ANA)

Das Differentialzellbild der BAL zeigte einen erhöhten Anteil neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten (56, 123) und einen verminderten T4/T8 Quotient (34). Die Diagnostik der begleitenden Lungenfibrose erfolgte bei der Gruppe der systemischen Bindegeweserkrankungen nach den gleichen Kriterien wie bereits bei der Patientengruppe mit IPF beschrieben.

2.1.7 Exogen allergische Alveolitis

Die exogen allergische Alveolitis, kurz EAA, ist eine interstitielle Lungenerkrankung, die durch wiederholte Inhalation organischer Antigene bei entsprechend sensibilisierten Personen hervorgerufen wird. In der Immunpathogenese gibt es Hinweise auf eine humorale, durch Antikörper vermittelte Typ-III- als auch auf eine zellvermittelte Typ-IV-Reaktion (112, 109).

Die wichtigsten Formen der EAA sind in der Tabelle 2 aufgeführt. Die dominierenden Antigene innerhalb der EAA-Gruppe umfassten bei den sogenannten Farmer -und Befeuchterlungen vor allem thermophile Aktinomyzeten und Aspergillusarten, bei Vogelhalterlungen Proteine aus Vogelkot, -serum, oder -federn und bei Bäckerlungen schimmeliges Korn und Mehl.

Die Diagnose der EAA erfolgte unter anderem durch eine ausführliche Berufsanamnese und den Nachweis eines inhalativen Antigens, das durch ständige oder sich periodisch wiederholende Exposition krankheitsauslösend war. Zusätzlich wurde ein breites

Spektrum an präzipitierenden Antikörpern untersucht. Weitere Kriterien waren charakteristische klinische Symptome wie Dyspnoe, Husten und Fieber im akuten Stadium, das Röntgenbild oder die hochauflösende Computertomographie mit fleckig-retikulo-nodulären Infiltraten in beiden Lungenhälften und eine restriktive Ventilationsstörung mit Verminderung der Vital- und Diffusionskapazität. Das Differentialzellbild der BAL zeigte bei stark erhöhter Gesamtzellzahl eine erhöhte Lymphozytenzahl und einen erniedrigten CD4/CD8 Quotienten (112, 109, 22). In der Histologie der Lungenbiopsie zeigten sich bei chronischen Verlaufsformen interstitielle lymphozytäre Infiltrate und nicht-verkäsende Epitheloidzellgranulome mit Riesenzellen. Das Patientenkollektiv bestand aus 30 Personen, 19 weiblichen und elf männlichen Geschlechts, mit einem Alter im Median von 54 (23-73) Jahren. In dieser Gruppe waren fünf Patienten Raucher und 25 Nichtraucher. Insgesamt wurden acht Patienten mit inhalativen Steroiden behandelt.

Tabelle 2: Verschiedene Formen der EAA nach Sennekamp (20)

Krankheitsbezeichnung	Antigene	Exposition
Farmerlunge	thermophile Aktinomyzeten, Aspergillusarten und andere Pilze	Landwirtschaft, Gärtner
Taubenzüchterlunge	Proteine aus Vogelkot, -serum, -federn	Vogelzucht, -haltung (Vogelhändler, Tierarzt, Zoowärter, Federnleser)
Wellensittichhalterlunge		
Kanarienvogelhalterlunge (und andere Vogelhalterlungen)		
Befeuchterlunge	thermophile Aktinomyzeten, Aspergillusarten, andere Pilze und Bakterien	Klimaanlagen, Kühlsysteme, Luftbefeuchter (Druckereiarbeiter)
Malzarbeiterlunge	Aspergillus fumigatus und clavatus	Brauwesen (schimmelige Gerste und Malz)
Käsewäscherlunge	Penicillium casei und frequentas	Milchverarbeitung (schimmeligere Käse)
Waschmittellunge	Bacillus subtilis	Waschmittelherstellung
Kürschnerlunge	tierische Pelzhaare, verschiedene Pilze	Pelzverarbeitung
Holzarbeiterlunge	Holzstaub, Alternariaarten	Holzverarbeitung
Rattentalveolitis	Ratten- und Mäuseurin	Tierpfleger, Laborant
Müller-, Bäckerlunge	schimmeliges Mehl, Korn	Müller, Bäcker
Isocyanatalveolitis	Isocyanatverbindungen	Chemiearbeiter, Spritzlackierer

2.2 Gewinnung des Zellmaterials

2.2.1 Bronchoskopie, bronchoalveoläre Lavage, Lungenbiopsie

Die bronchoalveolären Lavageproben stammten von freiwilligen Probanden und den zuvor beschriebenen Patientenkollektiven, die in der Medizinischen Klinik II der JLU Gießen und in der Pneumonologischen Klinik „Waldhof Elgershausen“, Greifenstein behandelt wurden. Bei diesen Patienten wurde im Rahmen der klinischen Diagnostik eine Bronchoskopie durchgeführt, im Verlauf derer eine bronchoalveoläre Lavage ausgeführt und gegebenenfalls eine Biopsie entnommen wurde (101, 44). Für die an freiwilligen Probanden durchgeführten Untersuchungen und die an Patientenmaterial vorgenommenen Analysen liegt ein positives Votum der Ethikkommission des Klinikums der Justus-Liebig Universität Gießen vor (Aktenzeichen: Ha/L).

Für die bronchoskopische Untersuchung wurde ein peripher-venöser Zugang (Braunüle[®]) gelegt, worüber 500 ml 0,9% NaCl-Lösung und 0,5-1 mg Atropin zu Beginn der Bronchoskopie infundiert wurden. Die Lokalanästhesie der Schleimhaut von Nasopharynx und Bronchialbaum wurde durch Inhalation von 4 ml Novesine[®] über einen Vernebler (Pariboy[®]) und durch zusätzliches Aufsprühen des Anästhetikums auf die Rachenschleimhaut vorgenommen.

Das flexible Bronchoskop wurde bei allen Patienten über einen Trachealtubus, bei Normalpersonen über die Nasenöffnung, in ein Subsegment des Mittellappens oder, falls dort aus anatomischen Gründen nicht möglich, in die Lingula eingeführt (90). Bei Pneumonie-Patienten erfolgte die Bronchoskopie in den im Röntgenbild infiltrativ veränderten Segmenten. Dort wurde das Bronchoskop in Wedge-Position gebracht, um einen optimalen Flüssigkeitsrückgewinn zu erzielen (90). Der Instrumentierkanal des Bronchoskops wurde genutzt, um 8 x 20 ml sterile und 37°C warme physiologische Kochsalzlösung nacheinander zu instillieren. Das Gesamtinstillationsvolumen betrug damit circa 150 ml. Nach Instillation jeder Einzelfraktion wurde sofort sanft aspiriert. Das zurückgewonnene Flüssigkeitsvolumen (Recovery) betrug bei Normalpersonen 76,7% und bei Patienten mit Lungenerkrankung 50,2 - 68,8%.

Zur histologischen Diagnostik des Lungengewebes wurde eine transbronchiale Zangenbiopsie unter Röntgenkontrolle durchgeführt.

2.3 Aufbereitung der BAL-Zellen

Die gewonnene Lavageflüssigkeit wurde nach gründlichem Mischen durch sterile Gaze gefiltert, um grobe Schleimflocken zu entfernen. Die Zellzusammensetzung wird durch diese Mullfiltration nicht beeinträchtigt (90).

Es wurden 50 ml Kunststoffröhrchen aus Polypropylen verwendet, um unkontrollierte Zellverluste durch Zelladhärenz zu vermeiden. In diesen wurde die bronchoalveoläre Flüssigkeit (BALF) zehn Minuten bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Pellet resuspendiert und mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier „Hanks' Balanced Salt Solution“ gewaschen. Bei einem Erythrozytenanteil im Pellet von $> 50\%$ wurde eine Ammoniumchlorid-Lyse der Erythrozyten durchgeführt.

Die Überprüfung der Vitalität der Zellen erfolgte mit dem Trypanblautest. Dazu wurden 10 μl der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen 0,5-prozentiger Trypanblau-Lösung zwei Minuten inkubiert. Dabei zeigten tote Zellen eine blaue Anfärbung. Die Vitalität der gewonnenen Zellen lag zwischen 80-95%. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Für die Erstellung der Differentialzytologie wurden zuerst mit Hilfe einer Zytozentrifuge circa 10^5 Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert und luftgetrocknet. Danach erfolgte die Fixation der Zellen in unverdünnter May-Grünwald-Lösung für fünf Minuten mit anschließender Färbung in einer 1:10 verdünnten Giemsa-Lösung für einen Zeitraum von zehn Minuten (Pappenheim-Färbung). Nach wiederholtem Waschen in Aqua destillata und Trocknen der Präparate erfolgte die Zelldifferenzierung in einer Öl-Immersionslösung bei 500facher Vergrößerung.

Der zellfreie BALF Überstand wurde in 1,5 ml Eppendorf-Cups aliquotiert und bei -80°C für Analysen der nichtzellulären Komponenten tiefgefroren.

2.3.1 Zytozentrifugenpräparate

Im Folgenden sind repräsentative Zytozentrifugenpräparate der bronchoalveolären Lavage nach Pappenheim-Färbung bei Normalpersonen und den beschriebenen Patientenkollektiven dargestellt.

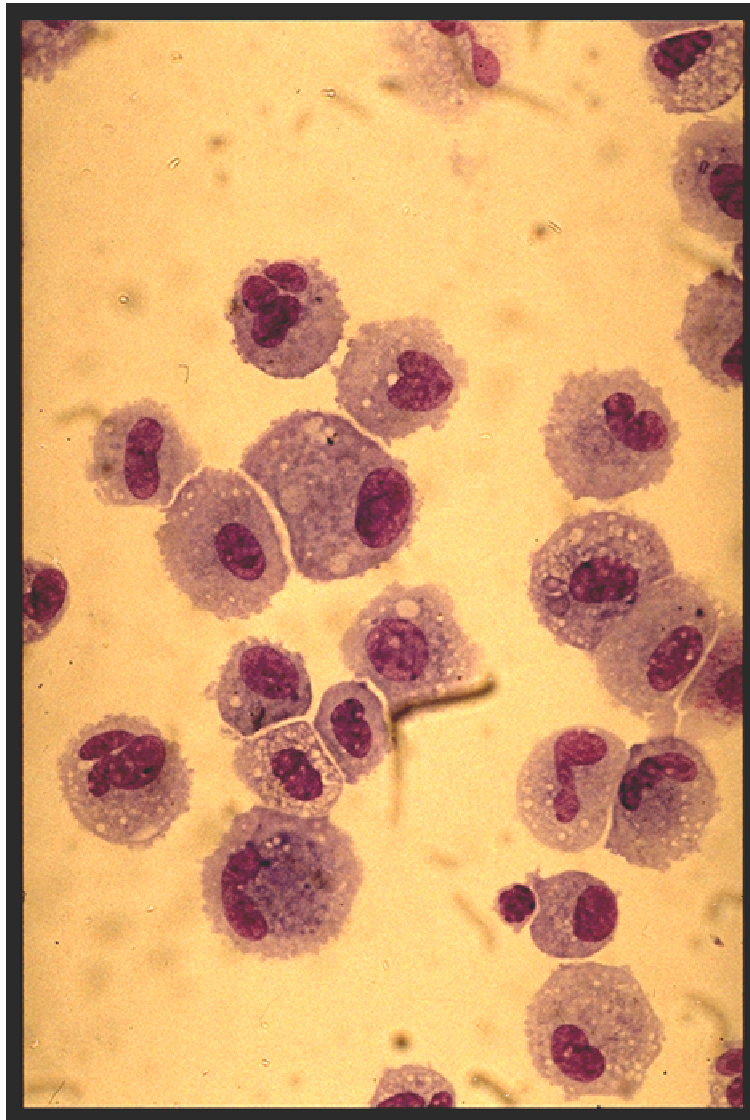


Abb. 1: Differentialzellbild der BAL einer Normalperson

Das Bild zeigt einen Normalbefund mit Überwiegen der Alveolarmakrophagen. Ein einzelner Lymphozyt ist erkennbar (Pappenheimfärbung, Vergrößerung 200 fach).

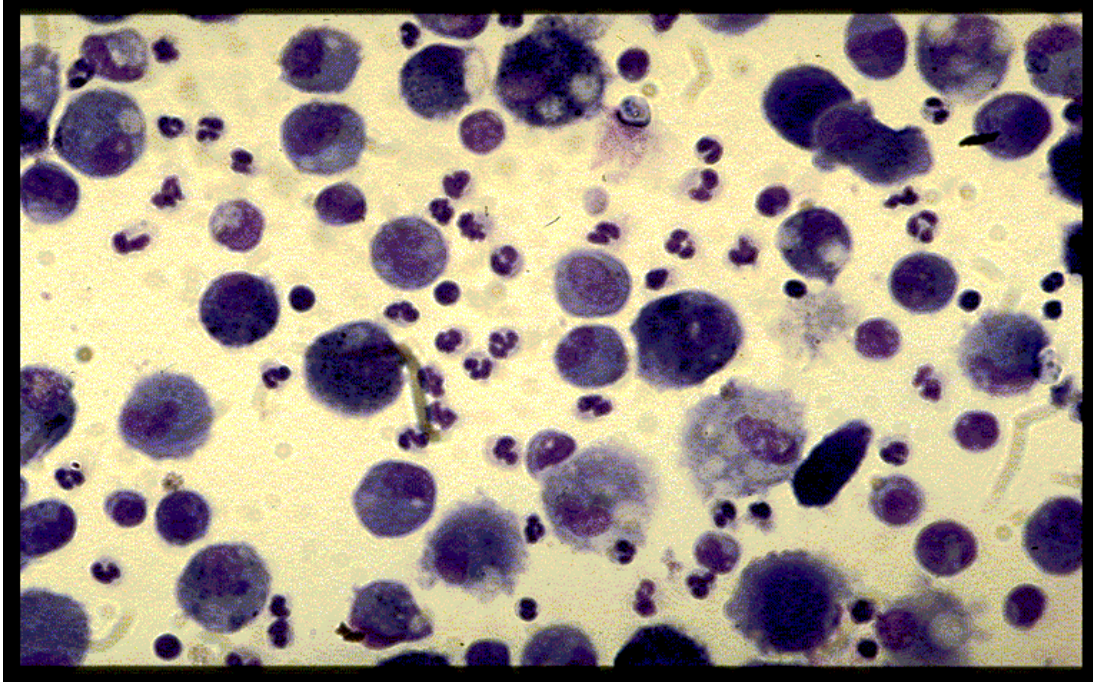


Abb. 2: Differentialzellbild der BAL eines Patienten mit Pneumonie

Das Bild zeigt eine starke Alveolitis mit Überwiegen der neutrophilen Granulozyten. Lymphozyten und Plasmazellen sind ebenfalls vermehrt sichtbar (Pappenheimfärbung, Vergrößerung 100 fach).

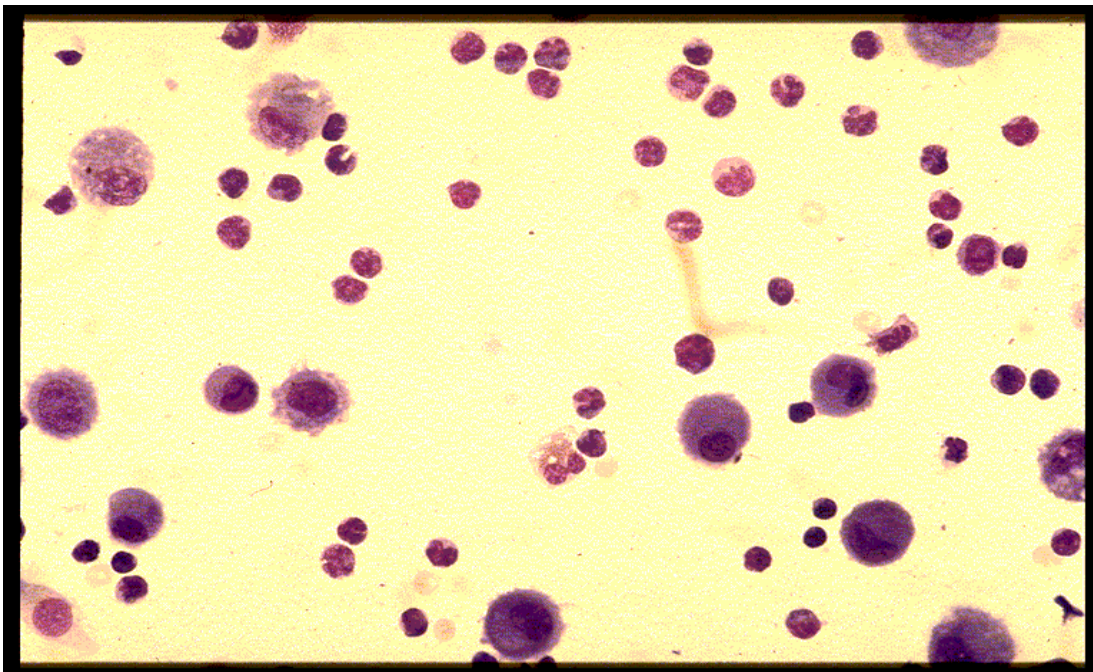


Abb. 3: Differentialbild der BAL eines Patienten mit COPD

Das Bild zeigt eine chronisch obstruktive Bronchitis bei akuter Exazerbation. Die Alveolitis ist von einem erhöhten Anteil an neutrophilen Granulozyten und besonders an Lymphozyten gekennzeichnet (Pappenheimfärbung, Vergrößerung 100 fach).

