

# Antikörper gegen Proteinase 3 induzieren eine granulozyten-medierte Lungenschädigung

Etablierung eines experimentellen Modells der akuten  
Wegener'schen Granulomatose am Beispiel der  
permanent ventilierten und perfundierten Rattenlunge

**STEFANIE OPPERMANN**



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin 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 2011

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.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 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](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus  
dem Institut für Veterinär-Physiologie des  
Fachbereiches der Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen  
Betreuer: Herr Prof. Dr. R. Gerstberger  
und  
dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik V  
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen  
Betreuer: Herr Prof. Dr. U. Sibelius

**Antikörper gegen Proteinase 3 induzieren eine  
granulozyten-medierte Lungenschädigung-  
Etablierung eines experimentellen Modells der akuten  
Wegener'schen Granulomatose am Beispiel der  
permanent ventilierten und perfundierten Rattenlunge**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr.med.vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

eingereicht von

**Stefanie Oppermann**

Tierärztin aus Stuttgart, Bad Cannstatt

Giessen, 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

Prof. Dr. Ulf Sibelius

Tag der Disputation:

30.Mai 2011

Meinen lieben Eltern,  
meinem Schatz

## ***INHALTSVERZEICHNIS***

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i> .....	1
I. Einleitung .....	4
I.1. Vorwort.....	4
I.2. Systemische Vaskulitiden .....	4
I.2.1. Primäre systemische Vaskulitiden .....	5
I.2.2. Sekundäre systemische Vaskulitiden (SSV).....	9
I.3. ANCA-assoziierte Vaskulitiden.....	9
I.3.1. Wegener´sche Granulomatose .....	9
I.3.2. Mikroskopische Polyangiitis .....	17
I.3.3. Churg-Strauss-Syndrom .....	17
I.4. ANCA: Pathogenetische Rolle und diagnostische Relevanz.....	18
I.4.1. Definition.....	18
I.4.2. Korrelation zwischen cANCA-Titer und Krankheitsbild.....	20
I.4.3. Zielantigen von cANCA: Proteinase 3.....	21
I.4.4. cANCA und PR3: Interaktion und pathogenetische Rolle.....	23
I.4.5. cANCA und Endothelzellen .....	24
I.5. Neutrophile Granulozyten und ihre Rolle in der Vaskulitis .....	24
I.5.1. Übersicht: Granulozytäre Mechanismen der Inflammation.....	24
I.5.2. Granulozytäre Zerstörungsmechanismen in der Vaskulitis.....	27
I.6. Die Regulation des inflammatorischen Granulozytenverhaltens .....	34
I.6.1. Zytokine.....	34
I.6.2. Lipidmediatoren.....	35
I.7. Rolle der neutrophilen Granulozyten im akuten Lungenversagen in.....	
der Wegener´schen Granulomatose .....	36
I.8. Fragestellung.....	38
II. Material und Methodik .....	39
II.1. Material .....	39
II.1.1. Tiere .....	39
II.1.2. Anti- PR3- Antikörper .....	39
II.1.3. Experimentelle Pharmaka, Agentien und Materialien .....	40
II.1.4. Materialien und Lösungen für die Zellisolation und Inkubation.....	41

II.1.5. Materialien und Lösungen für die FACS-Analytik .....	42
II.1.6. Materialien und Lösungen zur Anfertigung der histologischen .....	
Schnitte und deren Färbung .....	42
II.2. Methodik.....	43
II.2.1. Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten.....	43
II.2.2. Vorbereitung und Verlauf der Tierpräparation zur Entnahme der .....	
Lunge, Ventilation und Perfusion .....	45
II.2.3. Versuchsprotokoll.....	50
II.2.4. Messung der Lungenparameter .....	52
II.2.5. Fixierung der Rattenlunge zur Anfertigung von histologischen .....	
Schnitten .....	55
II.2.6. Schnittpräparate , HE-Färbung und Immunhistochemie .....	56
II.2.7. Durchflußzytometrie.....	57
II.2.8. Statistische Auswertung.....	59
III. Ergebnisse.....	60
III.1. Übersicht .....	60
III.2. PR3-Membranexpression in TNF $\alpha$ -„geprimten“ PMN.....	61
III.3. ANCA's induzierten eine pulmonale Schrankenstörung an der.....	
isolierten Rattenlunge .....	62
III.4. Der $K_{f,c}$ als Maßeinheit für die Durchlässigkeit des pulmonalen .....	
Endothels.....	65
III.5. Fehlende vasokonstriktorische Komponente im ANCA- .....	
induzierten Lungenödem.....	65
III.6. Effekt des Einsatzes von O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Inhibitoren auf die Bildung der .....	
ANCA - induzierten pulmonalen Schrankenstörung .....	68
III.7. Auswirkungen des Einsatzes eines Leukotrien-Inhibitors im .....	
Vergleich zur Verwendung eines Elastase- Inhibitors.....	71
III. 8. Adhäsion von neutrophilen Granulozyten in der Rattenlunge .....	74
IV. Diskussion .....	78
IV.1. Entwicklung der Fragestellung.....	78
IV.2. Das Modell der isoliert perfundierten und ventilierten.....	
Rattenlunge – ein repräsentatives Tiermodell der Wegener'schen .....	
Granulomatose?!.....	79
IV.3. Adhäsion von neutrophilen Granulozyten in der Rattenlunge.....	80

IV.4. Die pulmonale Schrankenstörung - begründet durch spezifische .....	
Interaktion zwischen cANCA und PMN-Zellen .....	81
IV.5. Ursache der pulmonalen Ödembildung: die primäre endotheliale .....	
Schrankenstörung .....	83
IV.6. Hemmung von Leukotrienen durch MK886 – kein Effekt im .....	
vorliegenden Modell .....	84
IV.7. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS): pathogenetische Rolle bei der .....	
Entstehung des Lungenödems im Rahmen der Wegener´schen .....	
Granulomatose .....	85
IV.8. Neutrophile Elastase: hat dieses Enzym eine Bedeutung für die .....	
Entstehung des Lungenödems in der Wegener´schen .....	
Granulomatose? .....	87
V. Zusammenfassung .....	89
V.1. Summary .....	91
VI. Literaturverzeichnis .....	93
VI.1. Eigene Publikationen zum Promotionsthema .....	116
Originalarbeiten .....	116
Abstracts und veröffentlichte Vorträge .....	116
VII. Anhang .....	117
VII.1. Liste verwendeter Abkürzungen .....	117
VII.2. Danksagung .....	119
VII.3. Lebenslauf .....	120
VII.4. Erklärung .....	122

# **I. Einleitung**

## **I.1. Vorwort**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2003 bis September 2005 am Zentrum für Innere Medizin V im Laborbereich unter Leitung und Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Ulf Sibelius. Die Untersuchungen wurden im Rahmen des SFB 547 „Kardiopulmonales Gefäßsystem“ Teilprojekt 8 gefördert und befassten sich mit der pathophysiologischen Relevanz anti-neutrophiler zytoplasmatischer Antikörper - aus dem Englischen „anti-neutrophil cytoplasmatic antibodies“ – (ANCA), die bei an der Wegener’schen Granulomatose erkrankten Patienten nachweisbar sind. Gegenstand der Untersuchungen war die Etablierung eines Modells des akuten pulmonalen Morbus Wegener an der isoliert ventilierten und perfundierten Lunge der Ratte. Es galt zu überprüfen, inwiefern den anti-neutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern bei der Entstehung einer akuten respiratorischen Insuffizienz eine pathogenetische Rolle zuteil werden könnte.

## **I.2. Systemische Vaskulitiden**

*Per definitionem* handelt es sich bei den Vaskulitiden um nichtinfektiöse Entzündungsvorgänge in der Gefäßwand, die zu morphologischen Veränderungen führen und mit einschlägigen Krankheitsbildern einhergehen (1). Die Gruppe der Vaskulitiden beinhaltet eine Vielzahl von Krankheitsbildern, deren Pathogenese bisher noch weitgehend ungeklärt ist. Die Vaskulitiden unterscheiden sich in ihrer Ätiologie, Pathogenese, Morphologie und in ihrer klinischen Manifestation. Ihr gemeinsames Merkmal - die entzündliche Schädigung oder Zerstörung von Blutgefäßwänden - stellt sich in der Histologie als fibrinoide Nekrose der inneren und mittleren Gefäßwand dar, die eine Leukozyteninfiltration aufweist (2, 3). Kommt es zu einer lokalen Gefäßläsion, kann diese sowohl Gefäßerweiterungen als auch Stenosen und völlige Okklusionen zur Folge haben. Daraus können Störungen der Blutversorgungen der betroffenen Organe resultieren, die letztlich eine Organdysfunktion nach sich ziehen können (4, 5). Unterteilt werden die Vaskulitiden in primäre, „idiopathische“ Vaskulitiden und in sekundäre. Diese Einteilung von Fauci, die seit 1978 existiert, basiert auf ätiologischen Kriterien.

### I.2.1. Primäre systemische Vaskulitiden

Die primären systemischen Vaskulitiden (PSV) sind eigenständige Erkrankungen, da sie nicht zwingenderweise in Zusammenhang mit anderen Vorerkrankungen stehen. Gemäß der Einteilung nach Fauci ist eine primäre Vaskulitis eine Gefäßentzündung, die sich primär am Gefäßsystem abspielt und als nosologische Einheit nicht Teil einer übergeordneten Erkrankung ist (6, 7). Um die Einteilung der Vaskulitiden trotz mangelnder ätiopathogenetischer Kenntnisse zu spezifizieren, wurden neue Kriterien aufgestellt. Seit 1992 steht das auf der „Chapel Hill International Consensus Conference“ (CHC) entwickelte Klassifikationssystem zur Verfügung (8), welches das des „American College of Rheumatologists“ (ACR) von 1990 (9) ergänzt. Als Hauptcharakteristikum dient die Größe der betroffenen Gefäße. Man unterteilt demzufolge in Vaskulitiden der kleinen, der mittelgroßen und der großen Gefäße. (Tabelle I)

#### **Tabelle I**

**Klassifikation der primären systemischen Vaskulitiden nach der Chapel Hill Conference (8)**

<b>Vaskulitisform</b>	<b>Betroffene Gefäße</b>	<b>Krankheitsbilder</b>
Vaskulitiden großer Gefäße	Aorta und Hauptgefäße	1. Riesenzellarteriitis 2. Takayasu- Arteriitis
Vaskulitiden mittelgroßer Gefäße	Mittelgroße und kleine Arterien	1. <i>Polyarteriitis nodosa</i> (Panarteriitis) 2. Kawasaki- Arteriitis
Vaskulitiden kleiner Gefäße	Arteriolen, Kapillaren, Venolen	2. Wegener´sche Granulomatose 3. Mikroskopische Polyangiitis 4. Churg- Strauss- Syndrom 5. Purpura Schönlein- Henoch 6. Essentielle Kryoglobulinämie 7. Kutane leukozytoklastische Vaskulitis

Nach klinischen Gesichtspunkten erscheint es als sinnvoll, neben der Gefäßgröße als weiteres Kriterium die Morphologie hinzuzuziehen. Hieraus ergibt sich die Klassifikation durch Kombination des Kriteriums I (Morphologie) und II (Gefäßgröße) nach Rieger (1998), Lie und Chapel Hill Consensus (1). Gross (1993) kombinierte das Charakteristikum „Gefäßgröße“ mit den histologischen Befunden. Lie (1994) hingegen wählte die nosologische Einteilung in primäre und sekundäre Vaskulitiden als Kombinationsmöglichkeit. Rieger (1998) zieht wie in Tabelle II gezeigt neben dem Gefäßkaliber, der Histologie und der Immunpathogenese auch die Immunerologie als weiteres differentialdiagnostisches Kriterium hinzu.

## **Tabelle II**

### **Vaskulitiden: Einteilungsprinzipien und Kriterien (aus Rieger 1998)**

<b>Einteilungsprinzipien</b>	<b>Einteilungskriterien</b>
Ätiologie und Nosologie	Primär- sekundär
Gefäßkaliber	Groß
	Mittelgroß
	Klein
Histologie	Granulomatös
	Riesenzellen-assoziiert
	Leukozytoklastisch
Immunpathogenese	ANCA-assoziiert
	Immunkomplexe
	T-Zell-assoziiert
Immunserologie	Normokomplementär
	Hypokomplementär
	Hyperkomplementär

Durch immunologische Ergebnisse unterlegt werden mittlerweile die ANCA-positiven von den ANCA-negativen Vaskulitiden unterschieden (10) und ihrer Immunpathogenese zufolge in drei Untergruppen unterteilt, wie aus Tabelle II ersichtlich wird. Das Krankheitsgeschehen beruht hier auf indirekten Reaktions- und Schädigungsmechanismen der Gefäßwand; sie sind immunvermittelt. Den intravasalen Ablagerungen von Immunkomplexen scheint eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Vaskulitiden zuzukommen. Diese Komplexe induzieren eine Gefäßentzündung, die durch weitere Noxen wie z.B. Histamin, Anaphylotoxine u.a. verstärkt werden kann. Die Schädigung der Gefäße sowie ihre Permeabilität werden durch den Anstieg des hydrostatischen Druckes und durch andere mechanische Faktoren gesteigert. Als Antwort auf die abgelagerten Immunkomplexe kommt es zur Aktivierung des Komplementsystemes. Die hierbei freigesetzten Lysozyme (Elastasen, Kollagenasen) führen gemeinsam mit intravasalen freien Sauerstoffradikalen und Metaboliten der Arachidonsäure zu Endothelschädigungen. Diese werden durch Zytokine (Interleukin-1 = IL-1, Tumornekrosefaktor  $\alpha$  = TNF $\alpha$ ) und einwandernde Monozyten aufrechterhalten (7).

Bei den **ANCA-assoziierten Vaskulitiden** handelt es sich um Autoantikörpervermittelte Erkrankungen. Die anti-neutrophilen Antikörper bilden eine Gruppe von Autoantikörpern, die gegen zytoplasmatische Antigene neutrophiler Granulozyten gerichtet sind. Erstmals wurden ANCA 1982 in Seren von Patienten mit renaler Vaskulitis beschrieben (11, 12). Da sie regelmäßig bei einigen primären Vaskulitiden der kleinen Blutgefäße anzutreffen sind, wurde der Begriff der ANCA-assoziierten Vaskulitiden (AAV) geprägt. Zu dieser Gruppe gehören die Wegener'sche Granulomatose (WG), die Mikroskopische Polyangiitis (MPA) und das Churg-Strauss-Syndrom (CSS) (13-15). Neben der pathogenetischen Relevanz - *in vitro*-Versuche ergaben, dass ANCA inflammatorisches Granulozytenverhalten auslösen - kommt den ANCA auch eine herausragende Rolle in der Diagnostik zuteil. Sie dienen nicht nur als Seromarker, sondern sind auch zum Monitoring der Krankheitsaktivität und zur Kontrolle des Therapieerfolges geeignet, weil die Höhe des ANCA-Titers im Serum mit der Krankheitsaktivität korreliert (10, 13, 16). Des Weiteren können spezifische zelluläre Immunreaktionen in die Pathogenese von Vaskulitiden involviert sein. Über Induktion des Komplementsystemes oder über TNF $\alpha$  kommt es zur Bindung von

T-Lymphozyten (CD4+) an sich zu Riesenzellen entwickelnde Makrophagen mit einer Granulombildung in Folge (7).

In der Pathogenese der Vaskulitiden scheinen auch genetische Komponenten eine Rolle zu spielen. Inwieweit sie Einfluss auf die Entstehung der Vaskulitiden haben, ist allerdings noch nicht genau geklärt (17). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Entstehung endothelialer Nekrosen letztendlich eine gestörte leukozytär-endotheliale Interaktion mit konsekutivem Endothelschaden Voraussetzung ist (18, 19).

In der **Klinik** wird die Diagnose der systemischen Vaskulitiden durch das Auftreten von meist sehr unspezifischen Allgemeinsymptomen erschwert. Zwar wird die klinische Manifestation in der Regel von der Größe und Lokalisation der betroffenen Gefäße bestimmt, doch kommt es nicht selten zur Überlappung verschiedener Gefäßtypen. Allgemeinsymptome wie Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Adynamie finden sich regelmäßig und können von rheumatischen Beschwerden begleitet werden (6). Labordiagnostisch zeigen sich eine Beschleunigung der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), CRP-Erhöhung, Leukozytose und Thrombozytose (7). Charakteristisch ist eine Beteiligung der Nieren. In der Regel zeigt sie sich in Form einer chronisch-progredienten, selten einer rapid-progressiven Glomerulonephritis oder einer interstitiellen Nephritis (20, 21). Außerdem sind Respirationstrakt, Haut, Auge, Gastrointestinaltrakt und das Zentralnervöse System (ZNS) häufig betroffene Organsysteme (22-27).

Auch in der **Veterinärmedizin** sind PSV vielfach beschrieben (28). So ist z.B. die *Polyarteriitis nodosa* nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Schweinen, Hunden und Katzen bekannt. Eine der Kawasaki-Krankheit ähnelnde Vaskulitisform ist die durch nekrotisierende Entzündung der kleinen und mittleren Arterien von Herz, *Mediastinum* und zervikalem Rückenmark mit fibrinoider Nekrose und massiver Entzündungszellinfiltration charakterisierte Canine juvenile Polyarteriitis (29). Sie ist auch unter dem Namen „steril-eitrige Meningitis-Arteriitis“ (SRMA) oder „Canine Pain Syndrome“ bekannt und weist einen pauci-immunen Charakter auf (30, 31). Außerdem haben Untersuchungen ergeben, dass im Blut von Hunden mit Caniner juveniler Polyarteritis ANCA vorhanden sind (32, 33). Des Weiteren ähneln die Voraussetzungen, unter denen es zur idiopathischen Vaskulopathie des Greyhounds kommt, denen humaner Vaskulitiden, zu denen Pedersen u.a. die WG zählen (28, 34, 35).

### **I.2.2. Sekundäre systemische Vaskulitiden (SSV)**

Die bei den sekundären systemischen Vaskulitiden auftretenden entzündlichen Gefäßläsionen können sich als Begleiterscheinungen im Rahmen zahlreicher Erkrankungen manifestieren. Sie können als Reaktionen auf primäre pathologische Geschehen verstanden werden. Zu den Auslösern zählen beispielsweise Allergien, Infektionen, tumoröse Prozesse sowie Autoimmunerkrankungen. So lassen sich die sekundären Vaskulitiden ihren Grunderkrankungen bzw. gemäß den auslösenden Faktoren zufolge unterteilen. Sie können als Konsequenz zahlreicher Autoimmunerkrankungen auftreten, zu denen u.a. der *Systemische Lupus erythematoses* (SLE), die Systemische Sklerose, das Sjögren-Syndrom und Morbus Crohn zählen. Auch Infektionen wie Streptokokken-Infektion, Hepatitis B und C, Borreliose, HIV u.a. können eine sekundäre systemische Vaskulitis mit sich führen. Des Weiteren sind Malignome (Lymphome, solide Tumoren, Haarzell-Leukämie u.a.) als auslösende Faktoren bekannt. Verursacht werden können SSV darüber hinaus sowohl durch zahlreiche Medikamente wie beispielsweise Antibiotika, Zytostatika, Benzodiazepine, ACE-Hemmer, Heparin als auch durch Kokain- oder Morphin-Intoxikationen (7). Der *systemische Lupus erythematoses* ist als induzierende Autoimmunerkrankung besonders hervorzuheben, da er mit 143 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr die häufigste Kollagenose darstellt (1). Zu beobachten ist er neben anderen SSV wie dem Sjögren-Syndrom und der Rheumatoiden Arthritis auch beim Tier. Während er bei der Katze eher selten vorkommt und dort mit Antiglobulin-positiver Anämie einhergeht, tritt er bei bestimmten Hunderassen (Collie, Beagle, DSH u.a.) vermehrt auf. Beim Pferd tritt er meist als generalisierte Hauterkrankung in Erscheinung (29).

### **I.3. ANCA-assoziierte Vaskulitiden**

#### **I.3.1. Wegener'sche Granulomatose**

Syn. Morbus Wegener, Wegener-Granulomatose

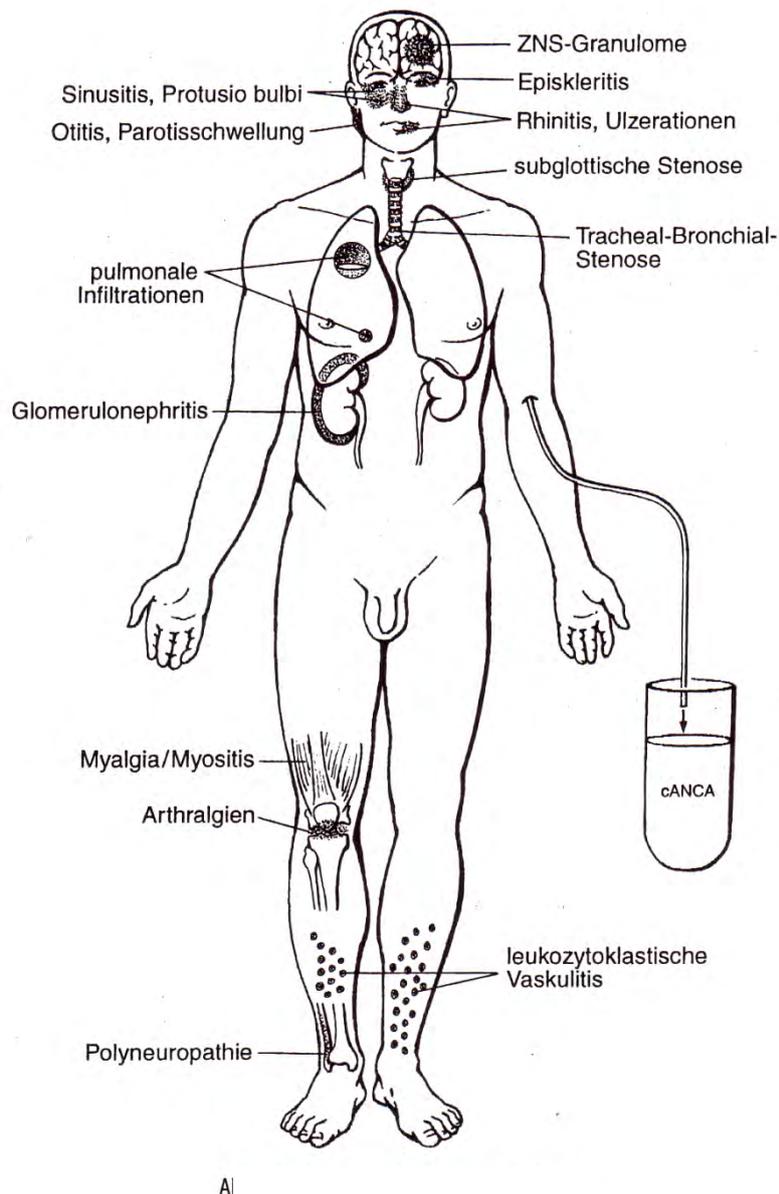
#### **Definition**

Die Wegener'sche Granulomatose (WG) wurde 1896 erstmals von McBride beschrieben. 1931 beschrieb Heinz Klinger das pathologisch-anatomische Bild als Sonderform der *Periarteriitis nodosa* (36) und später wurde sie von Friedrich Wegener als

eigenständiges Krankheitsbild definiert (37, 38). Die Wegener'sche Granulomatose gehört zur Gruppe der primär-systemischen Vaskulitiden (PSV). In dieser Gruppe stellt sie mit einer jährlichen Inzidenz, die abhängig von der geographischen Lage zwischen 2,9 pro Million und 10,6 pro Million liegt, eine der häufigsten Formen dar (39). Die WG gehört zur Gruppe der Autoantikörper-vermittelten Vaskulitiden, welche sich in weitere Untergruppen unterteilen lässt. Da die anti-neutrophilen zytoplasmatischen Antikörper (ANCA) gegen Proteinase 3 (PR3) in der WG als Seromarker fungieren (im Serum lassen sich 95% cytoplasmatische ANCA, die sog. cANCA, nachweisen), wird sie zur Untergruppe der ANCA-assoziierten Vaskulitiden (AAV) gezählt, zu der auch das Churg-Strauss-Syndrom und die Mikroskopische Polyangiitis gehören.

### **Klinik**

Klinisch ist die WG durch eine granulomatöse, nekrotisierende Entzündung der kleinen und mittleren Gefäße gekennzeichnet. Typische Manifestationsorte während der Initialphase sind der obere und untere Respirationstrakt sowie später im sogenannten Generalisationsstadium die Nieren.

**Abb. 1:****Die Symptomatik der Wegener'schen Granulomatose**

*In der obigen Abbildung wird die Symptomatik der Wegener'schen Granulomatose veranschaulicht. Die verschiedenen Manifestationsorte, an welchen die Krankheitszeichen der WG auftreten können, werden hier bildlich dargestellt (10).*

Goodman und Churg beschrieben die Charakteristika der WG 1954 in Form eines TRIAS:

- systemische, nekrotisierende Angiitis
- nekrotisierende Glomerulonephritis
- nekrotisierende Entzündung des Respirationstraktes (10, 40)

1990 legte das American College of Rheumatologists Klassifikationskriterien für die Wegener'sche Granulomatose fest. Um die Diagnose WG stellen zu können, müssen zwei der folgenden Charakteristika zutreffen:

- Entzündung in Nase oder Mund ( ulzerierend/ hämorrhagisch/ purulent)
- Infiltration der Lunge in thorakalen Röntgenaufnahme ( Rundherde, Kavernen, „fixe“ Infiltrationen)
- nephritisches Urinsediment ( Erythrozyturie, >5 Erys/ Gesichtsfeld; Ery- Zylinder)
- histologisch granulomatöse Entzündung ( in der Gefäßwand, peri- und extravaskulär) (9)

Die Erstmanifestation erfolgt meist in der 5. Lebensdekade, wobei Männer und Frauen gleich häufig betroffen sind, und es sich in den meisten Fällen um weißhäutige Patienten handelt (41). Der klinische Verlauf der WG lässt sich in zwei Hauptstadien aufteilen: Im Initialstadium – auch „lokalisierte WG“ genannt, deren Dauer von Wochen bis zu mehr als 10 Jahren variieren kann - kommt es zu Beschwerden im Nasen-Rachen-Raum: granulomatös-ulzeröse Prozesse führen u.a. zu antibiotikaresistenter Rhinitis, Sinusitis und Otitis. Infolge von Perforation des Nasenseptums und voranschreitender Gewebsdestruktion kann es zum Erscheinungsbild der „Sattelnase“ kommen. Allgemeinsymptome wie Mattigkeit, Fieber und Gelenkschmerzen treten auf. Auch leiden die Patienten unter Gewichtsverlust und nächtlichen Schweißausbrüchen (22). Durch Verstopfung der Eustachschen Röhre treten chronischen Mittelohrentzündungen auf. Die destruirenden Granulome im HNO-Bereich und an der Schädelbasis können druckbedingt zu ZNS-Symptomatik führen. Dazu zählen u.a. der Ausfall der Hirnnerven II, VI und VII sowie restriktive Okkulomotorikstörungen mit Exophthalmus. Mit Beteiligung des zentralen und des peripheren Nervensystems ist in 10 bzw. 30-35% der Fälle zu rechnen. Während der Initialphase weist der Patient keine klinischen Zeichen einer Vaskulitis auf. Die Generalisationsphase hingegen ist bestimmt von nekrotisierenden granulomatösen Entzündungsprozessen im oberen Atemtrakt und/ oder in der Lunge, wobei die Lunge mit einer Häufigkeit von 85-90% betroffen ist. Es zeigt sich eine nekrotisierende Vaskulitis der kleinen Gefäße. Die **Lungenmanifestation** der WG kann sich in verschiedene Varianten darstellen. Lungenrundherde sind neben diffusen Infiltraten

der häufigste pulmonale Röntgenbefund. Sie können singular oder multiple, einschmelzend oder nicht-einschmelzend sein (42, 43). Eine andere Form ist die WG-Pneumonitis. Sie ist Ausdruck einer sehr aktiven systemischen Vaskulitis mit Multiorganbeteiligung. Charakteristisch ist eine Erhöhung der neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage (BAL). Auch das Gewebeeinfiltrat wird von neutrophilen Granulozyten dominiert (44, 45). Zeichen einer hochaktiven Gefäßentzündung mit hohem Schädigungspotential kann neben der Pneumonitis auch die diffuse alveoläre Hämorrhagie (DAH) sein (46), die als initiale und häufig auch als einzige pulmonale Manifestation der WG auftreten kann (47). Außerdem kann es im Rahmen der Lungenmanifestation der WG zu tracheobronchialen Läsionen kommen. Man findet sie bei bis zu 60% der Patienten mit Atemwegssymptomen (Husten, Dyspnoe, Stridor), wobei zwischen stenosierender und nicht-stenosierender Form unterschieden wird. Für die WG ist die 3-5 cm unterhalb der Stimmbandebene liegende subglottische Stenose charakteristisch. Sie weist eine ausgeprägte Neigung zur Fibrosierung und narbigen Stenosierung auf (48, 49). Neben dem häufigen Befall der Lunge ist in ca. 80% der Fälle der Befall der Nieren zu beobachten. Er führt in der Regel zu einer rasch-progressiven Glomerulonephritis (RPGN) (41, 50). Während der Nierenbeteiligung ein wesentlicher Faktor für die Frühmortalität/-mortalität ist, tritt mit zunehmender Krankheitsdauer die pulmonale Morbidität in den Vordergrund (51). Sind sowohl die Nieren als auch die Lunge betroffen, so spricht man vom **pulmorenalen Syndrom**. Es handelt sich hierbei um ein potenziell lebensbedrohliches Krankheitsbild, das in ca. 60% der Fälle auf ANCA-assoziierte Vaskulitiden zurückzuführen ist. Zugrunde liegende Erkrankungen können auch das Goodpasture-Syndrom, systemischer *Lupus erythematodes* und andere Vaskulitiden sein. Das pulmorenale Syndrom geht mit einer diffusen, alveolären Hämorrhagie auf der Basis einer pulmonalen Kapillaritis und einer RPGN einher. Es ist Ausdruck einer Kleingefäßvaskulitis des pulmonalen und glomerulären Kapillarbettes. Symptome für die nachlassende Lungenfunktionalität sind progrediente Dyspnoe und Husten sowie teilweise Anzeichen akuter Blutungsanämie und eines intravasalen Volumenmangels. Dieses klinische Bild kann sich bereits Wochen und Monate vor der Nierenmanifestation zeigen. Es kann zur Ausbildung einer akuten respiratorischen Insuffizienz mit dem Vollbild eines akuten Atemnotsyndroms (ARDS) und Beatmungspflichtigkeit kommen. Der fortschreitende Verlust der Nierenfunktion äußert sich in Leistungsminderung, Unwohlsein, Übelkeit, Oligo-/Anurie, Ödemen und Gewichtszunahme. Es kann darüber hinaus zu arterieller Hypertonie kommen (52). Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium kann das Zentralnervensystem dann

in Form von Blutungen, Ischämien, Enzephalopathien und Kopfschmerzen betroffen sein. Es kann zu epileptischen Anfällen kommen, sowie zu Polyneuropathien als Symptome des peripheren Nervensystems. Andere Organe wie beispielsweise Auge, Haut, Muskeln und der Gastrointestinaltrakt können betroffen sein (24, 26, 27, 41, 53).

Um neben der Klinik auch das pathologische Spektrum der WG abzudecken, gliederte die European Vasculitis Study Group (EUVAS) den Krankheitsverlauf in die 5 folgenden Untergruppen:

1. lokalisierte Form
2. frühe systemische Form
3. generalisierte Form
4. Schwere renale Form und
5. die refraktäre Form (54).

### **Diagnostik**

Neben der Biopsieentnahme zur Durchführung histologischer Untersuchungen sind zur Absicherung der Diagnose bildgebende Verfahren wie Magnetresonanztomographie (MRT) der Nasenhöhle und des ZNS sowie Röntgen und Computertomographie (CT) des Thorax notwendig. Wegen der herdförmigen Verteilung der Gewebeläsionen ist es notwendig, Biopsien gezielt aus geschädigtem Gewebe zu entnehmen (55). Bevorzugt werden Nasenschleimhaut- oder Nasennebenhöhlenbiopsien, sofern zuvor mittels bildgebender Verfahren die Lokalisation genau bestimmt werden konnte (10, 56). Die Blutuntersuchung ist eine weitere wichtige diagnostische Maßnahme. Bei Patienten mit WG können im Blutbild eine Leukozytose sowie eine Thrombozytose erkennbar sein. Die Blutsenkungsgeschwindigkeit ist erhöht. In 50% der Fälle finden sich Rheumafaktoren (7). Den cANCA, deren Zielantigen die Proteinase 3 (PR3) ist, kommt eine besondere Bedeutung als spezifischer Seromarker für die WG zu. Die Spezifität der cANCA beträgt 99,9% und erhöht sich bei gleichzeitigem Nachweis von Anti-PR3 auf 100%. Je nach Stadium und Aktivität der Erkrankung kann die Sensitivität variieren. Sie liegt während der Initialphase bei ca. 50 - 60 %, kann aber in der Generalisationsphase auf nahezu 100% ansteigen (5, 10). Allerdings sind ANCA-negative Fälle der WG dokumentiert - vor allem in Fällen der „lokalen“ Form (57) - aber auch selten in der generalisierten Phase (25, 27), so dass die Biopsie hier als Diagnosemittel unumgänglich ist (58). Die Höhe des Titers korreliert im Regelfall mit der Krankheitsaktivität. Hohe Titer finden sich somit in den aktiven Phasen der WG,

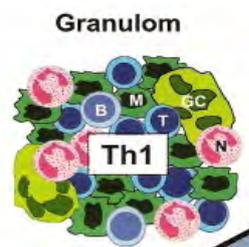
wohingegen sie nach erfolgreicher Therapie mit Eintritt einer Vollremission gegen Null gehen können. Jedoch sind auch Fälle beschrieben, in denen Patienten in der Remissionsphase über Jahre einen erhöhten ANCA-Titer aufwiesen, ohne rückfällig zu werden (50, 59).

### **Histologie**

Nach erfolgter Biopsieentnahme (s. Diagnostik) zeigen sich im histologischen Bild fibrinoide Gefäßwandnekrosen mit Leukozyteninfiltration. Im Frühstadium sind die neutrophilen Granulozyten in der Überzahl, werden aber in der späteren Phase von den Monozyten abgelöst (3, 60, 61). Als typisches histologisches Merkmal ist die Bildung von palisardenartigen Granulomen mit vielkernigen Riesenzellen anzusehen (60, 62). Sie befinden sich im Regelfall in der Gefäßwand, können aber auch im Interstitium beobachtet werden. Sind die Nieren mitbetroffen, so zeigt sich unter dem Lichtmikroskop in der Regel eine halbmondbildende, segmental nekrotisierende Glomerulonephritis. In der Lunge lassen sich bei Vorliegen einer pulmonalen Kapillaritis mikrovaskuläre Fibrinthromben finden (52). Es handelt sich bei der WG um eine „pauci-immune“ Vaskulitis. Das bedeutet, dass sich immunhistochemisch keine oder nur minimale Immunglobulin- und/ oder Komplementablagerungen im Gefäß nachweisen lassen (10, 50). Die histologische Sicherung gelingt in etwa 70% aus dem oberen Respirationstrakt und in 10-20% an anderen extrapulmonalen Läsionen (Haut- oder Skelettmuskelvaskulitiden) (55).

### **Abb. 2:**

#### **Aufbau eines Granuloms in der Initialphase der WG**



*Charakteristikum der WG sind die zu Beginn vorkommenden Th1-Typ-nekrotisierenden granulomatösen Läsionen im oberen und/oder unteren Respirationstrakt. Der Aufbau ist im Bild beschrieben: B: B-Zelle, GC: Riesenzelle, N: neutrophiler Granulozyt, T: T-Zelle M: Makrophage (54)*

## **Therapie**

Die Therapie der WG erfolgt abhängig vom Stadium und der Aktivität der Erkrankung. Die Aktivität wird mithilfe des Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) beurteilt (63). Der Disease Extension Index (DEI) dient der Erfassung der Ausbreitung und Organmanifestation (64). Im frühen Stadium kann durch eine antibiotische Therapie mit der Gabe von Trimethoprim- Sulfamethoxazol (Cotrimoxazol) in einigen Fällen eine Vollremission erreicht werden (65). Im Generalisationsstadium wird nach dem Fauci-Schema mit einer remissionsinduzierende Therapie mit Cyclophosphamid (CYC) und Glukokortikoiden (GC) wie z.B. Prednisolon eingeleitet, um später auf eine remissionerhaltende Behandlung umzustellen, welche weniger toxische Nebenwirkungen besitzt. Bewährt hat sich hier in einer Studie der EUVAS der Wirkstoff Azathioprin (66). Aber auch für den Wirkstoff Methotrexat liegen große Erfahrungen vor. Ein weiteres Standardschema ist das sog. modifizierte Austin-Schema. Anders als beim Fauci-Schema handelt es sich hierbei nicht um eine CYC-Dauer- sondern um eine Stoßtherapie. Generell wird in Induktions- und Erhaltungstherapie unterteilt. Während erstere in der Regel über 6-9 Monate durchgeführt wird, ist die remissionserhaltende Behandlung durchschnittlich über 12-18 Monate erforderlich (67). Prognostisch ist zu sagen, dass ohne Immunsuppressiva 80 % der Patienten innerhalb eines Jahres versterben (7). Durch intensive Therapie nach dem Fauci-Schema kann die Überlebensdauer in 80% der Fälle auf bis über 5 Jahre ausgedehnt werden (65). Es kann evtl. zu jahrelanger Vollremission kommen. Dennoch kommt es in etwa 50% meist nach Beendigung der Therapie zu einem Rückfall (68). Die bereits erwähnte Korrelation der ANCA-Titerhöhe mit der Krankheitsaktivität eignet sich sehr gut zur Kontrolle, da die Titer häufig bereits bis zu 2 Wochen vor einer Rezidivbildung deutlich ansteigen (69-74). Es wurde in einer Studie gezeigt, dass ein frühzeitig erkanntes Rezidiv durch sofortige Intensivierung der Therapie verhindert werden konnte (10).

## **Nebenwirkungen der Therapie nach dem Fauci-Schema**

Einen schwerwiegenden Nachteil des Behandlungskonzeptes nach Fauci stellen die zahlreichen Nebenwirkungen der eingesetzten Medikamente dar. Vor allem die Phase der Induktionstherapie, ist durch eine sehr aggressive Behandlung gekennzeichnet. Zu den Nebenwirkungen von CYC zählen u.a eine erhöhte Infektanfälligkeit, Neoplasien (z.B. Lymphome, Blasenkarzinome), Osteoporose, hämorrhagische Zystitis und Ovarialinsuffizienz in über 50% der Fälle mit daraus folgender Infertilität. Durch GC

bedingt kann es zum Bild des Steroidkataraktes kommen. Auch aseptische Nekrosen wurden als Begleiterscheinungen beobachtet (75, 76).

### **I.3.2. Mikroskopische Polyangiitis**

Die Mikroskopische Polyangiitis (MPA) ist eine Erkrankung der Arteriolen, Kapillaren und Venolen der Nieren, die in seltenen Fällen auch die kleinen Lymphgefäße betreffen kann. Charakteristisch für die MPA ist das Fehlen von Granulomen im histologischen Bild, welches von granulo-monozytär infiltrierten Gefäßwandnekrosen bestimmt wird (4). In der Klinik manifestiert sich eine vaskulitische Glomerulonephritis (GN). Sie findet sich zunächst als fokal-segmental nekrotisierende und sklerosierende GN, kann aber im Weiteren in die sehr gefährliche Form der halbmondbildenden GN übergehen. Bei der MPA finden sich immunhistochemisch keine oder lediglich minimale Ablagerungen von Immunkomponenten. Daher wird sie wie die WG zur Gruppe der pauci-immunen Vaskulitiden gezählt. Des Weiteren tritt häufig eine pulmonale Vaskulitis auf, die in Form einer Kapillaritis mit diffuser alveolärer Hämorrhagie einhergehen kann. Es handelt sich dabei um das sog. Pulmorenale Syndrom. Klinisch ist die MPA oft nur schwer von der WG und dem Churg-Strauss-Syndrom (CSS) zu trennen. Hierbei können die häufige Assoziation von MPA mit pANCA und das Fehlen von Granulomen helfen. Bei der MPA findet sich in mehr als 50% der Fälle ein pANCA, der gegen Myeloperoxidase (MPO) gerichtet ist. Seine Spezifität liegt in etwa bei 80% (10). Die Standardtherapie der MPA erfolgt so wie die der WG nach dem Fauci- Schema mittels einer Kombinationstherapie aus Cyclophosphamid (CYC) und Glukokortikoiden (65, 77). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 70%.

### **I.3.3. Churg-Strauss-Syndrom**

Das Churg-Strauss-Syndrom ist geprägt durch das Erscheinungsbild einer eosinophilen, granulomatösen Inflammation der Gefäße im Respirationstrakt, gekoppelt mit gleichzeitiger Nekrose der kleinen und mittleren Gefäße. Das CSS ist in der Regel mit *Asthma bronchiale* und einer Bluteosinophilie assoziiert (78, 79). Im Gegensatz zur WG und MPA wirkt sich CSS nicht auf die Nierenfunktion aus. Erstmals wurde das Churg-Strauss-Syndrom 1951 von Jacob Churg und Lotte Strauss als „allergische Angiitis“ beschrieben. Schon damals wurde sie in histopathologischen und pathogenetischen Kriterien mit der WG und der MPA in Verbindung gebracht (80). Die Therapie erfolgt mittels Gabe von Kortikosteroiden (Prednisolon). Oft ist eine zusätzliche Gabe von Immunsuppressiva (Cyclophosphamid) nötig. Die 1-Jahres-Überlebensrate liegt bei 90%,

die 5-Jahres-Überlebenszeit bei lediglich 60%. Ohne Therapie überleben nur 5-50% der Patienten ein Jahr.

## **I.4. ANCA: Pathogenetische Rolle und diagnostische Relevanz**

### **I.4.1. Definition**

ANCA sind Autoantikörper, die gegen Granulaproteine der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) gerichtet sind (81). Erstmals wurden sie 1982 in Seren von Patienten mit renaler Vaskulitis beschrieben (11, 12). In der Diagnostik wird derzeit eine Kombination des Immunfluoreszenztests (IFT) auf Granulozyten und eines antigenspezifischen ELISAs verwendet, um eine genaue Identifikation der ANCA zu ermöglichen (5). Zur Kontrolle und frühzeitigen Erkennung eines möglichen Rückfalls eignet sich allerdings der sog. capture ELISA besser als der standard ELISA (82).

Es sind 4 verschiedene ANCA bekannt, die sich anhand ihrer Fluoreszenzmuster unterscheiden lassen: 1. cANCA ( "cytoplasmatic" oder " classic")

2. atypische cANCA ( ähnlich cANCA ohne zentrale Akzente)

3. pANCA

4. atypische pANCA= xANCA (Mischform pANCA und cANCA)

cANCA erzeugen das sog. cytoplasmatische Fluoreszenzmuster, das eine fein-granuläre Anfärbung des Granulozyten-Zytosols mit zentraler Akzentuierung und Aussparung des Zellkerns aufweist (63). pANCA können aufgrund des perinucleären Musters identifiziert werden, welches durch eine intensive Fluoreszenz um den Zellkern charakterisiert ist (83). xANCA hingegen sind durch Auslösung eines atypischen Musters mit diffuser Anfärbung des PMN-Zytosols gekennzeichnet. Im Gegensatz zu den beiden anderen ANCA-Typen wurden sie bisher weder mit einem definierten Antigen noch mit einem speziellen Krankheitsbild in Verbindung gebracht (75).

### **pANCA**

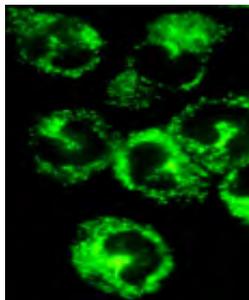
Bei den AAV werden pANCA typischerweise gegen Myeloperoxidase gebildet. MPO ist ein Enzym, das sich sowohl in den azurophilen Granula von Neutrophilen als auch in den Lysosomen von Monozyten befindet. Dieses Protein zählt zu den Metalloenzymen, da es Eisen enthält. Die pANCA treten vorwiegend bei der Mikroskopischen Polyangiitis auf, wobei Spezifität und Sensitivität eher gering sind. Bei 60 % der MPA-Patienten lassen sich im Serum pANCA nachweisen, wobei die Spezifität bei ca. 80% liegt (7, 10, 75). Allerdings können auch andere neutrophile Granulakomponenten als Zielantigene für pANCA dienen. Hierzu zählen u.a. Elastase, Cathepsin G, Lactoferrin

und Lysozym. Dennoch ist in 50% aller pANCA-positiven Seren das Zielantigen unbekannt. Zwar stellen pANCA im speziellen für MPA gute Marker dar, doch wurden sie auch bei sekundären Vaskulitiden und in anderen „nicht-vaskulitischen“ ANCA-assoziierten Erkrankungen gefunden (beispielsweise *Colitis ulcerosa*) (75, 84-87). Beim *systemischen Lupus erythematodes* und beim Sjögren-Syndrom zeigt sich in etwa 25% der Fälle ein positiver pANCA und bei rheumatoider Arthritis mit assoziierter Vaskulitis sogar in bis zu 50% (7).

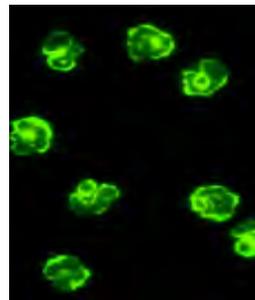
### Immunfluoreszenzaufnahmen

von

**Abb.3: cANCA**



**Abb.4: pANCA**



*In den Fluoreszenzaufnahmen wird das unterschiedliche Verteilungsmuster von cANCA und pANCA in Ethanol-fixierten Granulozyten veranschaulicht. Die cANCA werden nach Anfärbung durch cANCA-positives Serum sichtbar und zeigen eine feingranuläre Verteilung im PMN-Zytosol. Hingegen weisen die Granulozyten nach Anfärbung durch ein pANCA-positives Serum in ihrem Inneren eine deutlich perinukleäres Fluoreszenzmuster der antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörper auf. Beide Abbildungen (Abb.3 +4) stammen von der Homepage des Firma Euroimmun AG, Lübeck, Deutschland. [www.Euroimmun.de](http://www.Euroimmun.de)*

### cANCA

cANCA hingegen sind überwiegend durch anti-PR3-Antikörper (PR3-ANCA) und in lediglich 5 % durch anti-BPI (bactericidal/permeability-increasing protein)-Antikörper definiert (5). Sie zeigen eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Wegener'sche Granulomatose (13, 81, 83). Die Spezifität von cANCA liegt bei 99,9% und erhöht sich bei gleichzeitigem Nachweis von PR3-ANCA auf 100%. Die Sensitivität ist abhängig von Krankheitsstadium und -aktivität. Bereits in der Initialphase finden sich in 50% der Fälle cANCA im Serum, in der generalisierten Phase beträgt die Häufigkeit von cANCA sogar 90% (s. auch Tab. III) (5, 7). Die Bildung von ANCA scheint T-Zell-abhängig zu sein (88).

### I.4.2. Korrelation zwischen cANCA-Titer und Krankheitsbild

Da wie im Kapitel WG bereits beschrieben in mehreren Studien gezeigt wurde, dass ein Anstieg des cANCA-Titers in den meisten Fällen mit einer Aggravation des Krankheitsbildes einhergeht, (13, 69-73) wurde vermutet, dass diesen Antikörpern neben ihrer diagnostischen Wichtigkeit auch eine pathogenetische Funktion zukommen könnte. Verstärkt wurde diese Vermutung durch Berichte von Patienten mit Hyperthyreose, die auf eine Therapie mit Propylthiourazil (PTU) mit cANCA-Bildung reagierten und daraufhin eine nekrotisierende Vaskulitis incl. Glomerulonephritis entwickelten. Nach Absetzen des Medikamentes erfolgte ein Absinken des Titers, und die Symptome verschwanden (89-93). Bei an Hyperthyreose erkrankten Katzen, die mit PTU behandelt wurden, konnten im Serum gegen Myeloperoxidase gerichtete pANCA gefunden werden (94).

### Tabelle III

#### Häufigkeit von antineutrophilen zytoplasmatischen Autoantikörpern (ANCA)

Vaskulitis	cANCA (%)	pANCA (%)
Wegener'sche Granulomatose	90	<5
Churg-Strauss- Syndrom	20	20
Mikroskopische Polyangiitis	10	60
Purpura- Schoenlein- Henoch	< 5	
<i>Polyarteritiis nodosa</i>	<5	<5
Riesenzellarteriitis	5	

*Die Wegener'sche Granulomatose ist durch das starke Auftreten von cANCA im Serum der Patienten charakterisiert. Bei der Mikroskopischen Polyangiitis hingegen kommt es zu vermehrtem Auftreten von pANCA (7).*

### **I.4.3. Zielantigen von cANCA: Proteinase 3**

#### **I.4.3.1. Definition**

Proteinase 3 (PR3) wird neben Elastase (HNE= humane neutrophile Elastase), Azurodinin (AZU) und Cathepsin G (CatG) zu den neutralen Serinproteasen gezählt, die in den azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten sowie in den Lysosomen von Monozyten lokalisiert sind (95-97). Außerdem konnte PR3 intrazytoplasmatisch in Endothelzellen, in renalen Tubulusepithelzellen und in Pneumozyten I und II nachgewiesen werden (98-101). Das Molekulargewicht dieses Glycoproteins beträgt 29 kD. Es besteht aus 228 Aminosäuren, und sein Gen ist auf dem Chromosom 19 lokalisiert (5). PR3 ist identisch mit der neutrophilen Protease p29, dem azurophilen Granulaprotein 7 (AGP7) und mit Myeloblastin (102-105). 1989 wurde PR3 als Autoantigen in der WG identifiziert (106).

#### **I.4.3.2. Funktionen von Proteinase 3**

Proteinase 3 besitzt proteolytische Aktivität u.a. für Elastin, Fibronectin, Laminin und für Kollagen IV. Durch Spaltung und Abbau von extrazellulären Matrixkomponenten ermöglicht sie die Migration von neutrophilen Granulozyten ins Gewebe (107). Einer ihrer physiologischen Inhibitoren ist  $\alpha$ -1-Antitrypsin (108), aber auch  $\alpha$ -2-Makroglobulin und Elafin weisen hemmende Wirkung auf. Des Weiteren weist PR3 antimikrobielle Eigenschaften auf und bewirkt Myeloidzellendifferenzierung. Neben der Potenzierung der Plättchenaktivierung von CatG ist PR3 auch verantwortlich für die Spaltung und Inaktivierung des C1-Inhibitors und für die Aktivierung von Zytokinen wie IL-8, TNF $\alpha$  und TGF $\beta$ . Auch an der Bindung von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen (EC) und deren Aktivierung *in vitro* ist diese Protease beteiligt (109). Im Rahmen einer Studie der Arbeitsgruppe Falk und Jennette wurde nachgewiesen, dass PR3 nach Internalisierung durch Endothelzellen in diesen Apoptose induzierte (5).

#### **I.4.3.3. Steigerung der PR3-Membranexpression *in vivo* und *in vitro***

Bisher wurden die Konsequenzen der Bindung von cANCA und PR3 hauptsächlich an isolierten neutrophilen Granulozyten beschrieben: Voraussetzung für diese Bindung ist die Translokation von Proteinase 3 aus den intrazellulären azurophilen Granula auf die granulozytäre Zelloberfläche. Bewirkt wird die Translokation durch vorherige Stimulation der PMN in erster Linie durch proinflammatorische Zytokine. Aber auch *in vivo* scheint dieser Vorstimulierung eine pathophysiologische Rolle zuzukommen.

Während einiger Studien wurden Beobachtungen gemacht, die diese Annahme bestärken. So ist in der Klinik der Beginn bzw. das Wiederaufflammen von ANCA-assoziierten Vaskulitiden typischerweise von grippeähnlichen Symptomen wie z.B. Fieber, Gelenkschmerzen u.a. begleitet. Dies lässt annehmen, dass zu diesem Zeitpunkt auch der Gehalt an zirkulierenden Zytokinen erhöht ist. Diese wiederum könnten die neutrophilen Granulozyten vorstimulieren, um dann eine Interaktion mit ANCA zu ermöglichen (110). In Patienten mit Vaskulitis konnten solche erhöhten Zytokingehalte dokumentiert werden (111-113). Ausserdem wurden in Seren von Patienten mit AAV neutrophile Granulozyten nachgewiesen, die auf ihrer Oberfläche bereits vor Stimulierung ANCA-Antigene exprimierten (114, 115).

#### **I.4.3.4. „Priming“**

*In vitro* konnte die Erhöhung der Membranexpression von PR3 durch Vorstimulierung mithilfe von proinflammatorischen Zytokinen gezeigt werden. Zu diesen Zytokinen zählen beispielsweise  $\gamma$ - Interferon, TNF $\alpha$ , Interleukin-8 (IL-8) und Interleukin-1 (IL-1) (64, 116, 117). Die Zytokine liegen in einer Konzentration vor, die zwar ausreichend hoch ist, um eine Expression von PR3 auf der Zellmembran auszulösen, jedoch zu gering, um eine komplette Neutrophilenaktivierung zu induzieren (110). Für dieses Geschehen wurde die Bezeichnung „priming“ geprägt (118-120). Ziel des „priming“ ist es, den neutrophilen Granulozyten auf seine Antwort auf einen evtl. folgenden Stimulus vorzubereiten. Hierzu gehört neben der Expression von PR3 auf der Oberfläche auch die Adhäsion der PMN-Zelle an die Gefäßwand und die Migration durch die endotheliale Zellschicht (57). Die Adhäsion der PMN-Zellen an eine Oberfläche- hauptsächlich an Endothelzellen- ist Voraussetzung für die folgende Interaktion mit cANCA. Untersuchungen haben ergeben, dass zirkulierende neutrophile Granulozyten *in vivo* nicht von ANCA aktiviert werden können (121, 122). Somit scheint das Vorhandensein aktivierter Endothelzellen Bedingung für die folgende Interaktion zwischen ANCA und PMN-Zellen zu sein. Stimulierung des Endothels induziert eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 u.a) und das Freisetzen von Chemokinen wie z.B. IL-8. Die Chemokine, die zunächst für die Adhärenz der PMN-Zellen an den Endothelzellen nötig sind, wirken dann als vorstimulierende Faktoren. In der Klinik scheint dem Vorkommen von Infektionen eine wichtige Rolle in der Genese der WG - im speziellen für den Vorgang des „priming“ zuzukommen. Es wurde beobachtet, dass Patienten mit einer chronischen nasalen *Staphylococcus aureus*-Besiedlung vermehrt zu Rezidiven neigten und eine höhere Rückfallrate aufwiesen (123). Es ist anzunehmen, dass hier die

Vorstimulierung der PMN-Zellen durch *Staph. aureus* ausgelöst wird, und diesem Bakterium somit eine direkte pathogenetische Rolle zusteht. So wurde ein von *Staph. aureus* produziertes Protein, welches *in vitro* an Endothelzellen bindet, in den Glomerula von WG-Patienten nachgewiesen (122, 124). Die alleinige Präsenz von ANCA reicht nicht als Auslöser für einen Schub der WG aus. Es sind weitere Rahmenbedingungen für den Ausbruch dieser Immunerkrankung verantwortlich, die durch ihren pro-inflammatorischen Charakter in der Lage sind, neutrophile Granulozyten vorzustimulieren (122). Hierzu gehören neben infektiösen Erregern beispielsweise genetische Faktoren, Kontakt zu chemischen Substanzen und Behandlung mit bestimmten Medikamenten (125-127)

#### **I.4.4. cANCA und PR3: Interaktion und pathogenetische Rolle**

Nach erfolgter Expression des Zielantigens auf der granulozytären Zellmembran führt die Konfrontation isolierter Granulozyten mit dem Autoantikörper zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten. Der Mechanismus, durch den ANCA „geprimte“ PMN-Zellen stimulieren, ist noch nicht völlig geklärt. Man geht derzeit davon aus, dass für die Induktion der Neutrophilenaktivität sowohl die direkte Bindung des Fab'-2-Fragmentes von ANCA an membranexprimierte PR3 als auch das „Andocken“ des Fc-Endes von ANCA an den Fc-Rezeptor des Granulozyten nach Bildung des ANCA-Antigen-Komplexes auf der Oberfläche oder in unmittelbarer Umgebung notwendig ist (110, 128). Ergebnisse verschiedener Untersuchungen haben der Bindung an den Fc-Rezeptor eine bedeutende Rolle in der PMN-Aktivierung zugesprochen (115, 129). Die Aktivierung der Granulozyten hat die Freisetzung von Sauerstoffradikalen ("oxidative burst") zur Folge, welche mengenmäßig mit der Anzahl an stimulierenden ANCA korreliert (130). Auch die TNF $\alpha$ -induzierte Granulamobilisierung, die Leukotrienproduktion (LTB $_4$ ) und die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten werden durch ANCA verstärkt (131, 132). Außerdem können die feste Adhäsion und Transmigration neutrophiler Granulozyten durch ANCA potenziert werden (64, 133). Darüber hinaus kommt es zur Degranulation der PMN mit Ausschüttung von aggressiven lysosomalen und toxischen Enzymen, die im weiteren Verlauf zu einer nekrotisierenden Vaskulitis führen (5, 115-117, 129). Zu den freigesetzten Enzymen gehören u.a. PR3, MPO und Elastase. Sie induzieren in Gegenwart von EC deren Lyse (57, 134, 135). Konsequenz ist somit die endotheliale Schrankenstörung (136). Es wurde zudem gezeigt, dass PMN-Zellen in Gegenwart von ANCA zur Adhärenz an Endothelzellen befähigt sind und deren Auflösung auslösen (134).

Der endotheliale Zelltod ist einerseits durch Nekrose bedingt, der Apoptose scheint aber auch eine wichtige Funktion in diesem Geschehen zuzukommen (110, 137).

#### **I.4.5. cANCA und Endothelzellen**

ANCA können auch direkt mit „geprimten“ EC interagieren und so deren vollständige Aktivierung bewirken. Es wurde beobachtet, dass Zytokin-vorstimulierte humane EC PR3 an ihrer Zelloberfläche exprimieren (98, 138). Das Binden von ANCA an PR3 induziert die Produktion von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin und VCAM-1, was wiederum eine gesteigerte Adhärenz von neutrophilen Granulozyten und T-Zellen zur Folge hat (98). Es lässt sich daraus schließen, dass neben den PMN-Zellen auch den EC eine entscheidende Bedeutung im Krankheitsgeschehen der AAV zukommt. Außerdem hat sich gezeigt, dass ANCA nicht nur in Monozyten, sondern auch in EC eine starke IL-8-Ausschüttung bewirken. Dieses stark chemotaktisch wirksame Zytokin ist schließlich für die gerichtete Leukozytenmigration von Wichtigkeit (139).

### **I.5. Neutrophile Granulozyten und ihre Rolle in der Vaskulitis**

#### **I.5.1. Übersicht: Granulozytäre Mechanismen der Inflammation**

##### **I.5.1.1. Der neutrophile Granulozyt: Definition, Entwicklung und Verteilung**

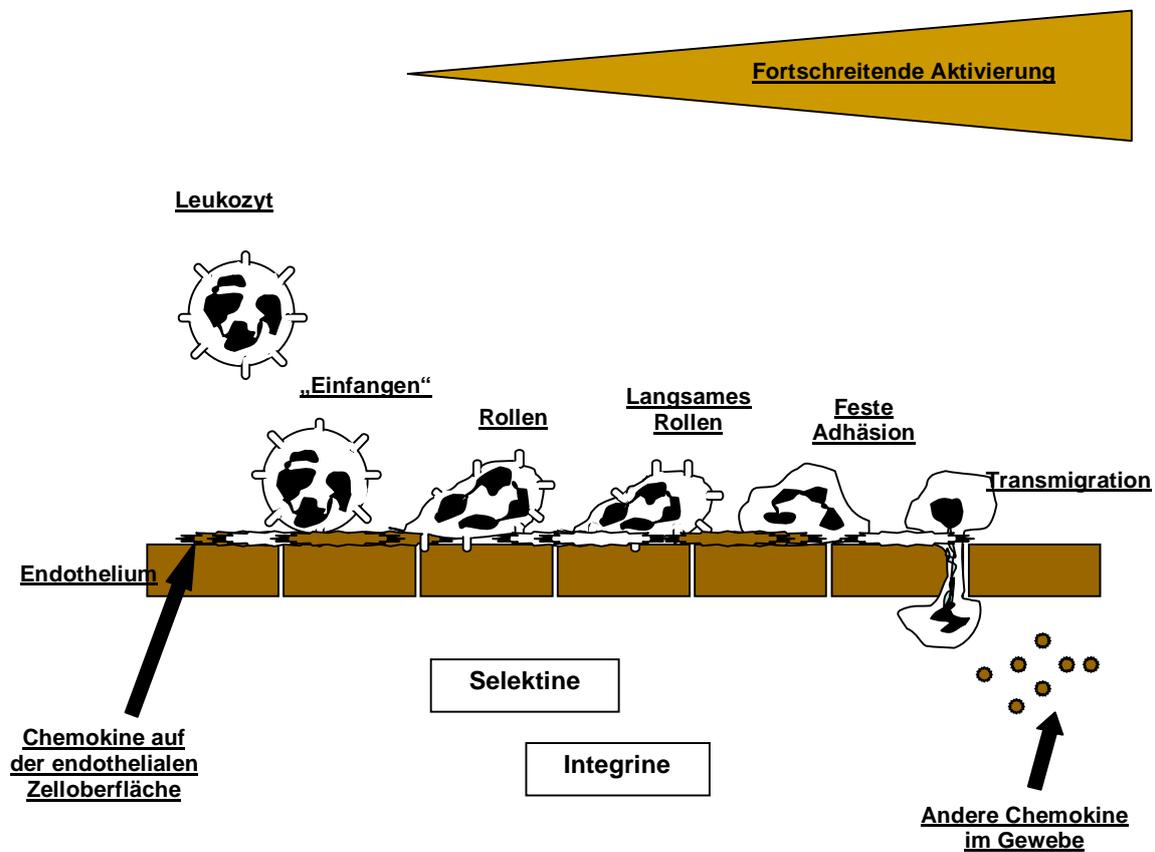
Polymorphkernige Granulozyten (PMN) gehören neben den Monozyten zur Gruppe der Blutphagozyten, die einen essentiellen Bestandteil der unspezifischen Immunität darstellen und dienen primär der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen. Aufgrund ihrer sehr geringen Größe (Durchmesser: im Durchschnitt 12 µm) werden sie auch als „Mikrophagen“ bezeichnet (29, 140). Sie stammen von pluripotenten Stammzellen ab und gehören der myeloischen Zellreihe an. Je nach Anfärbbarkeit ihrer Granula unterteilt man die Granulozyten in neutrophile, basophile und eosinophile. Diesen Granula sowie ihrem gelappten Kern haben die Polymorphkernigen ihren Namen zu verdanken. Granulozyten stellen beim Menschen ungefähr 60-70 % der gesamten Blutleukozyten dar. Im Knochenmark werden 80 Mio. pro Minute produziert, von denen in etwa 90 % dort auf Abruf (im Falle einer Infektion) verbleiben (141). Nur ca. 5 % der Tagesproduktion an PMN befinden sich nach abgeschlossener Entwicklung im Blut. Von diesen zirkuliert knapp die Hälfte, die andere Hälfte haftet als sogenannter marginaler Pool am Gefäßendothel. Die Reifezeit der Granulozyten beträgt 5-10 Tage,

ihre gesamte Lebenszeit um die 12 Tage, was sie im Vergleich zu Monozyten und Makrophagen als sehr kurzlebig dastehen lässt. Im Blut liegt die Halbwertszeit sogar lediglich bei 8-10 Stunden (142). Unter den Granulozyten stellen die neutrophilen Granulozyten mit einem Anteil von 90% die stärkste Fraktion dar. 2-5 % aller Leukozyten im Blut sind eosinophile und nur unter 0,2 % basophile Granulozyten (141). Nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Hund, Katze und Pferd sind die neutrophilen Granulozyten die zahlenmäßig größte Untereinheit der weißen Blutkörperchen (143, 144). Beim Rind hingegen stellen die neutrophilen Granulozyten mit 25-45% nach den Lymphozyten mit 45-65% lediglich die zweitstärkste Leukozytenpopulation dar (145). Auch bei Nagern (Ratte, Maus), wie sie zu Versuchszwecken verwendet werden, liegt der Anteil der neutrophilen Granulozyten nur bei 20- 30% (29). Da diese Zellen Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen waren wird der Begriff „Granulozyten“ im Folgenden als Synonym für neutrophile Granulozyten verwendet. Man zählt sie auch zu den Entzündungszellen, weil sich die Abwehr von Mikroorganismen in der Regel im Rahmen eines Entzündungsgeschehens (Inflammation) abspielt.

### **I.5.1.2. Die granulozytär-endotheliale Interaktion**

Die Entzündung selbst ist als unspezifische Reaktion des Körpers auf exogene oder endogene Noxen zu verstehen. Die Inflammation wird durch erhöhte Blutzufuhr zum Infektionsort und eine gesteigerte Permeabilität der Kapillaren durch Kontraktion der Endothelzellen charakterisiert. Im Rahmen der Inflammation wandern Leukozyten - speziell neutrophile Granulozyten - aus den Kapillaren in das umliegende Gewebe aus. Der Prozess der Leukozytentransmigration besteht aus verschiedenen Teilvorgängen. Zunächst müssen die sich in der Zirkulation befindlichen Zellen durch am Entzündungsort freigesetzte chemotaktische Peptide (v.a C5a, aber auch Fibrinopeptid B, Plättchenfaktor 4 und Leukotrien B4) angelockt werden. Diesen Vorgang, durch den die Phagozyten zum Entzündungsort hingezogen werden, nennt man *Chemotaxis*. Bereits 5-15 Minuten nach Einsetzen einer inflammatorischen Zirkulationsstörung, wenn die Durchblutung verstärkt und beschleunigt ist, bewegen sich die Granulozyten mehrheitlich im Rand- und nicht mehr im Axialstrom. Dies ist die sog. *Marginalisation*. Bevor die Granulozyten im Folgenden fest an den Endothelien adhären, werden sie immer wieder vom Blutstrom mitgerissen. Dadurch entsteht der Eindruck, dass die Zellen langsam und schwerfällig über das Endothel „hinwegtorkeln“. Im Englischen wurde hierfür der Name „rolling“ geprägt. Nach ca. 30 Minuten befinden sich die Granulozyten

fest auf den Endothelzellen. Dieser Schritt der *Adhäsion* - auch „sticking“ oder „pavementing“ genannt - wird durch die feste Bindung an Adhäsionsmoleküle bedingt, welche zuvor von den Endothelzellen unter Einfluss der aktivierten Leukozyten gebildet wurden. Einmal fest am Endothel haftend folgt der Schritt der *Transmigration*. Die Granulozyten lösen in den Endothelzellen mithilfe ihrer Membranglykoproteine eine Kontraktion aus und gleiten dann amöboid durch die entstandene Lücke bis zur nächsten Zellschicht. Über eine Kollagenase sind sie in der Lage, Basalmembranen aufzulösen. Dieses Hindurchkriechen durch das Endothel bis in den Extrazellulärraum des Entzündungsfeldes heißt auch *Diapedese*. Im extravaskulären Bindegewebe angelangt, bewegen sich die Granulozyten entlang eines Konzentrationsgradienten chemotaktischer und chemokinetischer Moleküle in Richtung des Entzündungsherdes. Am Infektionsort steht nun die Eliminierung der eingedrungenen Erreger im Vordergrund, in deren Mittelpunkt die Phagozytose mit Phagosombildung und darauf folgender intrazellulärer Abtötung steht. Um dem Phagozyten das Erkennen des Erregers zu erleichtern, erfolgt zuvor eine Anlagerung von Immunglobulinen oder von Komplementfaktor wie z.B. C3b an den Keim, die auch *Opsonierung* genannt wird. Über die entsprechenden Rezeptoren lagern sich nun die Phagozyten an den Keim und bilden um ihn herum Pseudopodien aus, die anschließend zusammenfließen. Dadurch befindet sich der Mikroorganismus in einem geschlossenen Kompartiment, dem Phagosom. Es beginnt die Abtötung des Keimes (29, 140, 146).

**Abb.7:****Der Mechanismus der leukozytären transendothelialen Migration**

Die einzelnen Phasen des im Text beschriebenen Mechanismus der leukozytären transendothelialen Migration werden anhand von Abbildung 7 deutlich dargestellt. Nach Anlocken der Leukozyten durch chemotaktische Peptide auf der Zelloberfläche rollen die Leukozyten mit abnehmender Geschwindigkeit über das Endothel, bis es zur festen Adhäsion und zur anschließenden Migration ins Gewebe kommt.