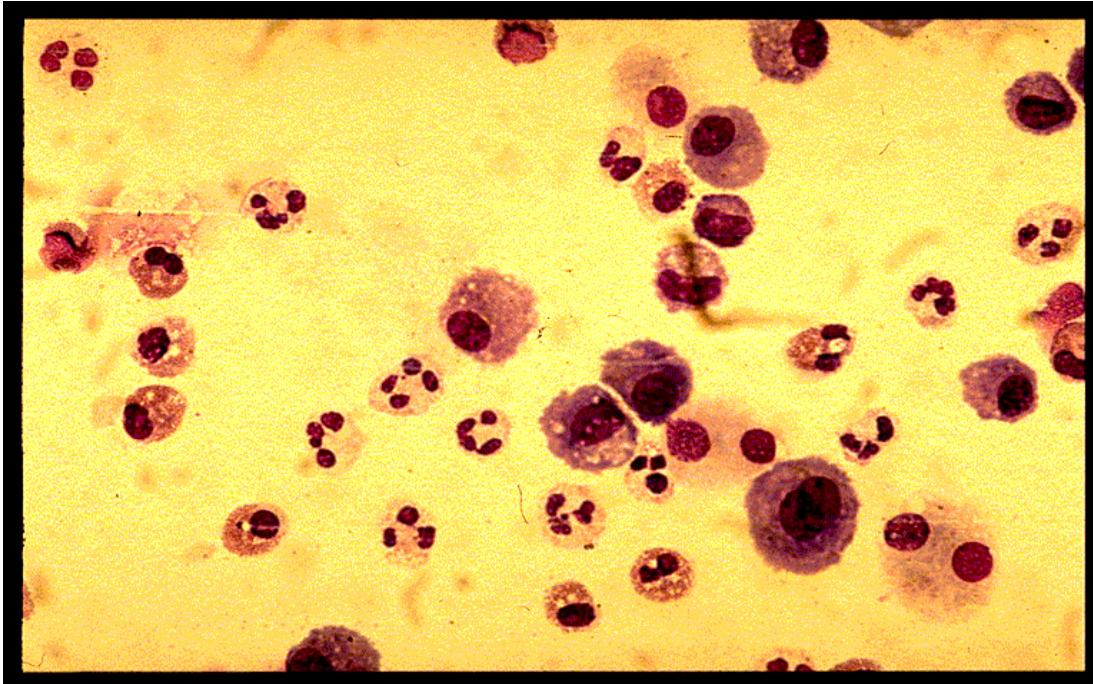


Abb. 4: Differentialzellbild der BAL eines Patienten mit IPF

Das Bild zeigt eine Alveolitis mit einem erhöhten Anteil an neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (Pappenheimfärbung, Vergrößerung 100 fach).

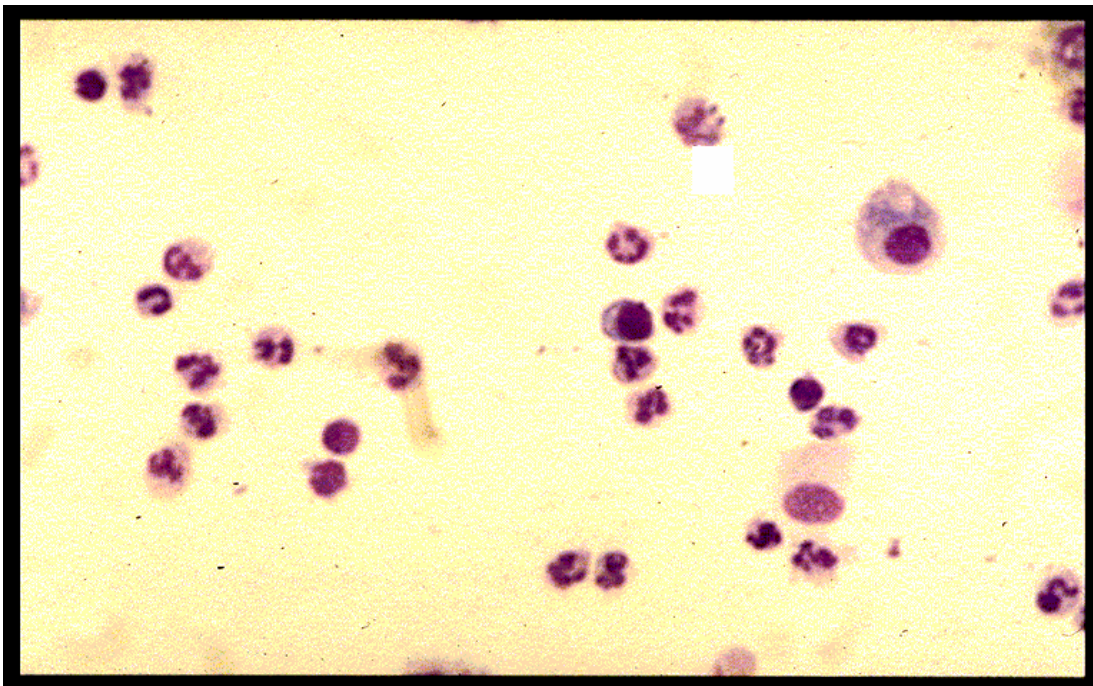


Abb. 5: Differentialzellbild der BAL eines Patienten mit ILE-K/V

Das Bild zeigt eine Alveolitis mit Vermehrung der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten (Pappenheimfärbung, Vergrößerung 100 fach).

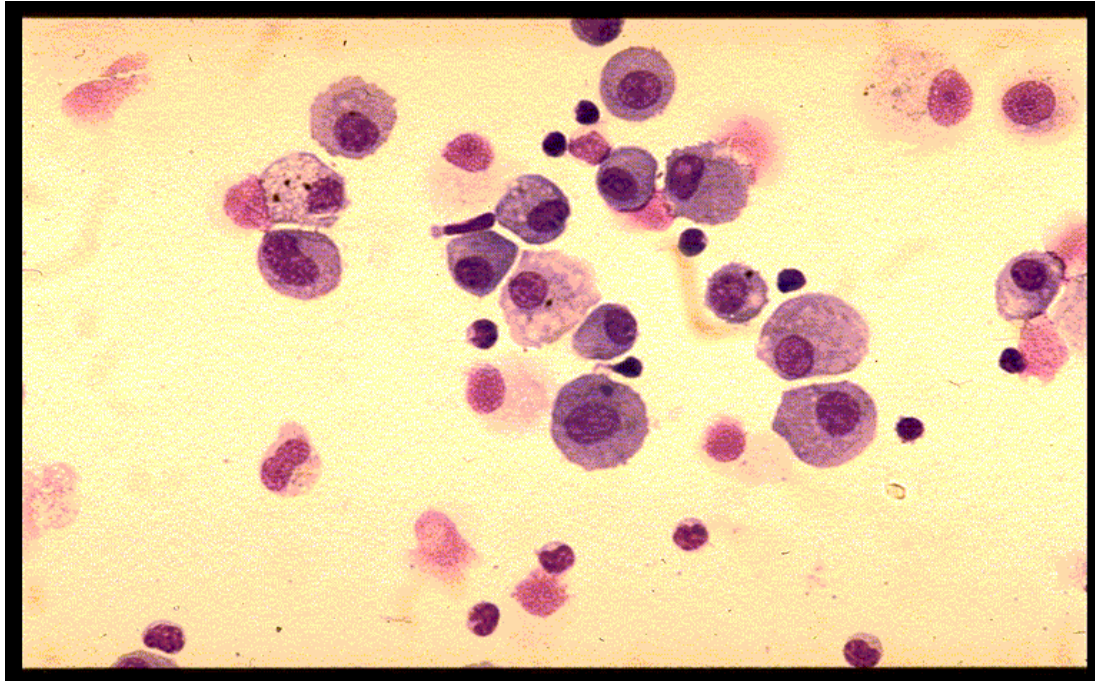


Abb. 6: Differentialzellbild der BAL eines Patienten mit Sarkoidose

Das Bild zeigt eine Alveolitis mit deutlicher Vermehrung der Lymphozyten (Pappenheimfärbung, Vergrößerung 100 fach).

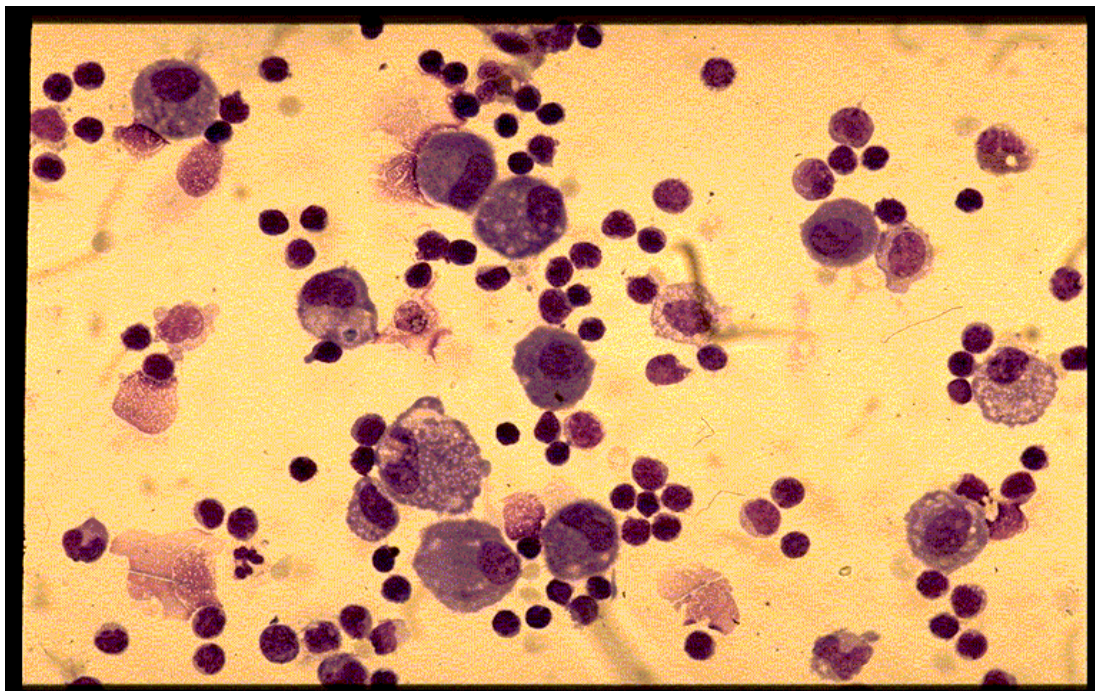


Abb. 7: Differentialzellbild der BAL eines Patienten mit EAA

Das Bild zeigt eine exzessive lymphozytäre Alveolitis. Teilweise sind aktivierte Lymphozyten mit breitem Zytoplasma zu erkennen (Pappenheimfärbung, Vergrößerung 100 fach).

2.4 Immunfluoreszenzmarkierung

Die Identifizierung der Lymphozyten-Oberflächenantigene erfolgte mit Fluorochrommarkierten Antikörpern (91, 64). Es wurden die FITC- oder PE- konjugierten Maus monoklonalen Antikörper b-ly7 (CD103), FIB504 (integrin β_7), Leu-3a (CD4), Leu-2a (CD8) und entsprechende Isotyp-Kontrollen verwendet.

Es wurden jeweils 2×10^5 Zellen/Well der in Calcium- und Magnesium-freier HBSS resuspendierten BAL-Zellen auf flexible Rundboden-Mikrotiterplatten verteilt. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 4°C und die Waschungen mit PBS, welches 1% Rinderalbumin und 0,02% NaN_3 enthielt. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C und 100 g für drei Minuten. Nach Resuspendierung der Zellen erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörper in einer die Bindungsstellen sättigenden Konzentration für 30 Minuten bei 4°C unter gelegentlichem Schütteln der Platte. Danach folgte das dreimalige Waschen mit 4°C PBS-BSA- NaN_3 . Dabei wurde parallel immer eine Negativkontrolle mitgeführt, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Die Negativkontrolle enthielt ein Gemisch aus fluorochrommarkierten IgG-Isotypen (IgG1, IgG2a, IgG2b) anstelle der spezifischen monoklonalen Antikörper.

2.5 Flowzytometrische Analyse

Die Durchflußzytometrie (FACScan, Bencton Dickinson) ermöglichte die Identifizierung von Einzelzellen aufgrund ihrer Oberflächenantigene nach vorangegangener Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen.

Die Vereinzelung der Zellen erfolgte durch eine hydrodynamische Fokussierung. Hierbei wurde eine lineare Anordnung der Zellen im Flüssigkeitsstrahl erzeugt (35). Dazu wurde die zu untersuchende Probe vor dem Messvorgang in spezielle Polystyrenröhrchen aufgenommen, luftdicht am Ansaugstutzen befestigt und mit Hilfe eines regulierbaren Überdrucks in den Probenschlauch gedrückt, der die Probenflüssigkeit zu einer Küvette beförderte. Die einzelnen Zellen wurden in der Küvette vom Licht eines bei 488 nm emittierenden Argon-Ion-Lasers im Laser-Intersect-Point erfasst.

An jeder einzelnen Zelle kommt es zu einer Lichtstreuung, wobei jede Zelle ein charakteristisches Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) erzeugt.

Des Weiteren werden die Farbstoffmoleküle, die an die Zelle gebunden sind, zur Emission spezifischer Fluoreszenzlichtcharakteristika angeregt. Das emittierte Licht wird durch Filter mit verschiedenen Bandbreiten auf Photomultiplier gelenkt und mit Hilfe von spezieller Software analysiert. Die Messergebnisse wurden über das Datenverarbeitungsprogramm Cellquest ausgewertet und graphisch dargestellt. In den Diagrammen wird in einer 4-Dekaden logarithmischen Darstellung die Grünfluoreszenz (FITC) auf der Abszisse gegen die Gelbfluoreszenz (PE) auf der Ordinate dargestellt. Dies ermöglicht es, den prozentualen Anteil von CD4, CD8 und CD103 positiven Zellen zu ermitteln.

2.6 Quantifizierung der RANTES-Konzentration in der BALF

2.6.1 ELISA

Die Konzentration von RANTES Protein wurde in den zellfreien Überständen der BALF mit Hilfe eines spezifischen ELISA (enzyme-linked-immuno-sorbent-assay) bestimmt.

Alle Proben wurden mit der gleichen Methode gemessen.

Zunächst wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten mit 50 µl/well des Capture-Antikörpers, in einer Konzentration von 3 µg/ml in Coatingpuffer, beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen folgte eine dreimalige Spülung der Mikrotiterplatten mit 200 µl/well Waschlösung, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Freie hydrophile Bindungsstellen der Mikrotiterplatte wurden mit 200 µl/well eines 0,2%igen Caseinpuffers abgesättigt und für zwei Stunden bei RT auf einem Rüttler (600 U/min) inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Proben, Kontrollen und eine Standardreihe mit 50µl/well als Doppelbestimmung aufgebracht. Die Standardreihe umfasste eine Konzentrationsspanne von 0 - 10.000 pg/ml RANTES, die Kontrollen die Werte 100 und 1.000 pg/ml.

Nach zweistündiger Inkubation bei RT auf dem Rüttler erfolgte die Entfernung von ungebundenen Komponenten durch einen weiteren Waschvorgang. Der nächste Schritt beinhaltete das Aufbringen von 50µl/well des Nachweis-Antikörpers (3µg/ml) in 0,2%iger Caseinlösung für weitere zwei Stunden bei RT auf dem Rüttler. Ein gegen das F_c-Fragment des Nachweisantikörpers gerichteter biotinylierter Antikörper wurde nach erneutem Waschschritt in einer Konzentration von 1 µg/ml in 0,2%iger Caseinlösung mit 50 µl/well für eine Stunde bei 37°C aufgebracht. Nach erfolgtem Waschen wurde für eine Stunde bei 37°C der in PBS 1/50 verdünnte AB-Complex mit 50 µl/well hinzugefügt. Im letzten Schritt erfolgte nach wiederholtem dreimaligen Spülen die Zugabe von 20 mg ABTS und 10 µl H₂O₂ (30% v/v) auf 30 ml Substratpuffer mit 200 µl/well. Diese hellgrüne Lösung verfärbte sich, je nach RANTES-Protein Konzentration, durch die Peroxidasekonzentration, welche durch H₂O₂ initiiert wurde, unterschiedlich stark dunkelgrün.

Die Extinktion des umgesetzten Substrates wurde mittels ELISA-Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Werte der optischen Dichte

wurden mit dem Rechnerprogramm Easy Fit® durch Extrapolation mit der bei jeder Platte mitgeführten Standardkurve in Konzentrationswerte umgerechnet.

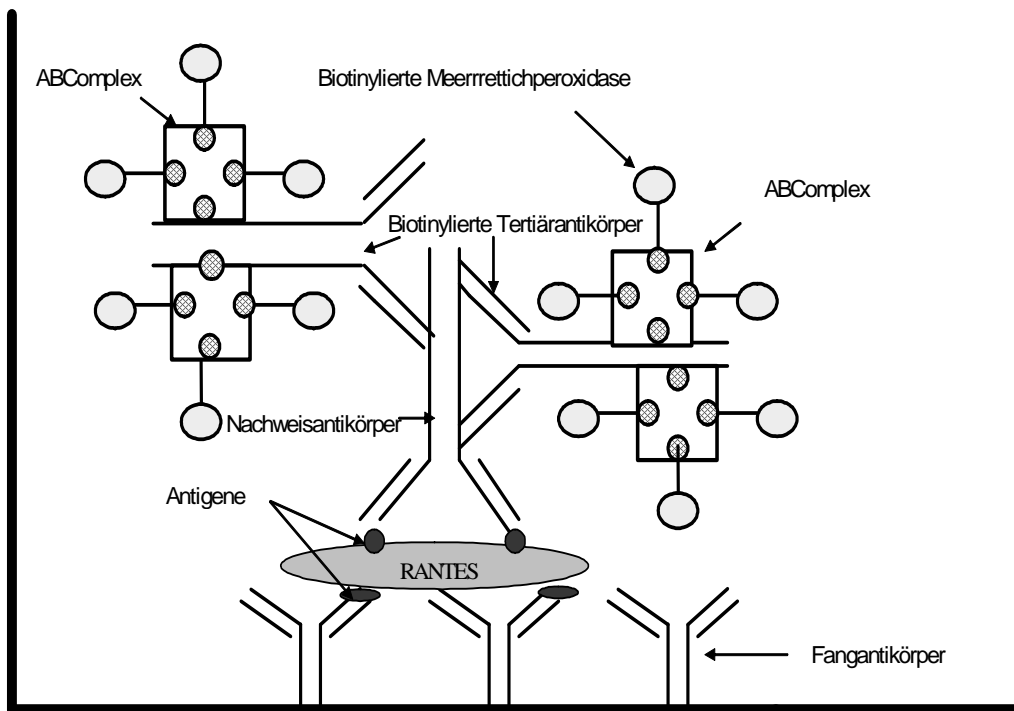


Abb. 8: Schematischer Aufbau des „Doppel-Sandwich-ELISA“

Querschnitt durch ein Well einer 96-Loch-ELISA-Platte und schematischer Aufbau des hier verwendeten „Sandwich-ELISA“. Mit dem Fc-Teil am Boden der Platte gebundene Fangantikörper binden das entsprechende Zytokin (RANTES) aus der Probe. Im nächsten Schritt lagert sich der Nachweisantikörper an eine andere Antigenstruktur auf dem Zytokin. Der entstandene Antigen-Antikörperkomplex wird über einen biotinylierten Drittantikörper und den AB-Komplex (ABC) mit dem Enzym (Meerrettichperoxidase) gekoppelt. Nach Zugabe der Substratlösung und Initiierung der Reaktion mit Wasserstoffperoxid kommt es zum Farbumschlag, der photometrisch erfasst wird (37).