### I.5.2. Granulozytäre Zerstörungsmechanismen in der Vaskulitis

Bei der intrazellulären Zerstörung der Mikroben wirken sowohl sauerstoffabhängige (Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies) als auch –unabhängige Mechanismen (Sekretion der Granulakomponenten = Degranulierung) synergistisch (147). Diese Vorgänge können auch als Folgen der vollständigen Aktivierung der Granulozyten verstanden werden (57). Neben der Freisetzung von Sauerstoffradikalen (incl. der Aktivierung von NADPH-Oxidase) und Degranulation führt die Aktivierung der PMN-Zellen auch zu Erhöhung der Produktion von Nitrat-Oxiden, Chemokinen und von Zytokinen wie z.B. IL-1 (148) und IL-8 (149, 150). Zwar sind wirkungsvolle

granulozytäre Reaktionen für die Immunabwehr unverzichtbar, doch führen inadäquate Varianten der Aktivierung von PMN-Zellen wie beispielsweise die extrazelluläre Freisetzung destruktiver Metaboliten zur Gewebeschädigung (151). In der Pathogenese der AAV scheint den neutrophilen Granulozyten eine Schlüsselrolle zuzukommen. Die Histologie zeigt das typische Bild einer Granulozytenakkumulation in den Gefäßwänden und in deren näheren Umgebung (2). Zudem konnten *in vitro* Studien zeigen, dass eine ANCA-induzierte Freisetzung toxischer granulozytärer Metaboliten Nekrose von Endothelzellen bewirken kann (57, 134, 152). Man geht davon aus, dass die Granulozytenaktivierung auch *in vivo* eine wichtige pathogenetische Rolle spielt, da neben dem charakteristischen histologischen Bild der PMN-Akkumulation die Freisetzung granulozytärer Proteasen in vaskulitischen Inflammationsherden und somit eine *in-situ*-Aktivierung neutrophiler Granulozyten beschrieben werden konnte (153).

### **I.5.2.1. Degranulierung**

Im Zytosol von Granulozyten finden sich innerhalb abgeschlossener Kompartimente (Granula) Enzyme mit antimikrobieller Wirkung. Im Rahmen der Phagozytose, die Teil der Mikrobenabwehr ist, werden diese proteolytischen Enzyme durch Fusion der Granulamembran mit dem Phagosom (=Phagolysosom) freigesetzt. Eine Granulafusion mit der Zellmembran hingegen hat eine Freisetzung der Enzyme in das umliegende Gewebe mit konsekutiver Degeneration von Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix und Nekrose zur Folge. Diese Reaktion konnte bei überschüssigen inflammatorischen Prozessen beobachtet werden (151). Die Entwicklung der neutrophilen Granulozyten ist durch die Entstehung von für diese Zellen typischen Granula charakterisiert. Gemäß dem zeitlichen Auftreten im Rahmen der Zellreifung werden drei Klassen von Granula differenziert. Man unterscheidet die primären oder azurophilen Granula von den sekundären oder spezifischen und von den tertiären Granula. Näher eingegangen wird hier auf die primären und die sekundären Granula, da ihre Inhaltsstoffe eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der AAV spielen und somit auch für die spätere Versuchsprotokolle von Bedeutung sind. Eine zusammenfassende Übersicht über alle drei Granulaklassen zeigt Tabelle IV.

Die *primären oder azurophilen Granula* sind bereits in der Promyelozytenphase zu finden. Sie enthalten vorwiegend Myeloperoxidase, neutrale Proteasen (Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3) und saure Hydrolasen (saure Phosphatase,  $\alpha$ -Mannosidase, N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase) (154, 155). Da diese Enzyme auch in Lysosomen anderer Zelltypen aufzufinden sind, werden die primären Granula auch unspezifische Granula genannt. Nicht nur bei der Beseitigung von Mikroorganismen sind die primären Granula von Bedeutung. Ihre Inhaltsstoffe werden auch stark mit der Pathogenese von verschiedenen Gewebsschädigungen in Zusammenhang gebracht (156).

Die *sekundären oder spezifischen Granula* treten in einem späteren Stadium der Granulozytopoese auf. Ihre Inhaltsstoffe werden vorwiegend in den Extrazellulärraum abgegeben, da sie der Abtötung nicht-phagozytierbarer Mikroorganismen dienen. Zu den Inhaltsstoffen zählen antimikrobielle Enzyme wie Lysozym, aber auch die als Chemokin wirkende Kollagenase. Wird sie freigesetzt lockt sie die PMN zum Infektionsort (Chemotaxis) (157). Des Weiteren sind diverse Proteine wie Lactoferrin und Vitamin B-12 bindendes Protein in den sekundären Granula lokalisiert. Sie entziehen extrazellulären Mikroorganismen essentielle Nährstoffe (158).

**Tabelle IV:****Granula humaner neutrophiler Granulozyten**

	<b>Primäre Granula</b>	<b>Sekundäre Granula</b>	<b>Tertiäre Granula</b>
<b>Synonyme</b>	azurophil, unspezifisch	spezifisch	
<b>Saure Hydrolasen</b>	B- Glucuronidase Saure Phosphatase Cathepsin B, D		
<b>Serinproteasen</b>	Elastase Cathepsin G Proteinase 3	Plasminogen- Aktivator	
<b>Metalloenzym</b>	Myeloperoxidase	Kollagenase	
<b>Antimikrobielle Enzyme</b>	Lysozym Kationische Proteine	Lysozym Lactoferrin Vitamin B12- bindendes Protein	
<b>Rezeptoren Adhäsine</b>		Laminin- Rezeptor Fibrinogen-Rezeptor fMLP- Rezeptor	

*adaptiert nach (159).*

*In Tabelle IV werden die Inhaltsstoffe der primären sowie der sekundären Granula aufgeführt. Die tertiären Granula sind lediglich genannt. Es wird nicht auf ihre Zusammensetzung eingegangen, da sie für die vorliegende Arbeit keine bedeutende Rolle spielen.*

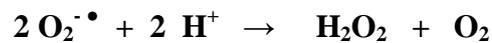
### I.5.2.2. Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Neben der Degranulierung dient auch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch den Granulozyten der Abwehr von Mikroorganismen. Bereits im Jahr 1932 wurde beobachtet, dass der Sauerstoffverbrauch des Granulozyten während der Phagozytose auf das 50- bis 100fache ansteigt (160). Dieses Phänomen ist als Folge einer plötzlich einsetzenden Produktion von verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies zu verstehen. Die Bildung dieser ROS erfolgt in einer explosionsartigen Kaskade und wird deshalb auch „respiratory burst“ oder „oxidative burst“ genannt. Das katalysierende Enzym ist die NADPH-Oxidase, die einen Multienzymkomplex darstellt, der aus verschiedenen Komponenten besteht. Zum einen gehört hierzu die membranständige Komponente bestehend aus den Proteinen gp91<sup>phox</sup> und p22<sup>phox</sup>, welche die Rolle des Elektronenakzeptors übernimmt. Diese Proteine befinden sich in der Membran der sekretorischen Vesikel, die im Rahmen der Phagozytose mit der invaginierten Plasmamembran des Phagosoms verschmilzt, und bilden gemeinsam das Enzym Cytochrom b<sub>558</sub> (161). Die andere Komponente wird von zytosolischen Proteinen gebildet (p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>) (162, 163). Im ruhenden neutrophilen Granulozyten liegen die einzelnen Bestandteile dissoziiert vor, sie sind inaktiv. Erst nach adäquater Stimulation kommt es zu einer Proteinkinase C-abhängigen Phosphorylierung von p47<sup>phox</sup> (164) und folglich zu einer Translokation des gesamten zytosolischen Komplexes zur Plasmamembran (165, 166). Hier führt die Bindung an das Cytochrom b<sub>558</sub> zur Entstehung des kompletten NADPH-Oxidase-Komplexes, zu dessen Aktivierung aber noch zwei weitere Ras-abhängige GTP-bindende Proteine nötig sind: Rap1A und p21rac (bzw. Rac1-humanes Protein; Rac2-murinale Herkunft) (166-170). Während sich Rac1 im Zytosol befindet, ist Rap1 in der Vesikelmembran lokalisiert (170). Die NADPH-Oxidase katalysiert primär die Bildung von Superoxidanion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) über die Reduktion von molekularem Sauerstoff (O<sub>2</sub>). Hierbei dient das im Pentosephosphatweg gebildete NADPH als Elektronendonator (166, 171-173).

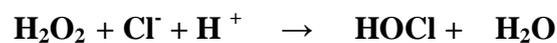


Das gebildete Superoxidanion ist im Vergleich zu anderen reaktiven Sauerstoffspezies weniger reaktiv und besitzt lediglich eine geringe mikrobizide Wirkung. Es dient als Vorstufe zur Umwandlung in weitaus reaktivere Sauerstoffspezies. Die Reduktion zu

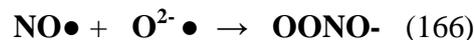
Hydrogenperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) erfolgt meist spontan- besonders bei niedrigem pH- kann aber auch durch das Enzym „Superoxid-Dismutase“ (SOD) katalysiert werden.



Weitere reaktive Verbindungen können ausgehend von Hydrogenperoxid gebildet werden. Besonders in der Anwesenheit von Metallionen-haltigen Verbindungen wie z.B. das  $\text{Fe}^{2+}$ -haltige Lactoferrin, das in den sekundären Granula zu finden ist, führen weitere Reaktionen zur Entstehung hochreaktiver Hydroxylradikale ( $\text{OH}\bullet$ ). Darüber hinaus katalysiert Myeloperoxidase- ein Enzym, das in den primären Granula lokalisiert ist- die Bildung von Hypochlorsäure:



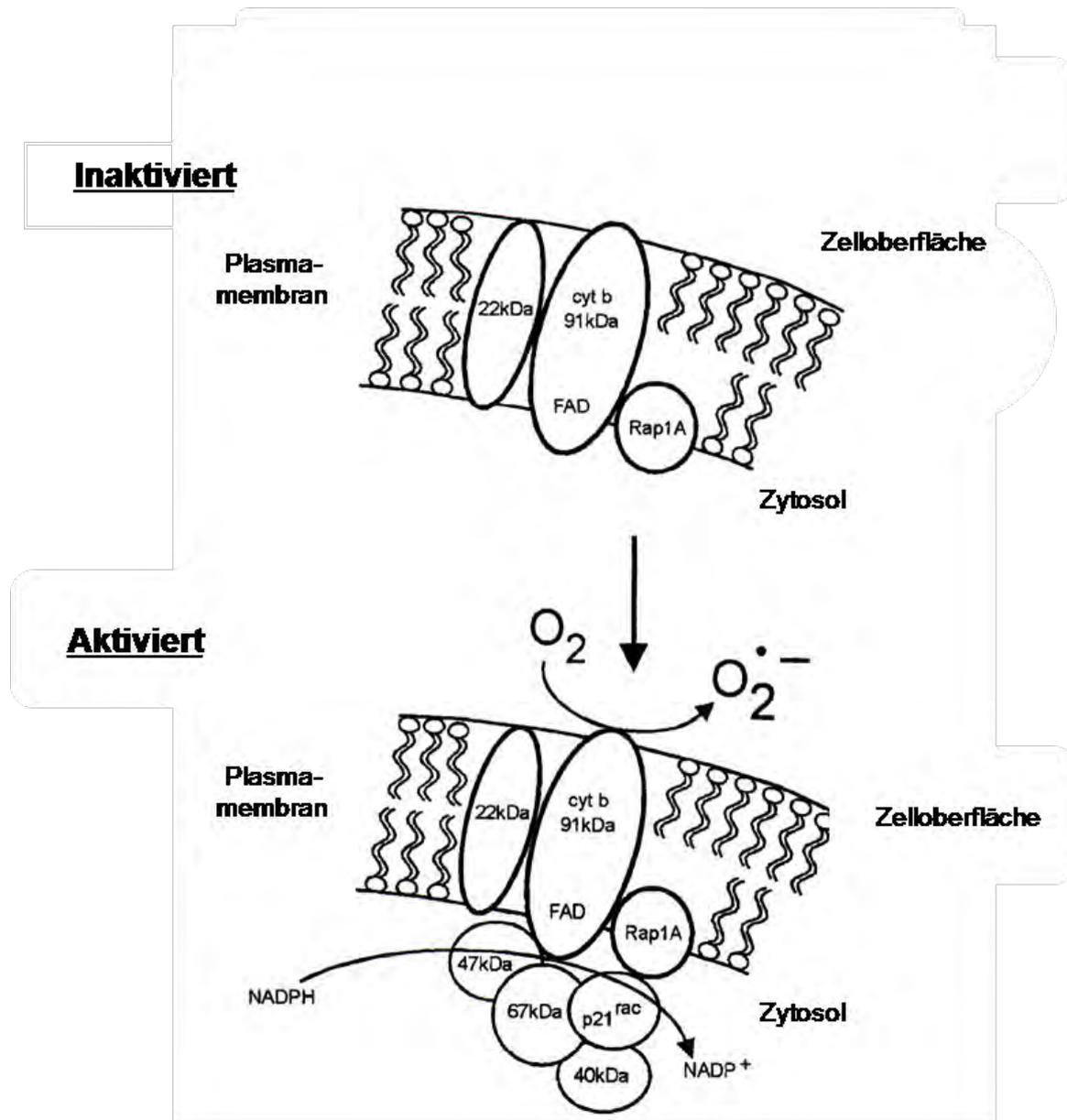
Durch die Interaktion von Superoxid mit Nitritoxid ( $\text{NO}\bullet$ ) kann ein anderes Molekül mit großem antimikrobiellen Potential entstehen: das Peroxynitrit ( $\text{OONO}^-$ ):



Am Beispiel der Hypochlorsäure sowie der Hydroxylradikalen wird das synergistische Zusammenspiel der Mechanismen der Degranulierung und konsekutiver Freisetzung der Granulaenzyme und der Bildung der Sauerstoffradikalen deutlich. Die Aufgabe der gebildeten Sauerstoffspezies ist die Destruktion phagozytierter Mikroorganismen. Diese kann auf unterschiedliche Weise erfüllt werden: sie können sowohl direkt mit Proteinen, Nukleinsäuren oder Membranlipiden interagieren als auch indirekt über die Inaktivierung endogener Proteaseinhibitoren ( $\alpha 1$ -Antitrypsin u.a.) wirken und somit einen maximalen Effekt der granulozytären Proteasen gewährleisten. Wichtig ist, dass das Superoxid primär in das Phagosom freigesetzt wird, um Schädigung der umliegenden Zellen zu verhindern (174). Allerdings kann die respiratorische Entladung auch unabhängig von der Phagozytose durch andere Wechselwirkungen der Zelle mit Stimulanzen induziert werden. Neben der Bindung von Antikörpern an den  $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptor der PMN (142) und von komplementopsonierten Bakterien an den Komplementrezeptoren kann auch die Ankopplung anderer Zellen über die Adhäsionsmoleküle CD11b/18 eine ROS-Ausschüttung zur Folge haben (175, 176). Darüber hinaus hat der Kontakt mit Entzündungsmediatoren ( $\text{TNF}\alpha$  u.a.) denselben Effekt (177).

**Abb. 8:**

Schematische Darstellung der NADPH-Oxidase und ihrer Aktivierung



Wie im vorangehenden Text ausführlich beschrieben veranschaulicht die Abbildung die Translokation verschiedener Komponenten aus dem Zytosol zur Membran hin, welche für die Aktivierung der NADPH-Oxidase notwendig ist (166). Die einzelnen Bestandteile sind in der Abbildung gemäß ihres Molekulargewichtes benannt. 22kDa und 91kDa sind die beiden membranständigen Polypeptide p22<sup>phox</sup> und gp91<sup>phox</sup>, die gemeinsam das Enzym Cytochrom b<sub>558</sub> (cyt b) bilden, welches als Elektronenakzeptor fungiert. gp91<sup>phox</sup> enthält eine Flavin-Adenin-Dinukleotid-Gruppe (FAD), die den Transfer von Elektronen vom zytosolischen NADPH durch die Membran zum molekularen Sauerstoff hin ermöglicht. Rap1A und p21<sup>rac</sup> sind Ras-abhängige GTP-bindende Proteine, die an der Aktivierung der NADPH-Oxidase beteiligt sind. 40 kDa, 47 kDa und 67 kDa stehen für die zytosolischen Polypeptide p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup>.

## **I.6. Die Regulation des inflammatorischen Granulozytenverhaltens**

### **I.6.1 Zytokine**

Zytokine sind kleine Proteine, die im Körper von verschiedenen Zellen freigesetzt werden und durch Bindung an spezifische Rezeptoren Reaktionen auslösen. Als primäre Resource für diese immunregulatorischen Proteine sind ortsständige Makrophagen, periphere Blutmonozyten und Lymphozyten anzusehen. Zytokine können sowohl lokal, d.h. autokrin und parakrin als auch endokrin, d.h. über die Blutbahn auf entfernt liegende Zellen systemisch wirken. Ihre Aufgabe ist die Regulierung der Immunantwort und die Steuerung des Inflammationsgeschehens. Zu der strukturell sehr heterogenen Gruppe der Zytokine gehören u.a. IL-1, IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$ . Man bezeichnet diese Moleküle auch als proinflammatorische Zytokine, da sie an der akuten Phase einer Immunreaktion beteiligt sind. Die primär sezernierten Moleküle IL-1 und TNF $\alpha$  induzieren hierbei die Synthese weiterer Zytokine. In der Leber regen sie entsprechend die Produktion der Akute-Phase-Proteine (z.B. C-reaktives Protein) an und im Knochenmark die Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten. Im Hypothalamus induzieren sie die Erhöhung der Körperkerntemperatur, weshalb man sie auch als endogene Pyrogene bezeichnet. Darüber hinaus mobilisieren sie Proteine aus Fett und Muskulatur zur Energiegewinnung und aktivieren B- und T-Lymphozyten. Folglich werden über ein Akute-Phase-Protein das Komplementsystem aktiviert und der Keim opsoniert. Neutrophile Granulozyten wandern an den Ort der Entzündung, um dort Keime zu phagozytieren. Fieber und Lymphozyten spielen eine weitere Rolle in der Keimabwehr (142, 177). Die proinflammatorischen Zytokine regulieren mit zusätzlicher Einwirkung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (G-CSF, GM-CSF) die Funktionen des neutrophilen Granulozyten. So können sie den Granulozyten in einen „voraktivierten“ Zustand („priming“) versetzen, was eine verstärkte granulozytäre Antwort auf einen nachfolgenden Stimulus bedingt (178). Durch das „priming“ erfährt der Granulozyt eine Formveränderung, die durch eine Polarisierung der Zelle und eine verstärkte Expression verschiedener Moleküle an der Zellmembran charakterisiert ist. Diese Oberflächenexpression wird teilweise durch Translokation der entsprechenden Granulakomponenten vom Zytosol an die Zellmembran bedingt (179, 180). Da Zytokine neben den Leukozyten auch Endothelzellen aktivieren und die Interaktionen zwischen diesen forcieren können, scheint ihnen in der Entwicklung von PSV eine bedeutende Rolle zuzukommen. Auch Allgemeinsymptome bei Vaskulitiden wie Fieber und

Gewichtsverlust werden durch das Vorhandensein erhöhter Zytokinspiegel im Serum erklärt (110). Darüber hinaus wurden bei Patienten mit aktiver, generalisierter WG erhöhte Zytokinspiegel (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8) im Serum sowie im Gewebe festgestellt (181-183).

## **I.6.2. Lipidmediatoren**

Neben den Zytokinen sind für die Steuerung des inflammatorischen Granulozytenverhaltens bioaktive Lipide, die sog. Lipidmediatoren von zentraler Bedeutung. Hierzu gehören in erster Linie die Arachidonsäuremetaboliten, die auf dem Lipoxygenaseweg entstehen (Leukotriene), sowie acetylierte Derivate des Membranlipids Phosphatidylcholin, insbesondere der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF). Aktivierte Granulozyten sind befähigt, Mediatoren beider Substanzgruppen in großen Mengen zu sezernieren. Da die biologische und chemische Halbwertszeit dieser Stoffe extrem kurz ist, wirken sie als Lokalmediatoren, d.h. in ihrer nächsten Umgebung.

### *Eikosanoide*

Die Metabolite der Arachidonsäure werden in ihrer Gesamtheit auch als Eikosanoide bezeichnet und stellen eine Gruppe proinflammatorischer Lipidmediatoren dar, die zahlreiche Immunreaktionen induzieren. Jegliche Zellschädigung- einschließlich der Entzündung- führt über die Aktivierung von Phospholipase A<sub>2</sub> zur Freisetzung mehrfach ungesättigter C-20-Fettsäuren aus Phospholipiden der Zellmembran, wie vor allem die C-20-FS Arachidonsäure (AA). Als Ausgangsmaterial für einige hochwirksame und weit verbreitete Entzündungsmediatoren kann sie über zwei verschiedene Wege verstoffwechselt werden. Über den Lipoxygenaseweg werden die Leukotriene (LT) gebildet, auf die im weiteren noch näher eingegangen wird, da sie vor allem in neutrophilen und eosinophilen Granulozyten gebildet werden. Thromboxane, Prostaglandine und Prostazyklin entstehen über den Zyklooxygenaseweg. Während Thromboxane vorwiegend in den Thrombozyten und Prostazykline in den Endothelzellen entstehen, kommen Prostaglandine ubiquitär vor. Granulozyten verfügen nur über eine sehr geringe Zyklooxygenase-Aktivität. Ihre endogene Hauptressource für freie Arachidonsäure ist das Membranlipid Phosphatidylcholin. Allerdings sind sie auch dazu befähigt, Angebote an exogener AA zu metabolisieren. *In vivo* sind es im Rahmen einer Inflammation verschiedene Zelltypen wie Alveolarmakrophagen und vaskuläres Endothel, die als Arachidonsäure-Liberatoren dienen. Man nennt diesen Vorgang auch „kooperative Eikosanoidsynthese“ (184).

### *Lipoxygenase-Produkte der Arachidonsäure*

Unter Mitwirkung von Lipoxygenasen entstehen im Granulozyten aus Arachidonsäure über mehrere Zwischenstufen verschiedene Vertreter der Gruppe der Leukotriene. Neben den Cysteinylleukotrienen LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub>, welche auch unter dem Namen „slow reaction substance of anaphylaxis“ (SRS-A) zusammengefasst werden, gehört hierzu auch Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), welches stark proinflammatorische Eigenschaften besitzt. Im Gegensatz zu SRS-A sind die Zielzellen von LTB<sub>4</sub> primär Leukozyten. Auf Granulozyten, Monozyten und Mastzellen hat diese Substanz einen starken chemotaktischen Effekt. Auch spielt es – dem Plättchen-aktivierenden Faktor ähnelnd - bei der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel einen wichtigen Part: es wirkt als Adhäsions- und Diapedese-induzierender Mediator (185, 186). Außerdem scheint LTB<sub>4</sub> eine zentrale autokrine Aufgabe bei der Regulation von inflammatorischen Granulozytenreaktionen - wie Sauerstoffradikalbildung und Degranulierung - zu erfüllen. Untersuchungen zeigten, dass eine Vielzahl von „klassischen“ Granulozytenstimuli (darunter Calciumionophor A23187 und das Bakterien-Tripeptid fMLP) indirekt über endogen gebildetes LTB<sub>4</sub> auf Granulozyten wirken (187-189). Aber auch direkte Immunmodulation gehört zu den Eigenschaften dieses Leukotriens: *in vitro* stimuliert es die Zytokinsynthese in Monozyten und bewirkt Proliferation von T-Lymphozyten (190, 191).

## **I.7. Rolle der neutrophilen Granulozyten im akuten Lungenversagen in der Wegener'schen Granulomatose**

In der kapillären Strombahn der Lunge, vor allem in den postkapillären Venolen, befindet sich ein großer Pool von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, der in ständigem Austausch mit der Zirkulation steht. Dieser Pool kann sich auf zahlreiche Reize hin innerhalb kürzester Zeit noch um ein Vielfaches vergrößern (192). Da der durchschnittliche Durchmesser der PMN-Zellen größer als der der Kapillaren ist, treten die Granulozyten in engen Kontakt mit den Gefäßendothelzellen. Die Flussgeschwindigkeit wird verlangsamt: das sog. „sticking“ tritt ein. Erfolgt nun eine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten oder der EC, so kommt es zur Adhäsion, Transmigration ins Lungeninterstitium und Entladung des antimikrobiellen Potentials der Granulozyten - wie bereits im vorherigen Kapitel genauer erläutert worden ist (193).

Im Rahmen der WG sind die in der Lunge befindlichen neutrophilen Granulozyten die Auslöser des akuten Lungenversagens. Die Depletierung von PMN-Zellen konnte *in vitro* die Entstehung einer akuten Lungeninsuffizienz (ALI) verhindern (194, 195). Außerdem wurde nachgewiesen, dass sie die Hauptressource für IL-1 $\beta$  und weitere proinflammatorischer Zytokine und Chemokine darstellen (196). Beispielsweise ist IL-8 zu großem Teil für die Akkumulation weiterer Granulozyten in den Lungen von WG-Patienten verantwortlich. Es wurde in Untersuchungen bestätigt, dass sein Gehalt in bronchoalveolären Spülproben von Patienten mit WG im Vergleich zu Proben gesunder Probanden deutlich erhöht gewesen ist (197). Außerdem wurden in bronchoalveolären Spülproben von Patienten mit aktiver WG neben einer hohen Anzahl von cANCA eine erhöhte Menge von neutrophilen Granulozyten gefunden. Diese intrapulmonale Ansammlung von neutrophilen Granulozyten wird als charakteristisch für die WG angesehen. Man geht davon aus, dass diese PMN-Zellen infolge von Degranulation durch ihre oxidativen und proteolytischen Produkte zur Lungenschädigung führen, wobei die Lunge in der WG unter Ausbildung eines ALI das meist betroffene Organ darstellt. In wenigen Fällen kann die Lunge sogar der einzige Manifestationsort sein (197-199). In den BALF von WG-Patienten sowie in solchen von Patienten mit ALI ist darüber hinaus die neutrophile Granulozyten Elastase (NE) erhöht gewesen. Ihr kommt neben der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowohl im Krankheitsbild des ALI als auch bei der Wegener'schen Granulomatose eine entscheidende pathogenetische Rolle zu (200-202, 203). Untersuchungen von renalen Biopsien von WG-Patienten im akuten Stadium, die eine gesteigerte Präsenz von aktivierten Neutrophilen im betroffenen Gewebe feststellten, sprechen dafür, dass die neutrophilen Granulozyten eine zentrale Rolle im Krankheitsgeschehen der Wegener'schen Granulomatose spielen. Hierbei korrelierte die Zahl der aktivierten PMN-Zellen mit dem Grad der Gewebeschädigung (153, 181). Da bisher nur *in vitro* gezeigt wurde, dass ANCA toxische, granulozytäre Reaktionen induzieren können, ist die Untersuchung der ANCA-PMN-Interaktion am isolierten Organmodell von bedeutendem Interesse.

## I.8. Fragestellung

Die Wegener'sche Granulomatose stellt eine der häufigsten Formen der primär-systemischen Vaskulitiden dar. Sie ist charakterisiert durch das sehr spezifische Auf-reten von gegen PR3 gerichteten cANCA in ca. 95% der Seren von WG-Patienten. Zur Untersuchung der zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismen in der WG und der daraus resultierenden Frage, inwiefern man in das Geschehen mittels inhibitorisch wirksamer Substanzen therapeutisch eingreifen könnte, war das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit die Etablierung eines Modells der akuten Wegener'schen Granulomatose an der isoliert perfundierten und ventilerten Rattenlunge. Anhand dieses Modells sollten die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Kann durch Applikation humaner neutrophiler Granulozyten und anti-leukozytärer Antikörper am Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Rattenlunge eine pulmonale Schrankenstörung ausgelöst werden?
2. Welche Rolle spielt dafür die vorherige Aktivierung („Priming“) und die PR3-Oberflächenexpression der Granulozyten?
3. Welche leukozytären Mediatoren sind bei der Antikörper-medierten Schädigung der pulmonalen Strombahn ursächlich beteiligt?
4. Lässt sich nach Perfusion ANCA-aktivierter Granulozyten ein morphologisches Korrelat der pulmonalen Schädigung nachweisen?
5. Sind aus den Ergebnissen neue Möglichkeiten zur Therapie des fulminanten M. Wegener ableitbar?

Zunächst wurden zahlreiche Kontrollversuche zur Festlegung der Basiswerte durchgeführt. Anschließend wurden zur Beantwortung dieser Fragen der Perfusatlösung, mit der die isoliert ventilerten Rattenlungen perfundiert wurde, „geprimte“ PMN und cANCA zugesetzt und verschiedene spezifische Inhibitoren der Enzyme, von deren Beteiligung am Geschehen des fulminanten M. Wegener auszugehen ist, eingesetzt. Die Reaktionen der Lungen auf den Einsatz von „geprimten“ PMN und ANCA und den der

Inhibitoren wurden durch permanente Messung des Ventilationsdruckes, der Drücke der Pulmonalarterie und des linken Ventrikels, sowie des Lungengewichtes registriert. Darüber hinaus wurde der kapilläre Filtrationskoeffizient berechnet. Er gilt als sehr aussagekräftiger Wert zur Beurteilung der voranschreitenden Permeabilität der Lungenkapillaren und somit des Grades der pulmonalen Schrankenstörung. Ausserdem wurden Kryoschnitte einzelner Lungen aus verschiedenen Versuchsgruppen angefertigt und einer immunhistologischen Färbung zum Nachweis von Myeloperoxidase als Marker einer Granulozyteninfiltration in die Alveolarsepten unterzogen.

## **II. Material und Methodik**

### **II.1. Material**

#### **II.1.1. Tiere**

Für alle Untersuchungen wurden männliche CD-Ratten (Charles River Wiga, D-Sulzfeld) mit einem Gewicht von 350- 450g verwendet. Die Haltung der Tiere und alle experimentellen Verfahren wurden in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Die anzeigepflichtigen Versuche wurden beim Regierungspräsidium Giessen gemeldet und genehmigt. Die Ratten wurden in Gruppen von max. 5 Tieren auf Labortiereinstreu aus Hobelspänen gehalten; die Nutzfläche der Käfige betrug 1500 cm<sup>2</sup>. Die Raumtemperatur lag bei 22-24°C, die Luftfeuchte bei 55-60%. Leitungswasser und Nagetierfutter standen *ad libitum* zur Verfügung.

- Hoch-Temperatur-Polysulfon-Käfige 1500 U Eurostandard TypIV S, Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland
- Labortiereinstreu aus Hobelspänen, Abedd Lab & Vet Service GmbH, Wien, Österreich
- Nagetierfutter = Harlan Teclad 2018 Global Rodent Diet, Harlan Teclad, Shaw's Farm, Blackthorn, Großbritannien

#### **II.1.2. Anti- PR3- Antikörper**

Verwendet wurde ein muriner monoklonaler Antikörper der Klasse IgG gegen humane granulozytäre Proteinase 3. Dieser Antikörper (MAB PR3 4A5) wurde von der Firma

Wieslab (Lund, Schweden) bezogen. Als Kontrollantikörper kam MOPC-21, ein murinales IgG der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland), zum Einsatz.

### II.1.3. Experimentelle Pharmaka, Agentien und Materialien

- Narcoren<sup>®</sup> ( Pentobarbital- Natrium), Merial, Hallbergmoos, Deutschland
- Xylocain 2%, Astra Zeneca GmbH, Wedel, Deutschland
- Braunol<sup>®</sup>, B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Liquemin<sup>®</sup> ( Heparin- Natrium), Hoffmann- La Roche, Grenzach- Wyhlen, Deutschland
- Isotonische Kochsalzlösung 0,9%, Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland
- *Aqua ad injectabilia*, Baxter S.A., Lessines, Belgien
- Isotone Kochsalzlösung, Baxter S.A, Lessines, Belgien
- Elektrolytlösung IIN, Sera-Wiessner KG, Naila, Deutschland
- Krebs-Henseleit-Puffer (endotoxinfrei mit 5% Hydroxylethylstärke), Serag-Wiessner, Naila, Deutschland
- Natrium- Hydrogencarbonat 8,4 %, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
- MK886 ( Lipoxygenase- Inhibitor), Biomol, Hamburg, Deutschland
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- AAPVCK (Ala(2)-Pro Val Chloromethyl Keton) ( spezifischer Elastase- Inhibitor), Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- SOD (Superoxid- Dismutase), Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- DPI (Diphenyleneiodonium), (Inhibitor der NADPH-Oxidase), Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Deutschland
- O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Messer Griesheim, Herborn, Deutschland
- Pulmonalkatheter aus Metall, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland
- Trachealkatheter aus Metall, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland
- Ventrikelkatheter aus Metall, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland
- Glasgefäße, Glaswärmekammer, Glasspirale, Glasbläserei Justus-Liebig- Universität, Giessen, Deutschland
- Spritzen: 50 ml, 20ml, 5ml, 2ml, B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Kanülen: 24Gx1-Nr.17 und 26Gx1/2, BD Microlance, Fraga, Spanien und BD, Drogheda, Irland
- Beatmungsgerät, KTR-4, Hugo Sachs Electronic, March, Deutschland

- 4-Kanal-Brückenverstärker, Transbridge 4M, TBM, World Precision Instruments, Sarasota, USA
- elektronische Wägezelle = Kraftaufnehmer Typ U1A, Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Messverstärker für Elektronische Wägezelle U1, Hottinger Baldwin Messtechnik GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Druckaufnehmer, Combitrans, Monitoring Set Med. II zur Messung des arteriellen Druckes, B. Braun, Melsungen, Deutschland
- AD/DA Messkarte PCL-818 HG, Spectra Computersysteme, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland
- Labtech Notebook Software Pro-Version 10.1, Spectra Computersysteme, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland
- Peristaltikpumpe Masterflex<sup>®</sup>, Cole Parmer Instrument Co., Chicago, USA
- Easy-Load-Pumpenkopf, Modell 7518-10, Cole Parmer Instrument Co., Chicago, USA
- Thermopumpe bestehend aus Heizgerät, Thermomix<sup>®</sup>, Modell 1442 und Kühlgerät, Frigomix<sup>®</sup>, Modell 1495, B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Blutgasanalysator, Rapidlab<sup>™</sup> 348, Bayer Healthcare, East Walpole, USA
- Schlauchsystem, Einzelschläuche: Masterflex<sup>®</sup> Tygon<sup>®</sup>, Cole Parmer Instrument Co., Chicago, USA
- Handschuhe, Nobaglove-Latex, Noba Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG, Wetter, Deutschland

#### II.1.4. Materialien und Lösungen für die Zellisolation und Inkubation

- Zentrifuge, Mikro 200R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
- Neubauerkammer, LO-Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland
- Rüttler, VXR basic Vibrax<sup>®</sup>, IKA<sup>®</sup> Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
- Dextran-T500, Pharmacia AB, Uppsala, Schweden
- Ammoniumchlorid- Puffer, pH 7,4:
  - 8,3g Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl), Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
  - 1g Kaliumhydrogencarbonat (KHCO<sub>3</sub>), Merck, Darmstadt, Deutschland
  - 0,037g Natrium- EDTA- Triplex, Merck, Darmstadt, Deutschland
  - 1000 ml *Aqua destillata*

- PBS<sup>-/-</sup> 10x stock, pH 7,4:  
80g Natriumchlorid (NaCl), Carl Roth GmbH+CoKG, Karlsruhe, Deutschland  
2g Kaliumchlorid (KCl) Merck, Darmstadt, Deutschland  
11,5g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O), Merck, Darmstadt, Deutschland  
2g Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Merck, Darmstadt, Deutschland  
mit *Aqua destillata* auf 1000 ml auffüllen
- Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
- TNF $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha, human, rekombinant),Boehringer, Mannheim, Deutschland
- PBS<sup>+/+</sup> (cum Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup>):  
100 ml PBS 10x (cum Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup>) , Gibco, Karlsruhe, Deutschland  
900ml *Aqua destillata*  
1 n NaOH ad pH 7

### II.1.5. Materialien und Lösungen für die FACS-Analytik

- BSA (bovines Serum-Albumin, fettsäurefrei), Calbiochem, La Jolla, USA
- Phycoerythrin(PE)-conjugated goat-anti-mouse IgG, Dako, Hamburg, Deutschland
- IgG, Isotype control, Dianova, Hamburg, Deutschland
- pooled human IgG (Octagam), Octapharma, Langenfeld, Deutschland
- Zytometer, BD FACScan<sup>TM</sup>, Becton-Dickinson, Mountain View, USA
- FACS-Software, BD CellQuest<sup>®</sup> software, Becton-Dickinson, MountainView, USA

### II.1.6. Materialien und Lösungen zur Anfertigung der histologischen

#### Schnitte und deren Färbung

- Tissue Freezing Medium, Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Deutschland
- Formaldehyd 4,5%ig, säurefrei ,phosphatgepuffert, Roth GmbH+CoKG, Karlsruhe, Deutschland
- Isopentan = 2- Propanol, Fluka, Buchs, Schweiz
- Polypropylen-Becher mit Polyethylen-Schraubdeckel = Urinbecher, Brand GmbH CoKG, Wertheim, Deutschland
- Superfrostobjektträger, Menzel, Braunschweig, Deutschland
- Xylol, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- 70%iger Alkohol = Ethanol, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

- Eisessig, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Haemalaun sauer nach Mayer, Waldeck GmbH&CoKG, Division Chroma, Münster, Deutschland
- Eosinlösung:  
Eosinstammlösung, Microscopy Eosin-G-Lsg 0,5% wässrig, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland + 70%igen Alkohol im Verhältnis 1:1 + 5 Tropfen Eisessig pro 100 ml der Mischung
- Pertex, Schnelleindeckmittel für histologische und zytologische Präparate, Burgdorf, Deutschland
- Kryomikrotom, Leica Jung CM 3000, Bensheim, Deutschland
- Polarisationsmikroskop, Zeiss Axioskop 40, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Digitalkamera, JVC KY-S75U, JVC, Friedberg, Deutschland
- Diskus software, Version 4.5, Carl. H. Hilgers, Königswinter, Deutschland
- Rabbit polyclonal anti-human-myeloperoxidase Code No. A 398 Lot 117, DAKO, Hamburg, Deutschland
- Mouse anti-rabbit IgG Code M 737, DAKO, Hamburg, Deutschland
- APAAP ChemMate kit, K5000, DAKO, Hamburg, Deutschland
- Alle verwendeten Salze und Chemikalien, wenn nicht anders angegeben, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## II.2. Methodik

### II.2.1. Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten

Humane neutrophile Granulozyten wurden aus peripherem Blut nach der Methode von Boyum durch Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten gewonnen (204). Die Isolation wurde unter sterilen Bedingungen bei einer Raumtemperatur von durchschnittlich 22 ° C durchgeführt und dauerte in etwa 2 Stunden.

#### **Blutentnahme**

Die Granulozyten stammten aus dem venösen Blut gesunder Spender, welches diesen durch Punktion einer peripheren Vene der Armbeuge entnommen wurde. Hierzu wurde eine Kanüle der Größe 19G verwendet. Das Blut wurde in eine zuvor mit EDTA befüllte Spritze aufgezogen, so dass die EDTA-Endkonzentration 0,125% betrug. Die

Blutentnahme wurde entweder von mir persönlich oder von der Medizinisch-technischen Assistentin Frau Bettina Schmidt durchgeführt. Um den zeitlich einwandfreien Ablauf der Versuche gewährleisten zu können, wurde die zuvor gemeinsam erlernte weitere Aufbereitung der Proben zur Isolierung der Granulozyten von Frau B. Schmidt gemäß den im Folgenden erläuterten Arbeitsschritten durchgeführt.

### **Ficoll-Gradient**

Das EDTA-Vollblut wurde mit Dextran im Verhältnis 1:4 in einem Falcon- Rörchen gemischt. Ein solches Propylen-Rörchen (Falcon) enthielt das Gesamtvolumen von 50 ml. Dann folgte eine Inkubationsphase von 30 Minuten. Das Rörchen wurde hierfür in den 37°C warmen Brutschrank gestellt. In der Zwischenzeit wurden pro 50 ml Vollblut-Dextran-Gemisch (entsprach einem Blutrörchen) 2 Falcons mit jeweils 10 ml Ficoll vorgelegt. Nach beendeter Inkubation wurde der Überstand eines jeden Rörchens abpipettiert und jeweils die Hälfte davon auf je ein vorbereitetes Ficollrörchen aufgeschichtet. Jegliches Vermischen von Überstand und Ficoll mußte vermieden werden. Anschließend erfolgte bei Raumtemperatur eine 20minütige Zentrifugation bei 250 x g. Diese Zentrifugation über dem Ficoll-Gradienten bewirkte eine Auftrennung von thrombozytenreichem Plasma und mononukleären Zellen (Mono- und Lymphozyten) im Überstand sowie von Granulo- und Erythrozyten im Sediment. Der Überstand (Thrombozyten und mononukleäre Zellen) wurde abgesaugt und verworfen.

### **Hämolyse**

Um nun die roten Blutkörperchen zu eliminieren, wurde eine Hämolyse ausgelöst. Dies geschah folgendermaßen: Man gab in jedes Rörchen 8 ml eines Ammonium-Chlorid-Puffers und resuspendierte das Pellet mit einer Pipette. Nun wurden je zwei Rörchen gepoolt. Anschließend stellte man das Gemisch für 5 Minuten auf Eis. Das so entstandene Volumen wurde mit PBS<sup>-/-</sup> auf 50 ml aufgefüllt. Man nennt diesen Arbeitsschritt „Waschen“. Nach einer weiteren Zentrifugationsphase von 5 Minuten bei 110 x g wurde der Überstand abgesaugt. Die übrigbleibenden Pellets wurden resuspendiert und auf ein Falcon gepoolt. Erneut wurde mit PBS<sup>-/-</sup> auf 50 ml aufgefüllt. Der vorherige Zentrifugationsvorgang wurde wiederholt, der Überstand abgesaugt und verworfen, das Pellet - jetzt fast ausschließlich aus Granulozyten bestehend - resuspendiert und das Volumen mit PBS<sup>-/-</sup> erneut auf 50 ml aufgefüllt.

### **Zellzählung**

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde eine Neubauerkammer verwendet. 10  $\mu$ l der Granulozyten- Suspension wurden auf die Kammer pipetiert. Gezählt wurden die Granulozyten in 4 Eckquadraten. Multiplizierte man das Ergebnis mit 2,5 und dann mit 50 000, so entsprach dies der Menge an Granulozyten in 50 ml. Bei sehr großem Pellet konnte es nötig sein, die Suspension 1:10 zu verdünnen (100  $\mu$ l + 900 $\mu$ l PBS<sup>-/-</sup>).

### **Weiteres Verfahren**

Die isolierten Granulozyten wurden nun in PBS<sup>+/+</sup> gelöst. Der für den Versuch nötigen Menge von 150 Mio. PMN wurden 10 ml PBS<sup>+/+</sup> zugesetzt. Bis zu dem Zeitpunkt, an dem die neutrophilen Granulozyten benötigt wurden, wurden diese im Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C langsam auf einem Rüttler geschwenkt.

### **Vorinkubation**

Um die Granulozytenaktivität zu steigern, erfolgte eine Vorinkubation mit TNF $\alpha$ . Die in PBS<sup>+/+</sup> gelösten neutrophilen Granulozyten wurden mit TNF $\alpha$  in der Konzentration 2 ng/ml versetzt. Dies geschah 30 Minuten bevor das Gemisch als Bolus in das Perfusat vor der Lunge gespritzt wurde.

## **II.2.2. Vorbereitung und Verlauf der Tierpräparation zur Entnahme der**

### **Lunge, Ventilation und Perfusion**

#### **Narkose**

Bei den zu operierenden Tieren wurde eine reine Pentobarbitalnarkose (Narcoren®) durchgeführt. Sie wurde als intraperitoneale Injektion, d.h. in die Bauchhöhle, verabreicht. Zur Erreichung einer ausreichend tiefen Narkose wurde die Dosierung von 80 mg/kg Körpergewicht gewählt, was im Durchschnitt einem Injektionsvolumen von 0,2ml Narcoren verdünnt mit 0,8ml 0,9%iger Kochsalzlösung entsprach. Als Anhaltspunkt für die Beurteilung der Narkosetiefe dienten der Lidreflex, der Zwischenkrallenreflex und der Cornealreflex. Außerdem ließ sich anhand der nachlassenden Empfindlichkeit auf Kälte und Nässe im abdominalen Bereich feststellen, ob die Ratte ausreichend narkotisiert war.

Die folgende Präparation der Lunge und deren Entnahme wurden in Anlehnung an bereits in Veröffentlichungen beschriebenen Lungenmodellen durchgeführt. Hierbei handelte es sich sowohl um etablierte Modelle der isolierten Kaninchenlunge (205) als auch der isolierten Rattenlunge (206-208).

### **OP-Vorbereitung**

Nach Erreichen eines sicheren, tiefen Narkosestadiums wurde das Tier zur Fixierung sowohl an den Vorder- als auch an den Hinterbeinen ausgebunden. Anschließend erfolgte eine gründliche Desinfektion des gesamten Operationsfeldes mit Braunol. Vor Beginn der eigentlichen Operation wurde die Ratte intubiert und an das Beatmungsgerät angeschlossen. Hierfür wurde eine Tracheotomie durchgeführt. Zur zusätzlichen Sensibilitätsausschaltung wurde eine kutane Quaddel von 0,9 ml 2% Xylocain<sup>®</sup> verdünnt mit 0,6 ml NaCl gesetzt. Durch vorsichtige Präparation wurde die Trachea dargestellt und anschließend durch eine Tracheotomie mit einer Trachealkatheter von 2,5 mm Durchmesser versetzt. Die Inzision wurde genau zwischen zwei Trachealspangen gesetzt, um Blutungen und Verletzungen der Luftröhre zu vermeiden. Nach erfolgter Intubation wurde die Rattenlunge mit Luft folgender Zusammensetzung ventiliert: 21% O<sub>2</sub>; 5,3% CO<sub>2</sub>; 73,7% N<sub>2</sub>. Die Ventilation erfolgte mittels eines Beatmungsgerätes für Kleintiere. Das Atemzugvolumen betrug 4 ml bei einer Frequenz von 65 Atemzügen pro Minute und einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von 2 cm Wassersäule [cm H<sub>2</sub>O].

### **Operationsverlauf**

Der folgende Präparationsschritt umfasste die großflächige Ablösung der Bauchhaut von der darunter liegenden externen Bauchmuskulatur. Nun wurde eine Laparotomie durchgeführt. Kaudal des *Sternum* wurde eine Inzision der Bauchdeckenmuskulatur gesetzt und diese Öffnung durch Durchtrennung von Unterhaut, Muskulatur und Faszien beidseits entlang der Rippenbögen erweitert. Nach Durchtrennung des *Musculus rectus abdominis* lag das Abdomen weiträumig frei. Jetzt wurde zur Vermeidung einer eventuellen Thrombenbildung in den Koronarien Heparin (Liquemin<sup>®</sup> 1000 IU/kg Körpergewicht) in die *Arteria renalis sinistra* injiziert. Zur besseren Darstellung des Zwerchfelles wurde der *Processus xiphoideus* mit einer Klemme nach ventral gezogen. Anschließend wurde das Diaphragma vorsichtig von den Rippenbögen getrennt und somit der Thorax eröffnet. Aufgrund des Kollabierens der beiden Lungenhälften konnte eine mediale Sternotomie ohne Gefährdung des kardio-pulmonalen Organsystems durchgeführt

werden, so dass Lunge und Herz frei sichtbar und gut zugänglich im Operationsfeld lagen. Anschließend wurde der Thymus durch stumpfes Präparieren entfernt. Zur weiteren Präparation wurde das Herz an seiner Spitze mit einer Klemme fixiert. Um das spätere Fixieren eines im Folgenden zu schiebenden Pulmonalkatheters mit 2,5 mm Durchmesser zu ermöglichen, wurden *Aorta ascendens* und *Arteria pulmonalis* mit einem Faden unterfahren und eine Ligatur locker vorgelegt. Nach Inzision des rechten Ventrikels auf Höhe des Abganges der Pulmonalarterie wurde der erwähnte Katheter, der bereits an das Perfusionssystem angeschlossen war, in die *Arteria pulmonalis* eingeführt und mittels der vorgelegten Ligatur fixiert. Um einen zu hohen Druck in der Lungenstrombahn zu vermeiden, wurde sofort nach Legen des Katheters die Herzspitze abgesetzt. Die Perfusion erfolgte nun mit einer Geschwindigkeit von 8 ml/min. Das Perfusat hatte eine Anfangstemperatur von 4° C. Um den Organkomplex - bestehend aus Herz und Lunge - entnehmen zu können, wurde zunächst die Trachea von dem ihr anliegenden Gewebe getrennt und dann die Lungenhälften stumpf nach kaudal freipräpariert. Nach Durchtrennung des Ösophagus und der *Vena cava caudalis* konnten Herz und Lunge entnommen und mitsamt der Beatmungs- und Perfusionsschläuche zur späteren Gewichtskontrolle an einer elektronischen Wägezelle (Messbereich 0-500g, Messgenauigkeit ±0,01g) in einer befeuchteten Wärmekammer frei hängend befestigt werden. Zum Schließen des Perfusionskreislaufes wurde ein weiterer Katheter mit 2,5 mm Durchmesser in den eröffneten linken Ventrikel geschoben. Die Fixation dieses Ventrikelkatheters erfolgte durch eine Ligatur, die um das gesamte Herz auf Höhe des unteren Drittels festgezogen wurde. Durch ihn konnte nun das aus dem Lungenkreislauf kommende Perfusat in den künstlichen Kreislauf zurückgeführt werden. Die gesamte Präparation wurde in einer Zeitspanne von max. 30 Minuten durchgeführt. Während dieser Phase wurde die Lunge durchgehend ventiliert und perfundiert.

### **Perfusion mithilfe eines extrakorporalen Zirkulationssystems**

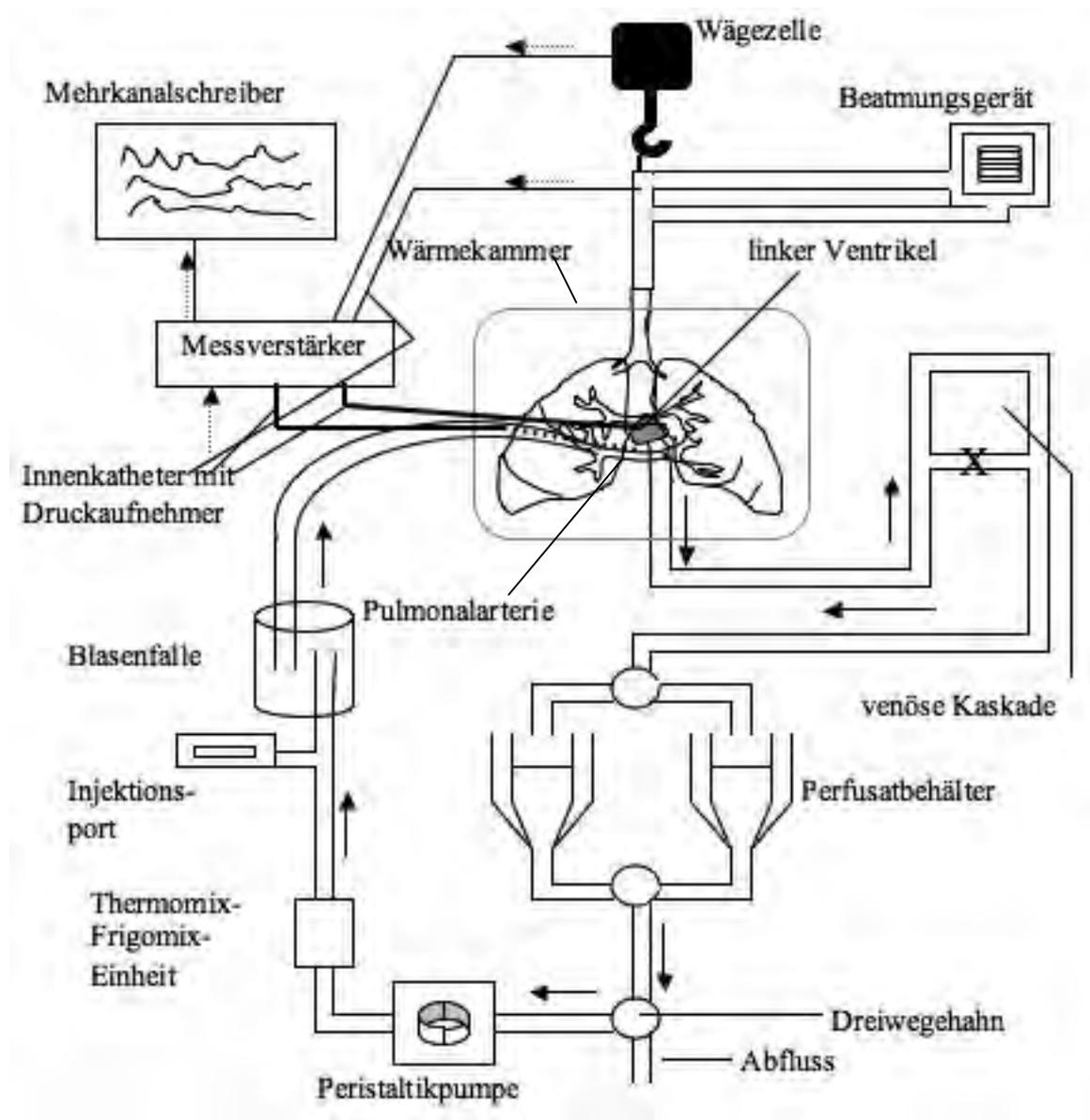
Die pulsatile Lungenperfusion erfolgte nach einem im Laborbereich von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Grimminger des Zentrums für Innere Medizin II seit langem etablierten und mehrfach publizierten Lungenmodell (206, 209). Sie wurde mit Hilfe einer Masterflex®-Peristaltikpumpe mit Easy-Load-Pumpenkopf durchgeführt. Die Geschwindigkeit des Perfusatflusses von 8 ml/min während der Präparation wurde nach komplettem Einhängen und Anschließen der Lunge an den Kreislauf kontinuierlich auf 13 ml/min gesteigert. Als Perfusat wurde ein endotoxinfreier Krebs-Henseleit-Puffer mit 5%

Hydroxyethylstärke zur onkotischen Stabilisierung verwendet. Das Perfusat wurde in zwei in den Kreislauf geschalteten Glasgefäßen gefüllt, die unabhängig voneinander regulierbar waren. So konnte nach der Präparation ein Perfusatwechsel durchgeführt werden, indem Gefäß 1 durch Schluß seines Zulaufes aus dem Kreislauf genommen und Gefäß 2 zeitgleich durch Öffnen seines Zulaufes in die Zirkulation einbezogen wurde. Das Perfusatvolumen betrug im Gefäß 70 ml und im Schlauchsystem ebenfalls 70 ml, sodass mit einem Gesamtvolumen von 140 ml gearbeitet wurde. Da die Perfusatbehälter aus doppelwandigem Glas bestanden und über eine Thermopumpe mit Temperierflüssigkeit durchflossen wurden, war es möglich, die Temperatur des Perfusats zu steuern. Während der Präparation betrug diese 4°C und wurde nach Schließen des Kreislaufes langsam bis auf 41°C gesteigert, was einem Wert von 37°C an der Spitze des arteriellen Katheters entsprach. Da das Schlauchsystem nach jedem Versuch Formaldehyd gassterilisiert und alle Doppelwand-Glasgefäße hitzesterilisiert wurden, war gesichert, dass mit endo- und extotoxinfreiem Perfusat gearbeitet werden konnte.

### **Perfusionssystem**

Das aus dem Gefäß kommende Perfusat gelangte durch den Katheter in der *Arteria pulmonalis* erst ins rechte Herz, dann in die Lunge und konnte schließlich über den venösen Schenkel, den der Katheter im linken Ventrikel darstellte, wieder abfließen. Nach Passage des Herz-Lungen-Komplexes wurde die Perfusionsflüssigkeit über ein leiterförmiges Kaskadensystem in das zugeschaltete Vorratsgefäß zurückgeleitet. Durch das Kaskadensystem war die Möglichkeit gegeben, den hydrostatischen Druck im pulmonalen Gefäßsystem zu variieren. Durch Setzen einer Arterienklemme auf der unteren Sprosse konnte der Druck von 0 auf 10 cm Wassersäule gesteigert werden (bezogen auf den Lungenhilus).

**Abb.9:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der isoliert ventilerten und blutfrei perfundierten Rattenlunge



Im Schema zentral gelegen befindet sich die isolierte Rattenlunge. Darunter sind die zur Perfusion eingesetzten Geräte dargestellt. Die Flussrichtung des blutfreien Perfusats wurde durch die Pfeile veranschaulicht. Oberhalb der Lunge sind die zur Ventilation benötigte Beatmungspumpe sowie die verwendeten Messinstrumente dargestellt. Die gestrichelten Pfeile weisen die Richtung des Datenflusses auf. Zugunsten der Übersichtbarkeit der Skizze wurde darauf verzichtet, die Verbindung der aus doppelwandigem Glas bestehenden befeuchteten Wärmekammer mit den Perfusatgefäßen einzuzichnen. Die in dem doppelwandigen Glassystem befindliche Temperierflüssigkeit ermöglichte es, sowohl die Temperatur des Perfusats als auch die Umgebungstemperatur der Lunge zu steuern und konstant zu halten. X markiert die Stelle der Kaskadenleiter, an der die Klemme zur Erhöhung des hydrostatischen Druckes gesetzt wurde.

### II.2.3. Versuchsprotokoll

Nachdem die Perfusatfließgeschwindigkeit bei 13 ml/min lag, die zeitgleiche Temperatursteigerung der Temperierflüssigkeit auf 41°C abgeschlossen war und der PEEP von 1 cm H<sub>2</sub>O auf 2 cm H<sub>2</sub>O umgestellt worden war, konnte ein Perfusatwechsel, d.h. Umschalten vom rechten auf das linke Glasgefäß, in dem sich frische Perfusionsflüssigkeit befand, durchgeführt werden. Der Perfusatwechsel gewährleistete, dass die im Versuch eingesetzte Perfusionsflüssigkeit frei von Blutbestandteilen war, die während der Lungenpräparation aus dem Gefäßsystem der Lunge ausgewaschen worden waren. Sobald der Perfusatwechsel abgeschlossen war, konnte die Versuchszeit gestartet werden. Der Startpunkt 0:00 min. wurde so gewählt, dass er 10 Minuten vor dem Beginn der Vorinkubation der isolierten PMN-Zellen mit TNF $\alpha$  lag. Diese sollte exakt 30 min. dauern, um die Granulozyten bei 00:40 als Bolus durch den Injektionsport in das Perfusionssystem vor die Lunge injizieren zu können. Nach Start der Zeitmessung folgte eine Vorlaufphase, die sog. „steady state“-Phase, von 15 Minuten, in der überprüft werden sollte, ob die Lunge ohne Manipulation von außen stabil in Erscheinungsbild, Gewicht und dem pulmonal-arteriellen Druck (pulmonary arterial pressure = PAP) blieb. Um für den weiteren Versuchsablauf geeignet zu sein, mussten die Lungen folgende Kriterien erfüllen:

- die sichtbaren, subpleuralen Parenchymanteile mussten homogen weiß erscheinen - ohne Anzeichen von Hämostase, Ödem oder Atelektase
- der gemessene PAP [mmHg] musste konstant sein und
- während einer „steady state“-Phase von 15 Minuten mussten sowohl der linksventrikuläre Druck (left ventricular pressure = LVP) als auch das Gewicht der Lunge konstant bleiben.

Zu Beginn der Vorlaufphase wurde die Lunge zweimal für jeweils zwei Atemhübe gebläht. Dies geschah durch manuellen Verschluss des Schlauches, der die Ausatemungsluft abführte und sollte vorhandene atelektatische Areale in der Lunge öffnen. Im weiteren Versuchsverlauf wurde die Lunge alle 30 Minuten einmalig für die Dauer von zwei Atemhüben gebläht. Eine Messung des Perfusat-pH, der idealerweise zwischen 7,3 und 7,4 liegen sollte, wurde in regelmäßigen Abständen durch Entnahme von Perfusatproben und deren Messung mit einem Blutgasanalysator durchgeführt. War der pH zu niedrig, wurde dem Perfusat Natriumbicarbonat zugesetzt; war er zu alkalisch, musste reine Elektrolytlösung hinzugegeben werden. Bei 0:25 erfolgte die erste Kaskade oder „Hydrostatic Challenge“. Das bedeutet, dass der venöse Druck und somit auch der

linksventrikuläre Druck für die Dauer von 8 Minuten um  $\Delta p = 10 \text{ cm H}_2\text{O}$  erhöht wurden. Dies geschah durch Setzen einer Arterienklemme (bei 0:26) auf die unterste Stufe einer leiterähnlichen Konstruktion des venösen Schlauchsystems (Kaskadenleiter), so dass das Perfusat über die obere Stufe fließen musste und folglich ein hydrostatischer Druckanstieg bedingt wurde. Bei 0:34 wurde die Klemme wieder abgenommen. Die vorinkubierten Granulozyten wurden in einer Spritze aufgezogen und bei 00:40 als Bolus in das Perfusatsystem vor die Lunge injiziert. Je nach Versuchsart wurden den „geprimten“ Granulozyten vor der Injektion cANCA, Kontrollantikörper (MOPC-21) oder keine weitere Substanz (Kontrollversuch) zugesetzt. Da für die vorliegende Arbeit lediglich cANCA von Relevanz waren, wird der Begriff „ANCA“ im Weiteren als Synonym für cANCA verwendet werden.

#### **Weitere Kaskaden erfolgten zu den festgelegten Zeiten:**

2. Kaskade: 0:55-1:06
3. Kaskade: 1:35-1:46
4. Kaskade: 2:15-2:26
5. Kaskade: 2:55-3:06

Um die Korrektheit und Übersichtlichkeit der Computeraufzeichnungen zu gewährleisten, wurden in der separaten Zeitmessung zusätzlich eine 1-minütige Vor- & eine 2-minütige Nachlaufphase gemessen, die in diesen Angaben bereits enthalten sind. Die gesamte Versuchszeit betrug 190 Minuten. Die zu testenden Substanzen wurden - wie bei den einzelnen Gruppen noch beschrieben werden wird - dem Perfusat zu festgelegten Zeitpunkten zugesetzt. Die einzelnen Kaskaden dienten dazu, das Druckgleichgewicht ( $\Delta p = 0$ ) zwischen Perfusat und Interstitium der Lunge, welches sich im „steady state“ eingestellt hatte, zu stören. Durch die definierte Erhöhung der Nachlast der Lunge erfolgte eine Volumenverlagerung von den pulmonalen Kapillaren ins Interstitium bis zum Erreichen eines neuen Gleichgewichtes auf höherem Gewichtsniveau. Dies war für die experimentelle Bestimmung des Maßes der Permeabilität des Endothels der Lungenstrombahn unumgänglich (s.  $K_{f,c}$ ).

**Für folgende Versuchsgruppen gilt  $n \geq 4$ :**

- Versuchsgruppe I: native Lunge ohne Zugabe von Substanzen = Kontrolle
- Versuchsgruppe II: Lunge+PMN+TNF $\alpha$  = PMN+TNF
- Versuchsgruppe III: Lunge+PMN+TNF $\alpha$ +MOPC-21 = PMN+TNF+MOPC-21
- Versuchsgruppe IV: Lunge+PMN+TNF $\alpha$ +ANCA = PMN+TNF+ANCA
- Versuchsgruppe V: Lunge+PMN+TNF $\alpha$ +ANCA+SOD = PMN+TNF+ANCA  
+SOD
- Versuchsgruppe VI: Lunge+PMN+TNF $\alpha$ +ANCA+DPI = PMN+TNF+ANCA+DPI
- Versuchsgruppe VII: Lunge+PMN+TNF $\alpha$ +ANCA+MK886 = PMN+TNF+ANCA  
+MK886
- Versuchsgruppe VIII: Lunge+PMN+TNF $\alpha$ +ANCA+AAPVCK = PMN+TNF  
+ANCA+AAPVCK

Es wurden darüber hinaus Vorversuche durchgeführt, in denen dem Perfusat entweder nur native neutrophile Granulozyten, nur ANCA oder ANCA in Kombination mit nativen Granulozyten zugesetzt wurden. Da sich diese Versuchsreihen in ihren Ergebnisse nicht von der Kontrollgruppe I unterschieden, sind sie für die Auswertung der durchgeführten Arbeit nur von geringer Bedeutung und werden nicht explizit aufgeführt.

**II.2.4. Messung der Lungenparameter****Direkt gemessene Parameter**

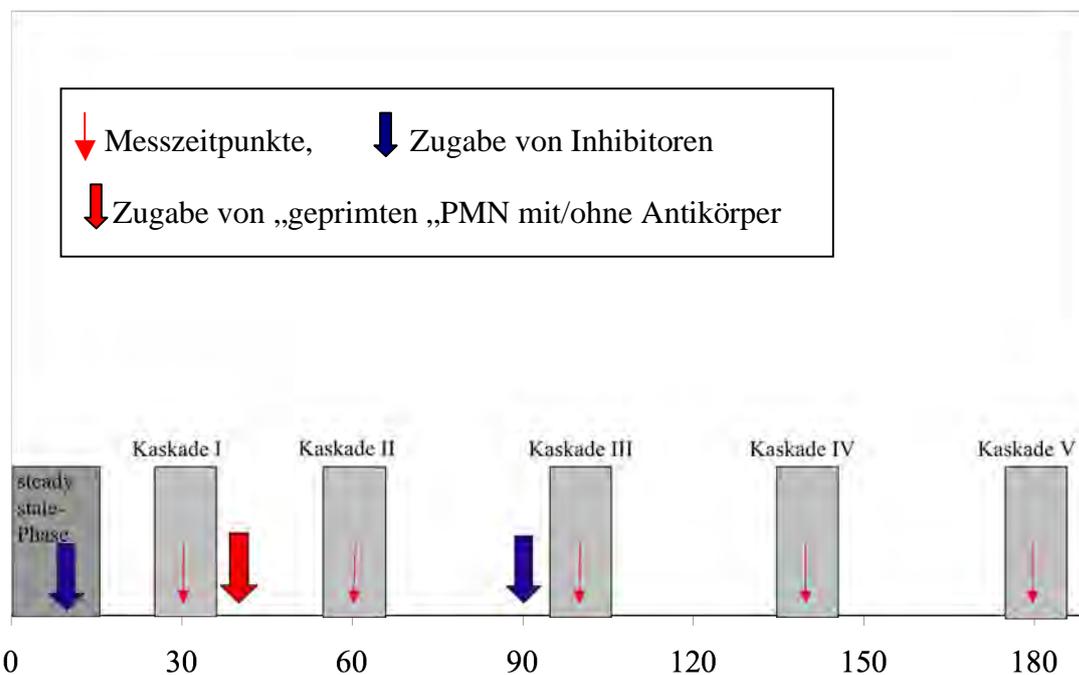
Zur direkten und kontinuierlichen Messung der folgend aufgeführten Parameter wurden in das mit Perfusat gefüllte Schlauchsystem luftblasenfreie Polyethylen-Innenkatheter mit einem Durchmesser von 0,5 mm eingesetzt. Diese wurden nahe der Messstellen platziert: vor dem Tracheal-, dem Pulmonalis- und vor dem Ventrikel-Katheter. Die PE-Innenkatheter wurden an Druckaufnehmer angeschlossen, die mit einem Blutdruckmonitor verbunden waren. Vor Versuchsbeginn wurde der Nullpunkt der Druckaufnehmer auf Höhe des Lungenhilus eingestellt und der Druck gegen den atmosphärischen Druck auf 0 mmHg geeicht. Jegliche Abweichung vom Normwert konnte sofort erfasst werden. Zur Auswertung der Daten wurden jedoch spezielle Messzeitpunkte festgelegt:

1. 0:30
2. 0:60
3. 1:40 = 100. Minute
4. 2:20 = 140. Minute
5. 3:00 = 180. Minute

Diese Messzeitpunkte waren so gewählt, dass sie jeweils 5 Minuten nach Beginn der entsprechenden Kaskade lagen und somit jegliche Veränderungen der Parameter nach Erhöhung des LVP direkt dokumentiert und ausgewertet werden konnten.

### **Abb.10:**

#### **Zeitplan zum Versuchsablauf aller Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenlunge**



Die Aufzeichnung der Daten begann mit einer 15-minütigen „steady state“-Phase und endete nach 190 Minuten. Die einzelnen Kaskaden sind zu den jeweiligen Zeitpunkten dargestellt. Die Zugabe von „geprägten“ Granulozyten mit oder ohne Antikörper erfolgte nach 40 Minuten. Die Inhibitoren DPI, SOD und AAPVCK wurden dem Perfusat in den jeweiligen Versuchsgruppen nach 10 und nach 90 Minuten zugesetzt.

**1. Lungengewicht:** Das Gewicht der isoliert perfundierten Lunge wurde direkt durch die elektronische Wägezelle gemessen und die geringste Veränderung auf dem PC-Bildschirm angezeigt. Vor Starten der Versuchszeit, nach der „steady state“-Phase und erneut nach der 1. Kaskade wurde das Gewicht auf den Wert 1 eingestellt. Das Gewicht wurde in Gramm [g] gemessen. Die Zunahme des Lungengewichtes wurde als Differenz zwischen dem Gewicht zum jeweiligen Messzeitpunkt und dem Ausgangsgewicht (1g), als  $\Delta$  Gewicht [g] berechnet. Sie war der für die Auswertung bedeutsame Messwert. Die Gewichtsmessung diente zur Erfassung von Flüssigkeitseinlagerung in das Lungengewebe, wie sie im Rahmen eines Lungenödems auftreten. Das Lungenödem repräsentierte das klinische Bild einer gesteigerten Permeabilität der geschädigten pulmonalen Strombahn und hatte einen Gewichtsanstieg zur Folge.

**2. PAP:** pulmonary arterial pressure. Der pulmonal-arterielle Druck wurde während der gesamten Versuchszeit gemessen und zeigt den Druck in der *A. pulmonalis* an. Nach erfolgreicher, schonender Präparation der Lunge lag dieser in der Regel zwischen 6 und 8 mmHg.