2.7 Lungenfunktionsdiagnostik

Zur Beurteilung der Lungenfunktion wurde die Spirometrie angewandt. Mittels eines offenen Systems mit Atemrohr (Pneumotachograph) und elektronischer Integration der Strömungsgeschwindigkeit wurden die Vital- und Einsekundenkapazität bestimmt.

Die Vitalkapazität, welche als maximal mobilisierbares Lungenvolumen definiert ist, wurde bei langsamer Inspiration nach maximaler langsamer Expiration gemessen. Die Sollwerte, welche als Referenzwerte herangezogen wurden, waren abhängig von Geschlecht, Körpergröße und Alter und wurden von der Software des Spirometers berechnet. Die Sollwerte sind auf BTPS-Bedingungen (Body temperature, pressure, saturated) bezogen.

Das forcierte expiratorische Volumen in der ersten Sekunde, FEV₁, wurde mit dem Atemstoßtest nach Tiffenau bestimmt. Die Messung erfasst die in der ersten Sekunde, nach langsamer tiefstmöglicher Inspiration, mit maximaler Anstrengung schnellstmöglich ausgeatmete Luftmenge, die als Absolutwert dargestellt wurde. Außerdem wurde der auf die IST-VC bezogene relative Wert (FEV₁% VC) beurteilt.

2.8 Messung der Gasaustauschfunktion

Zur Beurteilung des Wirkungsgrades der Atmung wurde eine arterielle Blutgasanalyse, mit Bestimmung des O₂-, CO₂-Partialdrucks, der O₂-Sättigung und des pH-Wertes, durchgeführt. Das Blut wurde durch arterielle Punktion oder als arterialisiertes Kapillarblut aus einem hyperämisierten Ohrläppchen entnommen.

Die Bestimmung des O₂-Partialdrucks erfolgte mit kunststoffüberzogenen Mikroelektroden (polarographisches Verfahren). Der CO₂-Partialdruck wurde entweder wie der O₂-Partialdruck oder nach dem Astrup-Verfahren wie der pH-Wert bestimmt. Die Messung der O₂-Sättigung wurde mit Hilfe eines Fingerpulsoxymeters vorgenommen. Hierbei wird das Verhältnis $\frac{[\text{HbO}_2]}{([\text{Hb}] + [\text{HbO}_2])}$ durch photometrische Messung bei zwei Wellenlängen bestimmt. Das Verfahren ist geeignet, die Abnahme der O₂-Sättigung bei pulmonalen Störungen quantitativ zu erfassen.

Als weitere Prüfung erfolgte die Bestimmung der Diffusionskapazität (Transferfaktor), d.h. die Menge Sauerstoff, die pro Einheit O₂-Druckdifferenz zwischen Alveole und Kapillare und pro Zeiteinheit vom Alveolarraum bis zum Hämoglobin des Erythrozyten gelangt. Als Indikatorgas wurde Kohlenmonoxid (CO) genutzt, da es eine viel höhere Affinität zum Hämoglobin besitzt als Sauerstoff (O₂). Mit der „Single-Breath-Technik“

atmete der Patient nach maximaler Expiration ein CO-Helium-Luft-Gemisch ein und nach zehn Sekunden Apnoe wieder aus. Aus dem „Verschwinden“ des CO wurde der Transferfaktor, welcher die Diffusionskapazität bezogen auf das Lungenvolumen beschreibt, bestimmt.

2.9 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit der „Sigma-STAT®“ Computer-Software (SPSS Inc.). Alle Daten wurden als Median mit der zugehörigen Spannweite angegeben. Um die statistischen Unterschiede zwischen den einzelnen Patientenkollektiven hinsichtlich der in Tabelle 3 aufgeführten Parameter inklusive den RANTES Proteinkonzentrationen in BALF auf Signifikanz zu testen, kam die One Way Analysis of Variance on Ranks zur Anwendung (Kruskal-Wallis Test). Die Interpretation der multiplen Vergleiche erfolgte mit der „Dunn’s Methode“.

Um die Korrelationen zwischen der RANTES Proteinkonzentration in der BALF und den in Tabelle 3 dargestellten Parametern zu untersuchen, wurde der Spearman Rank Korrelationstest durchgeführt. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als signifikant angenommen.

2.10 Materialien und verwendete Lösungen

2.10.1 Material und Bezugsquellen

96-Loch-Mikrotiterplatten	Nunc, D-Wiesbaden
ABCComplex	Dako, Glostrup, Dänemark
ABTS	Sigma, D-Deisenhofen
Antikörper gegen hrRANTES (monoklonal von der Maus)	R&D Systems, D-Wiesbaden
Antikörper gegen hrRANTES (polyklonal von der Ziege)	R&D Systems, D-Wiesbaden
Anti-Ziege-Immunglobulin, Antikörper aus dem Esel (F(ab)2 Fragment, biotinyliert)	Dianova, D-Hamburg
Aqua destilla	Braun, D-Melsungen
Blue Max 50ml, Polypropylen	Falcon, D-Heidelberg
Blue-Max 15ml, Polypropylen	Falcon, D-Heidelberg
b-ly7 (CD103), monoklonal von der Maus	Biermann, D-B. Nauheim
Bovines Serumalbumin	Sigma, D-Deisenhofen
Casein	Sigma, D-Deisenhofen
Eppendorf-Cups (1;2,5 und 5ml)	Eppendorf, D-Hamburg
Ethanol	Riedel de Haen, D-Seelze
FIB504 (integrin β_7)	Pharmingen, San Diego, CA
Fluorescein-Isothiocyanat-Streptavidin-Konjugat	Becton Dickinson, D-Heidelberg
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung	Merck, D-Darmstadt
Hanks' Balanced Salts Solution (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -Ionen)	Gibco, D-Eggenstein
hrRANTES	R&D Systems, D-Wiesbaden
Isotyp-Kontrolle (IgG1, IgG2a, IgG2b)	Dianova, D-Hamburg
Leu-2a (CD8)	Becton Dickinson, San Jose, USA
Leu-3a (CD4)	Becton Dickinson, San Jose, USA
May-Grünwald Eosin-Methylenblau-Lösung	Merck, D-Darmstadt

Mikropipetten (0-10,10-100,100-1000µl)	Eppendorf, D-Hamburg
Natriumchlorid / NaCl-Lösung 0,9%	Braun, D-Melsungen
Natronlauge 2M	Merck, D-Darmstadt
PBS-Salzlösung	Gibco, D-Eggenstein
Phycoerythrin-Streptavidin-Konjugat	Becton Dickinson, D-Heidelberg
Pipettenspitzen (5;100 und 1000µl)	Eppendorf, D-Hamburg
Rundboden-Mikrotiterplatten	Falcon, D-Heidelberg
Salzsäure 4N	Merck, D-Darmstadt
Sterile Kompressen 50x50mm	Braun, D-Melsungen
Trypanblau	Sigma, D-Deisenhofen
TWEEN-20 [®]	Sigma, D-Deisenhofen
Wasserstoffperoxyd	Merck, D-Darmstadt

Des Weiteren kamen aus Laborbeständen zum Einsatz:

- Bechergläser verschiedener Größen
- Deckgläschen (24x24mm)
- Filterpapierstreifen
- Glaspipetten (5, 10, 25, 50ml)
- Multipipette
- Neubauer-Zählkammer
- Objektträger
- Öl-Immersionslösung
- Pipettierhilfe
- Tiefkühlschrank (-80°C) und Kühlschrank (4°C)

2.10.2 Verwendete Lösungen

<u>Beschichtungspuffer:</u>	Na ₂ CO ₃	1,59g	
	NaHCO ₃	2,93g	
	Aqua destilla	1000ml	
			pH: 9,6

<u>Substratpuffer:</u>	NaC ₂ H ₃ O Anhydrat	8,2g	
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	6,9g	
	Aqua destilla	1000ml	
			pH: 4,2

<u>ABTS-Lösung:</u>	ABTS	20mg	
	Substratpuffer	30ml	
	H ₂ O ₂	10µl	

<u>Caseinpuffer:</u>	Caseinpulver	200µl	
	0,3M NaOH	80ml	
	mit 4N HCL auf pH 7,0 titrieren		
	mit Aqua destilla auf 100ml auffüllen		
			pH: 7,0

<u>Waschlösung für ELISA:</u>	PBS	100ml	
	TWEEN [®] 0,5%	100ml	
	Aqua destilla	800ml	

<u>PBS:</u>	NaCl	8g	
	Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	2,9g	
	KCL	0,2g	
	KH ₂ PO ₄	0,2g	
	Aqua destilla	1000ml	
			pH: 7,4

Waschpuffer für Zellpräparation:

PBS
0,1% BSA
0,02% NaN₃

Erylyse-Puffer:

Ammoniumchlorid	1,652g
Kalium-Bicarbonat	0,2g
EDTA	0,0074g
Aqua destilla	200ml

2.10.3 Herstellernachweis verwendeter Geräte

Bronchoskop	Olympus, D-Hamburg
Brutschrank	Heraeus Instruments, D-Hanau
ELISA-Reader	Medgenix, D-Ratingen
ELISA-Washer	Medgenix, D-Ratingen
FACStar ^{Plus} Durchflußzytometer	Becton Dickinson, Mountain View, Kalifornien, USA
Mikroskope	Leitz, D-Wetzlar
pH-Meter	Schott, D-Hofheim
Pipetten	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Rüttelgerät	Janke & Kunkel, D-Staufen i. Br.
Thermomixer	Eppendorf, D-Hamburg
Wasserbad	Julabo, D-Seelbach
Zentrifugen	Hettick, D-Tuttlingen Heraeus, D-Hanau

3 Ergebnisse

3.1 Lungenfunktionsanalytik und BAL-Zytologie der untersuchten Normalpersonen und Patientenkollektive

Die Ergebnisse der Lungenfunktionstests, der Blutgasanalysen und der BAL-Zellprofile von Normalpersonen und den Patientengruppen, bei denen die RANTES Proteinkonzentration in der BALF gemessen wurde, sind in Tabelle 3 zusammenfassend dargestellt. Der Median der erhobenen Messwerte wurde hinsichtlich der Abweichung vom Normalkollektiv sowie der Unterschiede zwischen den Patientengruppen auf statistische Signifikanz untersucht.

3.1.1 Lungenfunktions- und BGA- Daten

Es wurden die Lungenfunktionsparameter VC%S., FEV₁%S., FEV₁/VC%S., TLC_{CO_{SB}}%S. und das arterielle PO₂ (mmHg) bestimmt.

Die VC%S. war bei allen Patientengruppen (Pneumonie: 78,0%; COPD: 79,0%; Sarkoidose: 77,5%; IPF: 64,8%; ILE-K/V: 50,0%; EAA: 54,5%) gegenüber Normalpersonen (102,0%) statistisch signifikant erniedrigt (jeweils $p < 0,01$, außer Pneumonie versus Normalpersonen mit $p < 0,05$). Die verminderte Vitalkapazität und damit Verkleinerung der ventilatorischen Volumenreserve wurde damit als typischer Befund interstitieller Lungenerkrankungen und der COPD für die hier untersuchten Patientenkollektive bestätigt.

Für FEV₁%S. fanden sich im Vergleich zu den Normalpersonen (102,0%) statistisch signifikant erniedrigte Werte bei Patienten mit COPD (68,0%), Sarkoidose (71,5%), IPF (64,8%), ILE-K/V (51,0%) und EAA (62,0%) ($p < 0,01$). Das erniedrigte FEV₁%S. weist bei Patienten mit COPD auf die bronchiale Obstruktion und bei Patienten mit ILE auf eine Herabsetzung der Lungenretraktionskraft hin.

Der auf die IST-VC bezogene relative Wert FEV₁/VC%S. darf nicht isoliert, sondern nur im Zusammenhang mit den Einzelwerten VC und FEV₁ betrachtet werden, da eine erniedrigte VC den FEV₁/VC Quotienten scheinbar in den Normbereich verschieben kann. Signifikant erniedrigte Werte lagen bei COPD-Patienten (85,0%) im Vergleich zu Normalpersonen (100,0%), Patienten mit Pneumonie (103,0%), ILE-K/V (113,0%) und EAA (105,0%) vor ($p < 0,05$).

Der CO-Diffusionskapazität $TLCO_{SB}\%S$ zeigte signifikant erniedrigte Werte bei Patienten mit IPF (50,4%), ILE-K/V (49,6%) und EAA (64,0%) verglichen mit Normalpersonen (95,0%) und Patienten mit Pneumonie (103,5%) ($p < 0,05$). Die erniedrigten $TLCO$ -Werte bei Patienten mit IPF, ILE-K/V und EAA reflektieren die alveoläre Diffusionsstörung bei fibrosierenden Lungenerkrankungen, die durch einen vermehrten Bindegewebsgehalt der pulmonalen Endstrecke bedingt ist.

Der arterielle PO_2 -Wert in der Blutgasanalyse war bei Patienten mit IPF (71,0 mmHg), ILE-K/V (71,2 mmHg), EAA (75,6 mmHg) und COPD (73,3 mmHg) signifikant niedriger als bei Normalpersonen (84,0 mmHg) ($p < 0,05$). Dieses Ergebnis dokumentiert die respiratorische Partialinsuffizienz bei Patienten mit COPD und Lungenfibrosen.

3.1.2 BAL-Differentialzellbild

Vergleichsuntersuchungen zwischen BAL-Zytologie und transbronchialen Biopsien haben gezeigt, dass die Zellverteilung in der BAL relativ gut die Infiltration der Alveolarwände und des interstitiellen Lungengewebes durch Entzündungszellen repräsentiert (10, 85).

Das bei der BAL zurückgewonnene Flüssigkeitsvolumen, die „Recovery rate“, lag zwischen 50,2% (Patienten mit Pneumonie) und 79,2% (Patienten mit ILE-K/V) des Instillationsvolumen. Statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der „Recovery rate“ ergaben sich zwischen Patienten mit Pneumonie (50,2%) im Vergleich zu Normalpersonen (77,1%), Patienten mit ILE-K/V (79,2%) und Sarkoidose (68,8%) ($p < 0,05$).

Die Auswertung der Gesamtzellzahl, Zellzahl/ml BALF und der Prozent- und Absolutzahl der basophilen Granulozyten in der BALF ergab zwischen den sechs Patientengruppen und dem Normalkollektiv keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Der prozentuale Anteil der Alveolarmakrophagen in der BALF lag in der Kontrollgruppe (91,0%), übereinstimmend mit den Normwerten in der Literatur, am höchsten. Bei Patienten mit Pneumonie (55,0%), COPD (76,0%), ILE-K/V (63,5%), Sarkoidose (77,0%) und EAA (61,0%) fanden sich signifikant erniedrigte Prozentzahlen der Alveolarmakrophagen gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,01$), ebenso bei Patienten mit IPF (82,0%, $p < 0,05$). Der Vergleich der Absolutzahlen der

Alveolarmakrophagen/ml BALF ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven.

Die Patientengruppe mit Pneumonie zeigte den höchsten prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten in der BALF (34,0%) in Übereinstimmung mit anderen Studien (121). Sie grenzte sich mit den statistisch signifikant erhöhten PMN-Werten von Normalpersonen (1,0%), Patienten mit COPD (4,0%), IPF (4,5%), Sarkoidose (2,0%) und EAA (4,5%) ab ($p < 0,01$). Patienten mit ILE-K/V zeigten einen signifikant erhöhten Prozentsatz der PMN gegenüber der Kontroll- und Sarkoidosegruppe ($p < 0,01$) (123, 124, 76).

Die höchsten Prozentwerte an Lymphozyten in der BALF fanden sich bei den Kollektiven EAA, Sarkoidose und ILE-K/V. Patienten mit EAA und Sarkoidose unterschieden sich signifikant ($p < 0,01$) von den anderen Patientenkollektiven. ILE-K/V-Patienten differierten nur von Normalpersonen ($p < 0,05$).

EAA-Patienten wiesen mit 24,5% Lymphozyten in der BALF den höchsten Wert im Vergleich zu allen anderen ILE (Sarkoidose:20,0%; IPF:7,0%; ILE-K/V:20,0%) auf, entsprechend einer 4,5fachen Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe (5,5%).

Der Prozentsatz der lavagierten Lymphozyten war bei Sarkoidosepatienten (20%) signifikant höher als bei der Kontrollgruppe (5,5%), den Patienten mit COPD (7,0%) und IPF (7,0%) ($p < 0,01$).

ILE-K/V-Patienten zeigten mit einem medianen Anteil von 20% Lymphozyten in der BALF ebenfalls einen signifikant erhöhten Lymphozytenanteil gegenüber Normalpersonen (5,5%) ($p < 0,05$).

Die Lymphozytenzahl/ml und deren Gesamtzahl in der BALF lag bei Sarkoidose ($3,49 \times 10^4$; $2,52 \times 10^6$) und EAA-Patienten ($5,32 \times 10^4$; $4,17 \times 10^6$) am höchsten (Normalpersonen: $0,71 \times 10^4$; $0,84 \times 10^6$, Pneumonie: $1,37 \times 10^4$; $0,98 \times 10^6$, COPD: $1,4 \times 10^4$; $0,9 \times 10^6$, ILE-K/V: $1,97 \times 10^4$; $2,09 \times 10^6$, IPF: $1,19 \times 10^4$; $0,93 \times 10^6$). Sarkoidose-Patienten und Patienten mit EAA wiesen signifikant höhere absolute Lymphozytenzahlen/ml BALF als Normalpersonen ($p < 0,01$) sowie COPD und IPF Patienten ($p < 0,05$) auf. Bei EAA Patienten lag die absolute Lymphozytenzahl in der BALF auch signifikant höher als in der Pneumoniegruppe ($p < 0,01$).

Der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten in der BALF war bei Patienten mit IPF (1,0%) im Vergleich zu Normalpersonen (0,0%) ($p < 0,05$) signifikant erhöht. Die Gruppe der ILE-K/V zeigte ebenfalls einen geringfügig, allerdings nicht signifikant erhöhten Prozentsatz der eosinophilen Granulozyten (1,0%) in der BALF im Vergleich

zu Normalpersonen. Andere Studien zur zellulären Zusammensetzung der BALF haben gezeigt, daß der Anteil eosinophiler Granulozyten bei Kollagenosen/Vaskulitiden mit begleitender ILE erhöht ist, neben einer erhöhten Zahl an PMN und Lymphozyten (123).