**3. LVP:** left ventricular pressure. Der linksventrikuläre Druck wurde durch Platzierung der untersten Stufe der Kaskadenleiter im venösen Schenkel des Perfusatsystems so eingestellt, dass er während der gesamten Versuchsdauer (ausgenommen der Kaskadenphasen) konstant 1 mmHg betrug. Dadurch konnten in der Endexpirationsphase Zone-III-Bedingungen in allen Lungenbereichen garantiert werden. Das bedeutet, dass unter diesen Voraussetzungen alle Lungenkapillaren geöffnet waren und somit alle Areale der Lunge perfundiert wurden. Während der Kaskaden wurde der LVP für jeweils 8 Minuten um  $\Delta p = 10 \text{ cm H}_2\text{O}$  erhöht. 10 cm H<sub>2</sub>O entsprechen 7,36 mmHg.

**4. VP:** ventilation pressure. Der Ventilationsdruck zeigte an, mit welchem Druck die Lunge durch das Beatmungsgerät ventilert wurde. Der einzuhaltende Normalbereich lag zwischen 3,5 und 5 mmHg.

### **Indirekt berechneter Parameter**

Nach Abschluss eines jeden Experimentes konnte mit Hilfe eines speziellen EDV-Programms ein weiterer Lungenwert berechnet werden:

**$K_{f,c}$** : capillary filtration coefficient. Der kapilläre Filtrationskoeffizient ist Ausdruck der Permeabilität der Kapillarwand bei isotonen Lösungen. Er stellt ein Maß für eine endotheliale Schrankenstörung dar. Je höher sein Wert, desto mehr Flüssigkeit kann in das Gewebe austreten und umso stärker und schneller wird sich ein Lungenödem entwickeln. Der  $K_{f,c}$  wird rechnerisch über einer Exponentialfunktion aus der Steigung der Gewichtskurven während der einzelnen Kaskaden ermittelt und stellt eine konstante Größe dar. Er wird folgendermaßen angegeben:  $K_{f,c}$  [  $\text{cm}^3 / (\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$  ] (210, 211).

## **II.2.5. Fixierung der Rattenlunge zur Anfertigung von histologischen**

### **Schnitten**

Nach Ablauf der Versuchszeit wurde die Rattenlunge durch ein spezielles Verfahren fixiert, um sie für die nachfolgende histologische Analyse mittels Hämalaun-Eosin-(HE)-Färbung und Immunhistochemie vorzubereiten und postmortale Veränderungen zu verhindern. Hierzu wurde eine Lungenhälfte nach Blähung am Hauptbronchus abgebunden, so dass die Luft nicht entweichen konnte und die Alveolen dadurch geweitet blieben. Nach vorsichtiger Abtrennung von der restlichen Lunge wurde diese Hälfte in einen mit säurefreiem 4,5%igen Formaldehyd gefüllten Becher aus Polypropylen (PP) gegeben und mit einem Polyethylen (PE)-Schraubdeckel verschlossen. Formaldehyd induziert die Bildung von Methylbrücken zwischen freien Aminogruppen der Proteine, was in einer Blockade dieser Aminogruppen resultiert. Durch die entstehende Vernetzung der Eiweiße wird das Lungengewebe fixiert. Die zweite Lungenhälfte wurde mit 4 ml Tissue Freezing Medium befüllt und in einen mit Isopentan gefüllten PP-Becher getaucht. Dieser Becher wurde in ein Behältnis mit flüssigem Stickstoff gehalten, so dass das Lungengewebe langsam, gleichmäßig und schonend eingefroren wurde. Anschließend wurde diese Lungenhälfte in einem PP-Becher mit PE-Schraubdeckel bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

## **II.2.6. Schnittpräparate , HE-Färbung und Immunhistochemie**

Die weitere Aufbereitung der Lungenhälften sowie die Durchführung der histologischen Auswertung erfolgte durch das immunhistologischen Labor des Klinischen Zentrums für Labordiagnostik und Pathologie der JLU Giessen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R.M. Bohle. Die formalinfixierte Lungenhälfte wurde einer HE-Färbung unterzogen, wohingegen die kryofixierte Hälfte mittels Immunhistochemie gefärbt wurde. Bei der Auswertung des Grades der Granulozyteninfiltration wurden Granulozytenaggregate gezählt, die als MPO-positive Zellakkumulate von mindestens drei Diametern von Alveolarsepten definiert wurden. Die Auswertung erfolgte „geblindet“ durch zwei unabhängige Untersucher.

### **Paraffinschnitte + HE-Färbung**

Die formalinfixierten Lungenhälften wurden zunächst in Alkohol von aufsteigender Konzentration (30%, 50%, 70%, 96%, 100%) für jeweils 60 Minuten entwässert. Anschließend wurden sie für 4 Stunden in Xylol überführt. Die 4-stündige Xylolbehandlung wurde insgesamt dreimal mit frischer Xylol-Lösung durchgeführt. Da Paraffin wasserunlöslich ist, war der Schritt der Entwässerung notwendig. Danach erfolgte die Paraffineinbettung. Die Präparate wurden für 60 Minuten in ein Paraffinbad von 56°C gegeben. Danach erfolgte ein weiteres Paraffinbad für die Dauer von 2 Stunden. Die Verhärtung des Gewebes erfolgte durch Polymerisationsvorgänge und wurde über Nacht automatisch durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden nach Erkalten des Paraffins mit einem Schlittenmikrotom in einer Dicke von 5 µm angefertigt. Sie wurden zum Glätten in ein mit 48°C warmem *Aqua destillata* (*Aqua dest.*) gefülltes Wasserbad eingebracht und nach wenigen Minuten auf Superfrostobjektträger aufgezogen. Zum Trocknen wurden die Schnitte bei 37°C für 24 Stunden im Brutschrank aufbewahrt. Für die HE-Färbung wurden die Schnitte für 10 Minuten in Xylol entparaffiniert. Anschließend wurden sie in Alkohol absteigender Konzentration geschwenkt (100%, 96%, 70%, 50%, 30%) und danach mit *Aqua dest.* gespült. Daraufhin folgte die 2-minütige Anfärbung in Hämalaunlösung, eine 5-minütige Spülung mit Leitungswasser und schließlich die ca. 10-Sekunden lange Gegenfärbung in Eosinlösung. Nun wurden die Schnitte in Alkohol aufsteigender Konzentration (30%, 50%, 70%, 96%, 100%) geschwenkt. Dann wurde eine Spülung in Xylol für 10 Minuten durchgeführt und die Schnitte am Schluß mit Pertex eingedeckelt.

### **Kryoschnitte + Immunhistologische Färbung**

Von den Lungenhälften, die zur Fixierung mit Tissue Tec Medium befüllt worden waren, wurden mittels eines Kryotoms 5µm dicke Schnitte angefertigt. Hierfür wurden die Lungenhälften zuvor in kleinere Gewebeblöcke zerlegt. Die Schnitte wurden auf beschichtete Superfrostobjektträger aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Nach einer mehrtägigen Lagerung bei -20°C wurde die immunhistologische Färbung unter Verwendung eines kommerziellen Färbesystems, dem sog. APAAP ChemMate kit durchgeführt. Bei dieser APAAP (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase)-Methode bindet ein Sekundärantikörper an einen unkonjugierten monoklonalen Primärantikörper. Der Sekundärantikörper wird auch Brückenantikörper genannt, da er den Primärantikörper mit dem APAAP-Komplex verbindet. Handelt es sich bei dem Primärantikörper jedoch um einen polyklonalen Antikörper, wird nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper ein zweiter Inkubationsschritt mit einem weiteren Antikörper, dem eigentlichen Brückenantikörper durchgeführt. Als Primärantikörper kam ein polyklonaler Anti-Myeloperoxidase-Antikörper in der Konzentration 1:6000 zum Einsatz. Nach mehreren Spülschritten und der Zugabe des Sekundärantikörpers, einem Maus-Anti-Kaninchen-Antikörper, wurde ein Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper als Brückenantikörper hinzugegeben. Nach Auftragen des APAAP-Komplexes auf die Schnitte, erfolgte die Zugabe des Farbstoffes für die Immunhistochemie. Für die Reaktion mit alkalischer Phosphatase wurde „Fast Red“, ein rotbraunes Farbprodukt, verwendet. Die Gegenfärbung erfolgte mittels Hämatoxylin. Zur Auswertung der Schnitte und zur Anfertigung digitaler Aufnahmen (2,5-fache Vergrößerung) wurde ein Polarisationsmikroskop (Zeiss Axioskop 40) in Verbindung mit einer Digitalkamera der Firma JVC verwendet.

### **II.2.7. Durchflußzytometrie**

Die Quantifizierung der granulozytären PR3-Membranexpression bei den humanen PMN-Zellen erfolgte mittels durchflußzytometrischer Analysen in einem FACS-Gerät (fluorescence-associated cell sorter). Diese wurde von Frau B. Schmidt unter Anleitung von Frau Dr. Katja Hattar in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Lohmeyer (Med. Klinik II, Uni-Klinikum Giessen) durchgeführt.

### **Prinzip**

Die Durchflußzytometrie diente dem Nachweis zellulärer Oberflächenantigene. Zunächst wurden intakte Zellen mit einem Primärantikörper gegen das nachzuweisende Oberflächenantigen inkubiert. Mithilfe eines fluoreszierenden Sekundärantikörpers, der an die Fc-Domäne des Primärantikörpers band, erfolgte die Markierung membrangebundener Primärantikörper. In einem Zytometer wurde die Intensität der Fluoreszenz gemessen, die indirekt der Antigenexpression entsprach.

### **Durchführung**

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde den PMN-Zellen ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ ) zur Membranstabilisierung 1 ml eisgekühlte phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit jeweils 1% bovinem Serumalbumin (BSA) und Natrium-Azid (PBS A/B) zugesetzt. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle experimentellen Schritte bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt. Nach einem Waschschrift ( $300 \times g$ , 5 min) wurden die Zellen in PBS A/B aufgenommen, wobei die Zelldichte auf  $5 \times 10^6$  PMN/ml eingestellt wurde. 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden nun auf 96-well-Platten ausgesät. Dies entspricht einer PMN-Zahl von 500 000 PMN/well. Nach Blockierung der Fc-Rezeptoren durch Zupipettieren von 20  $\mu\text{l}$  gepooltem humanem Immunglobulin, das in einer Konzentration von 1 mg/ml vorlag, wurde der Anti-PR3-Antikörper (20  $\mu\text{l}$  einer Stocklösung von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder ein isotypgleicher muriner Kontrollantikörper (MOPC-21, ebenfalls 20  $\mu\text{l}$  einer Stocklösung von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) hinzugegeben. Im Anschluss an eine 30-minütige Inkubationszeit und 3 darauf folgende Waschschriffe ( $300 \times g$ , 5 min) wurde als Sekundärantikörper ein Phycoerythrin (PE)-markierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (Fab<sub>2</sub>-Fragmente) zugegeben (20  $\mu\text{l}$  einer Stocklösung von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und der Versuchsansatz erneut für 30 Minuten inkubiert. Bevor die Fluoreszenz schließlich in einem Zytometer der Firma Becton-Dickinson quantifiziert wurde, mussten nochmals 3 Waschschriffe durchgeführt werden. Die Auswertung erfolgte mittels einer speziellen Software des Geräteherstellers (BD CellQuest<sup>®</sup> software), wobei der Anteil der PR3-positiven Zellen nach Abzug der durch den Kontrollantikörper markierten Zellen hervorgerufenen Hintergrundfluoreszenz prozentual angegeben wurde.

### **II.2.8. Statistische Auswertung**

Alle erhobenen Daten sind als Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M) angegeben. Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way-ANOVA) und anschließendem Tukey's honestly significant difference test. Ein p-Wert von  $<0.05$  wurde als statistisch signifikant angesehen, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % entspricht.

### III. Ergebnisse

#### III.1. Übersicht

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Reproduktion des sich in den Lungen abspielenden Krankheitsgeschehens im Rahmen der Wegener'schen Granulomatose. Hierzu wurde das Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Rattenlunge verwendet. Um untersuchen zu können, ob durch die zeitgleiche Applikation von humanen neutrophilen Granulozyten und anti-leukozytären Antikörpern das Ereignis einer pulmonalen Schrankenstörung ausgelöst werden kann, mussten zunächst die Grundvoraussetzungen für die Interaktion von ANCA und PMN-Zellen geschaffen und überprüft werden. Basierend auf der Hypothese, dass die Expression des Zielantigens Proteinase 3 auf der granulozytären Zellmembran diese Voraussetzung darstellt, wurde zunächst in Vorversuchen mittels FACS-Analyse ermittelt, welche experimentellen Bedingungen eine Membranexpression der Protease bewirken. Durch Applikation optimaler Dosen von TNF $\alpha$  wurde die Induktion der Zielantigenexpression ausgelöst und nachgewiesen. Anschließend wurde untersucht, welche Auswirkungen die Gabe eines Bolus von „geprimten“ PMN-Zellen und ANCA auf die Physiologie der isoliert ventilerten und perfundierten Rattenlunge hatte. Als Negativkontrolle zu dieser Versuchsgruppe dienten Untersuchungen, in denen MOPC-21 als Kontroll-Antikörper eingesetzt wurde. Außerdem sollten zusätzliche Versuche, in denen lediglich „geprimte“ PMN-Zellen appliziert wurden, sicherstellen, dass diese allein keine pathogenen Veränderungen auslösen konnten. Um auf indirektem Wege nachweisen zu können, welche Pathomechanismen und welche Substanzen/Mediatoren als Auslöser der pulmonalen Schrankenstörung in der WG fungieren, wurden dem Perfusat in weiteren Untersuchungen nach Applikation von PMN-Zellen und ANCA verschiedene Inhibitoren zugesetzt. So kamen die Substanzen SOD (Superoxid-Dismutase), welches die schädlichen Superoxidanionen abfängt, indem es sie in weniger aktives H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umwandelt und DPI (Diphenyleiodonium) als Inhibitor der NADPH-Oxidase zum Einsatz. Des Weiteren wurde auf indirektem Weg die Rolle von Elastase untersucht, indem der sehr spezifische Elastase-Inhibitor AAPVCK (Ala (2) Pro Val Chloromethyl Keton) eingesetzt wurde. Schließlich sollte mittels Zugabe von MK886, welches einen selektiven Inhibitor des 5-Lipoxygenase-aktivierenden Proteins repräsentiert, überprüft werden, inwiefern die Produktion der 5-Lipoxygenasemetaboliten für die Auslösung des pulmonalen Krankheitsprozesses in der WG verantwortlich sein könnte.

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich TNF $\alpha$  zum Einsatz kam, wird TNF im Folgenden als Synonym für TNF $\alpha$  eingesetzt.

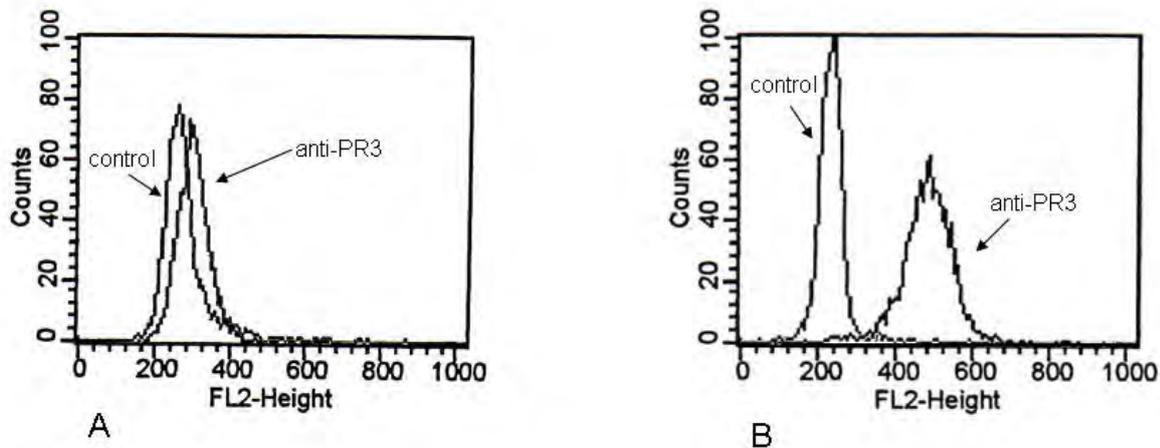
### III.2. PR3-Membranexpression in TNF $\alpha$ -„geprimten“ PMN

Zunächst wurde in Vorversuchen ermittelt, welche experimentellen Bedingungen *in vitro* zu einer Translokation von Proteinase 3 an die granulozytäre Zellmembran führen. Die PR3-Expression wurde durch FACS-Analysen quantifiziert. Dafür wurden die Zellen entweder in nativem Zustand belassen oder mit steigenden Konzentrationen von TNF (0,5- 2 ng/ml) inkubiert. Als optimales TNF-„priming“ mit maximaler PR3-Expression wurde in diesen Versuchen eine Vorinkubation mit 2 ng TNF/ml ermittelt, während native PMN das Zielantigen nur sehr schwach an ihrer Oberfläche exprimierten. Der Anteil PR3-positiver Zellen unter den jeweiligen Versuchsbedingungen ist in Tabelle V angegeben. Native PMN-Zellen wiesen nur eine recht schwache Membranexpression von PR3 auf (10,54% PR3-positiv Zellen). Alle eingesetzten TNF-Konzentrationen induzierten eine signifikante Steigerung der PR3-Membranexpression. Da unter der Vorstimulierung mit 2 ng/ml TNF der stärkste Effekt mit einem Nachweis von 67,48% PR3-positiver Zellen zu verzeichnen war, wurde diese TNF-Konzentration für die nachfolgenden Untersuchungen gewählt. Eine repräsentative durchflußzytometrische Analyse der PR3- Membranexpression ist in Abbildung 11 dargestellt.

**Tabelle V:**

TNF-Konzentration (ng/ml)	MW der PR-3 positiven Zellen (%) +/- SEM
0	10,54 +/- 2,23
0,5	49,64* +/- 8,33
1	58,48* +/- 6,51
2	67,48* +/- 3,90

*Diese Tabelle zeigt, wie sich die 30-minütige Inkubation der PMN-Zellen mit TNF $\alpha$  in verschiedenen Konzentrationen auf die Membranexpression von Proteinase 3 auswirkte. Durch die Vorstimulierung mit 2 ng TNF $\alpha$ /ml ließ sich die PR3-Expression maximal verstärken. Der Mittelwert von 67,48% PR3-positiver Zellen wurde aus 5 separat untersuchten Proben errechnet (n=5). Durch Steigerung der TNF $\alpha$ -Konzentration ließ sich keine stärkere PR3-Expression erzielen, weshalb auf Angabe weiterer Konzentrationen verzichtet worden ist. Die gekennzeichneten (\*) Werte unterscheiden sich signifikant (p<0,05) von den Kontrollen (unstimulierte Granulozyten).*

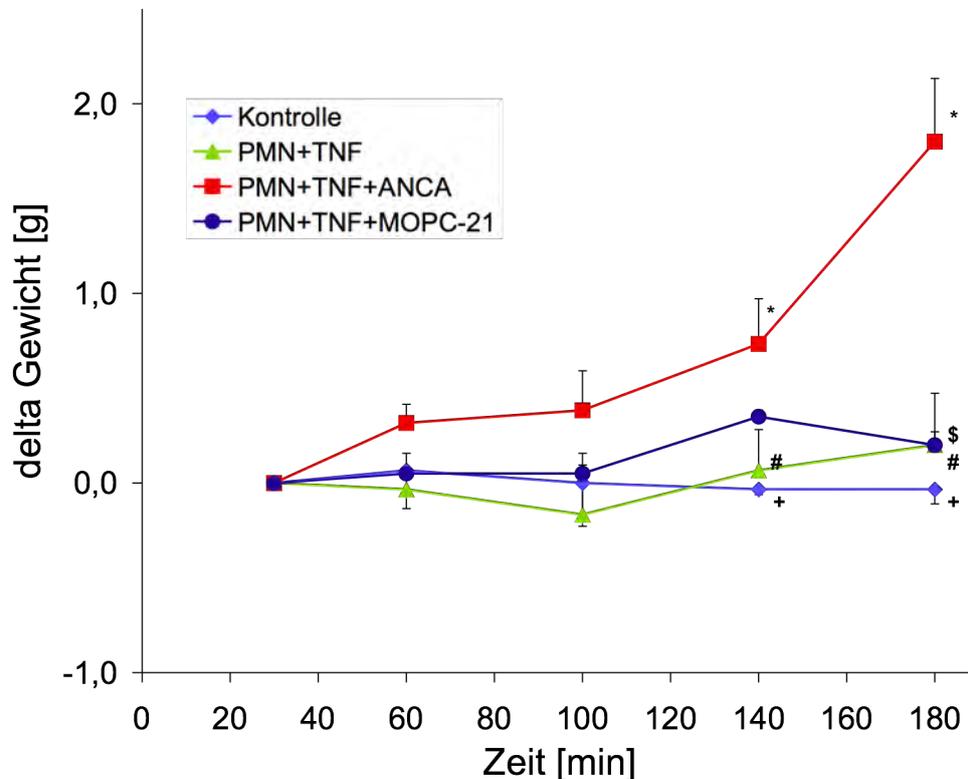
**Abb. 11:** PR3-Membranexpression in nativen TNF $\alpha$ -„geprimten“ PMN

$5 \times 10^6$  PMN/ml wurden für 30 Minuten in nativem Zustand belassen (A) oder mit 2 ng TNF $\alpha$ /ml inkubiert (B). Die Kontrolle (control) stellt die Bindung eines unspezifischen Kontroll-IgG dar, während die Gruppe anti-PR3 mit cANCA inkubiert wurde. Anschließend wurde ein PE-markierter Ziegen-anti-Maus-IgG hinzugefügt und die PR3-Oberflächenexpression mittels Durchflußzytometrie ermittelt. Die y-Achse gibt die Zellzahl (count) der PR3-positiven Zellen an, während die Fluoreszenzintensität (FL2-Height) an der x-Achse dargestellt ist und der Oberflächenexpression von PR3 entspricht. In dieser repräsentativen Analyse wurde gezeigt, dass unter TNF $\alpha$ -Vorinkubation eine deutliche PR3-Membranexpression nachgewiesen werden konnte (B).

### III.3. ANCA-s induzierten eine pulmonale Schrankenstörung an der isolierten Rattenlunge

Das Gewicht der Lunge wurde während der gesamten Versuchszeit kontinuierlich bestimmt und zu Beginn und nach der ersten Kaskade auf den Basiswert 1 eingestellt. Die Zunahme des Lungengewichtes -  $\Delta$ Gewicht - wurde in Gramm [g] gemessen. Wurde die Lunge zur Kontrolle nach erfolgter Entnahme an das System angeschlossen und während der folgenden 190 Minuten nicht manipuliert, so blieb das Gewicht annähernd konstant. Auch die Zugabe von nativen Granulozyten (nicht abgebildet) und TNF-„geprimten“ PMN-Zellen ( $10^6$ /ml) zum Zeitpunkt 0:40 als Bolus in das Perfusat vor die Lunge hatte keine signifikanten Auswirkungen auf das Gewicht (Abb.12). Das

gleiche galt für die Injektion von TNF-„geprimten“ PMN-Zellen ( $10^6$ /ml) mit dem Kontroll- Antikörper MOPC-21 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) bei 0:40, wohingegen nach Verabreichung von TNF-„geprimten“ PMN-Zellen ( $10^6$ /ml) mit dem murinen, monoklonalen anti-PR3-Antikörper in einer Konzentration von  $10 \mu\text{g/ml}$  ein signifikanter Gewichtsanstieg zu beobachten war. Dieser setzte nach 100 Minuten ein und betrug im Mittel  $0,383 \text{ g}$ , nach 140 Minuten bereits  $0,733 \text{ g}$ . In der 180. Minute wurde für  $\Delta$  Gewicht ein Wert von  $1,8 \text{ g}$  im arithmetischen Mittel gemessen. Parallel zum Anstieg des Gewichtes wurde das Erscheinen multipler ödematöser Herde auf der Lungenoberfläche beobachtet. Diese wurden mit zunehmendem Gewicht größer und konfluieren teilweise zu größeren Arealen. Dieser Anstieg des Gewichtes lässt sich als Parameter für das sich bildende - auch makroskopisch zu beobachtende - Lungenödem verstehen, welches eine Konsequenz der ANCA-induzierten pulmonalen Schrankenstörung darstellte. In der folgenden Abbildung 12 wurden die Veränderungen des Lungengewichtes in den einzelnen Versuchsgruppen dargestellt. Deutlich zu erkennen ist der oben beschriebene signifikante Gewichtsanstieg der Lungen in der Versuchsreihe IV (PMN+TNF+ANCA) im Vergleich zu den Gruppen I bis III.

**Abb.12:** Gewichtszunahme als Parameter für die Bildung eines Lungenödems

In der abgebildeten Grafik wurde die Verlaufskurve des Lungengewichtes in den vier Versuchsreihen:

- \* Kontrolle (n=5)
  - \* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) (n=5)
  - \* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) + MOPC-21 (10  $\mu g/ml$ ) (n=4)
  - \* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) + ANCA (10  $\mu g/ml$ ) (n=6)
- dargestellt.

Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben. Die markierten Werte (\*) unterschieden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) von der Kontrolle (+), von der Gruppe II (PMN+TNF(#)) sowie von der Gruppe III (PMN+TNF+MOPC-21(\$)). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA.

### III.4. Der $K_{f,c}$ als Maßeinheit für die Durchlässigkeit des pulmonalen

#### Endothels

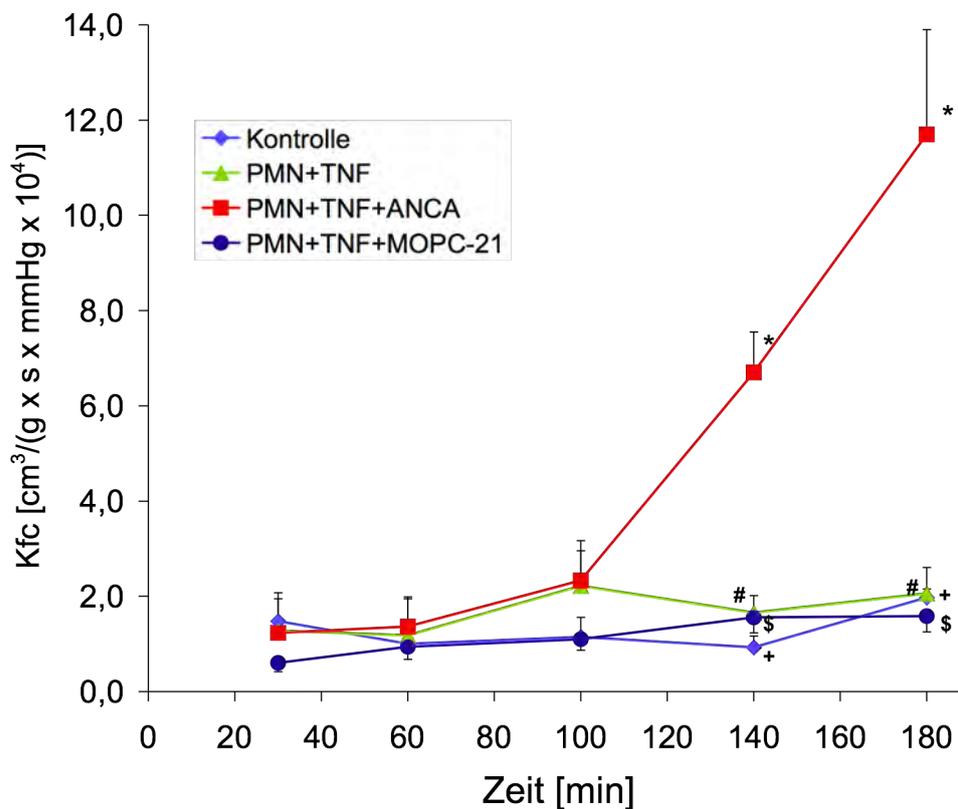
In Abbildung 13 wurde der Verlauf des  $K_{f,c}$  der Versuchsgruppen I bis IV miteinander verglichen. Es wurde bis auf Gruppe I, in der lediglich die native Lunge ohne Zusatz beobachtet wurde, jeweils mit einer PMN-Menge von  $10^6$  PMN/ml Perfusatlösung gearbeitet. TNF $\alpha$  wurde in einer Konzentration von 2 ng/ml eingesetzt. Für die Dauer von 30 Minuten wurden die PMN-Zellen mit TNF bei einer Temperatur von 37°C vorinkubiert. Der Kontrollantikörper MOPC-21 (10  $\mu$ g/ml) wurde dem Perfusat genau wie ANCA (10  $\mu$ g/ml) bei 0:40 gemeinsam mit den „geprimten“ PMN-Zellen als Bolus durch den Injektionsport direkt vor der Lunge hinzugefügt. Es ließ sich erkennen, dass der  $K_{f,c}$  als Indikator für die Durchlässigkeit des Endothels in der Versuchsgruppe IV (PMN+TNF+ANCA) bereits nach der 100. Minute stark anstieg. Sein Anfangswert (Min. 30) von  $1,23 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$  stieg bis zur 100. Minute leicht an und erreichte einen Wert von  $2,33 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$  im Mittel. Bei Minute 140 hatte sich der Wert des  $K_{f,c}$  bereits mehr als verfünffacht ( $6,70 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$ ), um bei Minute 180 mehr als das Zehnfache seines Ausgangswertes zu erreichen ( $11,70 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$ ). Trotz hoher Standardabweichungen unterschieden sich der 140- und der 180-Minuten-Wert der Gruppe IV signifikant von den entsprechenden  $K_{f,c}$ -Werten der Gruppen I, II und III. In diesen Kontrollgruppen blieb der  $K_{f,c}$  relativ stabil.

### III.5. Fehlende vasokonstriktorische Komponente im ANCA-induzierten Lungenödem

Während aller Untersuchungen wurde der pulmonal-arterielle Druck (PAP) kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet. In Abbildung 14 ist zu beobachten, dass der PAP nach Minute 30 in den Versuchsgruppen II (PMN+TNF) und IV (PMN+TNF+ANCA) bis zur Minute 60 leicht anstieg, um dann bei nur geringer weiterer Steigung seinen höchsten Wert in der 100. Minute zu erreichen. In den Gruppen I (Kontrolle) und III (PMN+TNF+MOPC-21) hingegen sank der PAP nach der 30. Minute geringgradig und pendelte sich auf Werten unterhalb des Anfangswertes ein. Die folgende Graphik zeigt trotz dieser Schwankungen, dass der pulmonal-arterielle Druck während der Versuchszeit

in keiner der Gruppen signifikante Änderungen erfuhr, sondern nahezu konstant blieb. Folglich ließ sich eine vasokonstriktorische Komponente im Geschehen des ANCA-induzierten Lungenödems, die sich im Laufe der Versuche durch einen Anstieg des PAP-Wertes bemerkbar gemacht hätte, ausschließen.

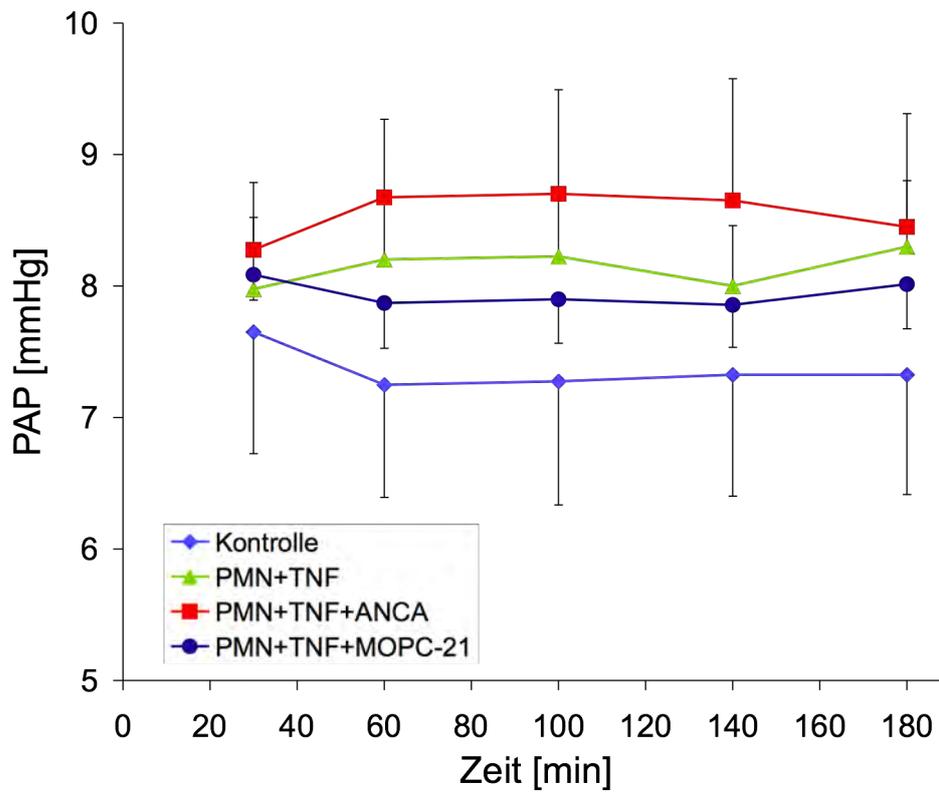
**Abb.13: Verlauf des  $K_{f,c}$**



Diese Graphik stellt den Verlauf des  $K_{f,c}$  in den 4 Versuchsreihen:

- \* Kontrolle (n=5)
- \* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) (n=5)
- \* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) + MOPC-21 (10  $\mu g/ml$ ) (n=4)
- \* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) + ANCA (10  $\mu g/ml$ ) (n=6) dar.

Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben. Die markierten Werte (\*) unterschieden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) von der Kontrolle (+), von der Gruppe II (PMN+TNF(#)) sowie von der Gruppe III (PMN+TNF+MOPC-21(\$)).

**Abb.14: Vergleich der PAP-Werte**

In der oben dargestellten Grafik ist der PAP für die Versuchsgruppen

\* Kontrolle (n=5)

\* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) (n=5)

\* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) + MOPC-21 (10  $\mu g/ml$ ) (n=4)

\* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) + ANCA (10  $\mu g/ml$ ) (n=6)

dargestellt.

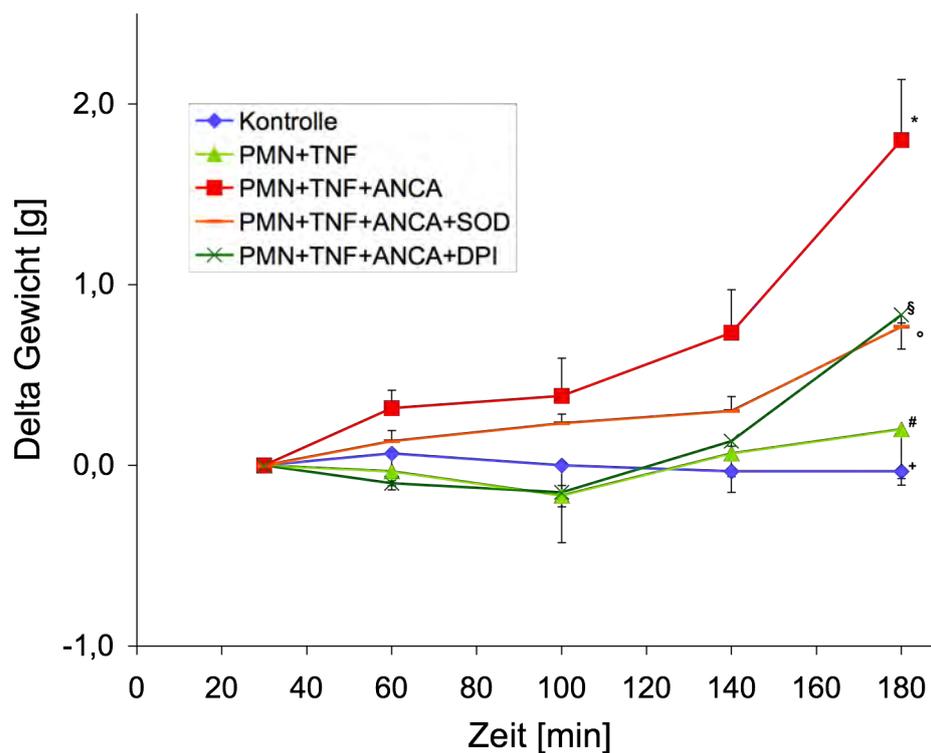
Die Bolusgabe von PMN + TNF ohne/ mit Antikörper (MOPC-21 bzw. ANCA) erfolgte nach 40 Minuten. Der PAP wurde in mmHg aufgezeichnet und zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen fand sich kein signifikanter Unterschied.

### III.6. Effekt des Einsatzes von $O_2^-$ - Inhibitoren auf die Bildung der ANCA - induzierten pulmonalen Schrankenstörung

Im Folgenden wurde untersucht, welche Auswirkungen die Hemmung der Sauerstoffradikal-Bildung durch die Substanzen SOD (Superoxid-Dismutase) und DPI (Diphenyleneiodonium) auf die mit „geprimten“ PMN-Zellen und ANCA behandelte Lunge hatte. In der Versuchsgruppe V (PMN+TNF+ANCA+SOD) wurde dem Perfusat sowohl zum Zeitpunkt 0:10 als auch zum Zeitpunkt 1:30 Superoxid-Dismutase in einer Konzentration von 300 U/ml zugesetzt. Die Injektion der TNF-„geprimten“ PMN-Zellen ( $10^6$ /ml) mit ANCA (10  $\mu$ g/ml) erfolgte bei 0:40, was auch während der Untersuchungen der Versuchsgruppe VI (PMN+TNF+ANCA+DPI) der Fall war. Hier wurde DPI in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml verwendet und nach 10 und 90 Minuten in das Perfusat gegeben. Der Verlauf der Gewichtskurve in Abb. 15a zeigt, dass die Hemmung der Sauerstoffradikalbildung erst nach der 140. Minute eine signifikante Senkung des Gewichtsanstiegs bewirken konnte. Während sich die 140-Minuten-Werte der Gruppen V und VI noch nicht signifikant von dem der Gruppe IV unterschieden, wiesen die 180-Minuten-Werte eine Signifikanz auf.  $\Delta$  Gewicht nach 180 Minuten betrug in der ANCA-Gruppe IV 1,8 g, wohingegen die entsprechenden Werte der SOD-Gruppe V 0,767 g und die der DPI-Gruppe VI 0,838 g betragen. Abbildung 15b zeigt, dass der durch die Gabe von „geprimten“ PMN mit ANCA induzierte Anstieg des  $K_{f,c}$  im Gegensatz zum Gewicht bereits nach der 100. Minute sowohl durch den Einsatz von SOD als auch von DPI deutlich gehemmt werden konnte. Die 140-Minuten-Werte von Gruppe V ( $2,24 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$ ) und VI  $3,5 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$ ) unterschieden sich signifikant von dem entsprechenden Wert der Gruppe IV ( $6,70 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$ ). Der Unterschied der  $K_{f,c}$ -Werte der Gruppen V ( $2,86 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$ ) und VI ( $3,88 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$ ) nach 180 Minuten von der Gruppe IV ( $11,70 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$ ) war ebenso signifikant. SOD wies in den Untersuchungen einen stärker inhibierenden Effekt auf den  $K_{f,c}$ -Anstieg auf als DPI. In beiden Gruppen war zu erkennen, dass weder durch Einsatz von SOD noch von DPI eine komplette Konstanz des  $K_{f,c}$  erzielt werden konnte. So lagen die Verlaufskurven der Gruppen V und VI noch leicht über der der unbehandelten Lunge. Dennoch wies die signifikante Senkung der Steigung der  $K_{f,c}$ -Verlaufskurve durch SOD und DPI gegenüber der Versuchsgruppe IV (PMN+TNF+ ANCA) darauf hin, dass die Bildung von Sauerstoffradikalen an der

Entstehung der pulmonal-endothelialen Schrankenstörung eine bedeutende Rolle zu spielen schien.

**Abb.15a:** Verlauf der Gewichtskurve nach Hemmung der Sauerstoffradikalbildung



Die Graphik zeigt den Verlauf der Gewichts-differenz der folgenden 5 Versuchsgruppen:

\* Kontrolle (n=5)

\* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) (n=5)

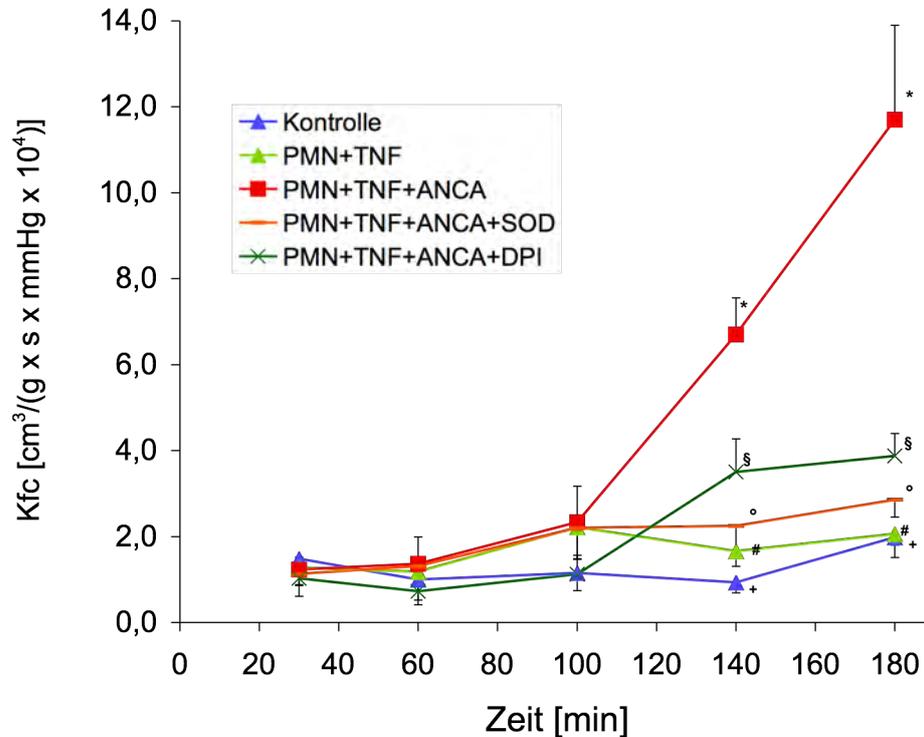
\* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) + ANCA (10  $\mu g/ml$ ) (n=6)

\* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) + ANCA (10  $\mu g/ml$ ) + SOD (300 U/ml) (n=7)

\* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) + ANCA (10  $\mu g/ml$ ) + DPI (5  $\mu g/ml$ ) (n=4).

Die Werte sind als Mittelwerte +/- S.E.M. angegeben. Die markierten Werte der Gruppen I, II, V und VI (+, #, °, §) unterschieden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) von Gruppe IV (PMN+TNF+ANCA(\*)).

**Abb.15b:** Hemmung der Sauerstoffradikalbildung senkte den Anstieg des  $K_{f,c}$  in der ANCA- behandelten Lunge



Die Graphik zeigt den Verlauf des  $K_{f,c}$ -Wertes der folgenden 5 Versuchsgruppen:

\* Kontrolle (n=5)

\* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) (n=5)

\* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) + ANCA (10  $\mu g/ml$ ) (n=6)

\* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) + ANCA (10  $\mu g/ml$ ) + SOD (300 U/ml) (n=7)

\* PMN ( $10^6/ml$ ) + TNF (2 ng/ml) + ANCA (10  $\mu g/ml$ ) + DPI (5  $\mu g/ml$ ) (n=4).

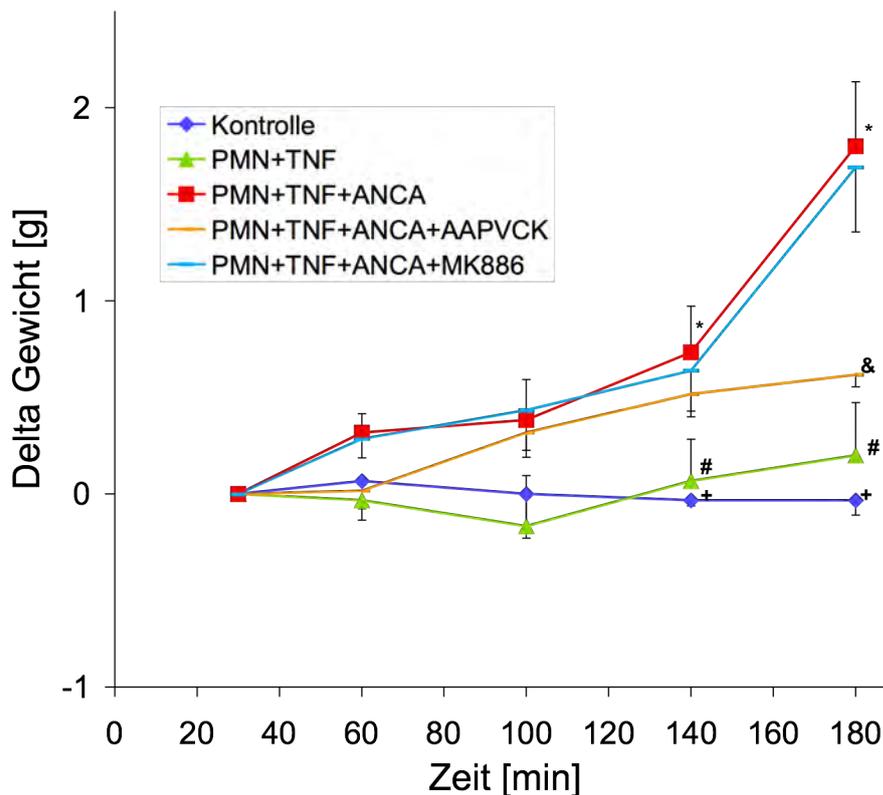
Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. angegeben. Die markierten Werte der Gruppen I, II, V und VI (+, #, °, §) unterschieden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) von Gruppe IV (PMN+TNF+ANCA(\*)).

### III.7. Auswirkungen des Einsatzes eines Leukotrien-Inhibitors im Vergleich zur Verwendung eines Elastase- Inhibitors

Die folgenden Abbildungen 16 a und b stellen dar, welche Auswirkungen die Hemmung der Elastase durch den spezifischen Inhibitor AAPVCK auf die mit „geprimten“ PMN-Zellen und ANCA behandelte Lunge hatte. Darüber hinaus wurde der Effekt der Hemmung der Leukotrien-Bildung durch die Substanz MK886 gezeigt. Um über die gesamte Versuchszeit einen effizienten Wirkspiegel aufrecht zu erhalten, erfolgte die Gabe von MK886 in einer Konzentration von 7,5  $\mu\text{M}$  in der Versuchsgruppe VII (PMN+TNF+ANCA+MK886) zweimalig: direkt zu Beginn des Versuches bei 0:10 und erneut zum Zeitpunkt 1:30. Die Injektion der TNF-„geprimten“ PMN ( $10^6/\text{ml}$ ) mit ANCA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) erfolgte dem Standardprotokoll folgend bei 0:40 und wurde dementsprechend auch während der Untersuchungen der Versuchsgruppe VIII (PMN+TNF+ANCA+AAPVCK) durchgeführt. Je 5  $\mu\text{M}$  AAPVCK wurde dem Perfusat sowohl bei 0:10 als auch bei 1:30 hinzugefügt. In Abbildung 16a zeigt sich, dass der Einsatz von AAPVCK nach der 140. Minute eine signifikante Senkung der Gewichtskurve bewirken konnte.  $\Delta$  Gewicht der Gruppe VIII betrug in der 180. Minute 0,617 g und unterschied sich somit signifikant vom entsprechenden Wert der ANCA-Gruppe IV (1,8 g). Der Einsatz von MK886 in der Gruppe VII hatte hingegen keine signifikante Auswirkung auf die Gewichtskurve. Der 180-Minuten-Wert lag bei 1,69 g. Die Abbildung 16b zeigt, dass die  $K_{f,c}$ -Verlaufskurve der mit MK886 behandelten Lungen bereits nach der 100. Minute stark anstieg. Die Verlaufskurve der Lungen aus Gruppe IV (TNF+PMN+ANCA) wies nach der 100. Minute eine ebenso starke Steigung auf. Der 140-Minuten-Wert von Gruppe VII lag mit  $4,85 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$  nahe dem 140-Minuten-Wert von Gruppe IV ( $6,7 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$ ). Ähnlich verhielt es sich mit den 180-Minuten-Werten: MK886-Gruppe VII ( $10,05 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$ ) und ANCA-Gruppe IV ( $11,70 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$ ). Dies machte deutlich, dass die Verwendung des Leukotrien-Inhibitors keinen inhibierenden Effekt auf den  $K_{f,c}$ -Anstieg, welcher durch die Injektion von „geprimten“ PMN-Zellen und ANCA induziert worden war, hatte. Die Verlaufskurve des  $K_{f,c}$  der Lungen aus Gruppe VIII (PMN+TNF+ANCA+AAPVCK) hingegen erreichte das Niveau der Kurven der Kontrollungen. Der spezifische Elastaseinhibitor (AAPVCK) rief somit eine signifikante Senkung der Steigung der  $K_{f,c}$ -Werte während der Versuchszeit hervor. Der 140-Minuten-Wert betrug  $1,4 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times \text{mmHg} \times 10^4)$  und unterschied sich so wie auch der 180-Minuten-Wert ( $1,93 \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{s} \times$

mmHg x 10<sup>4</sup>) signifikant von den entsprechenden Werten der Gruppe IV. Vergleichend lässt sich sagen, dass im Gegensatz zur Leukotrienbildung, die scheinbar keine Rolle in der Entstehung des Lungenödems im vorliegenden Modell spielte, der Elastase eine umso wichtigere pathogenetische Funktion zukam.

**Abb.16a:** Hemmung der Elastase verhinderte signifikant den Gewichtsanstieg

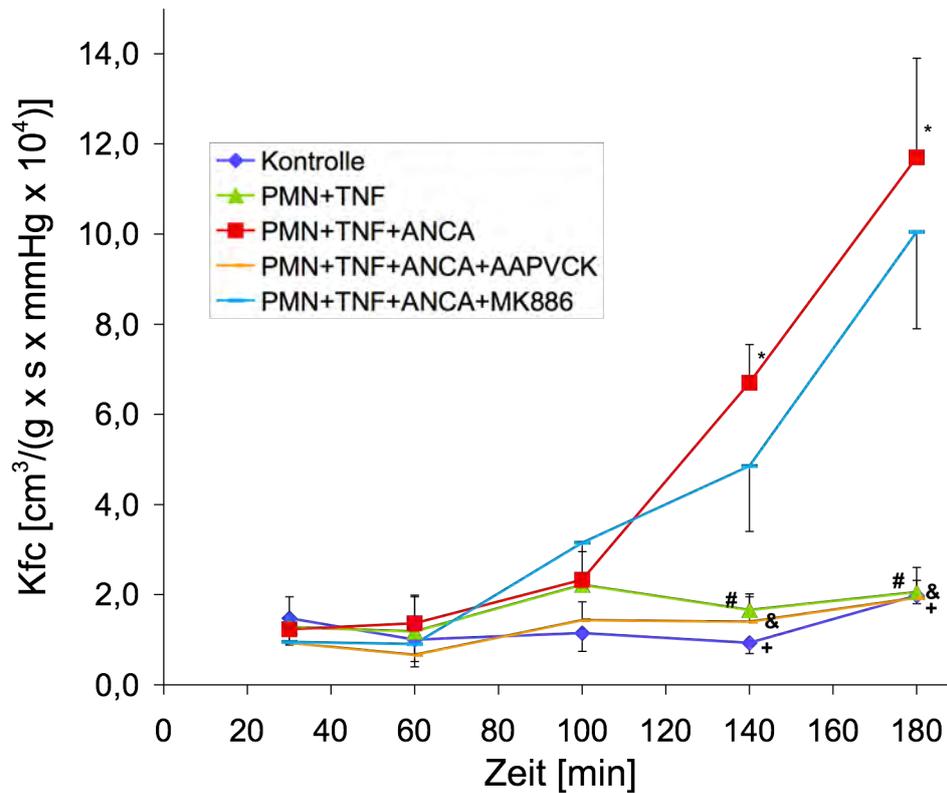


Die Graphik zeigt den Verlauf der Gewichtskurven der folgenden 5 Versuchsgruppen:

- \* Kontrolle (n=5)
- \* PMN (10<sup>6</sup>/ml) +TNF (2 ng/ml) (n=5)
- \* PMN (10<sup>6</sup>/ml) +TNF (2 ng/ml) +ANCA (10 µg/ml) (n=6)
- \* PMN (10<sup>6</sup>/ml) +TNF (2 ng/ml) +ANCA (10 µg/ml) +MK886(7,5 µM/ml) (n=4)
- \* PMN (10<sup>6</sup>/ml) +TNF (2 ng/ml) +ANCA (10µg/ml) +AAPVCK (5 µM/ml) (n=5)

Die Werte sind als Mittelwerte +/- S.E.M. angegeben. Die markierten Werte der Gruppen I (Kontrolle(+)), II (PMN+TNF(#)) und VIII (Lunge+TNF+ANCA+AAPVCK(&)) unterschieden sich signifikant (p<0,05) von Gruppe IV (PMN+TNF+ANCA(\*)).

**Abb16b:** Hemmung der Leukotrienbildung hatte keinen signifikanten, senkenden Effekt auf den Anstieg des  $K_{f,c}$  in der ANCA-behandelten Lunge- Hemmung der Elastase hingegen bewirkte Senkung der Steigung der  $K_{f,c}$ - Verlaufskurve



Die Graphik zeigt den Verlauf des  $K_{f,c}$ -Wertes der folgenden 5 Versuchsgruppen:

- \* Kontrolle (n=5)
- \* PMN ( $10^6/ml$ ) +TNF (2 ng/ml) (n=5)
- \* PMN ( $10^6/ml$ ) +TNF (2 ng/ml) +ANCA (10  $\mu g/ml$ ) (n=6)
- \* PMN ( $10^6/ml$ ) +TNF (2 ng/ml) +ANCA (10  $\mu g/ml$ ) +MK886(7,5  $\mu M/ml$ ) (n=4)
- \* PMN ( $10^6/ml$ ) +TNF (2 ng/ml) +ANCA (10 $\mu g/ml$ ) +AAPVCK (5  $\mu M/ml$ ) (n=5)

Die Werte sind als Mittelwerte +/- S.E.M. angegeben. Die markierten Werte der Gruppen I (Kontrolle(+)), II (PMN+TNF(#)) und VIII (Lunge+TNF+ANCA+AAPVCK(&)) unterschieden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) von den entsprechenden Kontrollen der Gruppe IV (PMN+TNF+ANCA(\*)).

Vor dem Hintergrund der zuvor beschriebenen inhibierenden Wirkung des Einsatzes von Sauerstoffradikaleninhibitoren auf das ANCA-induzierte Lungenödem wurde darüber hinaus untersucht, ob sich durch eine kombinierte Inhibition von ROS und Elastase eine zusätzliche Stabilisierung des  $K_{f,c}$  erzielen ließ. Wie in Tabelle VI abgebildet ließ sich der protektive Effekt der Elastase-Inhibition unter gleichzeitiger Gabe von SOD nicht steigern.

**Tabelle VI**

$K_{f,c}$ [(cm <sup>3</sup> /g x s x mmHg x 10 <sup>4</sup> )]	MW 140. Min	MW 180. Min.
PMN+TNF	1,7 +/- 0,09	2,06 +/- 0,06
PMN+TNF+ANCA	6,7 +/- 0,04	11,7 +/- 0,22
PMN+TNF+ANCA+AAPVCK	1,4 +/- 0,56	1,93 +/- 0,38
PMN+TNF+ANCA+SOD	2,24 +/- 0,60	2,86 +/- 0,40
PMN+TNF+ANCA+AAPVCK+SOD	1,7 +/- 0,60	2,68 +/- 0,73

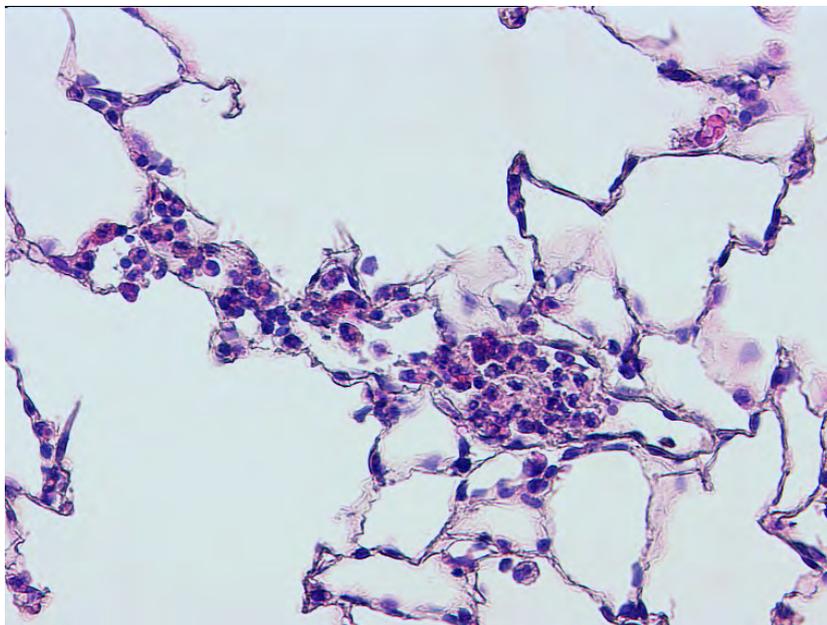
*Vergleich der inhibitorischen Effekte von Sauerstoffradikal- und Elastaseinhibition alleine und in Kombination auf den ANCA-induzierten Anstieg des  $K_{f,c}$ . Angegeben sind die Mittelwerte des  $K_{f,c}$  +/- S.E.M. in der 140. und 180. Minute. Die kombinierte Inhibition von Elastase und Sauerstoffradikalen (PMN+TNF+ANCA+AAPVCK+SOD) unterschied sich nicht signifikant vom Effekt der Einzelsubstanzen (PMN+TNF+ANCA+SOD bzw. PMN+TNF+ANCA+AAPVCK).*

### **III. 8. Adhäsion von neutrophilen Granulozyten in der Rattenlunge**

Das folgende lichtmikroskopische Bild (Abb.17) zeigt den von einer repräsentativen Lunge der Gruppe IV angefertigten Paraffinschnitt, welcher einer HE- Färbung unterzogen wurde. Dieser Lunge waren zuvor sowohl „geprimte“ Granulozyten als auch Anti-PR3-Antikörper zugesetzt worden. Es lässt sich eine starke Ansammlung von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarsepten erkennen. Hieraus wurde ersichtlich, dass es auch im vorliegenden Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Rattenlunge zur Adhäsion der neutrophilen Granulozyten als Voraussetzung für ihre Aktivierung in der

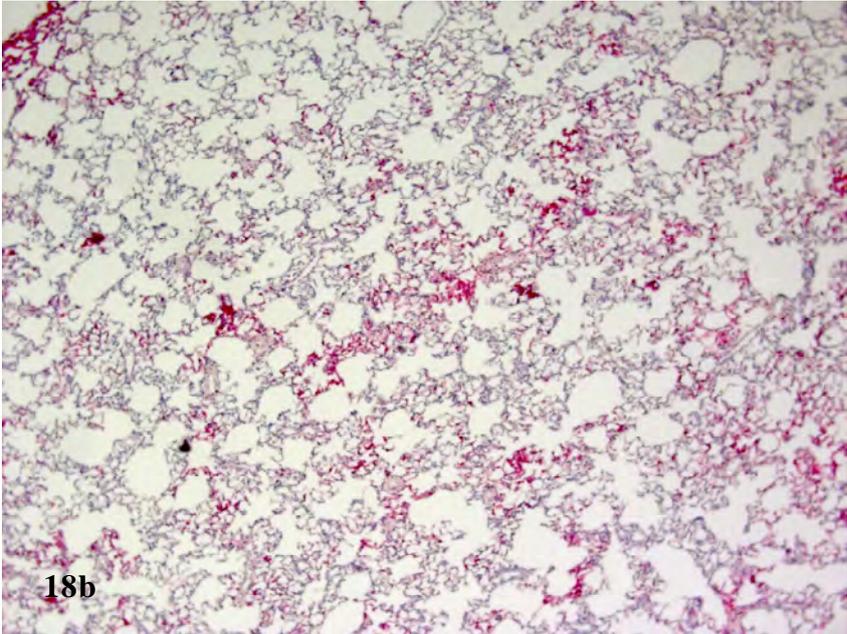
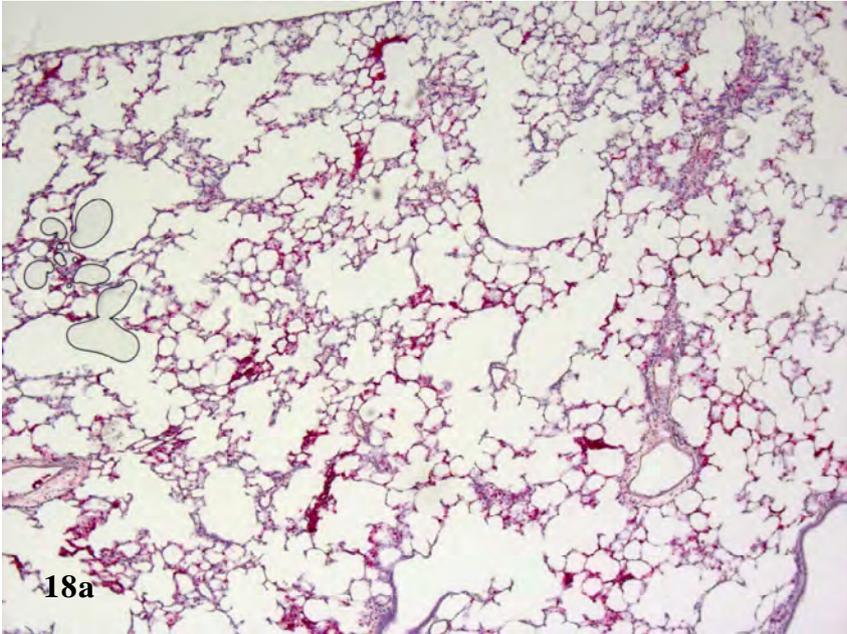
Lunge kam. Die Abbildungen 18a, b und c zeigen immunhistologische Aufnahmen repräsentativer Lungenschnitte aus den Gruppen I (native Lunge), III (PMN+TNF+MOPC-21) und IV (PMN+TNF+ANCA) (n = jeweils 3). Nicht nur in der Aufnahme der Schnitte der mit ANCA behandelten Lunge, sondern auch in der mit Kontrollantikörpern perfundierten Lunge zeigte sich eine signifikante Akkumulation von humanen neutrophilen Granulozyten in den alveolären Kapillaren. Die immunhistologischen Präparate wurden einer semiquantitativen Analyse zur Bestimmung der Retention humaner PMN-Zellen in der isolierten Rattenlunge unterzogen. Die Retention der neutrophilen Granulozyten wurde in der Anzahl „neutrophiler Aggregate“ gemessen. Ein „PMN-Aggregat“ wurde wie folgt definiert: ein „PMN-Aggregat“ war die intravaskuläre Akkumulation neutrophiler Granulozyten, die in mindestens einer Dimension ein Ausmaß von mehr als drei Diameter der Alveolarsepten erreichte. Die Auswertung erfolgte an einem Gewebeareal von 21,36 mm<sup>2</sup> des oberen Lungenlappens. Sie wurde zweifach pro Präparat von zwei „geblindeten“ Auswertern (Herr Prof. Dr. R.M. Bohle und Frau Dr. Regina Moritz) durchgeführt. In Tabelle V werden die „PMN-Aggregate“ pro mm<sup>2</sup> angegeben.

**Abb.17: Ansammlung von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarsepten**



*Die lichtmikroskopische Aufnahme des HE-gefärbten Paraffinschnittes einer repräsentativen Lunge der Gruppe IV zeigt, dass sich die „gepressten“ neutrophilen Granulozyten vermehrt in den Septen der Lungenalveolen wiederfinden. Diese als Grundbedingung für die weitere Aktivierung der PMN-Zellen angesehene Adhäsion wurde folglich im vorhandenen Modell erfüllt.*

**Abb.18a-c:** Immunhistologische Aufnahmen von Lungen der Gruppen I, III und IV



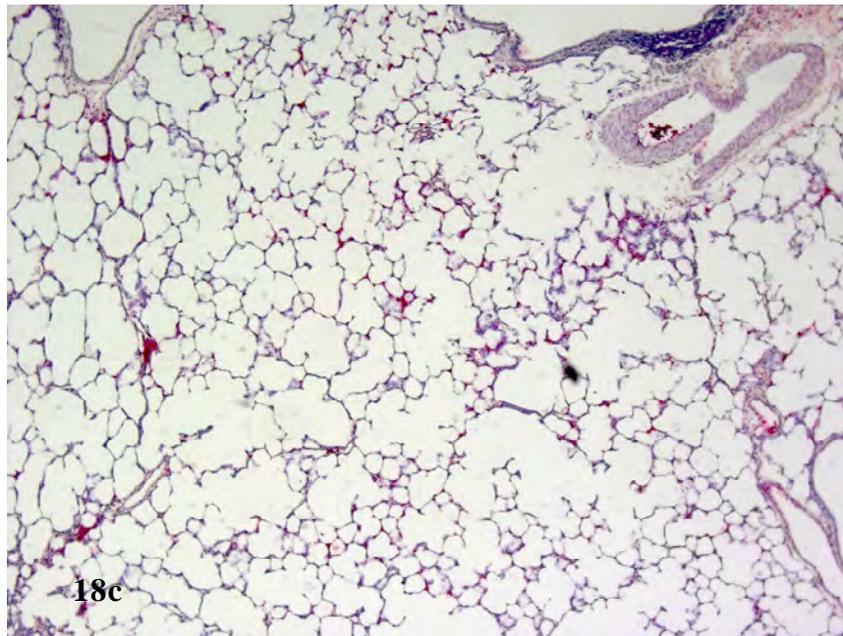


Abbildung 18a zeigt die immunhistologische Aufnahme des Schnittes einer nativen Lunge, die repräsentativ für die Gruppe I (Kontrolle) steht. Die nachfolgende Aufnahme 18b stammt von einer repräsentativen Lunge der Gruppe IV, die mit „geprägten“ Granulozyten und ANCA perfundiert worden war. Es ist die deutliche Ansammlung von humanen PMN-Zellen in den alveolären Kapillaren der Rattenlunge zu beachten. Auch die Perfusion von „geprägten Granulozyten und Kontrollantikörper in Gruppe III führte zu einer starken Akkumulation von PMN-Zellen in den Alveolarsepten der Rattenlunge - wie in Abbildung 18c dargestellt ist. Alle Aufnahmen sind in 2,5-facher Vergrößerung abgebildet. Für die Anfertigung von immunhistologisch gefärbten Lungenschnitten aller drei Gruppen galt  $n = 3$ .

### **Tabelle VII:**

	PMN-Aggregate/mm <sup>2</sup> (1.Auswerter)	PMN-Aggregate/mm <sup>2</sup> (2.Auswerter)
Kontrolle	0 +/- 0	0 +/- 0
PMN+TNF+ANCA	*10,33 +/- 3,95	*15,00 +/- 6,6
PMN+TNF+MOPC-21	*9,33 +/- 1,66	*12,33 +/- 2,68

Die Tabelle zeigt die Auswertung der Retention humaner PMN-Zellen in den Lungen der Versuchsgruppen I, III, und IV mit jeweils  $n=3$ . Die Werte sind als Mittelwerte +/- S.E.M. angegeben. Die markierten Werte (\*) der Gruppen III (PMN+TNF+MOPC-21) und IV (PMN+TNF+ANCA) unterschieden sich signifikant von der Kontrolle der Gruppe I (Kontrolle).

## IV. Diskussion

### IV.1. Entwicklung der Fragestellung

Die Pathogenese der Wegener'schen Granulomatose ist bisher nur teilweise geklärt. Einen großen Beitrag zur Klärung der zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismen leistete 1982 die Entdeckung von bei WG auftretenden, gegen die in neutrophilen Granulozyten befindliche Protease PR3 gerichteten Autoantikörpern (11, 12). Die Etablierung dieser antineutrophilen zytoplasmatischen Autoantikörper (ANCA) als diagnostischem Marker folgte kurz darauf (13). Neben ihrer Funktion als Seromarker wurde ihnen aufgrund durchgeführter *in vitro* Untersuchungen auch eine pathogenetische Rolle zugesprochen. Diese Studien zeigten, dass ANCA zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten in der Lage sind und in der Freisetzung granulozytärer Proteasen und reaktiver Sauerstoffverbindungen resultierte (115-117). Wie bereits erwähnt, stellt die Lunge das am häufigsten betroffene Organ dar. In wenigen Fällen ist sie sogar der einzige Manifestationsort (198). Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass die Interaktion der pathogenen Autoantikörper (ANCA) mit neutrophilen Granulozyten dieses Lungenversagen auslösen kann. So könnten die sich nach Vorstimulierung vermehrt in der Lunge ansammelnden PMN-Zellen durch ANCA aktiviert werden und die darauf folgende Ausschüttung von u.a. destruktiven Proteasen und reaktiven Sauerstoffspezies zur Schädigung des pulmonalen Endothels führen. Eine solche endotheliale Schrankenstörung mit erhöhter Permeabilität der Lungengefäße könnte im klinischen Bild eines Lungenödems resultieren. Auf diesen Erfahrungen basierend, ist es von Interesse, genauestens zu untersuchen, wie sich das Zusammentreffen von neutrophilen Granulozyten und ANCA in der Lunge auf diese auswirkt und zu untersuchen, inwiefern man - basierend auf der Erkenntnis, welche Mediatoren in das Geschehen involviert sind - dem Ereignis eines konsekutiven Lungenödems mit Lungenversagen therapeutisch entgegenwirken kann. Daher war es das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit, mit einem Lungenmodell zu arbeiten, an dem der pathogenetische Ablauf der WG reproduziert werden konnte. Bereits Mitte der 80er Jahre wurde im Institut der Inneren Medizin der JLU Giessen an der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge gearbeitet. Es handelte sich um Untersuchungen an Kaninchenlungen (209). Für die vorliegende Arbeit kam das etablierte Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Rattenlunge zum Einsatz (206, 212). Nachdem die Eignung dieses Modells gesichert war,

konnte der Schwerpunkt auf die Messung und Dokumentation der Veränderungen der einzelnen Lungenparameter als Indiz für die ANCA-PR3-Interaktion gelegt werden, um abschließend den Einfluss verschiedener inhibitorisch wirksamer Pharmaka zu testen.