Tabelle 3: Demographische, lungenfunktionelle und BAL-zytologische Daten der untersuchten Patientenkollektive

	Normalpersonen	Pneumonie	COPD	Sarkoidose	IPF	ILE-K/V	EAA
	Geschlecht: M=20, W=14 Alter (Jahre): 40(22-75)	Geschlecht: M=22, W=15 Alter (Jahre): 58(26-75)	Geschlecht: M=33, W=18 Alter (Jahre): 57(35-74)	Geschlecht: M=28, W=20 Alter (Jahre): 36(21-72)	Geschlecht: M=27, W=19 Alter (Jahre): 56(19-83)	Geschlecht: M=3, W=11 Alter (Jahre): 52(29-77)	Geschlecht: M=11, W=19 Alter (Jahre): 54(23-73)
Lungenfunktions-Daten							
VC% S.	102,0 (94,0-108,0) ^{***}	78,0 (68,0-106,6) [*]	79,0 (54,0-98) ^{***}	77,5 (29,5-119,0) ^{**}	64,8 (29,5-97,1) ^{**}	50,0 (29,8-90,3) ^{**}	54,5 (29,0-114,0) ^{**}
FEV ₁ % S.	102,0 (96,0-112,0) ^{***}	76,5 (62,0-111,2) ^{***}	68,0 (31,0-105,0) ^{**}	71,5 (26,3-112,0) ^{**}	62,0 (32,2-102,9) ^{**}	51,0 (36,0-94,9) ^{**}	62,0 (26,0-105,0) ^{**}
FEV ₁ /VC% S.	100,0 (92,0-115,0) [#]	103,0 (80,0-129,0) [#]	85,0 (54,0-110,0) ^{*,&}	94,4 (69,0-121,0) [°]	97,0 (68,0-124,0) [°]	113,0 (98,3-131,0) ^{##}	105,0 (57,0-120,0) [#]
TLC _{OB} % S.	95,0 (87,0-106,0) ^{§&}	103,5 (80,0-130,0) ^{§&}	83,6 (42,0-131,0) ^{§&}	92,2 (42,0-132,0) [°]	50,4 (20,0-100,0) [†]	49,6 (24,1-106,0) [†]	64,0 (18,0-122,0) [†]
PO ₂ (mmHg)	84,0 (84,0-103,0) ^{##&}	82,7 (62,2-94,0)	73,7 (58,1-100,5) [*]	79,9 (55,1-102,0)	71,0 (53,7-93,0) [*]	71,2 (48,0-82,0) [*]	75,6 (42,3-103,0) [*]
BALF-Daten							
Recovery rate (%)	77,1 (33,3-95,8) [†]	50,2 (19,5-92,9) ^{***§}	66,7 (20,8-95,8)	68,8 (20,8-95,9) [†]	64,6 (29,2-91,7)	79,2 (44,8-95,8) [†]	62,4 (16,7-91,7)
Zellen/ml (x 10 ⁵)	1,2 (0,4-11,8)	2,2 (0,1-9,3)	1,4 (0,2-13,8)	1,7 (0,04-12,0)	2,1 (0,1-16,0)	1,6 (0,4-7,5)	2,4 (0,8-7,4)
Macrophagen (%)	91,0 (81,0-99,0) ^{††###}	55,0 (4,0-97,0) ^{††###}	76,0 (6,0-98,0) ^{***}	77,0 (20,0-94,0) ^{**}	82,0 (26,0-99,0) ^{††}	63,5 (17,0-92,0) ^{**}	61,0 (6,0-92,0) ^{**}
PMN (%)	1,0 (0,0-6,0) ^{††°}	34,0 (0,0-95,0) ^{††###}	4,0 (0,0-89,0) ^{††}	2,0 (0,0-39,0) ^{††°}	4,5 (0,0-54,0) ^{††}	9,0 (3,0-65,0) ^{***§§}	4,5 (0,0-90,0) ^{††}
Lymphocyten (%)	5,5 (0,0-27,0) ^{§§&}	9,0 (0,0-38,0) ^{§§&}	7,0 (0,0-39,0) ^{§§&}	20,0 (1,0-74,0) ^{***###}	7,0 (0,0-55,0) ^{§§&}	20,0 (1,0-51,0) [*]	24,5 (0,0-79,0) ^{***###}
Eosinophile (%)	0,0 (0,0-1,0) [§]	0,0 (0,0-7,0)	0,0 (0,0-18,0)	0,0 (0,0-9,0)	1,0 (0,0-34,0) [*]	1,0 (0,0-22,0)	0,0 (0,0-10,0)
Basophile (%)	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-5,0)	0,0 (0,0-2,0)	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-1,0)
CD4/CD8	2,2 (2,0-2,6)	1,3 (0,2-3,4) ^{§§}	1,9 (0,1-7,7) ^{§§}	5,0 (0,5-25,7) ^{††###}	1,3 (0,1-15,5) ^{§§}	0,8 (0,2-4,5) ^{§§}	0,7 (0,2-1,4) ^{§§}

Die Daten sind als Median und Range angegeben.

Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb aller Patientenkollektive sind durch folgende Zeichen dargestellt:

*P<0,05 versus Normalpersonen; **P<0,01 versus Normalpersonen

†P<0,05 versus Pneumonie; ††P<0,01 versus Pneumonie

‡P<0,05 versus COPD; ‡‡P<0,01 versus COPD

°P<0,05 versus ILE-K/V; °°P<0,01 versus ILE-K/V

§P<0,05 versus IPF; §§P<0,01 versus IPF

§§P<0,05 versus Sarkoidose; §§§P<0,01 versus Sarkoidose

&P<0,05 versus EAA; &&P<0,01 versus EAA

3.1.3 Expression von Oberflächenantigenen auf BALF Lymphozyten

Mit Hilfe von Immunfluoreszenz und Durchflußzytometrie wurde die Expression der Oberflächenantigene CD4, CD8 und CD103 auf Lymphozyten ermittelt.

3.1.3.1 Proportionen von CD4- und CD8-Lymphozyten in der BALF

Das BAL-Zellprofil von Sarkoidose-Patienten ist durch die Akkumulation von CD4 positiven Lymphozyten, wie in Abb.9 gezeigt, charakterisiert. Entsprechend war der Anteil der CD4-Lymphozyten in der Gesamtlmphozytenpopulation bei Sarkoidose-Patienten (83,16%) im Vergleich zu Patienten mit Pneumonie (56,52%), COPD (66,44%), IPF (57,14%), ILE-K/V (43,43%) und EAA (41,07%) signifikant erhöht ($p < 0,01$).

Die Betrachtung der CD4-Zellen/ml und Gesamt-CD4-Zellzahl in der BALF ergab bei Patienten mit Sarkoidose statistisch signifikant erhöhte Werte ($2,9 \times 10^4$; $2,4 \times 10^6$) gegenüber Patienten mit COPD ($1,29 \times 10^4$; $0,98 \times 10^6$) und IPF ($1,01 \times 10^4$; $0,72 \times 10^6$) ($p < 0,05$).

Demgegenüber war der Anteil der CD8 Zellen in der Gesamtlmphozytenpopulation mit 16,84% bei der Patientengruppe mit Sarkoidose (Abb.9) statistisch signifikant im Vergleich zu Patienten mit Pneumonie (43,48), COPD (33,56%), IPF (42,86%), ILE-K/V (56,57%) und EAA (58,93%) erniedrigt ($p < 0,01$).

Das BAL-Zellprofil von EAA-Patienten, das durch die Akkumulation von CD8 Lymphozyten charakterisiert ist, ergab signifikant höhere Werte der CD8 Zellen/ml und Gesamt-CD8-Zellen pro BAL ($2,85 \times 10^4$; $1,99 \times 10^6$) verglichen mit Patienten mit COPD ($0,76 \times 10^4$; $0,47 \times 10^6$), IPF ($0,77 \times 10^4$; $0,59 \times 10^6$) und Sarkoidose ($0,71 \times 10^4$; $0,58 \times 10^6$) ($p < 0,05$).

Die Bestimmung des CD4/CD8-Quotienten ergab, entsprechend der alveolären Akkumulation von CD4-Lymphozyten, einen signifikant erhöhten Quotienten bei Sarkoidose-Patienten (5,0) gegenüber Patienten mit COPD (1,9), IPF (1,3), ILE-K/V (0,8) und EAA (0,7) ($p < 0,01$).

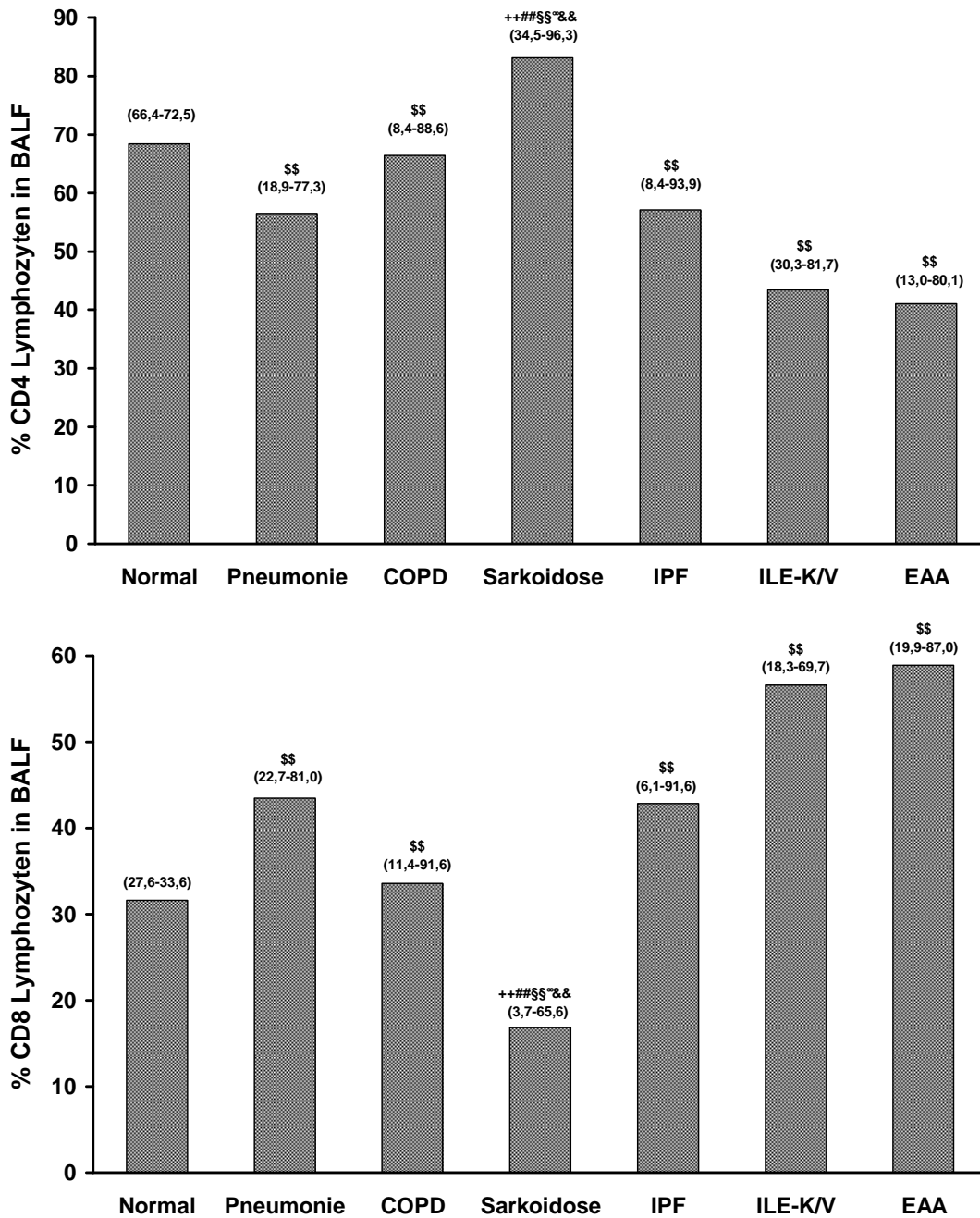


Abb. 9: Darstellung der prozentualen Verteilung der CD4- (oberes Diagramm) und CD8-Lymphozyten (unteres Diagramm) in der BALF, analysiert durch Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie. Die Ergebnisse sind als Median des prozentualen Anteils an der Gesamtlymphozytenpopulation mit der Spannweite angegeben. Alle Patientenkollektive und Normalpersonen wurden untereinander auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht und durch folgende Zeichen dargestellt:

- * P < 0,05 versus Normalperson; ** P < 0,01 versus Normalperson;
- + P < 0,05 versus Pneumonie; ++ P < 0,01 versus Pneumonie;
- # P < 0,05 versus COPD; ## P < 0,01 versus COPD
- § P < 0,05 versus Sarkoidose; §§ P < 0,01 versus Sarkoidose;
- § P < 0,05 versus IPF; §§ P < 0,01 versus IPF
- ° P < 0,05 versus ILE-K/V; °° P < 0,01 versus ILE-K/V;
- & P < 0,05 versus EAA; && P < 0,01 versus EAA

3.1.3.2 Expression von CD103 auf T-Lymphozyten in BALF

In Abb.10 ist der Median des prozentualen Anteiles von CD4-, CD8- und Gesamt-T-Lymphozyten, die CD103 koexprimieren, für die verschiedenen Patientenkollektive dargestellt. Die dazugehörigen repräsentativen flowzytometrischen Profile der CD103 (α^E) Expression von CD4⁺ und CD8⁺ BALF Lymphozyten zeigt Abb.11.

In der EAA-Patientengruppe waren die Prozentwerte CD103 exprimierender T-Zellen signifikant höher (72,2%) als bei Normalpersonen (39,6%), Patienten mit Pneumonie (43,8), COPD (41,1%) und Sarkoidose (49,5%) ($p < 0,01$). Der Vergleich des prozentualen Anteils der CD103 Expression auf den CD4- und CD8-positiven T-Zell Subpopulationen in der BALF ergab hingegen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen inklusive der Normalpersonen. Allerdings ist der Anteil der CD103 Expression auf CD8-positiven Lymphozyten deutlich höher als auf CD4-Lymphozyten. Der erhöhte Anteil CD103 exprimierender T-Zellen bei EAA Patienten ist somit im Wesentlichen bedingt durch den signifikant höheren Anteil an CD8-positiven in der BALF bei diesem Patientenkollektiv.

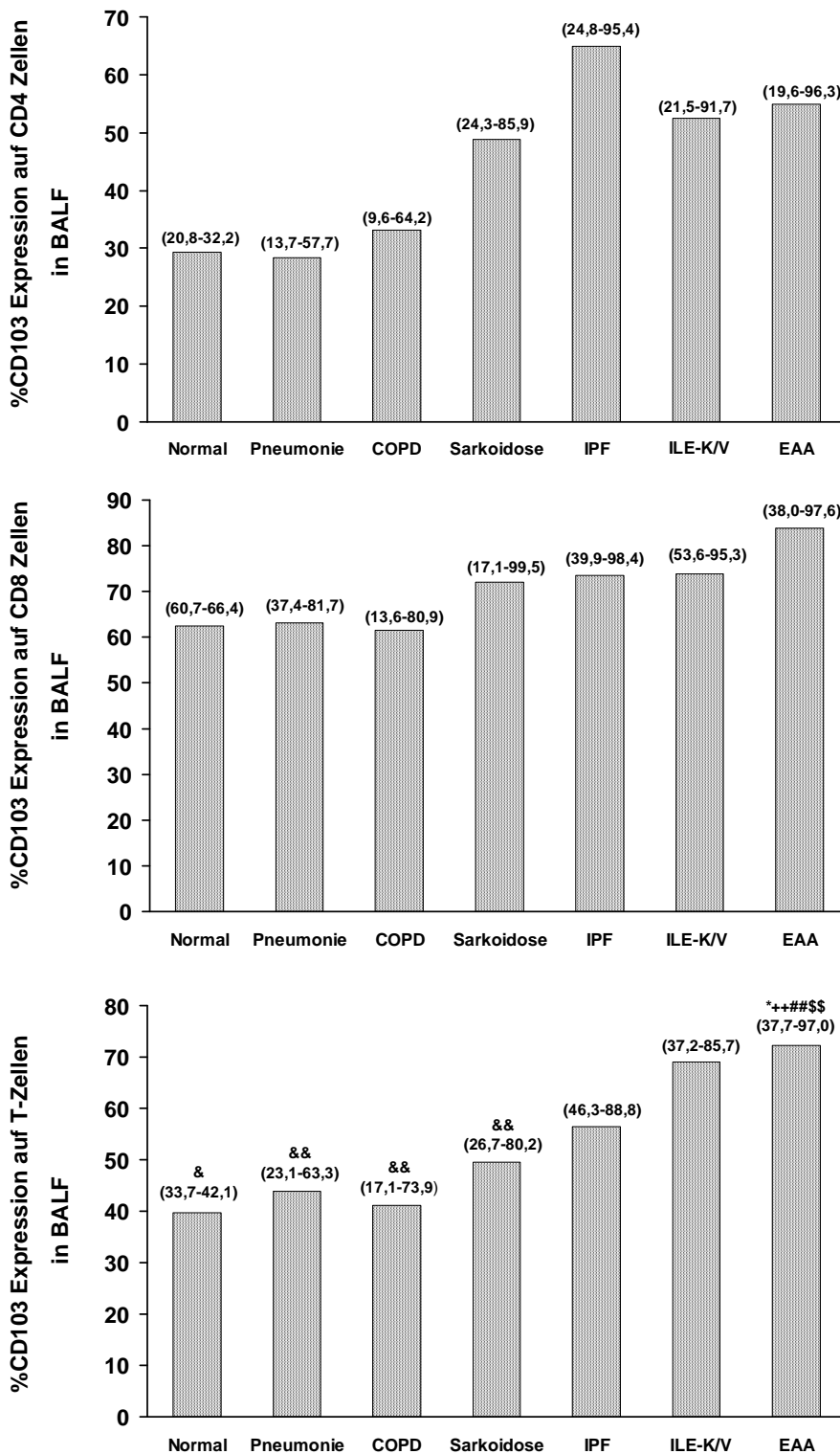


Abb. 10: Proportionen der Expression von CD103 auf CD4- (oberes Diagramm), CD8- (mittleres Diagramm) und Gesamt-T-Zellen (unteres Diagramm) in der BALF, determiniert durch Immunfluoreszenz und flowzytometrische Analyse. Die Ergebnisse sind als Prozentzahlen im Median mit der Spannweite angegeben. Alle Patientenkollektive und Normalpersonen wurden untereinander auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht und durch folgende Zeichen dargestellt:

* P < 0,05 versus Normalperson; ** P < 0,01 versus Normalperson;

+ P < 0,05 versus Pneumonie; ++ P < 0,01 versus Pneumonie; # P < 0,05 versus COPD; ## P < 0,01 versus COPD

§ P < 0,05 versus Sarkoidose; §§ P < 0,01 versus Sarkoidose; § P < 0,05 versus IPF; §§ P < 0,01 versus IPF

° P < 0,05 versus ILE-K/V; °° P < 0,01 versus ILE-K/V; & P < 0,05 versus EAA; && P < 0,01 versus EAA

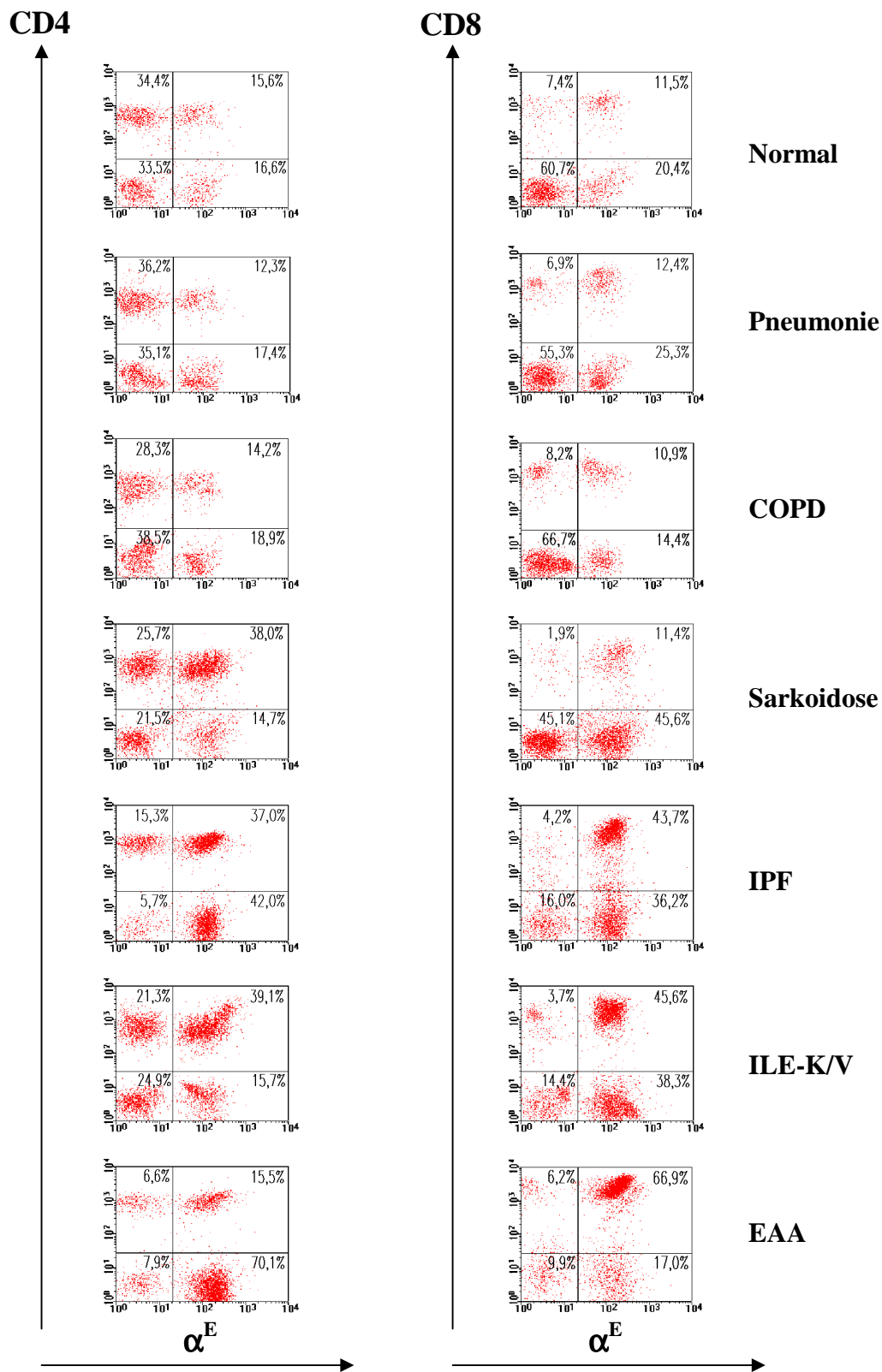


Abb. 11: Repräsentative flowzytometrische Profile der CD 103 (α^E) Expression von CD4⁺ und CD8⁺ BALF Lymphozyten bei Normalpersonen sowie Patienten mit Pneumonie, COPD, Sarkoidose, IPF, ILE-K/V und EAA. Die "Dot-Plot"-Darstellungen der FACS-Analyse zeigen die Fluoreszenzintensität der BALF Lymphozyten nach Markierung durch FITC-konjugierte anti- α^E (b-ly7) (Abszisse, log. Skala) und PE-konjugierte anti-CD4 (Leu-3a) oder anti-CD8 (Leu-2a) Antikörper (Ordinate, log. Skala).

3.2 RANTES Proteinkonzentration in BALF

Mit Hilfe der ELISA-Technik wurden die RANTES Proteinkonzentrationen in der BALF bei allen Patientenkollektiven und Normalpersonen ermittelt.

Die medianen RANTES Proteinspiegel in der BALF von Patienten mit ILE (IPF: 107,72 (0,0-517,7) pg/ml, ILE-K/V: 121,79 (0,0-121,79) pg/ml, Sarkoidose: 132,92 (0,0-993,81) pg/ml, EAA: 250,5 (84,99-2077,33) pg/ml) waren gegenüber Normalpersonen (0,0 (0,0-68,75) pg/ml), Patienten mit Pneumonie (0,0 (0,0-183,84) pg/ml) und COPD (0,0 (0,0-91,95) pg/ml) signifikant erhöht ($p < 0,01$) (Abb.12). Die höchsten RANTES Proteinkonzentrationen im Median und Maximalwert fanden sich bei EAA-Patienten, die im Gegensatz zu allen anderen Patientenkollektiven durchgehend messbare BALF RANTES Spiegel (Minimalwert: 84,99 pg/ml) aufwiesen. Interessanter Weise wurden bei einigen Patienten mit Pneumonie erhöhte RANTES Proteinlevel in BALF gemessen. Sechs Patienten mit Pneumonie wiesen RANTES Proteinkonzentrationen (107,27-183,84 pg/ml BALF) auf, die über den gemessenen Maximalwerten von Normalpersonen (68,75 pg/ml) und Patienten mit COPD (91,95 pg/ml) lagen.

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede der RANTES Proteinkonzentration in der BALF zwischen Rauchern und Nichtrauchern (Normalpersonen: $p = 0,637$; Pneumonie: $p = 0,544$; COPD: $p = 0,402$; IPF: $p = 0,349$; Sarkoidose: $p = 0,46$; EAA: $p = 0,155$) und zwischen Patienten mit und ohne inhalative Steroidbehandlung (COPD: $p = 0,802$; ILE-K/V: $p = 0,519$; IPF: $p = 0,586$; Sarkoidose: $p = 0,873$; EAA: $p = 0,181$). Wegen der geringen Anzahl von Rauchern (jeweils ein Patient) in der Patientengruppe mit ILE-K/V und von Patienten mit inhalativer Steroidbehandlung im Pneumoniekollektiv konnten in diesen beiden Gruppen keine entsprechenden Vergleichsuntersuchungen durchgeführt werden.

RANTES Proteinlevel in pg/ml BALF

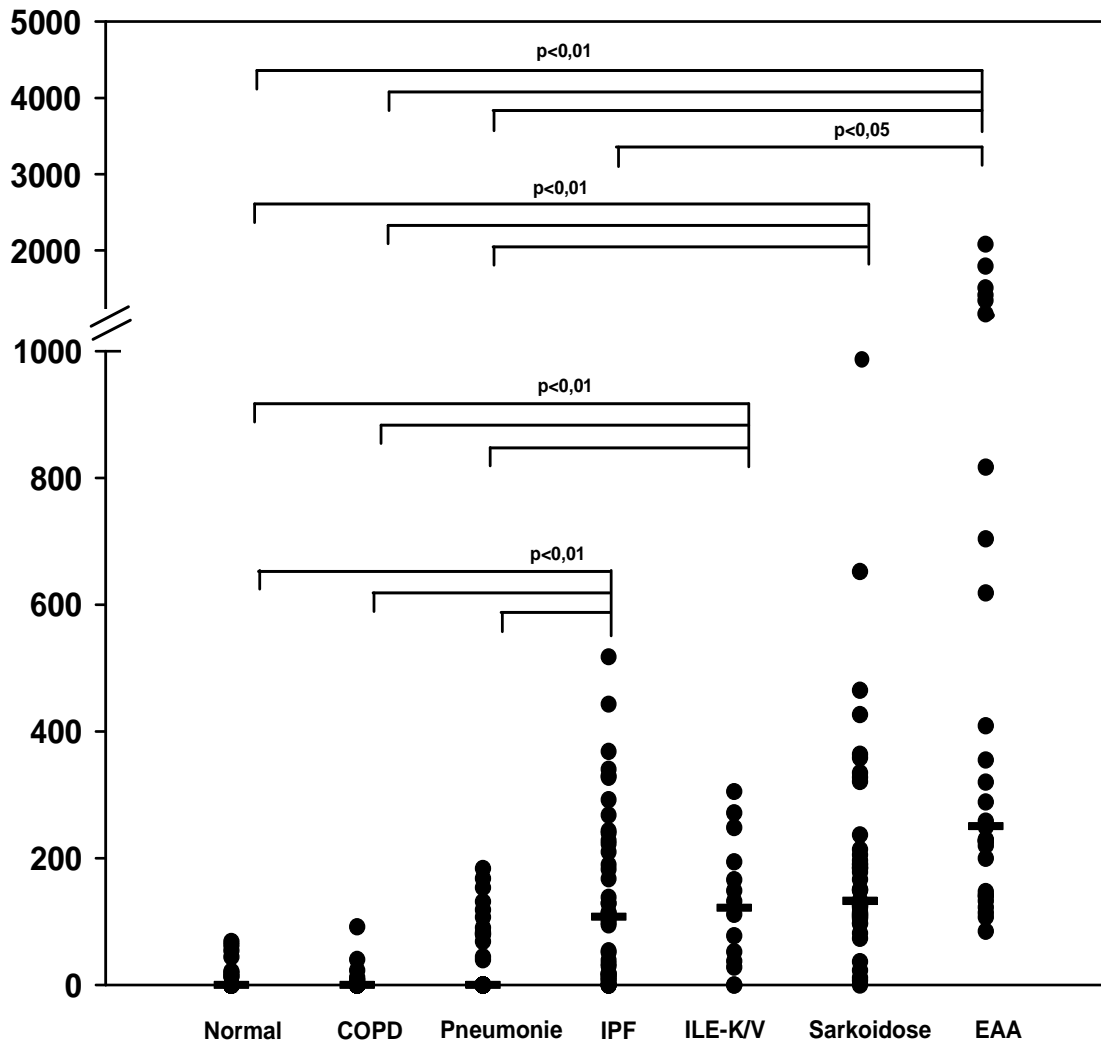


Abb. 12: RANTES Proteinspiegel in pg/ml BALF, analysiert durch ELISA-Technik. Verglichen wurden Normalpersonen und Patienten mit COPD, Pneumonie, IPF, ILE-K/V, Sarkoidose und EAA. Dargestellt sind die Einzelwerte (•) und die Medianwerte (-) sowie die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Kollektiven ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$).

3.2.1 Korrelation zwischen der RANTES Proteinkonzentration in der BALF und der BAL-Zytologie

Bei der gepoolten Analyse aller Patientenkollektive und Normalpersonen fand sich eine signifikante Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil der Gesamtlmphozyten an den lavagierten Zellen und den RANTES Proteinspiegeln in der BALF ($r = 0,384$; $p < 0,001$) (siehe Abb.13, oberes Diagramm). Außerdem fand sich eine schwache, aber signifikante Korrelation der RANTES Proteinkonzentrationen in der BALF mit dem prozentualen Anteil der CD8 Lymphozyten an der Gesamtlmphozytenpopulation ($r = 0,192$; $p < 0,05$) und eine schwache, aber signifikante inverse Korrelation mit dem Anteil der CD4 Lymphozyten an der Gesamtlmphozytenpopulation in der BALF ($r = -0,212$; $p < 0,05$, siehe Abb.13, mittleres und unteres Diagramm).

Die gepoolte Analyse aller Patientenkollektive und Normalpersonen zeigte darüber hinaus eine signifikante Korrelation zwischen dem Anteil der Gesamt-T-Zellen in der BALF, die CD103 exprimieren, und dem RANTES Proteinspiegel in BALF ($r = 0,440$, $p < 0,001$, siehe Abb.14 oberes Diagramm). Auch für die CD4- und CD8 positiven BALF Subpopulationen korrelierte der Anteil CD103 positiver Zellen bei allen Patientengruppen und Normalpersonen schwach, aber signifikant mit der RANTES Proteinkonzentration in BALF (CD103 auf CD4-Zellen: $r = 0,236$; $p = 0,05$; CD103 auf CD8-Zellen: $r = 0,257$; $p < 0,05$, siehe Abb.14, mittleres und unteres Diagramm).

Zwischen der BALF Recovery Rate, der BALF Gesamtzellzahl, dem Anteil der Alveolarmakrophagen, neutrophilen, eosinophilen oder basophilen Granulozyten in der BALF und dem CD4/CD8-Quotienten und der RANTES Proteinkonzentration in BALF fanden sich keine signifikanten Korrelationen.

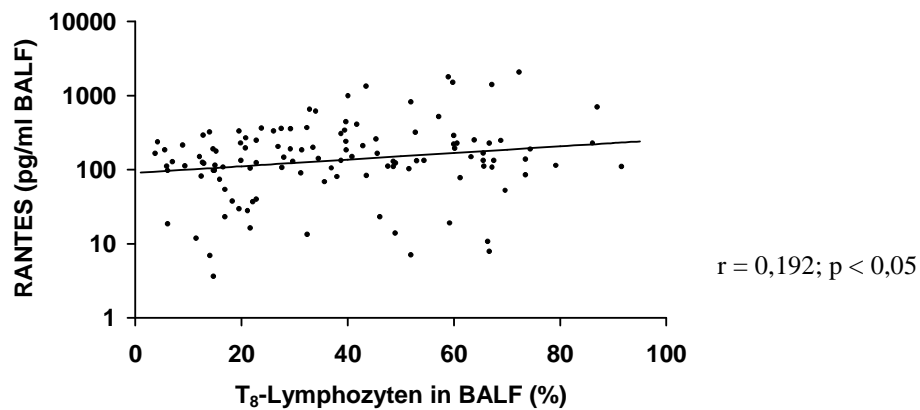
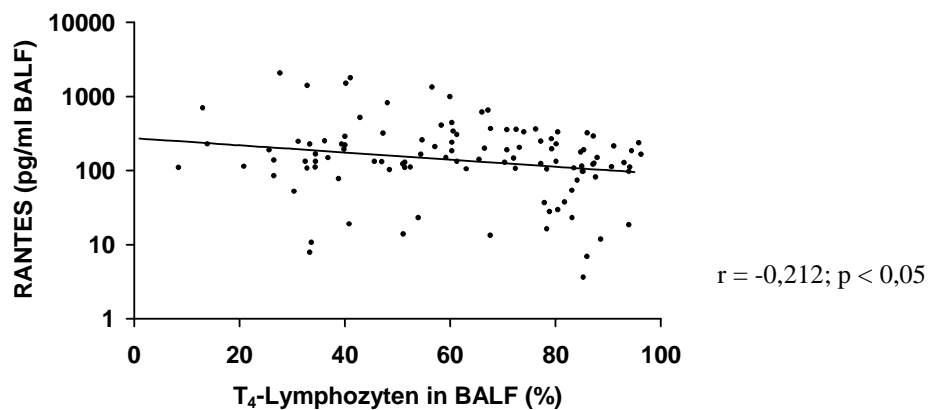
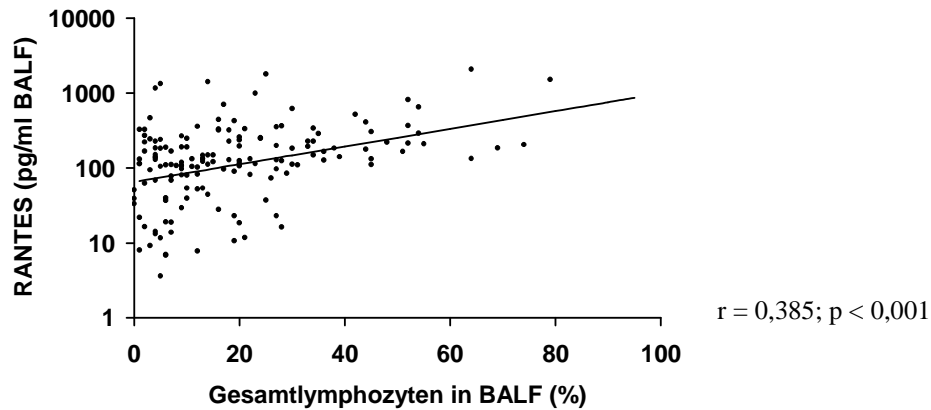


Abb.13: Korrelation zwischen der RANTES Proteinkonzentration in der BALF und dem prozentualen Anteil der Lymphozyten an den lavagierten Zellen (oberes Diagr.), sowie des prozentualen Anteils der CD4-Lymphozyten (mittleres Diagr.) und CD8-Lymphozyten (unteres Diagr.) an der Gesamtlymphozytenpopulation in der BALF in der gepoolten Analyse von Normalpersonen, sowie Patienten mit Pneumonie, COPD, IPF, ILE-K/V, Sarkoidose und EAA. Die Abszisse zeigt die Zellproportionen (%) in linearer Darstellung. Die RANTES Proteinspiegel in der BALF (pg/ml) sind auf der Ordinate in einer 4 - Dekaden logarithmischen Darstellung abgebildet.