## **IV.2. Das Modell der isoliert perfundierten und ventilierten**

### **Rattenlunge – ein repräsentatives Tiermodell der Wegener’schen Granulomatose?!**

Bei fulminanten Verläufen der Wegener’schen Granulomatose kann sich ein lebensbedrohliches akutes Lungenversagen ausbilden, welches durch eine rasch eintretende pulmonale Schrankenstörung mit konsekutivem Lungenödem und respiratorischer Insuffizienz charakterisiert ist. Die Induktion eines akuten Lungenversagens durch ANCA wurde am Organ- oder Tiermodell bisher nicht experimentell belegt. Für die mikroskopische Polyangiitis (MPA) wurde bereits ein Modell einer akuten renalen Vaskulitis an der MPO knock out Maus reproduziert (213). Bei der MPA treten sog. pANCA gegen Myeloperoxidase auf: es gelang eine Immunisierung der MPO knock out Maus gegen Myeloperoxidase. Der passive Transfer von pANCA oder pANCA-produzierenden Lymphozyten löste bei diesen Tieren eine Vaskulitis der Niere aus. Im Gegensatz zur MPO ist die PR3-Produktion lediglich auf den Menschen limitiert. Humane Anti-PR3-Antikörper reagieren nicht mit murinen Granulozyten kreuz (214, 215), weswegen bisher keine direkte Reproduktion der WG im Tiermodell erzielt werden konnte. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Ziel, ein akutes Lungenversagen durch cANCA zu verursachen, folgender „Kunstgriff“ angewandt: Humane, PR3-membranexprimierende PMN-Zellen wurden in die Rattenlunge perfundiert. In verschiedenen Studien (212, 216) wurde bereits zuvor belegt, dass sich humane PMN-Zellen im Rattengewebe physiologisch verhalten. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit anhand der histologischen Untersuchungen gezeigt werden, dass die humanen PMN-Zellen in der Rattenlunge retiniert wurden. Es lässt sich daraus schließen, dass das gewählte Modell – auch wenn es auf den ersten Blick artifiziell erscheinen mag – als repräsentativ für die WG anzusehen ist, da es die Registrierung akuter pathophysiologischer Veränderungen erlaubte, die typisch für das ALI in der WG sind. Als Alternative zur Perfusion „geprimter“ humaner Granulozyten wäre die Anwendung

chimärer Proteinase 3 zur Immunisierung anzusehen. Sie führte in Untersuchungen an Ratten zur Bildung von Autoantikörpern gegen murine Granulozyten (215).

### **IV.3. Adhäsion von neutrophilen Granulozyten in der Rattenlunge**

Die Adhäsion der PMN-Zellen an eine Oberfläche - hauptsächlich an Endothelzellen - ist Voraussetzung für eine Interaktion mit cANCA. Untersuchungen haben ergeben, dass zirkulierende neutrophile Granulozyten *in vivo* nicht von ANCA aktiviert werden können (121, 122). Diese Adhäsion der PMN-Zelle an die Gefäßwand und die Migration durch die endotheliale Zellschicht sind durch vorhergehendes „priming“ bedingt (57). Da diese Ergebnisse jedoch aus Studien an humanen Endothelzellen (EC) stammen, stellte sich die Frage, ob humane Granulozyten auch in der Rattenlunge zur Adhäsion befähigt sind. Um diese zu beantworten, wurden von den Versuchsgruppen I, III und IV jeweils drei Lungen nach Ablauf der Versuchszeit fixiert und anschließend für die Anfertigung von histologischen Schnitten verwendet. Nach Anfärbung der Präparate konnte im lichtmikroskopischen Bild der Lungen, welchen humane „geprimte“ Granulozyten und Anti-PR3-Antikörper zugesetzt worden waren, eine starke Ansammlung von PMN-Zellen in den Alveolarsepten gezeigt werden. Hieraus wurde ersichtlich, dass es auch im vorliegenden Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Rattenlunge zur Adhäsion der PMN-Zellen als Voraussetzung für ihre Aktivierung in der Lunge kam. Dieses Ergebnis stimmte mit anderen Untersuchungen überein, die zeigten, dass humane neutrophile Granulozyten im Organmodell der isolierten Lunge in den alveolären Kapillaren retiniert worden waren (212). Obwohl in Bezug auf die durch den Anstieg des Gewichtes und den steigenden kapillären Filtrationskoeffizienten dokumentierte Bildung eines Lungenödems ein sehr deutlicher Unterschied zwischen den Lungen der Gruppe III (PMN+TNF+MOPC-21) und IV (PMN+TNF+ANCA) zu erkennen war, ergab sich in der Auswertung der immunhistologisch angefärbten Lungenschnitte kein quantitativer Unterschied zwischen den ANCA- und den Kontrollantikörper-behandelten Lungen. Diese Diskrepanz könnte darin begründet sein, dass die rein quantitativ erfasste Infiltration der PMN-Zellen in die Alveolarsepten nicht zwingend deren Aktivierungszustand abbildet. Dies wurde auch in anderen ALI-Modellen gezeigt (217). Diesbezüglich wären weiterführende Untersuchungen wie die *in situ* Quantifizierung der PMN-Aktivierung hilfreich (Messung von Elastase und ROS). Aufgrund methodischer Limitierungen des

vorliegenden experimentellen Modells ließ sich das physiologisch nachgewiesene Lungenödem morphologisch nicht darstellen. Der hierfür notwendige Übergang von Protein ins Gewebe war durch den Einsatz von proteinfreier Perfusatlösung nicht möglich. Dies schmälert die Aussagekraft der histologischen Untersuchungen bezüglich der Integrität des pulmonalen Endothels. Des Weiteren können nach einer Perfusionsdauer von lediglich 190 Minuten keine hochgradigen morphologischen Veränderungen erwartet werden.

#### **IV.4. Die pulmonale Schrankenstörung - begründet durch spezifische**

##### **Interaktion zwischen cANCA und PMN-Zellen**

Nachdem der Nachweis erbracht war, dass humane PMN-Zellen in der Rattenlunge retiniert werden, kam der murine monoklonale Anti-PR3-Antikörper MAB PR3 4A5 als Surrogat für cANCA zum Einsatz. Wie sich herausstellte, konnte er in Verbindung mit der Gabe von nativen, frisch isolierten humanen Granulozyten in den Perfusatkreislauf keinerlei Veränderungen in der Lunge auslösen. Die gemessenen Parameter erwiesen sich über die gesamte Versuchszeit als nahezu konstant. Im Gegensatz hierzu führte die Injektion eines Bolus von vorstimulierten PMN-Zellen mit cANCA in den Perfusatkreislauf direkt vor die Lunge zu starker Einlagerung von Flüssigkeit in das Gewebe, welche sich in einem raschen Anstieg des Lungengewichtes darstellte. Ein deutlich ausgeprägtes Lungenödem entstand, welches schließlich zum Lungenversagen führte. Um sicherzustellen, dass diese Reaktion tatsächlich auf die spezifische Interaktion von cANCA mit den „geprimten“ Granulozyten zurückzuführen war, wurden weitere Kontrollen durchgeführt. Keine Auswirkung hatte die Verabreichung von vorstimulierten PMN-Zellen und einem Kontrollantikörper (MOPC-21). Auch konnten Reaktionen der „geprimten“ Granulozyten mit der Lunge ausgeschlossen werden, da die alleinige Gabe von mit TNF $\alpha$  vorinkubierten Granulozyten keinerlei Konsequenzen für die Funktionstüchtigkeit der Lunge hatte. Dasselbe ergab sich für eine mögliche Interaktion von cANCA und der Lunge. Die alleinige Gabe von reinem Anti-PR3-Antikörper hatte keinerlei Auswirkungen auf die Messwerte der Lungenparameter. Dies steht zunächst in scheinbarem Gegensatz zu Untersuchungen der letzten Jahre, die erwiesen haben, dass ANCA direkt mit vaskulärem Endothel interagieren und dessen vollständige Aktivierung bewirken (98, 138, 218). Jedoch wurden in diesen Studien stets humane makrovaskuläre

Endothelzellen eingesetzt. Aus den aktuellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ließ sich schließen, dass es zu keiner Bindung zwischen ANCA und den Endothelzellen der Rattenlunge kam, was auch der Beobachtung entspricht, dass Nager das ANCA-Zielantigen PR3 nicht exprimieren (215). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass das Entstehen der pulmonalen Schrankenstörung, als deren Ausdruck das Ödem anzusehen war, nicht auf eine direkte evtl. auch unspezifische Interaktion der eingesetzten PR3-Antikörper mit dem pulmonalen Endothel zurückzuführen war, sondern vielmehr auf das spezifische Zusammenspiel von vorstimulierten neutrophilen Granulozyten und cANCA. Die Translokation von PR3 aus den intrazellulären azurophilen Granula auf die granulozytäre Oberfläche bildet die Grundvoraussetzung für dieses Zusammenspiel (219, 220). Erstmals wurde diese PR3-Expression 1990 durch Gabe substimulatorischer Konzentrationen granulozyten-aktivierender Substanzen induziert (116, 117) und für diesen Vorgang die Bezeichnung „priming“ geprägt (118). „Geprimt“ wurden die Granulozyten für die Verwendung im Lungenmodell unter Verwendung von TNF $\alpha$ . Prinzipiell induzierten alle eingesetzten TNF-Konzentrationen die Zielantigenexpression, was auch den unterschiedlich zur PR3-Oberflächeninduktion eingesetzten TNF-Konzentrationen in der Literatur entspricht (116, 117, 120). Als optimales TNF-„priming“ mit maximaler PR3-Expression wurde unter den aktuellen Versuchsbedingungen eine 30-minütige Vorinkubation mit 2 ng TNF/ml ermittelt. Native Zellen hingegen wiesen kein oder nur sehr geringe Mengen des Zielantigens an ihrer Oberfläche auf. Dem „TNF-priming“ und der PR3-Membranexpression scheinen auch *in vivo* im Krankheitsgeschehen der WG eine Rolle zuzukommen: Im akuten Schub der WG ist die PR3-Oberflächenexpression an PMN-Zellen erhöht (120). Gleichzeitig finden sich lokal und systemisch erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine (221, 222). Zudem geht man derzeit davon aus, dass eine feste Anzahl von neutrophilen Granulozyten permanent PR3 an der Zelloberfläche exprimieren (membrane PR3 = mPR3). Diese Anzahl soll im Individuum genetisch determiniert und sehr stabil sein (223). Die PR3-exprimierende Subpopulation (mPR3+) kann zwischen 0 und 100% der gesamten Population an neutrophilen Granulozyten ausmachen (224). Diese sog. bi-modale PR3-Expression ist in Patienten mit AAV signifikant erhöht und scheint somit einen Risikofaktor darzustellen (224- 228). Hinzu kommt, dass die PMN-Zellen im Blut von WG-Patienten in verstärktem Maße zur Apoptose neigen, was wiederum mit einem höheren Gehalt an Oberflächen-PR3 korreliert (229). Zusammenfassend lässt sich aus den oben genannten Überlegungen folgern, dass die ANCA-induzierten Veränderungen der pulmonalen Physiologie im

Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Rattenlunge auf eine spezifische Reaktion der Autoantikörper mit PR3-exprimierenden PMN-Zellen beruhen.

#### **IV.5. Ursache der pulmonalen Ödembildung: die primäre endotheliale**

##### **Schrankenstörung**

Die Ko-Perfusion von TNF-„geprimten“ Granulozyten und Anti-PR3-Antikörpern verursachte einen massiven Anstieg des Lungengewichtes, welcher im Sinne eines Lungenödems zu sehen war. Neben der Zunahme des Gewichtes konnte bereits vor Erscheinen der makroskopisch sichtbaren ödematösen Herde, eine Steigerung des kapillären Filtrationskoeffizienten ( $K_{f,c}$ ) beobachtet werden, wohingegen der pulmonalarterielle Druck über die gesamte Versuchszeit konstant blieb. Der  $K_{f,c}$  stellt einen Messwert dar, der anzeigt, in welchem Maße Flüssigkeit aus den Gefäßen durch das Endothel in das Gewebe austritt. Eine hohe Durchlässigkeit des Endothels zeigt sich folglich in einem hohen  $K_{f,c}$ . Da die Aufzeichnungen des pulmonalarteriellen Druckes keine Veränderungen erkennen ließen, konnte ausgeschlossen werden, dass die Schädigung des Endothels Konsequenz einer Erhöhung des Druckes in der Pulmonalarterie war. Somit wird deutlich, dass von einer primären endothelialen Schrankenstörung als Ursache für die pulmonale Schrankenstörung im Rahmen des akuten pulmonalen M. Wegener ausgegangen werden muss. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen diesbezüglich mit den von P. Lamprecht beschriebenen Vorgängen der Interaktion von ANCA mit vorstimulierten, neutrophilen Granulozyten überein, wonach deren Aktivierung zur Adhäsion am Gefäßendothel, der Schädigung von Endothelzellen und somit konsekutiv zur Induktion der Vaskulitis führt (64). Diese pathogenetische Schrittfolge wurde in Form der „ANCA-Zytokin-Sequenz-Theorie“ beschrieben (58). Parallel zu meiner Dissertationsarbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Sibelius ein isoliertes Schrankenmodell zum Nachweis einer Endothelschädigung durch ANCA-aktivierte PMN-Zellen etabliert. An isolierten Monolayern von humanen und murinen Endothelzellen makro- und mikrovaskulären Ursprungs sollen die Pathomechanismen der ANCA-PMN-induzierten endothelialen Schrankenstörung untersucht werden. Eine ähnliche, primäre endotheliale Schrankenstörung wurde bereits durch Perfusion von leukozytären Alloantikörpern, die im Rahmen von Transfusionsreaktionen auftreten, von der

Arbeitsgruppe um Prof. Bux im Zentrum für Transfusionsmedizin der JLU Gießen gezeigt (212).

## **IV.6. Hemmung von Leukotrienen durch MK886 – kein Effekt im**

### **vorliegenden Modell**

In vorherigen Studien wurde demonstriert, dass PMN-Zellen als Antwort auf die Stimulation durch ANCA mit der Freisetzung von Leukotrienen reagierten (131). Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass 5-LO-Produkte an der Entstehung von leukozyten-medierten Lungenschädigungen beteiligt waren (209). Um dies im vorliegenden Modell zu überprüfen, kam in der Versuchsgruppe VII MK886 in einer Konzentration von 7,5  $\mu\text{M}$  zum Einsatz. MK886 ist eine Substanz, die zu den Inhibitoren der Leukotriensynthese zählt. Sie bindet an FLAP (5-Lipoxygenase aktivierendes Protein) und führt so zu einer Hemmung der Lipoxygenase. In den vorliegenden Untersuchungen konnten keine signifikant hemmenden Auswirkungen auf die Entwicklung eines ANCA-induzierten Lungenödems beobachtet werden. Außerdem wiesen diese Lungen makroskopisch sichtbare stark ödematöse Veränderungen auf. Aus der Beobachtung heraus, dass MK 886 in diesem Modell keinen sichtbaren Effekt hatte, lässt sich schließen, dass den Leukotrienen in der Pathogenese im vorliegenden Modell des pulmonalen Morbus Wegener keine entscheidende Rolle zukommt. Auch der fehlende Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks ist ein indirekter Hinweis darauf, dass in diesem Lungenmodell keine physiologisch relevanten Mengen an Leukotrienen anfielen. Im Rahmen der kooperativen Eicosanoidsynthese entsteht neben  $\text{LTB}_4$  auch  $\text{LTC}_4$  (184). Dieses Cysteinylleukotrien wirkt als Vasokonstriktor. Folge einer Vasokonstriktion wäre zwingend ein Anstieg des PAP. Da die PAP-Werte aber nahezu konstant blieben, konnte keine Eicosanoidsynthese stattgefunden haben. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die ANCA-induzierte Leukotriensynthese strikt auf die Präsenz freier Arachidonsäure angewiesen ist (230). Diese war unter den aktuellen Versuchsbedingungen nicht zugegeben worden. Obwohl den Leukotrienen *in vivo* eine Rolle in der ANCA-induzierten Gewebeschädigung nicht abgesprochen werden kann, konnten diese Mediatoren in der isoliert perfundierten Rattenlunge kein ALI auslösen.

## IV.7. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS): pathogenetische Rolle bei der

### Entstehung des Lungenödems im Rahmen der Wegener'schen

#### Granulomatose

In zahlreichen Untersuchungen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass ANCA neutrophile Granulozyten aktivieren, was neben der Degranulation die Freisetzung von aggressiv-lytischen Sauerstoffradikalen durch die PMN-Zellen zur Folge hat. Dieses Phänomen wird auch als „oxidative/respiratory burst“ bezeichnet (115-117, 128, 130, 231). Es wird darüber hinaus diskutiert, dass ROS eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener Lungenerkrankungen spielen (203, 232, 233, 234). Vor diesem Hintergrund erschien es wichtig, die Rolle der ROS in der Entstehung des Lungenversagens im Rahmen der WG zu untersuchen. Der Nachweis hierfür wurde indirekt durch Hemmung von Mediatoren, die wichtige Rollen in der Synthese von ROS übernehmen, durchgeführt. Die ROS-Produktion findet in Form einer Kettenreaktion statt. Die initiale Reaktion, bei der das Superoxid-Anion ( $O_2^{\bullet -}$ ) entsteht, wird von der NADPH-Oxidase katalysiert, weshalb diese als eine primäre Quelle der reaktiven Sauerstoffspezies angesehen wird (166). Des Weiteren ist bekannt, dass zur Verhinderung von Zellschädigungen in den Zellen zahlreiche enzymatische und nicht-enzymatische Mechanismen bestehen, die die ROS in weniger aggressive Formen überführen (235). Ein Enzym, das das hochreaktive  $O_2^{\bullet -}$  in eine weniger aktive Form - das Hydrogen-Peroxid - überführt, ist die Superoxid-Dismutase (SOD). In der vorliegenden Arbeit kamen sowohl ein spezifischer NADPH-Oxidase-Inhibitor (DPI= Diphenyleneiodonium) als auch die Superoxid-Dismutase zum Einsatz. Beide Substanzen konnten eine signifikante Verringerung der Steigung der  $K_{f,c}$ -Verlaufskurve bewirken, was darauf hinweist, dass die Bildung von Sauerstoffradikalen für die Entstehung der pulmonal-endothelialen Schrankenstörung eine bedeutende Rolle spielte. Beim Vergleich der Verlaufskurven der Gruppen V (DPI) und VI (SOD) wurde deutlich, dass SOD dem Anstieg des  $K_{f,c}$  stärker entgegenwirkte als DPI. DPI ist die Substanz, die bereits auf der ersten Stufe der Reaktionskaskade an der NADPH-Oxidase angreift und somit die Bildung des Superoxid-Ions verhindert. Da der hemmende Effekt von SOD, obwohl es erst später enzymatisch wirksam wird, größer ist als der von DPI, muß davon ausgegangen werden, dass Superoxid-Anion noch auf anderem Wege entsteht. Im Granulozyten muss es neben der NADPH-Oxidase weitere Mediatoren geben, die als Quelle für Sauerstoffradikale dienen. Beispielsweise zählt auch der Vasodilatator

Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}^\bullet$ ) zu den reaktiven Sauerstoffspezies. Durch Reaktion mit dem  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Ion kann das sehr starke „oxidant“ Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) entstehen, welches sehr toxisch wirken oder zu weiteren schädlichen Oxidantien aufgespalten werden kann (203). Untersuchungen an Rattennieren ergaben, dass neben der NADPH-Oxidase auch die freie NO-Synthetase eine Hauptquelle des glomerulären Superoxids darstellt (236). Es bleibt folglich zu untersuchen, inwiefern sich die NO-Synthetase im Rahmen der pulmonalen Manifestation der WG über die Produktion von NO indirekt als  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Lieferant betätigt. Dennoch stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Untersuchungen überein, die zu der Aussage führten, dass ROS prinzipiell als Vermittler im Geschehen der neutrophil-abhängigen Endothelschädigung zu fungieren scheinen (203). Zusätzlich konnten bei Patienten mit ALI erhöhte Levels an Markern von oxidativem Stress in der Expirationsluft wie z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$  festgestellt werden. In den entsprechenden Seren waren die Lipid-Peroxidations-Levels erhöht (237). Im Szenario der ANCA-induzierten endothelialen Schädigung wurde bereits neben dem Nachweis einer effektiven NADPH-abhängigen Sauerstoffradikalfreisetzung aus ANCA-aktivierten Granulozyten (115-117, 128, 130, 231) gezeigt, dass ANCA-aktivierte PMN-Zellen einen zytotoxischen Effekt auf endotheliale Monolayer ausüben (135). Neuere Untersuchungen bestätigten einen zytotoxischen Effekt von ANCA-aktivierten PMN-Zellen auf EC. Diese Untersuchungen sprachen der ROS-Freisetzung in diesem Zusammenhang keine pathogenetische Rolle zu (238). Es bleibt allerdings zu diskutieren, ob die in der Arbeit von Lu quantifizierte Freisetzung von vWF als Marker einer unspezifischen endothelialen Schädigung tatsächlich auch die komplexen Vorgänge der Induktion eines Lungenödems, wie sie im isolierten Lungenmodell nach Perfusion von ANCA-aktivierter PMN-Zellen auftritt, widerspiegelt. Zudem wird in der WG eine *in vivo*-Relevanz der Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch die Korrelation des Grades der Gewebeschädigung mit der Menge der ROS-Metaboliten, die durch aktivierte Granulozyten ausgeschüttet worden waren, belegt (153).

## **IV.8. Neutrophile Elastase: hat dieses Enzym eine Bedeutung für die**

### **Entstehung des Lungenödems in der Wegener'schen**

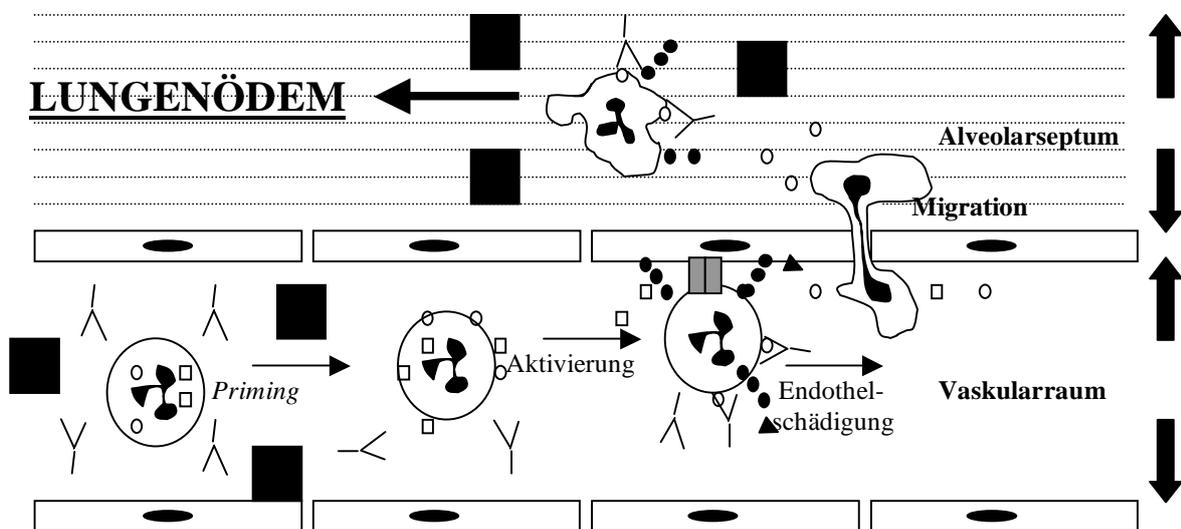
#### **Granulomatose ?**

Die Neutrophile Elastase (NE) ist ein proteolytisches Enzym, welches von aktivierten neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird. Sie ist u.a. in der Lage, die Synthese chemotaktischer Peptide wie IL-8 zu aktivieren (239) und hat sowohl direkt als auch indirekt Einfluss auf die Migration neutrophiler Granulozyten (240). Es ist erwiesen, dass die Ausschüttung der Elastase zur Schädigung humaner Endo- und Epithelzellen führt (241, 242). Um zu überprüfen, ob diese Schädigung auch im Rahmen der WG pathogenetisch wichtig ist, wurden die Untersuchungen unter Verwendung eines spezifischen Elastase-Inhibitors (AAPVCK) erneut durchgeführt. Seine stark protektiven Eigenschaften waren zuvor in anderen Studien belegt worden (201). Im Ergebnisteil wurde bereits erläutert, dass die Lungen der Gruppe VIII (PMN+TNF+ANCA+AAPVCK) eine relativ flache Verlaufskurve des  $K_{f,c}$  aufwiesen. Wenn die Hemmung der Elastase einen signifikanten Anstieg des  $K_{f,c}$ - wie er ohne Hemmung zu beobachten ist - verhindern kann, lässt sich dies insofern verstehen, als dass der Elastase eine bedeutende Rolle in der Entstehung der endothelialen Schrankenstörung und des darauf folgenden Lungenödems zukommt. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Untersuchungen überein, in denen ein sehr spezifischer NE-Inhibitor (Silvestat) eingesetzt wurde (200-202). Eine dieser Studien ergab, dass die NE durch ihre Fähigkeit, eine große Anzahl unterschiedlicher Matrix-Proteine aufzulösen, eine entscheidende Funktion beim Auslösen und Fortschreiten des alveolären Ödems im akuten Lungenversagen übernimmt. Weitere Hinweise auf die Bedeutung der Elastase in der Pathogenese der WG ergaben Analysen der bronchoalveolären Spülproben (BALF) von WG-Patienten. Neben Mukae et al., der bereits 1996 berichtete, dass die Elastase in bronchoalveolären Spülproben von WG-Patienten signifikant erhöht gewesen sei, führten auch andere Studien zu diesem Ergebnis (197, 240, 243). In experimentellen Studien hatte die Inhibition von NE eine starke Senkung der neutrophilen Migration in das Lungengewebe sowie eine Abnahme an Entzündungszellen in den Spülproben zur Folge (240). Kürzlich wurde die NE in der bereits zitierten Arbeit von Lu als Mediator für die Entstehung der endothelialen Zellschädigung durch ANCA-aktivierte Granulozyten definiert (238), was sehr gut mit den vorliegenden Ergebnissen

übereinstimmt. Die Hemmung von NE oder ROS-Produkten konnte das Auftreten eines ALI in der isoliert perfundierten Rattenlunge verhindern. Interessanterweise war es jedoch nicht möglich, diesen Effekt durch kombinierte Gabe beider Inhibitoren zu verstärken. Dieses Ergebnis sollte in Relation mit der Tatsache gesehen werden, dass Sauerstoffradikale und Neutrophile Elastase synergistisch wirken. Bereits 1989 ging Weiss von einer synergistischen Wirkung zwischen ROS und NE aus. Während die NE einen Anstieg der ROS-Produktion in Makrophagen (244) und pulmonalen Epithelzellen (245) induzierte, inaktivierten die reaktiven Sauerstoffspezies endogene Protease-Inhibitoren, so dass die Elastase ungehindert Gewebe angreifen und zerstören konnte (151). Abschließend wird in Abbildung 19 schematisch die Induktion eines Lungenödems durch ANCA-induzierte Freisetzung von ROS und Elastase dargestellt.

**Abb.19:**

**Schematische Zusammenfassung der pathogenetischen Abläufe im vorliegenden Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Rattenlunge**



Die Abbildung stellt schematisch die einzelnen Teilschritte der pathogenetischen Abläufe des zugrunde liegenden Modells der isoliert perfundierten und ventilierten Rattenlunge dar. Nach dem Priming durch Zytokine exprimieren die Granulozyten Proteinase 3 an ihrer Oberfläche. Diese Aktivierung ermöglicht die Interaktion von ANCA mit PR3. Durch Freisetzung von ROS und Elastase wird eine Endothelschädigung induziert, die die Migration der Granulozyten in die Alveolarepten ermöglicht. Dort entsteht infolge der weiteren Ausschüttung von ROS und Elastase das für die WG spezifische ANCA-induzierte Lungenödem (modifiziert nach 246).

- Y ANCA
- Proteinase 3
- Myeloperoxidase
- Sauerstoffradikale
- ▲ Elastase
- ▭ Adhäsionsmoleküle
- Zytokine

## V. Zusammenfassung

Nach ihrer Erstbeschreibung durch Davies 1982 wurden die anti-neutrophilen zytoplasmatischen Antikörper (cANCA) erstmals 1985 von van der Woude mit dem Krankheitsbild der Wegener'schen Granulomatose (WG) in Verbindung gebracht. Wurde die Proteinase 3 (PR3) 1990 bereits als ihr Zielantigen identifiziert, so gelten cANCA gegen PR3 mittlerweile als hocho sensitiver und spezifischer Seromarker für die WG. Des Weiteren wird diesen Autoantikörpern eine entscheidende pathogenetische Funktion für die Entstehung und die Chronifizierung der Erkrankung zugeschrieben. Da die Lunge einen der Hauptmanifestationsorte der WG darstellt, und es in schweren Fällen zum akuten Lungenversagen (ALI) kommen kann, sollte in der vorliegenden Arbeit ein Modell etabliert werden, mit dessen Hilfe die pulmonal stattfindenden pathophysiologischen Veränderungen im ALI in der WG reproduziert und die involvierten Mechanismen charakterisiert werden konnten. Um zu überprüfen, ob die permanent ventilierte und perfundierte Rattenlunge das hierfür geeignete Modell darstellen könnte, musste zunächst untersucht werden, ob die humanen neutrophilen Granulozyten (PMN) als Zielzellen für cANCA auch in der Rattenlunge zur Adhäsion befähigt waren. Die histologischen Analysen hierfür angefertigter Kryoschnitte von Lungen aus verschiedenen Versuchsgruppen zeigten deutlich, dass es zur erforderlichen Anheftung der humanen PMN-Zellen in der Rattenlunge kam und sich das Modell der permanent perfundierten und ventilerten Rattenlunge unter Ko-Perfusion von humanen PMN-Zellen für die Durchführung der vorliegenden experimentellen Arbeit sehr gut eignete. Vorversuche zeigten, dass die Vorinkubation der Granulozyten mit TNF $\alpha$ , wodurch eine Translokation des Autoantigens PR3 an die Zelloberfläche bewirkt wurde, eine wichtige Voraussetzung für die Interaktion der neutrophilen Granulozyten mit cANCA darstellte. Als Surrogat für cANCA wurden murine monoklonale Anti-PR3-Antikörper eingesetzt. Während die Perfusion von cANCA per se oder unbehandelter Granulozyten zusammen mit cANCA keinerlei Effekt hatte, bewirkte die Injektion vorstimulierter Granulozyten in Kombination mit cANCA in den Lungen eine extreme Gewichtszunahme. Da auch TNF-vorbehandelte Granulozyten alleine sowie auch in Kombination mit einem Kontrollantikörper in der Lunge keine Veränderung auslösten, konnte davon ausgegangen werden, dass das sogar makroskopisch sichtbare Lungenödem auf eine spezifische Aktivierung PR3-exprimierender Granulozyten durch cANCA zurückzuführen war. Neben der

Gewichtszunahme diente der  $K_{f,c}$ , der sog. Kapilläre Filtrationkoeffizient, als Indikator der Schrankenstörung. Durch Ko-Perfusion von TNF-„geprimten“ neutrophilen Granulozyten und cANCA wurde eine extreme Steigerung des  $K_{f,c}$  verursacht. Die Tatsache, dass der pulmonalarterielle Druck hingegen konstant blieb, wies darauf hin, dass es sich hierbei um eine primäre endotheliale Schrankenstörung handelte, die nicht durch erhöhten Druck in der Pulmonalarterie verursacht worden war. Zur weiteren Charakterisierung der involvierten Mechanismen kamen Inhibitoren zum Einsatz, die zur Hemmung granulozytärer Mediatoren führen sollten, deren Beteiligung bei der Entstehung des Lungenödems diskutiert wird. Zunächst wurde die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies an der Entstehung des cANCA-induzierten Lungenversagens untersucht. Zum Einsatz kam DPI, ein spezifischer Inhibitor der NADPH-Oxidase, der die Entstehung von Superoxid-Anion verhindert. Dieses wird dann innerhalb dieser Kaskade von SOD in eine weniger aktive Form überführt. Sowohl DPI als auch SOD führten nach Gabe in das Perfusionssystem zu einer signifikanten Verringerung der Ausbildung eines Lungenödems. Folglich spielten Sauerstoffradikale eine sehr wichtige Rolle in diesem Modell der cANCA-induzierten pulmonalen Schädigung. Die Frage, ob das Enzym Elastase und sein Potential, humane Zellen zu schädigen, in diesem Modell involviert waren, wurde geklärt, indem der spezifische Elastase-Inhibitor AAPVCK zum Einsatz kam. In Gegenwart des Elastase-Inhibitors war das durch Perfusion cANCA-aktivierter Granulozyten induzierte Lungenödem deutlich gemildert. Dies deutete auf eine entscheidende Rolle dieses Enzyms im vorliegenden Modell hin. Die Hemmung der Leukotriene durch den 5-Lipoxygenase-Inhibitor MK886 hingegen konnte nicht verhindern, dass sich im Lungengewebe massiv Flüssigkeit infolge gesteigerter Permeabilität der Endothelien einlagerte.

Zusammenfassend ist es gelungen, mit der permanent perfundierten und ventilierten Rattenlunge ein Modell der pulmonalen Wegener'schen Granulomatose zu etablieren, an dem eine pathogenetische Rolle für die cANCA-induzierte Granulozytenaktivierung belegt wurde. Darüber hinaus gelang es zu konkretisieren, dass granulozytär freigesetzte reaktive Sauerstoffspezies und Elastase an der Bildung der pulmonal-endothelialen Schrankenstörung beteiligt waren. Dies eröffnet Perspektiven zum künftigen Einsatz spezifischer Pharmaka beim Lungenversagen in der WG.