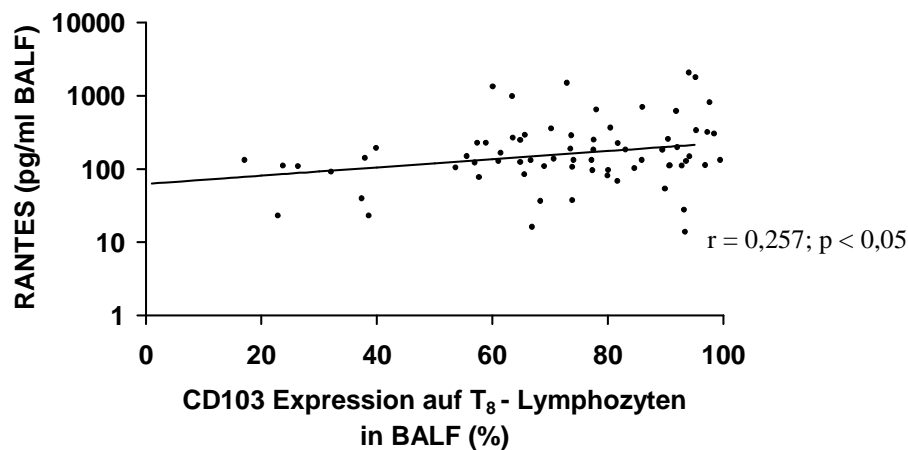
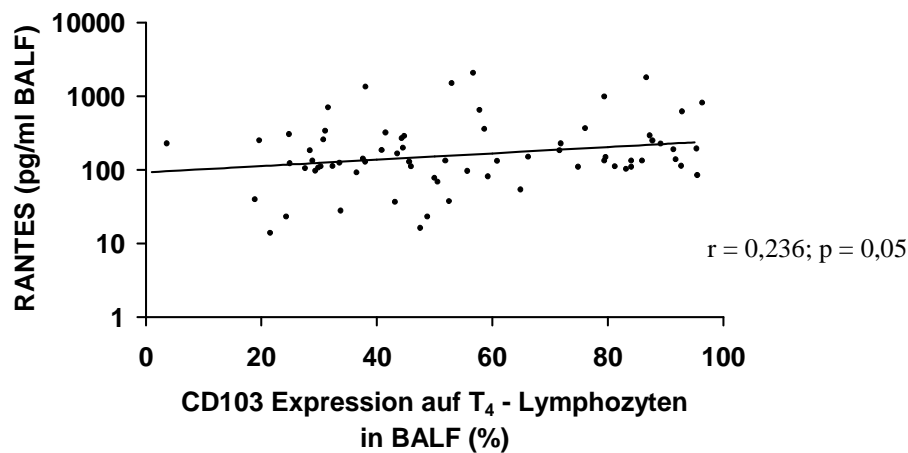
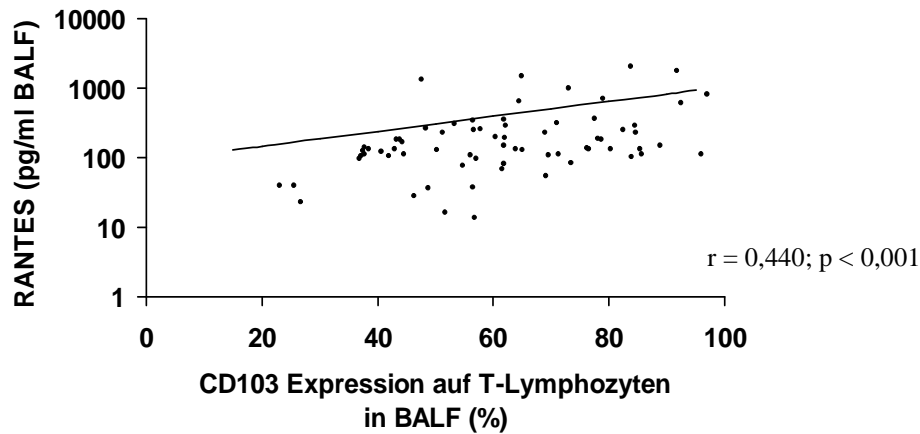


Abb.14: Korrelation zwischen der RANTES Proteinkonzentration in der BALF und dem prozentualen Anteil CD103 tragender Zellen in der CD3-positiven Gesamt-T-Zellpopulation (oberes Diagr.), sowie in den CD4-positiven (mittleres Diagr.) und CD8-positiven (unteres Diagr.) T-Zell Subpopulationen in der BALF in der gepoolten Analyse von Normalpersonen und Patienten mit Pneumonie, COPD, IPF, ILE-K/V, Sarkoidose und EAA. Die Abszisse zeigt die Proportionen (%) der Expression von CD103 auf BALF Gesamt T-, CD4-, und CD8-Lymphozyten in linearer Darstellung. Die RANTES Proteinspiegel in der BALF (pg/ml) sind auf der Ordinate in einer 4 - Dekaden logarithmischen Darstellung abgebildet.

3.3 Korrelation zwischen RANTES Proteinkonzentrationen in der BALF und Lungenfunktionsparametern

Die nachfolgenden Korrelationen wurden für das gepoolte Kollektiv aller Patienten mit Pneumonie, COPD, IPF, ILE-K/V, Sarkoidose und EAA und die Kontrollgruppe ermittelt.

Es fand sich eine schwache, aber signifikante inverse Korrelation zwischen der RANTES Proteinkonzentration in BALF und der VC%S. für das gepoolte Patientenkollektiv ($r_s = -0,359$; $p < 0,001$). Die Diffusionskapazität, $TLCO_{SB}\%$ S., korrelierte ebenfalls invers signifikant mit der RANTES Proteinkonzentration in der BALF für das gepoolte Patientenkollektiv ($r_s = -0,386$; $p < 0,001$).

Demgegenüber wurden keine signifikanten Korrelationen zwischen den Lungenfunktionsparametern $FEV_1\%$ S., $FEV_1/VC\%$ S. und PO_2 (mmHg) und der RANTES Proteinkonzentration in BALF beobachtet.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die BALF von 34 Normalpersonen und 226 Patienten mit ILE, Pneumonie oder COPD hinsichtlich der RANTES Proteinspiegel, der BAL-Differentialzytologie, sowie der CD4, CD8 und CD103 (HML-1) Expression auf BALF Lymphozyten untersucht. Zusätzlich wurden Lungenfunktionsparameter der verschiedenen Patientenkollektive als Maß für den pulmonalen Organschaden evaluiert. Die Quantifizierung nichtzellulärer Bestandteile im alveolären Kompartiment wird durch die dynamische Flüssigkeitsbewegung zwischen Kapillaren und Alveolen und die Verdünnung der Alveolarflüssigkeit durch die instillierte Kochsalzlösung erschwert (49). Eine oftmals favorisierte Bezugsgröße für die flüssigen Substanzen ist das Epitheliale Lining Fluid-Volumen kalkuliert nach der Harnstoffmethode (47, 99). Harnstoff besitzt ein niedriges Molekulargewicht und eine hohe Diffusionsrate. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Harnstoffkonzentration während der Zeit, die benötigt wird, um die BALF zu instillieren und aspirieren, ansteigt (125, 70). Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit den Richtlinien der „European Respiratory Society“ (38) auf die Kalkulation nach der Harnstoffmethode verzichtet.

Die BAL-Differentialzytologie bestätigte die aus der Literatur bekannte Zellverteilung für die verschiedenen ILEs und Kontrollkollektive. Im BALF-Zytozentrifugenpräparat der Normalpersonen überwogen mit 91% deutlich die Alveolarmakrophagen (54). Die Patientengruppe mit Pneumonie zeigte eine erhöhte BALF Gesamtzellzahl und einen erhöhten prozentualen Anteil an neutrophilen Granulozyten (121, 98). Patienten mit COPD zeichneten sich ebenfalls durch eine Erhöhung der Zahl der neutrophilen Granulozyten in der BALF aus (92, 71, 118).

Eine lymphozytäre Alveolitis konnte bei Patienten mit Sarkoidose (im Median 20% Lymphozyten), EAA (im Median 24,5% Lymphozyten) und ILE-K/V (im Median 20% Lymphozyten) festgestellt werden. Die absolute Lymphozytenzahl/ml BALF ergab bei Patienten der Sarkoidose- und EAA-Gruppe die höchsten Werte. In Übereinstimmung mit der Literatur fand sich im Sarkoidose Kollektiv ein signifikant erhöhter medianer CD4/CD8 Quotient von 5 (91), während das EAA Kollektiv einen signifikant erniedrigten medianen CD4/CD8 Quotienten von 0,7 aufwies (112, 109, 22).

Bei Patienten mit IPF konnte eine Vermehrung der Neutrophilenzahl detektiert werden, gleichzeitig war der Anteil der Lymphozyten und/oder Eosinophilen leicht erhöht (124, 56, 123). Das Krankheitsbild der IL-K/V war durch eine Vermehrung der Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten und einen erniedrigten CD4/CD8 Quotienten gekennzeichnet (8, 34).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass RANTES in die Rekrutierung von Lymphozyten, insbesondere von CD4- und CD8-positiven T-Zellen involviert ist (115, 61, 55). Entsprechend fanden wir bei Normalpersonen, d.h. bei fehlender Inflammation, keine signifikant erhöhte RANTES-Spiegel, während alle Patientenkollektive mit ILE passend zum erhöhten Lymphozytenanteil in der BALF auch statistisch signifikant erhöhte RANTES Proteinkonzentrationen in der BALF aufwiesen. Bei Patienten mit EAA und Sarkoidose, die durch eine ausgeprägte lymphozytäre Alveolitis charakterisiert sind, fanden sich die höchsten mittleren RANTES-Proteinkonzentrationen in der BALF. Bei der gepoolten Analyse aller Patientenkollektive und den Normalpersonen fand sich eine schwache Korrelation der BALF RANTES Konzentration mit dem prozentualen Anteil der Lymphozyten an den lavagierten Zellen. Dies spricht für eine Assoziation der RANTES Proteinspiegel mit dem Ausmaß der Lymphozytenrekrutierung bei ILE. Es bestätigt frühere Studien, in denen bei Sarkoidose und fibrosierender Alveolitis erhöhte RANTES mRNA Spiegel in Alveolarmakrophagen und erhöhte RANTES Proteinlevel in der BALF nachgewiesen wurden, die eine signifikante Korrelation mit dem Anteil CD45RO⁺ Lymphozyten in der BALF zeigten (89). In der gepoolten Analyse aller Patientenkollektive inklusive den Normalpersonen fand sich eine signifikante Korrelation zwischen RANTES Spiegel in der BALF und dem Anteil der CD8-Zellen an der Gesamtlymphozytenpopulation, sowie eine korrespondierende signifikante inverse Korrelation der RANTES Spiegel in der BALF mit dem prozentualen Anteil der CD4-Zellen an der Gesamtlymphozytenpopulation. Im Gesamtpatientenkollektiv scheint somit die Höhe der RANTES Spiegel in BALF, bedingt durch die besonders hohen RANTES Spiegel bei EAA Patienten, mit einer CD8-Dominanz der rekrutierten Lymphozyten assoziiert zu sein. Da jedoch auch Sarkoidose Patienten mit CD4-dominanter lymphozytärer Alveolitis gegenüber dem Normalkollektiv deutlich erhöhte RANTES Spiegel in der BALF aufweisen, lässt sich aus den vorliegenden Daten kein differentieller Einfluss der RANTES-Konzentration in der BALF auf die präferentielle Rekrutierung CD8- oder CD4-positiver T-Zell Subpopulationen in das alveoläre

Kompartiment ableiten. Zur weiteren Klärung der Rolle von RANTES für die präferentielle Rekrutierung von T-Zellsubpopulationen in den Alveolarraum sind Untersuchungen an größeren EAA- oder Sarkoidose Kollektiven, sequentielle Analysen und Untersuchungen in experimentellen Modellen erforderlich.

Bei den Patientenkollektiven mit IPF und IL-K/V fanden sich in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls signifikant erhöhte RANTES Konzentrationen in der BALF, obwohl der Lymphozytenanteil in der BALF bei diesen Kollektiven deutlich niedriger war als bei Sarkoidose und EAA Patienten. Dies spricht dafür, dass möglicherweise noch andere Faktoren das Ausmaß der Lymphozytenrekrutierung in den Alveolarraum mitbestimmen. RANTES ist nicht das einzige CC-Chemokin, das die Fähigkeit besitzt T-Zellen zu rekrutieren. MCP-1 – MCP-4, MCP1 α , MIP-1 β und I-309 besitzen ebenfalls diese Eigenschaft (48, 115, 61) und sind in diesem Zusammenhang zu berücksichtigen.

RANTES kann ebenso wie die CC-Chemokine Eotaxin, MIP-1 α und MCP-3 – 4 (48) auch die Migration von eosinophilen Granulozyten induzieren. Teran et al. fanden bei Patienten mit Asthma bronchiale eine signifikante Korrelation zwischen der RANTES Proteinkonzentration in der BALF und der Zahl der eosinophilen Granulozyten. Bei den von uns untersuchten Patientengruppen fand sich demgegenüber keine Korrelation zwischen den RANTES Proteinkonzentrationen und dem Anteil eosinophiler Granulozyten in der BALF. Dies spricht dafür, dass bei ILE Patienten noch andere chemotaktische Faktoren in die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten involviert sind. In der Pneumonie- und COPD-Gruppe war die mediane RANTES Proteinkonzentration nicht signifikant gegenüber Normalpersonen erhöht. Allerdings fanden wir hohe RANTES Proteinkonzentrationen in der BALF von langzeitbeatmeten Patienten mit chronischer Pneumonie. Bisherige Studien haben gezeigt, dass Fibroblasten nach geeigneter Stimulation (mit TNF- α und IFN- γ) an der RANTES Zytokinsekretion beteiligt sind (117). Bei den langzeitbeatmeten Patienten liegt eine interstitielle Fibroblastenaktivierung bei beginnender Lungenfibrosierung vor, wodurch sich die erhöhten RANTES Proteinkonzentrationen in der BALF erklären könnten.

Interessanter Weise ließ sich für das gepoolte Gesamtkollektiv aller Patienten und Normalpersonen eine schwache, aber signifikante Korrelation der gemessenen

RANTES Proteinkonzentrationen in der BALF mit der Expression von CD103 (HML-1, α^E) auf BALF Lymphozyten nachweisen. Diese Korrelation fand sich sowohl für den Anteil CD103-positiver Gesamtlymphozyten, als auch für den Anteil CD103-positiver CD4- bzw. CD8-Lymphozyten. Offen bleibt, ob RANTES präferentiell Lymphozytensubpopulationen rekrutiert, die zu CD103-positiven Mukosa-assoziierten Lymphozyten differenzieren oder ob RANTES selbst direkt oder indirekt die Expression von CD103 auf rekrutierten Lymphozyten im alveolären Kompartiment induziert. Da für den Anteil der CD103 tragenden CD4-Zellen signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit Sarkoidose Stadium I einschließlich dem Löfgren Syndrom und Patienten mit Sarkoidose St.II-III (63, 42) nachgewiesen wurden, wäre es für weitere Studien interessant, die RANTES Proteinkonzentrationen in der BALF bei den verschiedenen Sarkoidosestadien in Relation zur CD103 Expression auf BALF Lymphozyten zu evaluieren.

Aufgrund der in dieser und anderen Arbeiten gezeigten Korrelation zwischen Lymphozytenanteil und RANTES Proteinkonzentration in der BALF (55, 89, 83, 115, 107, 61) ist es vorstellbar, dass die Konzentration von RANTES im alveolären Kompartiment mit klinischen Progressionsparametern von ILE korreliert. Die alveoläre und interstitielle Entzündung bei ILE wird durch den Verlust von Typ I Epithelzellen sowie Endothelzellen, Proliferation von Typ II Zellen und der Deposition von Kollagen und anderen extrazellulären Matrixkomponenten perpetuiert (24). Hier besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen der RANTES induzierten mononukleären Zellinfiltration und sekundärer Fibroblastenproliferation mit konsekutiver Vergrößerung des alveolären Diffusionsweges und Rigidität des Lungenparenchyms und damit Herabsetzung der Lungenfunktion bei ILE.

In der Tat konnte eine signifikante inverse Korrelation zwischen der VC% bzw. der TLCO%S und der RANTES Proteinkonzentration bei allen Patientenkollektiven mit ILE nachgewiesen werden, was auf eine mögliche Rolle von RANTES in der Pathophysiologie interstitieller Lungenerkrankungen hinweist.

Demgegenüber können RANTES Proteinkonzentrationen in der BALF aufgrund der breiten Streuung nicht zur diagnostischen Differenzierung verschiedener Formen interstitieller Lungenerkrankungen beitragen bzw. auch nicht ILE sicher von Normalpersonen unterscheiden. Auch bei Normalpersonen wurden RANTES Proteinlevel bis 68,75 pg/ml gemessen, während bei Patienten mit IPF, ILE-K/V und Sarkoidose auch RANTES Spiegel von 0,00 pg/ml auftraten. Mögliche Gründe für

erhöhte RANTES Spiegel bei Normalpersonen könnten inapparente Virusinfekte oder inhalative Noxen sein. Bei der IPF, Sarkoidose und IL-K/V könnten unterschiedliche Krankheitsphasen, die hier nicht weiter differenziert wurden, für die breite Streuung der RANTES Proteinkonzentrationen in der BALF verantwortlich sein. Es wäre interessant, in zukünftigen Studien verschiedene Krankheitsphasen von ILE bezüglich der RANTES Expression zu evaluieren und den Verlauf der RANTES Spiegel bei therapeutischer Intervention mit z.B. Corticosteroiden oder Immunsuppressiva zu beobachten.

Insgesamt zeigt die hier durchgeführte retrospektive Analyse, dass Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen im Median signifikant höhere RANTES Proteinkonzentrationen in der BALF aufweisen als Normalpersonen. Die Höhe der RANTES Spiegel in der BALF korrelierte mit dem Lymphozytenanteil der aus der Lunge lavagierten Zellen. Erstmals ließ sich eine Korrelation der RANTES Spiegel in der BALF mit dem Anteil CD103 exprimierender Lymphozyten nachweisen, deren Anteil mit der Fibroseprogredienz bei Sarkoidosepatienten assoziiert zu sein scheint (41).

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Lungenfunktionsdaten und zytologische Befunde der bronchoalveolären Lavage von insgesamt 260 Patienten aus folgenden Kollektiven retrospektiv ausgewertet: Sarkoidose (n=48), Idiopathische Lungenfibrose (IPF, n=46), Interstielle Lungenerkrankung bei Kollagenose/Vaskulitis (ILE-K/V, n=14), Exogen allergische Alveolitis (EAA, n=30), Pneumonie (n=37) und Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD, n=51). Diese wurden einem Normalkollektiv (n=34) von freiwilligen Probanden gegenübergestellt. Außerdem wurden bei allen Patientenkollektiven und dem Normalkollektiv die RANTES Proteinkonzentrationen in der BALF mittels ELISA-Technik bestimmt.

Der Median der RANTES Proteinkonzentration in der BALF war bei interstitiellen Lungenerkrankungen (ILE) signifikant höher als bei Normalpersonen und Patienten mit Pneumonie und COPD, diskriminierte aber nicht zwischen den verschiedenen Formen der interstitiellen Lungenerkrankungen.

Es fand sich im Gesamtpatientenkollektiv und den Normalpersonen eine signifikante Korrelation der RANTES Proteinkonzentrationen in der BALF mit dem prozentualen Anteil der Lymphozyten an den lavagierten Zellen. Pulmonal produziertes RANTES könnte daher an der Lymphozytenrekrutierung in das alveoläre Kompartiment beteiligt sein. Außerdem zeigte sich im Gesamtpatientenkollektiv inklusive den Normalpersonen eine schwache positive Korrelation der RANTES Proteinkonzentrationen in der BALF mit dem Anteil der CD8 und eine inverse Korrelation mit dem Anteil der CD4 positiven T-Zellen an der Gesamtlymphozytenpopulation. Dies ist bedingt durch die besonders hohen RANTES Spiegel in der BALF bei Patienten mit EAA mit einer CD8-dominierten lymphozytären Alveolitis.

Es konnte keine Korrelation zwischen der RANTES Proteinkonzentration in der BALF und dem Anteil der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, sowie Alveolarmakrophagen in der BALF verifiziert werden. Demgegenüber ließ sich erstmals eine signifikante positive Korrelation der RANTES Proteinkonzentration in der BALF mit der Expression des Integrins CD103 auf Gesamt-T-Lymphozyten, sowie auf CD4- und CD8-positiven T-Zell Subpopulationen in der BALF nachweisen. Bezüglich der Lungenfunktion konnte eine signifikante inverse Korrelation der RANTES Proteinkonzentration in der BALF mit der Vitalkapazität (VC%) und der

Diffusionskapazität (TLCO%) im Gesamtpatientenkollektiv inklusive den Normalpersonen gezeigt werden.

Diese Befunde weisen auf eine mögliche Rolle von alveolär freigesetztem RANTES in der Pathophysiologie von interstitiellen Lungenerkrankungen hin.

6 Summary

In the present study cytological findings and pulmonary functions of the bronchoalveolar lavage fluid were analysed retrospectively of a group of 260 patients including the following cohorts: Sarkoidosis (n = 48), idiopathic pulmonary fibrosis (IPF, n = 46), interstitial lung disease with collagensis and vasculitis (ILE-K/V, n = 14), exogen allergic alveolitis (EAA, n = 30), pneumonia (n = 37), chronic obstructive pulmonary disease (COPD, n = 51) and a control cohort (n = 34). Furthermore, RANTES protein concentrations in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured by performing enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in all cohorts including the control cohort.

Mean RANTES-protein concentrations of BALF revealed by ELISA analysis were significantly increased in interstitial lung diseases (ILD) compared to pneumonia, COPD and control, while no alterations were found within distinct types of ILD.

Moreover, RANTES-protein level of BALF showed a significant positive correlation to the percental lymphocyte amount of lavaged cells in all cohorts including the control. Therefore RANTES of pulmonary origin could contribute to the alveolar recruitment of lymphocytes. Further, RANTES-protein level of all cohorts including the control cohort were positively low grade correlated to the amount of CD8⁺ T-cells, whereas the amount of CD4⁺ T-cells was negatively correlated to RANTES compared to the total population of lymphocytes. This is caused by particularly increased RANTES level in patients with EAA with a CD8 dominated lymphocyte alveolitis.

RANTES protein concentration was not correlated to the amount of neutrophil and eosinophil granulocytes and alveolar macrophages in BALF. Interestingly, a significant positive correlation between RANTES protein level and the expression of the integrin CD103 on the total population of T-lymphocytes as well as CD4⁺ and CD8⁺ subpopulation could be demonstrated in all cohorts including the control for the first time.

According to the pulmonary function we found an inverse correlation of RANTES to the vital capacity (VC %) and the diffusing capacity of the lung for carbon monoxide (TLCO %) in all cohorts including the control cohort.

These findings indicate that RANTES released by alveolae could be a relevant aspect in the pathophysiology of interstitial lung diseases.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin- Biotin- Komplex
ABTS	2,2-Azino-di (3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure- (6)
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACR	American College of Rheumatology
Ak	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BGA	Blutgasanalyse
BTPS	Body Temperature, Pressure, Saturated
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of differentiation
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAA	Exogen allergische Alveolitis
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FEV ₁	Forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde (Einsekundenkapazität)
FEV ₁ %/S.	FEV ₁ in % vom Sollwert
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forwardscatter
g	Wert der Erdbeschleunigung (9,81m/s)
HBSS	Hanks' balanced salts solution
HML-1	human mucosal lymphocyte-1 antigen
HRCT	High resolution Computertomographie
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IFN- γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin

ILE	Interstitielle Lungenerkrankung
ILE-K/V	Interstitielle Lungenerkrankung bei Kollagenose /Vaskulitis
Ilx	Interleukin x
IPF	Idiopathische Lungenfibrose
LTB4	Leukotrien B4
MCP-1-4	monocyte chemoattractant protein 1-4
MIP-1 α,β	macrophage inflammatory protein 1 α,β
MCTD	Mixed connective tissue disease
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBS	Phosphatpuffer
PE	Phycoerythrin
PDGF	platelet derived growth factor
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
RANTES	regulated on activation normal T-cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
r_s	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
RT	Raumtemperatur
S-IL-2R	Serum-Interleukin-2 Rezeptor
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SSC	Sidescatter
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor- β
TLCO _{SB}	Diffusionskapazität, Single Breath
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor - α
VC	Vitalkapazität
VC%S.	VC in % vom Sollwert
VCAM-1	vaskuläres Adhäsionsmolekül-1
WHO	World Health Organisation

8 Abbildungsverzeichnis

- Abb.1 Differentialzellbild der BAL einer Normalperson
- Abb.2 Differentialzellbild der BAL eines Patienten mit Pneumonie
- Abb.3 Differentialzellbild der BAL eines Patienten mit COPD
- Abb.4 Differentialzellbild der BAL eines Patienten mit IPF
- Abb.5 Differentialzellbild der BAL eines Patienten mit ILE-K/V
- Abb.6 Differentialzellbild der BAL eines Patienten mit Sarkoidose
- Abb.7 Differentialzellbild der BAL eines Patienten mit EAA
- Abb.8 Schematischer Aufbau des Doppel-Sandwich-ELISA
- Abb.9 Darstellung der prozentualen Verteilung der CD4 - und CD8 - Lymphozyten in der BALF
- Abb.10 Proportionen der Expression von CD103 auf CD4 -, CD8 - und Gesamt - T-Zellen in der BALF
- Abb.11 Repräsentative flowzytometrische Profile der CD103 Expression von CD4 und CD8 BALF Lymphozyten bei Normalpersonen sowie den untersuchten Patientenkollektiven
- Abb.12 RANTES Proteinlevel in pg/ml BALF
- Abb.13 Korrelation zwischen der RANTES Proteinkonzentration in der BALF und dem prozentualen Anteil der Lymphozyten an den lavagierten Zellen sowie des prozentualen Anteils der CD4-Lymphozyten und CD8-Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenpopulation in der BALF.
- Abb.14 Korrelation zwischen der RANTES Proteinkonzentration in der BALF und dem prozentualen Anteil CD103 tragender Zellen in der CD3-positiven Gesamt-T-Zellpopulation sowie in den CD4-positiven und CD8-positiven T-Zell Subpopulationen in der BALF.

9 Tabellenverzeichnis

Tab.1	Erregerspektrum der untersuchten Pneumonien
Tab.2	Verschiedene Formen der EAA nach Sennekamp
Tab.3	Demographische, lungenfunktionelle und BAL - zytologische Daten der untersuchten Patientenkollektive

10 Literaturverzeichnis

1. AINSLIE,G., R.M.DU BOIS, L.W.POULTER. Relation between immunocytological features of bronchoalveolar lavage fluid and clinical indices in sarkoidosis. *Thorax* 1989;44:501-9
2. ALAM,R., S.STAFFORD, P.FORSYTHE, R.HARRISON, D.FAUBION, J.A.GRANT. RANTES is a chemotactic and activating for human eosinophils. *J Immunol* 1993;150:3442-8
3. ANTONIADES,H.N., M.A.BRAVO, R.E.AVILA, T.GALANOPOULOS, J.NEVILLE-GOLDEN, M.MAXWELL, M.SELMAN. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1990 Oct;86(4):1055-64
4. BACON,K.B., B.A.PREMACK, P.GARDNER, T.J.SCHALL. Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science* 1995;269:1727-30
5. BAGGIOLINI,M., B.DEWALD, B.MOSER. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines, CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994;55:97-179
6. BALKWILL, F.R., BURKE, F. The cytokine network. *Immunol. Today* 10:299-304, 1989.
7. BECKER,S., W.REED, F.W.HENDERSON, T.L.NOAH. RSV infection of human airway epithelial cells causes production of the β -chemokine RANTES. *Am J Physiol* 1997;272:512-20
8. BERGROTH,V., Y.T.KONTTINEN, H.PIIRAINEN, E.JOHANSSON, D.NORDSTROM, M.MALMSTROM. Evaluation of lymphocyte activation in skin lesions of patients with mixed connective tissue disease and discoid lupus erythematoses. *Arch Dermatol Res* 1988;280(1):1-4
9. BROECKELMANN,T.J., A.H.LIMPER, T.V.COLBY, J.A.McDONALD. Transforming growth factor β 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 Aug 1;88(15):6642-6
10. CAMPBELL,D.A., L.W.POULTER, R.M.DU BOIS. Immunocompetent cells in bronchoalveolar lavage reflect the cell populations in transbronchial biopsies in pulmonary sarcoidosis. *Amer. Resp. Dis.* 132 (1985) 1300-1306

11. CAPELLI,A., A.DI STEFANO, I.GNEMMI, P.BALBO, C.G.CERUTTI, B.BALBI, M.LUSUARDI, C.F.DONNER. Increased MCP-1 and MIP-1 β in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. *Eur Respir J* 1999;14:160-5
12. CARRE,P.C., R.L.MORTENSON, T.E.Jr KING, P.W.NOBLE, C.L.SABLE, D.W.RICHES. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J Clin Invest* 1991 Dec;88(6):1802-10
13. CARTER,W.G., WAYNER,E.A., BOUCHARD,T.S., KAUR,P. The role of integrin α 2 β 1 and α 3 β 1 in cell-cell and cell-substrate adhaesion of human epidermal cells. *J. Cell Biol.* 110: 1387-1404, 1990.
14. CAVAILLON, J.-M., C. MUNOZ, C. FITTING, B. MISSET, AND J. CARLET. Circulating cytokines: The tip of the iceberg? *Circ. Shock* 38: 145-152, 1992.
15. CEPEC,K.L., SHAW,S.K., PARKER,C.M., RUSSEL,G.J., MORROW,J.S., RIMM,D.L., BRENNER, M.B. Adhaesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the $\alpha^E\beta$ 7 Integrin. *Nature* 372: 190-3, 1994.
16. CERWENKA,A., D.BEVEC, O.MAJDIC, W.KNAPP, W.HOLTER. TGF-beta 1 is a potent inducer of human effector T cells. *J Immunol* 1994;153:4367-77
17. COMBADIERE,C., AHUJA,S.K., MURPHY,P.M. Cloning and functional expression of a human eosinophil CC.chemokine receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 16491, 1995a.
18. COSTABEL,U. Atlas der bronchoalveolären Lavage, Thieme-Verlag,1994,S.18
19. COSTABEL,U. Atlas der bronchoalveolären Lavage, Thieme-Verlag,1994, S.26
20. COSTABEL,U. Atlas der bronchoalveolären Lavage, Thieme-Verlag,1994, S.20
21. COSTABEL,U., K.H.BROSS, H.MATTHYS. Pulmonary sarkoidosis: Assessment of disease activity by lung lymphocyte subpopulations. *Klein. Wsch.*61 (1983)349-356
22. COSTABEL,U., K.J.BROSS, J.MARXEN, H.MATTHYS. T-Lymphocytosis in bronchoalveolar lavage fluid of hypersensitivity pneumonitis. Changes in profile of T-cell subsets during the course of disease. *Chest* 1984 Apr;85(4):514-22
23. CRYSTAL,R.G., M.C.ROBERTS, G.W.HUNNIGHAKE, J.E.GADEK, J.D.FULMER, B.R.LINE. Pulmonary sarcoidosis: A disease characterized and perpetuated by activated lung T-lymphocytes. *Ann. Intern. Med.*94 (1981) 73-94

24. CRYSTAL,R.G., P.B.BITTERMAN, S.I.RENNARD, A.J.HANCE, B.A.KEOGH. Interstitial lung disease of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract. *N Engl J Med* 1984 Jan 19;310(3): 154-66
25. DAHINDEN,C.A., T.GEISER, T.BRUNNER, V.VON TSCHARNER, D.CAPUT, P.FERRARA, A.MINTY, M.BAGGIOLINI. Monocyte chemotactic protein 3 is a most effective basophil- and eosinophil-activating chemokine. *J Exp Med* 1994;179:751-6
26. DAVIS,W.B., G.A.FELLS, X.H.SUN, J.E.GADEK, A.VENET, R.G.CRYSTAL. Eosinophil-mediated injury to lung parenchymal cells and interstitial matrix. A possible role for eosinophils in chronic inflammation disorders of the lower respiratory tract. *J Clin Invest* 1984;74:269-78
27. DEFORGE, L.E., D.T. NGUYEN, S.L. KUNKEL, AND D.G. REMICK. Regulation of the pathophysiology of tumor necrosis factor. *J. Lab. Clin. Med. Clin. Med.* 116: 429-438, 1990.
28. DEVERGNE,O., A.MARFAING-KOKA, T.J.SCHALL, M.B.LEGER-RAVET, M.SADICK, M.PEUCHMAUR, M.C.CREVON, K.J.KIM. Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells. *J Exp Med* 1994 May 1;179(5):1689-94
29. DINARELLO, C.A. Interleukin-1. In: *The cytokine handbook*, pp. 47-82, ed. A. Thomson, Academic Press Ltd., San Diego, 1992.
30. DONLON,T.A., KRENSKY,A.M., WALLACE,M.R., COLLINS,F.S., LOVETT,M., CLAYBERGER,C. Localisation of a human T-cell-specific gene, RANTES, to chromosome 17q11.2-q12. *Genomics* 6, 548, 1990.
31. EBISAWA,M., T.YAMADA, C.BICKEL, D.KLUNK, R.P.SCHLEIMER. Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. *J Immunol* 1994;153:2153-60
32. ERLE,D.J., BROWN,T. CHRISTIAN,D. ARIS,R. Lung Epithelial Lining Fluid T Cell Subsets Defined by Distinct Patterns of b7 and b1 Integrin Expression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* Vol.10. pp.237-244, 1994.
33. FRASER,R.G., J.A.P.PARE, P.D.PARE, R.S.FRASER, G.P.GENEREUX. *Diagnosis of diseases of the chest.* 3rd ed. W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1989.

34. FUJITA,J., I.YAMADORI, T.YOSHINOUCI, Y.OHTSUKI, Y.YAMAJI, T.KAMEI, M.KOBAYASHI, Y.NAKAMURA, J.TAKAHARA. Clinical features of non-specific interstitial pneumonia. *Respir Med* 1999 Feb;93(2):113-8
35. FULWYLER,M.J. Hydrodynamic orientation of cells. *J Histochem Cytochem* 1977 Jul;25(7):781-3
36. GADEK,J.E., G.W.HUNNINGHAKE, R.L.ZIMMERMANN, R.G.CRYSTAL. Regulation of the release of alveolar macrophage-derived neutrophil chemotactic factor. *Am Rev Respir Dis* 1980 Apr;121(4):723-33
37. HAMMERL,P. Regulation der proinflammatorischen Zytokin-Synthese von humanen Alveolarmakrophagen und Monozyten durch Surfactant Protein A. Dissertation 1999, S.14.
38. HASLAM,P.L., BAUGHMAN,R.P. Report of ERS Task Force: guidelines for measurement of acellular components and standardization of BAL. *Eur Resp J* 14:245-248, 1999.
39. HASLAM,P.L., W.BAUER, V.DE ROSE, H.ECKERT, D.OLIVIERI, L.W.POULTIER, G.A.ROSSI, H.TESCHLER. The clinical role of BAL in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev* 1992;2:58-63
40. HEROLD,G. *Innere Medizin* 1999, S.539
41. HERON,M., GRUTTERS,J.C., VAN MOORSEL,C.H.M., RUVEN,H.J.T., KAZEMIER,K.M., CLAESSEN,A.M.E., VAN DEN BOSCH,J.M.M. Effect of variation in ITAGE on risk of sarkoidosis, CD 103 expression, and chest radiography. *Clinical Immunology* 133:117-125, 2009.
42. HERON,M., WALENTIA,A.T., ZANEN,P., VAN LOCHEM,E.G., HOOIJKAAS,H., VAN DEN BOSCH,J.M.M., VELZEN-BLAD,H. Evaluation of CD103 as a cellular marker for the diagnosis of pulmonary sarcoidosis. *Clinical Immunology* 126, 338-344, 2008.
43. HUNNINGHAKE, G.W., J.E. GADEK, H.M. FALES, AND R.G. CRYSTAL. Human alveolar macrophage-derived chemotactic factor for neutrophils. Stimulie and partial characterization. *J. Clin. Invest.* 66: 473-483, 1980.
44. HUNNINGHAKE,G.W., J.E.GADEK, O.KAWANAMI, V.J.FERRANS, R.G.CRYSTAL. Inflammatory and immune processes in the human lung in health and diseases: evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am J Pathol* 1979 Oct;97(1):149-206

45. HUNNINGHAKE,G.W., J.E.GADEK, T.J.LAWLEY, R.G.CRYSTAL.
Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1981 Jul;(1):259-69
46. JANEWAY,C.A.; TRAVERS,P. *Immunologie* , Spektrum, Akad. Verlag 1997 S. 358
47. JONES,K.P., J.H.EDWARDS, S.P.REYNOLDS, T.J. PETERS, B.H.DAVIES.
A comparison of albumin and urea as reference markers in bronchoalveolar lavage fluid from patients with interstitial lung disease. *Eur Respr J* 1990;3(2):152-6
48. KEANE,M.P., T.J.STANDIFORD, R.M.STRIETER. Chemokines are important cytokines in the pathogenesis of interstitial lung disease. *Eur Respir J* 1997; 10: 1199-1202
49. KELLY,C.A., J.D.FENWICK, P.A.CORRIS, D.J.HENDRICK, E.H.WALTERS. Fluid dynamics during bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1988;138(1):81-4
50. KERN,J.A., R.J.LAMB, C.J.REED, J.A.ELIAS, R.P.DANIELE. Interleukin-1 β gene expression in human monocytes and alveolar macrophages from normal subjects and patients with sarcoidosis. *Amer Rev resp Dis* 1988;137:1180-84
51. KHALIL,N., R.O`CONNOR, H.UNRUH, P.WARREN, K.C.FLANDERS, A.KEMP, O.H.BEREZNYAY, A.H.GREENBERG. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;5:155-62
52. KHORRAM,O., R.N.TAYLOR, I.P.RYAN, T.J.SCHALL, D.V.LANDERS. Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:1545-9
53. KIMMEL,P.L., I.BODI, A.ABRAHAM, T.M.PHILLIPS. Increased renal tissue cytokines in human HIV nephropathy. *J Am Soci Nephrol* 1993;4:279
54. KLECH,H., C.HUTTER. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage: Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur resp J* 1990;3:937-74
55. KODAMA,N., E.YAMAGUCHI, H.NOBUYUKI, K.FURUYA, J.KOJIMA, M.OGURI, T.TAKAHASHI, Y.KAWAKAMI. Expression of RANTES by Bronchoalveolar Cells in Nonsmoking Patients with Interstitial Lung Diseases. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* Vol.18,pp.526-531, 1998

56. KONIG,G., C.LUDERSCHMIDT, C.HAMMER, B.C.ADELMANN-GRILL, O.BRAUN-FALCO, G.FRUEHMANN. Lung involvement in scleroderma. *Chest* 1984 Mar;85(3):318-24
57. KUNA,P., S.R.REDDIGARI, T.J.SCHALL, D.RUCINSKI, M.Y.VIKSMAN, A.P.KAPLAN. RANTES a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils. *J Immunol* 1992;149:636-641
58. KWON,O.J., P.J.JOSE, R.A.ROBBINS, T.J.SCHALL, T.J.WILLIAMS, P.J.BARNES. Glucocorticoid inhibition of RANTES expression in human lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:488-96
59. LAM,S., J.C.LE RICHE, K.KIJEK. Effect of filtration and concentration on the composition of bronchoalveolar lavage fluid. *Chest* 1985 jun;87(6):740-2
60. LLOYED,A.R., J.J.OPPENHEIM, D.J.KELVIN, D.D.TAUB. Chemokines regulate T cell adherence to recombinant adhesion molecules and extracellular matrix proteins. *J Immunol* 1996;156:932-8
61. LOETSCHER,P., M.SEITZ, I.CLARK-LEWIS, M.BAGGIOLINI, B.MOSER. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2 and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *FASEB J* 1994;8(13):1055-60
62. LOHMEYER,J. J.FRIEDRICH, F.GRIMMINGER, U.MAUS, R.TENDER, H.MORR, H.G.VELCOVSKY, W.SEEGER, S.ROSSEAU. Expression of mucosa-related integrin $\alpha_E\beta_7$ on alveolar T cells in interstitial lung diseases. *Clin Exp Immunol* 1999;116:340-346
63. LOHMEYER,J., FRIEDRICH,J., GRIMMINGER,F., MAUS,U., TENTER,R., MORR,H., VELCOVSKY,H.G., SEEGER,W., ROSSEAU,S. Expression of mucosa-related integrin $\alpha^E\beta_7$ on alveolar T cells in interstitial lung diseases. *Clin Exp Immunol* 116:340-346, 1999.
64. LOHMEYER,J., J.FRIEDRICH, S.ROSSEAU, H.PRALLE, W.SEEGER. Improved multiparameter flow cytometric analysis of bronchoalveolar lavage derived inflammatory cells. *J Immunol Methods* 1994; 172:59-70.
65. LUCAS,N.W., R.M.STRIETER, S.W.CHENSUE, S.L.KUNKEL. Activation and regulation of chemokines in allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 1996;59(1):13-7
66. LUKACS,N.W., R.M.STRIETER, K.WARMINGTON, P.LINCOLN, S.W.CHENSUE, S.L.KUNKEL. Differential recruitment of leukocyte

- populations and alteration of airway hyperreactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation. *J Immunol* 1997;158:4398-404
67. LUKACS,N.W., T.J.STANDIFORD, R.M.STRIETER, S.W.CHENSUE, R.G.KUNKEL, S.L.KUNKEL. C-C chemokine-induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 1996;60:573-78
68. MAGHAZACHI,A.A., A.AL-AOUKATY, T.J.SCHALL. C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2 activated NK cells. Role for G proteins. *J Immunol* 1994;153:4969-75
69. MAIER,K., L.LEUSCHEL, U.COSTABEL. Increased levels of oxidized methionine residues in bronchoalveolar lavage fluid proteins from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:271-4
70. MARCY,T.W., W.W.MERILL, J.A.RANKIN, H.Y.REYNOLDS. Limitations of using urea to quantify epithelial lining fluid recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:1276-80
71. MARTIN,T.R., G.RAGHU, R.J.MAUNDER, S.C.SPRINGMEYER. The effects of chronic bronchitis and chronic air-flow obstruction on lung cell population recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1985 Aug;132(2):254-60
72. MARTINET,Y., W.N.ROM, G.R.GROTENDORST, G.R.MARTIN, R.G.CRYSTAL. Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1987 Jul 23;317(4):202-9
73. MIKUNIYA,T., S.NAGAI, T.TSUTSUMI, K.MORITA, T.MIO, N.SATAKE, T.IZUMI. Proinflammatory or regulated cytokines released from BALF macrophages of health smokers. *Respiration* 1999;66:419-26
74. MÜLLER-QUERNHEIM,J., STRAUSS,J., FERLINZ,R. The serum level of the secreted interleukin 2 receptor: a lymphocyte activity parameter in sarcoidosis. *Pneumologie*; 44 Suppl 1:213-4; 2/1990.
75. MURPHY,P.M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 593, 1994.
76. NAGAI,S., N.FUJIMURA, R.HIRATA, T.IZUMI. Differentiation between idiopathic pulmonary fibrosis and interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases by comparison of the ratio of OKT4+ cells and OKT8+ cells in BALF T-lymphocytes. *Eur. J. Respir. Dis.*, 1985; 67: 1-9

77. NEOTE,K., D.DI GREGORIO, J.Y.HORUK, T.J.SCHALL. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell* 1993;72:415-25
78. NEOTE,K., DIGREGORIO,D., MAK,J.Y., HORUK,R. SCHALL,T.J. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a CC chemokine receptor. *Cell* 72, 415, 1993a.
79. NEOTE,K., McCOLL,S.R. CC-chemokine receptors. In chemoattractant Ligands and their receptors. CRC Press, Boca Raton, FL. 1996
80. NEOTE,K., W.DARBONNE, J.OGEZ, R.HORUK, T.J.SCHALL. Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells. *J Biol Chem* 1993;268:12247-9
81. OLSZEWSKA-PAZDRAK,B., A.CASOLA, T.SAIRO, R.ALAM, S.E.CROWE, F.MEI, P.L.MEI, P.L.OGRA, R.P.GAROFALO. Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1 α by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J Virol* 1998;72(6):4756-64
82. OPPENHEIM, J.J. Overview of chemokines. In: *The chemokines*, pp.183-186, ed. I.J.D. Lindley et al., Plenum Press, New York, 1993
83. OSHIMA,M., A.MAEDA, S.ISHIOKA, K.HIYAMA, M.YAMAKIDO. Expression of C-C Chemokines in bronchoalveolar lavage cells from patients with granulomatous lung disease. *Lung* 1999;177:229-240
84. OZAKI,T., H.HAYASHI, K.TANI, F.OGUSHI, S.YASUOKA, T.OGURA. Neutrophil chemotactic factors in the respiratory tract of patients with chronic airway diseases or idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1992 Jan;145(1):85-91
85. PARADIS,I.L., J.H.DAUBER, B.S.RABIN. Lymphocyte phenotypes in bronchoalveolar lavage and lung tissue in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 133 (1986) 855-860
86. PARKER,C.M., K.L.CEPEK, G.J.RUSSEL, S.K.SHAW, D.N.POSNETT, R.SCHWARTING, M.B.BRENNER. A family of beta 7 integrins on human mucosal lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1924-8
87. PATTISON,J., P.J.NELSON, P.HUIE, I.VON LUETTICHAU, G.FARSHID, R.K.SIBLEY, A.M.KRENSKEY. RANTES chemokine expression in cell-

- mediated transplant rejection of the kidney. *Lancet* 1994 Jan22;343(8891):209-11
88. PATTISON,J.M., P.J.NELSON, P.HUIE, R.K.SIBLEY, A.M.KRENSLEY. RANTES chemokine expression in transplant-associated accelerated atherosclerosis. *J Heart Lung Transplant* 1996;15:1194-9
 89. PETREK,M., P.PANTELIDIS, A.M.SOUTHCOTT, P.LYMPANY, P.SAFRANEK, C.M.BLACK, V.KOLEK, E.WEIGL, R.M.DU BOIS. The source and role of RANTES in interstitial lung disease. *Eur Respir J* 1997;10:1207-1216
 90. PINGLETON,S.K., G.F.HARRISON, D..STECHSCHULTE, L.J.WESSELIUS, G.R.KERBY, W.E.RUTH. Effect of location, ph, and temperature of instillate in bronchoalveolar lavage in normal volunteers. *Am Rev Respir Dis* 1983 Dec;128(6):1035-7
 91. POULTER,L.W., G.A.ROSSI, L.BJERMER, U.COSTABEL, D.ISRAEL, H.KLECH. The value of bronchoalveolar lavage in the diagnosis and prognosis of sarcoidosis. *Eur Resp Rev* 1992,2:8,75-82
 92. POZZI,E., V.DE ROSE, S.I.RENNARD, L.M.FABBRI. Guidelines and recommendations for the clinical use of bronchoalveolar lavage in chronic bronchitis and emphysema. *Eur Resp. Rev.*, 1992,2:8,121-124
 93. PROCTOR D. F.. The upper airways. I. Nasal physiology and defence of the lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115: 97-129, 1977.
 94. PROCTOR D. F.The upper airways. II. The larynx and trachea. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115: 315-42. 1977.
 95. PYPE,J.L., L.J.DUPONT, P.MENTEN, E.VAN COILLIE, G.OPDENAKKER, J.VAN DAMME, K.F.CHUNG, M.G.DEMEDTS, G.M.VERLEDEN. Expression of MCP-1, MCP-2, and MCP-3 by human airway smooth-muscle cells. Modulation by corticosteroids and T-helper 2 cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:528-36
 96. RAPORT,C.J., GOSLING,J., SCHWEICKART,V.L., GRAY,P.W., CHARO,I.F. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP1 β and MIP-1 α . *J. Biol. Chem.* 271, 17161, 1996.
 97. RATHANASWAMI,P., M.HACHICHA, M.SADICK, T.J.SCHALL, S.R.MC COLL. Expression of the chemokine RANTES in human rheumatoid synovial

- fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1993;268:5834-9
98. RATJEN,F.,U.COSTABEL, W.HAVERS. Differtial cytology of bronchoalveolar lavage fluid in immunosuppressed children with pulmonary infiltrates. *Arch Dis Child* 1996 Jun;74(6):507-511
 99. RENNARD,S.I., G.BASSET, D.LECOSSIER, K.M.O`DONNEL, P.PINKSTON, P.G.MARTIN, R.G.CRYSTAL. Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *J App Physiol* 1986;60:532-8
 100. RENNARD,S.I., G.W.HUNNIGHAKE, P.B.BITTERMAN, R.G.CRYSTAL. Production of fibronectin by human alveolar macrophage: mechanism for recruitment of fibroblasts to sites of tissue injury in interstitial lung disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 Nov;78(11):7147-51
 101. REYNOLDS,H.Y. Bronchoalveolar lavage has extended the usefulness of bronchoscopy. *Eur Respir Rev* 1992,2:8,48-53
 102. RIHS,S., C.WALKER, J.C.VIRCHOW, C.BOER, C.KROEGEL, S.N.GIRI, R.K.BRAUN. Differential expression of $\alpha^E\beta_7$ integrins on bronchoalveolar lavage T lymphocyte subsets: regulation by $\alpha_4\beta_1$ -integrin crosslinking and TGF β . *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:660-10
 103. ROBINSON,B.W.S., T.L.MC LEMORE, R.G.CRYSTAL. Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarkoidosis. *J clin Invest* 1985;75:1488-95
 104. ROSSEAU,S., HAMMERL,P., MAUS,U., WALMRATH,H.D., SCHUTTE,H., GRIMMINGER,F., SEEGER,W., LOHMEYER,J. Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(1):L25-35, 7/2000.
 105. SCHALL,T.J. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine* 3(3):165-83
 106. SCHALL,T.J., J.JONGSTRA, B.J.BRADLEY. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol* 1988;141:1018-27
 107. SCHALL,T.J., K.BACON, K.J.TOY, D.V.GOEDDEL. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 1990;347:669-71

108. SCHROTH,M.K., E.GRIMM, P.FRINDT, D.M.GALAN, S.-I.KONNO, R.LOVE, J.E.GERN. Rhinovirus replication causes RANTES production in primary bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:1220-28
109. SEMENZATO,G., L.BJERMER, U.COSTABEL, P.L.HASLAM, D.OLIVIERI, L.TRENTIN. Clinical role of bronchoalveolar lavage in extrinsic allergic alveolitis. *Eur Respir Rev* 1992,2:8,69-74
110. SKELTON,N.J., ASPIRAS,F., OGEZ,J., SCHALL,T.J. Proton NMR assignments and solution conformation of RANTES, a chemokine of the CC-type. *Biochemistry* 34, 5329, 1995.
111. STRIETER, R.M., AND S.L. KUNKEL. The immunopathology of chemotactic cytokines. In: *The Chemokines*, pp. 19-27, ed. Lindley, I.J.D. et al., Plenum Press, New York 1993.
112. SUGA,M., H.YAMASAKI, K.NAKAGAWA, H.KOHROGI, M.ANDO. Mechanisms accounting for granulomatous responses in hypersensitivity pneumonitis. *Sarkoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1997 Sep;14(2):131-8
113. SUGA,M., H.YAMASAKI, K.NAKAGAWA, H.KOROGI, M.ANDO. Mechanism accounting for granulomatous responses in hypersensitivity pneumonitis. *Sarkoidosis Vasc Diff. Lung Dis.*(1997);14:131-138
114. TAUB, D.D., A.R. LLOYD, J-M. WANG, J.J. OPPENHEIM, AND D.J. KELVIN. The effects of human recombinant MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES on the chemotaxis and adhesion of t cell subsets. In: *The chemokines*, pp.139-1146, ed. I.J.D. Lindley et al., Plenum Press, New York, 1993
115. TAUB,D.D., K.COLON, A.R.LLOYD, J.J.OPPENHEIM, D.J.KELVIN. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 1993,16;260:355-8
116. TAUBB,D.D. C-C chemokines: an overview. In: KOCH,A.E., R.M.STRIETER. *Chemokines in Disease*. Biochemical Publishers, 1996; pp.27-54
117. TERAN,L.M., MOCHIZUKI,M., BARTELS,J., VALENCIA,E.L., NAKAJIMA,T., SCHRÖDER,J.-M. Th1- and Th2-Type Cytokines Regulate the Expression and Production of Eotaxin and RANTES by Human Lung Fibroblasts. *Am. Respir. Cell Mol. Biol.* Vol.20, pp.777-786, 1999.
118. THOMPSON,A.B., D.DAUGHTON, R.A.ROBBINS, M.A.GHAFOURI. Intraluminal airway inflammation in chronic bronchitis. Charakterization and

- correlation with clinical parameters. *Am Rev Respir Dis* 1989 Dec;140(6):1527-37
119. UGUCCIONI,M., DÀPUZZO, M., LOETSCHER, M., B. DEWALD, AND M. BAGGIOLINI. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP.3, RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 25: 64-68, 1995.
 120. VADDI,K., R.C.NEWTON. Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *J Immunol* 1994;153:4721-32
 121. VON EIFF,M., O.SCHLINGHEIDER, F.SCHULZE, M.ZUHLSDORF, J.VAN DE LOO. Differential cell count and lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage during pneumonia with and without peripheral neutropenia. *Lung*1995;173(1):25-33
 122. VON LUETTICHAU,I., P.J.NELSON, J.M.PATTISON, M.VAN DE RIN, P.HUIE, R.WARNKE, C.J.WIEDERMANN, R.A.K.STAHL, R.K.SIBLEY, A.M.KRENSKY. RANTES chemokine expression in diseased and normal human tissues. *CYTOKINE*, Vol.8,No.1;1996:89-98
 123. WALLAERT,B., A.HOORELBEKE, Y.SIBILLE, G.A.ROSSI. The clinical role of bronchoalveolar lavage in collagen-vascular diseases. *Eur Respir Rev* 1992;2:8,64-68
 124. WALLAERT,B., P.Y.HATRON, J.M.GROSBOIS, A.B.TONNEL, B.DEVULDER, C.VOISIN. Subclinical pulmonary involvement in collagen-vascular diseases assessed by bronchoalveolar lavage. Relationship between alveolitis and subsequent changes in lung function. *Am Rev Respir Dis* 1986 Apr;133(4):574-80
 125. WARD,C., M.DUDDRIDGE, J.FENWICK, S.WILLIAMS, P.V.GARDINER, D.J.HENDRICK, E.H.WALTERS. The origin of water and urea sampled at bronchoalveolar lavage in asthmatics and control subjects. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:444-47
 126. WIEDERMANN,C.J., E.N.KOWALD, N.REINISCH. Monocyte haptotaxis induced by RANTES chemokine. *Curr Biol* 1993;3:735-41
 127. WINGETT,D., K.FORCIER, C.P.NIELSON. Glucocorticoid-mediated inhibition of RANTES expression in human T lymphocytes. *FEBS Lett* 1996;398:308-11

128. WITT,D.P., A.D.LANDER. Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr Biol* 1994;4:394-400
129. YAMAGUCHI,E., A.ITOH, K.FURUYA, H.MIYAMOTO, S.ABE, Y.KAWAKAMI. Release of tumor necrosis factor-alpha from human alveolar macrophages is decreased in smokers. *Chest* 1993;103:479-83
130. YAMAGUCHI,E., N.OKAZAKI, A.ITOH, S.ABE, Y.KAWAKAMI, H.OKUYAMA. Interleukin 1 production by alveolar macrophages is decreased in smokers. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:397-402

11 Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inhalt noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alle aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, den 10.4.2012

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Lohmeyer für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe wissenschaftlich tätig zu sein. Ich bedanke mich für die sehr gute fachliche Betreuung und menschliche Begleitung über den sehr langen Zeitraum und der Phase der Umstrukturierung der Forschungsgruppe hinweg.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. med. Simone Rosseau für ihre wissenschaftliche Unterstützung bedanken, ebenso wie bei Herrn Dr. med. Peter Hammerl, Frau Regina Maus (MTA) und Frau Stefanie Moderer (MTA) für ihre routinierte technische Hilfe, womit sie einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieses Projektes geleistet haben.

Ich möchte mich bei meinen lieben Eltern bedanken, die mir meinen Lebensweg ermöglicht haben und mich in meinen Wünschen und Träumen immer unterstützt haben.



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5982-8



9 783835 195982 8