## V.1. Summary

After their first description in 1982 by Davies, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (cANCA) were for the first time related to the clinical picture of Wegener's granulomatosis (WG) by van der Woude in 1985. In 1990, Proteinase 3 (PR3) was already identified as main target of cANCA and cANCA targeting PR3 are known as a highly sensitive and specific seromarker of WG. Moreover, an important pathogenic role for the development and the chronification of the disease has been proposed for these autoantibodies. As the lung represents the organ most frequently involved in WG and fulminant disease can present as acute lung injury (ALI) the aim of the current study was to establish a model which could help to reproduce the acute pulmonary pathophysiological changes in ALI due to WG and to characterize the mechanisms involved. To find out whether the permanently ventilated and perfused isolated rat lung could be a suitable model it first had to be tested if human neutrophil granulocytes (PMN), the target cells of cANCA, were also able to adhere at the endothelium of rat lungs. Histological analyses of the prepared cryosections of the lungs from different experimental groups showed clearly that human PMN effectively adhered to the rat pulmonary endothelium, thus allowing the conclusion that the permanently perfused and ventilated rat lung was most suitable for the present study. Preliminary experiments showed that pre-incubation of PMN with TNF $\alpha$ , a process which provokes translocation of the autoantigen PR3 to the cell surface was an important prerequisite for the interaction between neutrophils and cANCA. A murine monoclonal anti-PR3-antibody was used as surrogate for cANCA. While sole perfusion of cANCA per se or "unprimed" PMN together with cANCA had no effect on pulmonary physiology, co-perfusion of TNF-primed neutrophils and cANCA induced a massive weight gain in isolated rat lungs. Moreover, as this effect was not observed when lungs were solely perfused with TNF-primed PMN or co-perfusion with an isotype-matched control-IgG was performed, one can conclude that specific activation of PR3-expressing granulocytes by cANCA was underlying the even macroscopically observed lung edema formation. Not only the weight gain but also the capillary filtration coefficient ( $K_{f,c}$ ) was used as a marker of increased pulmonary endothelial permeability. Co-perfusion of TNF-primed neutrophils and cANCA caused an extreme raise in the  $K_{f,c}$ . In contrast, the pulmonary artery pressure was not affected, indicating that ANCA-induced pulmonary edema formation was due to a primary injury of the pulmonary endothelial barrier function and not secondarily induced by any increase in pulmonary artery pressure. To

further characterize the involved mechanisms pharmacological inhibition of different neutrophil-derived mediators which are discussed to be implicated in the development of lung edema was performed. First, the influence of reactive oxygen species in the pathogenesis of ANCA-induced lung injury was investigated. DPI, a specific NADPH-oxidase inhibitor, preventing the synthesis of superoxide ( $O_2^-$ ) was employed. On this level SOD catalyses the dismutation from superoxide to the less active hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). Both oxygen radical suppressors, DPI and SOD, induced a significant reduction in the development of lung edema. Thus, oxygen radicals played an important role in this model of cANCA-induced pulmonary lesions. To answer the question if the enzyme elastase and its potential ability to damage human cells could play a role in this model of lung injury, the specific inhibitor of elastase AAPVCK was used. In the presence of this elastase-inhibitor the cANCA-induced lung injury was considerably moderated. The results revealed that elastase was centrally involved in the pathogenesis of cANCA-induced lung injury. Inhibiting the leukotrienes by the 5-lipoxygenase-inhibitor MK886 could not prevent the formation of a massive lung edema as a consequence of an increased endothelial permeability.

In conclusion, the aim of establishing a model of the pulmonary Wegener's granulomatosis was reached by using the permanently perfused and ventilated isolated rat lung. In this model, evidence for a pathogenic role of the cANCA-induced activation of neutrophils was provided. Moreover, neutrophil derived reactive oxygen species and elastase were identified to be causally involved in the present disruption of the pulmonary endothelial integrity. This model provides the possibility to develop therapeutic strategies for the future treatment of lung injury in fulminant WG.

## VI. Literaturverzeichnis

1. Brodmann, D.M. Entzündliche Gefäßerkrankungen. *Intern. 2* : 7- 12 (2003).
2. Churg, J., A. Churg. Idiopathic and secondary vasculitis; a review. *Modern Pathol. 2*: 144- 160 (1989).
3. Jennette, J.C. Antineutrophil cytoplasmatic autoantibody- associated diseases: a pathologist's perspective. *Am J Kidney Dis. 18*: 164- 170 (1991).
4. Cid, M.C. New developments in the pathogenesis of systemic vasculitis. *Curr Opin Rheumatol. 8*: 1- 11 (1996).
5. Csernok, E., P. Reichel, W.L. Gross. Neue Aspekte: Der Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA)- Diagnostik bei Vaskulitiden. *Z Rheumatol. 61*: 367- 377 (2002).
6. Fauci, A.S. The spectrum of vasculitis. Clinical, pathological, immunologic and therapeutic considerations. *Ann Intern Med. 89*: 660- 676 (1978).
7. Lawall, Dr.med.H., Prof.Dr.med.C. Diehm. Diagnostik und Therapie von Vaskulitiden. *Cardiovasc. 2*: 1- 15 (2002).
8. Jennette, J.C., J.R. Falk, K. Andrassy, P.A. Bacon, J. Churg, W.L. Gross, E.C. Hagen, G.S. Hoffmann, G.G. Hunder, C.G.M. Kallenberg, R.T. McLuskey, R.A. Sinico, A.J. Rees, L.A. Van Es, R. Waldherr, A. Wiik. Nomenclature of systemic vasculitis. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum. 37*: 187- 192 (1994).
9. Bloch, D.A., B.A. Michel, G.C. Hunder. The American college of Rheumatology 1990- criteria for the classification of vasculitis. *Arthritis Rheum. 33*: 1068- 1073 (1990).
10. Gross, W.L. Primär systemische Vaskulitiden Teil II: Krankheitsbild. *Der Internist. 40*: 951- 968 (1999).
11. Davies, D.J., J.E. Moran, J.F. Niall. Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *Brit Med J. 285*. 606 (1982).
12. Hall, J.B., B.M. Wadham, C.J. Wood, V. Ashton, W.R. Adams. Vasculitis and glomerulonephritis: a subgroup with an antineutrophil cytoplasmatic antibody. *Aust. NZ J Med. 14*: 277- 278 (1984).

13. Van der Woude, F.J., N. Rasmussen, S. Lobatto, A.Wiik, H. Permin, L.A. van Es, M. van der Giessen, G.K. van der Hem, T.H. The. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker in disease activity in Wegner's granulomatosis. *Lancet. I*: 425- 429 (1985).
14. Cohen Terveart, J.W., R. Goldschmeding, A. von dem Borne, C.G.M. Kallenberg. Anti-myeloperoxidase antibodies in Churg Strauss Syndrome. *Thorax. 46*: 70-71 (1991).
15. Falk, R.J., J.C. Jennette. Anti- neutrophil- cytoplasmatic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med. 318*: 1651- 1657 (1988).
16. Gross, W.L., G. Ludemann, G. Kiefer, H. Lehmann. Anticytoplasmatic antibodies in Wegener's Granulomatosis. *Lancet. 806* (1986).
17. Megan, E., E. Griffith, G. Gaskin, C.D. Pusey. Classification, pathogenesis and treatment of systemic vasculitis. *Ren Failure. 18*: 785- 802 (1996).
18. Savage, C.O.S., S.P. Cooke. The role of endothelium in systemic vasculitis. *JAutoimmun. 6*: 237- 249 (1993).
19. Savage, C.O.S. The interaction of the endothelial cells with inflammatory cells in vasculitis. *Sarcoidosis. 13*: 214- 216 (1996).
20. Rees, A.J. Vasculitis and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hyper. 5*: 273- 281 (1996).
21. Amico, G., R.A. Sinico, F. Ferrario. Renal vasculitis. *Nephrol Dial Trans. 11*: 69- 74 (1996).
22. Lee, S.A., O. Wiesner, D.J. Gillespie, T.E. Witzig, H. Homburger, U. Specks. A 70-year-old man with pulmonary infiltrates and a positive antineutrophil cytoplasmic autoantibody test result. *Chest. 127*: 1045- 1050 (2005).
23. Brons, R.H., M.C.J.M. de Jong, N.K. de Boer, C.A. Stegeman, C.G.M. Kallenberg, J.W. Cohen Tervaert. Detection of immune deposits in skin lesions of patients with Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis. 60*: 1097-1102 (2001).
24. Duran, E., P.A. Merkel, S. Sweet, N. Swan, V.L. Babikian. ANCA-associated small vessel vasculitis presenting with ischemic optic neuropathy. *Neurology. 62*: 152- 153 (2004).

25. Reinhold- Keller, E., K. de Groot, K. Holl- Ulrich, A.C. Arlt, M. Heller, A.C. Feller, W.L. Gross. Severe CNS manifestations as the clinical hallmark in generalized Wegener's granulomatosis consistently negative for antineutrophil cytoplasmatic antibodies (ANCA). A report of 3 cases and a review of the literature. *Clin Exp Rheumatol.* 19: 541- 549 (2001).
26. Thajeb, P., J-J. Tsai. Cerebral and ocularhinal manifestation of a limited form of Wegener's granulomatosis with c-ANCA-associated vasculitis. *J Neuroimaging.* 11: 59- 62 (2001).
27. Takwoingi, Y.M., J.H. Dempster. Wegener's granulomatosis: an analysis of 33 patients seen over a 10- year period. *Clin Otolaryngol.* 28: 187- 194 (2003).
28. Pedersen, N.C. A review of immunologic diseases of the dog. *Vet Immunol Immunopathol.* 69: 251- 342 (1999).
29. Tizard, I.R. *Veterinary immunology: an introduction.* Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1996.
30. Scott-Moncrieff, J.C.R., P.W. Snyder, L.T. Glickman, E.L. Davis, P.J. Felsburg. Systemic necrotizing vasculitis in nine young beagles. *JAVMA.* 201: 1553- 1558 (1992).
31. Tipold, A., M. Vandavelde, A. Zurbriggen,. Neuroimmunological studies in steroid- responsive menigitis-arteritis in dogs. *Res Vet Sci.* 58: 103- 108 (1995).
32. Felsburg, P.J., H. HogenEsch, R.L. Somberg, P.W. Snyder, L.T. Glickman. Immunologic abnormalities in canine juvenile polyarteritis syndrome. A naturally occurring animal model of Kawasaki disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 65: 110- 128 (1992).
33. Albers, E. Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) bei steril- eitriger Meningitis-Arteriitis (SRMA) des Hundes. *Dissertationsschrift aus der Klinik für kleine Haustiere der Tierärztl. Hochschule Hannover* (2001).
34. Carpenter, J.L., N.C. Andelman, F.M. Moore, N.W. King, Jr. Idiopathic cutaneous and renal glomerular vasculopathy of greyhounds. *Vet Pathol.* 25: 401- 407 (1988).
35. Cowan, L.A., D.M. Hertzke, B.W. Fenwick, C.B. Andreasen. Clinical and clinicopathologic abnormalities in greyhounds with cutaneous and renal

- glomerular vasculopathy: 18 cases 1992-1994. *J Am Vet Med Assn.* 210: 789- 793 (1997).
36. Klinger, H. Grenzformen der Periarteritis nodosa. *Frankf J Pathol.* 42: 455 (1931).
37. Wegener, F. Über generalisierte septische Gefäßerkrankungen. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 29: 202- 210 (1936).
38. Wegener, F. Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Nieren. *Beitr Path Anat.* 102: 36-68 (1939).
39. Reinhold- Keller, E., K. Herlyn, R. Wagner-Bastmeyer, J. Gutfleisch, H.H. Peter, H.H. Raspe, W.L. Gross. No difference in the incidences of vasculitides between north and south Germany: first results of the German vasculitis register. *Rheumatology.* 41: 540-549 (2002).
40. Godman, G.C., J. Churg. Wegener's granulomatosis: pathology and review of literature. *AMA Arch Pathol.* 58: 533- 553 (1954).
41. Hoffman, G.S., G.S. Kerr, R.Y. Leavitt, C.W. Hallahan, R.S. Lebovics, W.D. Travis, M. Rottem, A.S. Fauci. Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. *Ann Intern Med.* 116: 448- 498 (1992).
42. Cordier, J.F., D. Valeyre, L. Guillevin, R. Loire, J.-M. Brechot. Pulmonary Wegener's granulomatosis. A clinical and imaging study of 77 cases. *Chest.* 97: 906-912 (1990).
43. Reuter, M., A. Schnabel, F. Wesner, K. Tetzlaff, Y. Risheng, W.L. Gross, M. Heller. Pulmonary Wegener's granulomatosis. Correlation between high-resolution CT findings and clinical scoring disease activity. *Chest.* 114: 500-506 (1998).
44. Schnabel, A., M. Reuter, K. Gloeckner, J. Müller-Quernheim, W.L. Gross. Bronchoalveolar lavage cell profiles in Wegener's granulomatosis. *Respir Med.* 93: 498-506 (1999).
45. Travis, W.D., G.S. Hoffman, R.Y. Leavitt, H.I. Pass, A.S. Fauci. Surgical pathology of the lung in Wegener's granulomatosis. *Am J Surg Pathol.* 15: 315-333 (1991).
46. Ter Maaten, J.C., C.F.M. Franssen, R.O.B. Gans, R.J.M. Strack van Schindel, S.J. Hoortje. Respiratory failure in ANCA-associated vasculitis. *Chest.* 110: 347-362 (1996).

47. Schwarz, M.I., K.K. Brown. Small vessel vasculitis of the lung. *Thorax*. 55: 502-510 (2000).
48. Langford, C.A., M.C. Sneller, C.W. Hallahan, G.S. Hoffman, W.A. Kammerer, C. Talar-Williams, A.S. Fauci, R.S. Lebovics. Clinical features and therapeutic management of subglottic stenosis in patients with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum*. 39: 1754-1760 (1996).
49. Sreaton, N.J., P. Sivasothy, C.D.R. Flower, C.M. Lockwood. Tracheal involvement in Wegener's granulomatosis: Evaluation using spiral CT. *Clin Radiol*. 53: 809-815 (1998).
50. Sarraf, P., M.C. Sneller. Pathogenesis of Wegener's granulomatosis: current concepts. *Molec Med: Expert reviews*. 7: 1- 17 (2005).
51. DeRemee, R.A., T.J. McDonald, L.H. Weiland. Aspekte zur Therapie und Verlaufbeobachtungen der Wegenerschen Granulomatose. *Med Welt*. 38: 470-473 (1987).
52. De Groot, K., A. Schnabel. Das pulmorenale Syndrom. *Der Internist*. 46: 769-782 (2005).
53. Lamprecht, P., C. Lerin-Lozano, E. Reinhold-Keller, B. Nölle, W.L. Gross. Retinal artery occlusion in Wegener's granulomatosis. *Rheumatology*. 39: 928- 929 (2000).
54. Lamprecht, P., W.L. Gross. Wegener's Granulomatosis. *Herz*. 29: 47-56 (2004).
55. Schnabel, A., K. Holl-Ullrich, K. Dalhoff, M. Reuter, W.L. Gross. Efficacy of transbronchial biopsy in pulmonary vasculitis. *Eur Respir J*. 10: 2738-2743 (1997).
56. Schmitt, W.H., J. Paulsen, H. Rudert, W.L. Gross. ANCA-assozierte Vaskulitiden. Morbus Wegener, Mikroskopische Polyangiitis und Churg-Strauss-Syndrom. *HNO*. 45: 477-491 (1997).
57. Rarok, A.A., P.C. Limburg, C.G.M. Kallenberg. Neutrophil- activating potential of antineutrophil cytoplasm autoantibodies. *J Leukoc Biol*. 74: 3-15 (2003).
58. Hagen, E.C., M.R. Daha, J. Hermans, K. Andrassy, E. Csernok, G. Gaski, P. Lesavre, J. Lüdemann, N. Rasmussen, R.A. Sinico, A. Wiik, F.J. van der Woude, BCR Project for ANCA Assay Standardization. Diagnostic value of

- standardized assays for anti- neutrophil cytoplasmatic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. *Kidney Int.* 53: 743- 753 (1998).
59. Kerr, G.S., T.A. Fleisher, C.W. Hallahan, R.Y. Leavitt, A.S. Fauci, G.S. Hoffmann. Limited prognostic value of changes in antineutrophil cytoplasmic antibody titer in patients with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 36: 365- 371 (1993).
60. Wegener, F. Wegener's Granulomatosis. Thoughts and observations of a pathologist. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 247: 133-142 (1990).
61. Falk, R.J., J.C. Jennette. ANCA small-vessel vasculitis. *J Am Soc Nephrol.* 8(2): 314- 3222 (1997).
62. Devaney, K.O., W.D. Travis, G.S. Hoffmann, R. Leavitt, R. Lebovics, A.S. Fauci. Interpretation of head and neck biopsies in Wegener's Granulomatosis. A pathologic study of 126 biopsies in 70 patients. *Am J Surg Pathol.* 14: 555- 64 (1990).
63. Savige, J., D. Gillis, E. Benson, D. Davies, V. Esnault, R.J. Falk, E.C. Hagen, D. Jayne, J.C. Jennette, B. Paspaliaris, W. Pollock, C. Pusey, C.O. Savage, R. Silvestrini, F. van der Woude, J. Wieslander, A. Wiik. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmatic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol.* 111: 507- 513 (1999).
64. Lamprecht, P. Aktuelle Aspekte ANCA- assoziierter Vaskulitiden. *Medizinische Klinik.* 9: 518- 522 (2004).
65. Gross, W.L. Primär systemische Vaskulitiden Teil III: Pathogenese und Therapie. *Der Internist.* 40: 1194- 1215 (1999).
66. Jayne, D., N. Rasmussen, K. Andrassy, P. Bacon, J.W. Cohen Tervaert, J. Dadoniené, A. Ekstrand, G. Gaskin, G. Gregorini, K. de Groot, W. Gross, C. Hagen, E. Mirapeix, E. Petterson, C. Siegert, A. Sinico, V. Tesar, K. Westman, C. Pusey ; for the European Vasculitis Study Group. A randomized trial of maintenance therapy for vasculitis associated with antineutrophil autoantibodies. *N Engl J Med.* 349: 36-44 (2003).
67. Schnabel, A., W.L. Gross. Pulmonale Vaskulitis. *Pneumologie.* 54: 232-242 (2000).
68. Langford, C.A. Treatment of ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med.* 349: 177- 206 (2003).

69. Cohen Terveart, J.W., F.J. van der Woude, A.S. Fauci, J.L. Ambrus, J. Velosa, W.F. Keane, S. Meijer, M. van der Giessen, G.K. van der Hem, T.H. The, C.G.M. Kallenberg. Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmatic antibodies. *Arch Intern Med.* 149: 2461- 2465 (1989).
70. Jayne, D., G. Gaskin, C.D. Pusey, C.M. Lockwood. ANCA and predicting relapse in systemic vasculitis. *Quarterly J Med.* 88: 127- 133 (1995).
71. Egner, W.H.M.C. Titration of antibodies against neutrophil cytoplasmatic antigens is useful in monitoring disease activity in systemic vasculitides. *Clin Exp Immunol.* 82: 244- 249 (1990).
72. Kerr, G.S., T.A. Fleisher, C.W. Hallahan, R.Y. Leavitt, A.S. Fauci, G.S. Hoffmann. Limited prognostic value of changes in antineutrophil cytoplasmatic antibody titer in patients with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 36: 365- 371 (1993).
73. Hoffmann, G.S., G.S. Kerr. Rise in ANCA titer: to treat or not to treat (letter). *Am J Med.* 98: 102- 103 (1995).
74. Boomsma, M.M., C.A. Stegemann, M.J. van der Leij, W. Oost, J. Hermans, C.G.M. Kallenberg, P.C. Limburg, J.W. Cohen Terveart. Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of anti-neutrophil cytoplasmatic antibody levels: a prospective study. *Arthritis Rheum.* 43: 2025- 2033 (2000).
75. Gross, W.L. Vaskulitiden- Neues zur Klassifikation, Pathogenese und Therapie. *Dt. Aerzteblatt.* 92: 1019- 1026 (1995).
76. Aries, P.M., B. Hellmich, W.L. Gross. Glucocorticoide: Stellenwert in der Therapie der Vaskulitis. *Z Rheumatol.* 64: 155-161 (2005).
77. Lhote, F., P. Cohen, T. Genereau, M. Gayraud, L. Guillevin. Microscopic polyangiitis: clinical aspects and treatment. *Ann Med Int Paris.* 147: 165- 177 (1996).
78. Lanham, J.G., K.B. Elkon, C.D. Pusey, G.R.V. Huges. Systemic vasculitis in asthma and eosinophilia: a clinical approach to the Churg Strauss syndrome. *Medicine.* 63: 65- 81 (1984).
79. Masi, A.T., G.G. Hunder, J.T. Lie. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Churg Strauss syndrome (allergic granulomatosis and agiitis. *Arthritis Rheum.* 33: 1094- 1110 (1990).

80. Churg, J., L. Strauss. Allergic granulomatosis, allergic angiitis and periarteriitis nodosa. *Am J Pathol.* 27: 277- 301 (1951).
81. Wiik, A.S. Anti- neutrophil cytoplasmatic antibodies in primary small vessel vasculitides. *Scand J Rheuma.* 25: 65- 69 (1996).
82. Segelmark, M., B.D. Phillips, S.L. Hogan, R.J. Falk, J.C. Jennette. Monitoring Proteinase 3 Antineutrophil Cytoplasmatic Antibodies for Detection of Relapses in Small Vessel Vasculitis. *Clin Diag Lab Immun.* 10(5): 769- 774 (2003).
83. Kallenberg, C.G.M., E. Brouwer, J.J. Weening, J.W. Cohen- Terveart. Antineutrophil cytoplasmatic antibodies: current diagnostic and pathophysical potential. *Kidney Int.* 46: 1- 15 (1994).
84. Coremans, I.E.M., E.C. Hagen, M.R. Daha, F.J. van der Woude, E.A.M. van der Voort, C. Kleuburg-van der Keur, F.C. Breedveld. Antilactoferrin antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with vasculitis. *Arthritis Rheum.* 35: 1466-1475 (1992).
85. Sinico, R.A., C. Pozzi, A. Radice, A. Tincani, M. Li-Vecchi, S. Rota, C. Comotti, F. Ferrario, G. D'Amico. Clinical significance of anti-neutrophil cytoplasmatic autoantibodies with specificity for lactoferrin in renal diseases. *Am J Kidney Dis.* 22: 253-260 (1993).
86. Cohen Terveart, J.W., A.H.L. Mulder, C.A. Stegman, J.D. Elema, M.G. Huitema, T.H. The, C.G.M. Kallenberg. The occurrence of autoantibodies to human elastase in Wegener's Granulomatosis and other inflammatory disorders. *Ann Rheum Dis.* 52: 115-120 (1993).
87. Halbwachs-Mecarelli, L., P. Nusbaum, L.H. Noel, D. Reumaux, S. Erlinger, J.P. Grünfeld, P. Lesavre. Anti-neutrophil cytoplasmatic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin Exp Immunol.* 90: 79-84 (1992).
88. Clayton, A.R., C.O.S. Savage. What you should know about PR3- ANCA. Evidence for the role of T cells in the pathogenesis of systemic vasculitis. *Arthritis Res.* 2: 260- 262 (2000).
89. Kitahara, T., K. Hiromura, A. Maezawa, K. Ono, N. Narahara, S. Yano, T. Naruse, K. Takenouchi, Y. Yasumoto. Case of propylthiouracil-induced vasculitis associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA); review of literature. *Clin Nephrol.* 47: 336- 340 (1997).

90. Noh, J.Y., T. Asari, N. Hamada, F. Makino, N. Ishikawa, Y. Abes, K. Ito, K. Ito. Frequency of appearance of myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmatic antibody (MPO-ANCA) in Graves´disease patients treated with propylthiouracil and the relationship between MPO-ANCA and clinical manifestations. *Clin Endocrinol.* 54: 651- 654 (2001).
91. Erten, Y., H. Bodur, S. Sahiner, O. Tolunay, V. Akkaya, B. Canbakan, M. Bali. Antineutrophil cytoplasmatic antibody associated vasculitis and rapidly progressive glomerulonephritis as a complication of propylthiouracil therapy. *Clin Endocrinol.* 57: 699- 700 (2002).
92. Yamauchi, K., M. Sata, J.I Machiya, D. Osaka, T. Wada, S. Abe, K. Otake, I. Kubota. Antineutrophil cytoplasmatic antibody positive alveolar haemorrhage during propylthiouracil therapie for hyperthyroidism. *Resp.* 8: 532- 535 (2003).
93. Nakamori, Y., T. Tominaga, Y. Inoue, K. Shinohara. Propylthiouracil (PTU)- induced vasculitis associated with antineutrophil antibody against myeloperoxidase (MPO-ANCA). *Intern Med.* 42: 529- 533 (2003).
94. Waldhauser, L., J. Utrecht. Antibodies to myeloperoxidase in propylthiouracil-induced autoimmune disease in the cat. *Toxicology.* 114: 155- 162 (1996).
95. Csernok, E., J. Lüdemann, W.L. Gross, D.F. Bainton. Ultrastructural localization of proteinase 3 , the target antigen of anti- cytoplasmatic antibodies circulating in Wegener´s Granulomatosis. *Am J Pathol.* 137: 1113- 1120 (1990).
96. Gross, W.L., E. Csernok, B.K. Flesch. "Classic" anti- neutrophil cytoplasmatic autoantibodies (ANCA) , Wegener´s autoantigen, and their immunpathogenetic role in Wegener´s granulomatosis. *J Autoimmun.* 6: 171-184 (1993).
97. Van der Geld, Y.M., P.C. Limburg, C.G.M. Kallenberg. Proteinase 3, Wegener´s autoantigen: from gene to antigene. *J Leukoc Biol.* 69: 177-190 (2001).
98. Mayet, W.J., E. Csernok, C. Szymkowiak, W.L. Gross, K.H. Meyer zum Büschenfelde. Human endothelial cells express proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmatic antibodies in Wegener´s Granulomatosis. *Blood.* 82: 1221- 1229 (1993).

99. Mayet, W.J., E. Hermann, E. Csernok, A. Knuth, T. Poralla, W.L. Gross, K.H. Meyer zum Büschenfelde. A human renal cancer line as a new antigen source for the detection of antibodies in sera of patients with Wegener's Granulomatosis. *J Immunol Meth.* 143: 57- 64 (1991).
100. Schwarting, A., J.F. Schlaak, E. Wandel, K.H. Meyer zum Büschenfelde W.J. Mayet. human renal tubular epithelial cells as target cells for antibodies to proteinase 3 (c-ANCA). *Nephrol Dial Trans.* 21: 916- 923 (1997).
101. Brockmann, H., A. Schwarting, J. Kriegsmann, P. Petrow, A. Gaumann, K.M. Müller, P.R. Galle, W. Mayet. Proteinase-3 as the major autoantigen of c- ANCA is strongly expressed in lung tissue of patients with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Res.* 4: 220- 225 (2002).
102. Jenne, D.E., J. Tschopp, J. Lüdemann, B. Utecht, W.L. Gross. Wegener's autoantigen decoded (letter). *Nature.* 346: 520 (1990).
103. Gupta, S.K., J.L. Niles, R.T. McCluskey, M.A. Arnaout. Identity of Wegener's autoantigen (p29) with proteinase 3 and myeloblastin (letter). *Blood.* 74: 2162 (1990).
104. Wilde, C.G., J.L. Snable, J.E. Griffith, R.W. Scott. Characterization of two azurophil granule proteases with active- site homology to neutrophil elastase. *J Biol Chem.* 265: 2038- 2041 (1990).
105. Labbaye, C., P. Musette, Y.E. Cayre. Wegener autoantigen and myeloblastin are encoded by a single mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 9253- 9256 (1991).
106. Niles, J.L., R.T. McCluskey, M.F. Ahmad, M.A. Arnaut. Wegener's Granulomatosis autoantigen is a novel serine protease. *Blood.* 74: 1888- 1893 (1989).
107. Pezzato, E., M. Dona, L. Sartor, I. Dell'Aica, R. Benelli, A. Albin, S. Garbisa. Proteinase-3 directly activates MMP-2 and degrades gelatin and Matrigel; differential inhibition by (-)epigallocatechin-3-gallate. *J Leukocyte Biol.* 74: 88- 94 (2003).
108. Kam, C.M., J.E. Keerigan, K.M. Dolman, R. Goldschmeding, A. von dem Borne, J.C. Powers. Substrate and inhibitor studies on proteinase 3. *FEBS Letters.* 297: 119- 123 (1992).
109. Ballieux, B.E., K.T. Zondervan, P. Kievit, E.C. Hagen, L.A. van Es, F.J. van der Woude, M.R. Daha. Binding of proteinase 3 and myeloperoxidase to

- endothelial cells: ANCA-mediated endothelial cell damage through ADCC? *Clin Exp Immunol.* 97: 52- 60 (1994).
110. Jennette, J.C., R.J. Falk. Pathogenesis of the vascular and glomerular damage in ANCA- positive vasculitis. *Nephrol Dial Transplant.* 13: 16- 20 (1998).
111. Grau, G.E., P. Rouxlombard, C. Gysler, C. Lambert, P.H. Lambert, J.M. Dayer, L. Guillevin. Serum cytokine changes in systemic vasculitis. *Immunology.* 68: 196- 198 (1989).
112. Deguchi, Y., N. Shibata, S. Kishimoto. Enhanced transcription of TNF in systemic vasculitis. *Lancet.* 2: 745- 746 (1989).
113. Csernok, E., C.H. Szymkowiak, N. Mistry, M.R. Daha, W.L. Gross, J. Kekow. Transforming growth factor- beta (TGF- beta) expression and interaction with proteinase 3 (PR3) in anti- neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)- associated vasculitis. *Clin Exp Immunol.* 105: 104- 111 (1996).
114. Csernok, E., W.H. Schmidt, M. Ernst, D.F. Bainton, W.L. Gross. Membrane surface proteinase 3 expression and intracytoplasmic immunoglobulin on neutrophils from patients with ANCA- associated vasculitis. *Adv Exp Med Biol.* 336: 45- 50 (1993).
115. Porges, A.J., P.B. Redecha, W.T. Kimberley, E. Csernok, W.L. Gross, R.P. Kimberley. Anti- neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIIa. *J Immunol.* 153: 1271- 1280 (1994).
116. Charles, L.A., M.L.R. Caldas, R.J. Falk, R.S. Terrell, J.C. Jennette. Antibodies against granule proteins activate neutrophils *in vitro*. *J Leukocyte Biol.* 50: 539- 546 (1991).
117. Falk, R.J., R. Terrell, L.A. Charles, J.C. Jennette. Anti- neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 4115- 4119 (1990).
118. Haslett, C., L.A. Guthrie, M.M. Kopaniac, R.B. Johnston Jr., P.H. Henson. Modulation of multiple neutrophil functions by preperative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol.* 119: 101- 108 (1985).
119. Lüdemann, J., B. Utrecht, W.L. Gross. Anti- cytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis are directed against proteinase 3. In: New aspects

- of human polymorphonuclear leucocytes. *Plenum Press*. New York and London, Hörl, W.H. and S. Schollmeyer, 1991, pp. 141- 150.
120. Csernok, E., M. Ernst, W. Schmidt, D.F. Bainton, W.L. Gross. Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol*. 95: 244- 250 (1994).
121. Reumaux, D., P.J. Vossebeld, D. Roos, A.J. Verhoeven. Effect of tumor necrosis factor-induced integrin activation on Fc gamma receptor II-mediated signal transduction: relevance for activation of neutrophils by anti-proteinase 3 or anti-myeloperoxidase antibodies. *Blood*. 86: 3189- 3195 (1995).
122. Kallenberg, C.G.M., A.A. Rarok, C.A. Stegeman, P.C. Limburg. New insights into the pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitides. *Autoimm Rev*. 1: 61-66 (2002).
123. Stegeman, C.A., J.W. Cohen Tervaert, W.J. Sluiter, W. Manson, P.E. de Jong, C.G.M. Kallenberg. Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener's granulomatosis. *Ann Intern Med*. 113: 12- 17 (1994).
124. Brons, R.H., H.I. Bakker, N.W. van Wijk, N.W. van Dijk, A.C. Mülle-Kobold, P.C. Limburg, W.L. Manson, C.G.M. Kallenberg, J.W. Cohen Tervaert. Staphylococcal acid phosphatase binds to endothelial cells via interaction; a pathogenic role in Wegener's granulomatosis? *Clin Exp Immunol*. 19: 566- 573 (2000).
125. Terveart, J.W., P. Heeringa. Pathophysiology of ANCA- associated vasculitides: are ANCA really pathogenic? *Neth J Med*. 61: 404- 407 (2003).
126. Falk, R.J., J.C. Jennette. ANCA are pathogenic- oh yes they are! *J Am Soc Nephrol*. 13: 1977- 1979 (2002).
127. Hogan, S.L., K.K. Satterly, M.A. Dooley, P.H. Nachmann, J.C. Jennette, R.J. Falk. Silica exposure in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol*. 12: 134- 142 (2001).
128. Preston, G.A., R.J. Falk. ANCA signaling: Not just a matter of respiratory burst. *Kidney Int*. 59: 1981- 1982 (2001).
129. Mulder, A.H.L., P. Heeringa, E. Brouwer, P.C. Limburg, C.G.M. Kallenberg. Activation of granulocytes by anti- neutrophil cytoplasmic

- antibodies (ANCA): a Fc gamma RII- dependent process. *Clin Exp Immunol.* 153: 1271- 1280 (1994).
130. Kettritz, R., J.C. Jennette, R.J. Falk. Crosslinking of ANCA- antigens stimulates superoxide release by human neutrophils. *J Am Soc Nephrol.* 8: 386- 394 (1997).
131. Grimminger, F., K. Hattar, C. Papavassilis, B. Temmesfeld, E. Csernok, W.L. Gross, W. Seeger, U. Sibelius. Neutrophil activation by anti-proteinase 3 antibodies in Wegener's granulomatosis: role of exogenous arachidonic acid and leucotriene B4 generation. *J Exp Med.* 184: 1567- 1572 (1996).
132. Hattar, K., U. Sibelius, A. Bickenbach, E. Csernok, W. Seeger, F. Grimminger. Subthreshold concentrations of anti- proteinase 3 antibodies (c-ANCA) specifically prime human neutrophils for fMLP- induced leucotriene synthesis and chemotaxis. *J Leukoc Biol.* 69: 89- 97 (2001).
133. Radford, D.J., N.T. Luu, P. Hewins, G.B. Nash, C.O.S. Savage. Antineutrophil antibodies stabilize and promote migration of flowing neutrophils on endothelial cells. *Arthritis Rheum.* 44: 2851- 2861 (2001).
134. Savage, C.O.S., B.E. Pottinger, G. Gaskin, C.D. Pusey, J.D. Pearson. Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity towards cultured endothelial cells. *Am J Pathol.* 141: 335- 342 (1992).
135. Ewert, B.H., J.C. Jennette, R.J. Falk. Anti-myeloperoxidase antibodies stimulate neutrophils to damage human endothelial cells. *Kidney Int.* 41: 1366-1375 (1992).
136. Wyman, T.H., A.J. Bjornsen, D.J. Elzi, C.W. Smith, K.M. England, M. Kelher, C.C. Silliman. A two-insult in vitro model of PMN-mediated pulmonary endothelial damage: requirements for adherence and chemokine release. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283: C1592- C1603 (2002).
137. Esnault, V.L.M. Apoptosis: the central actor in the three hits that trigger anti- neutrophil cytoplasmic antibody- related systemic vasculitis. *Nephrol Dial Transplant.* 17: 1725- 1728 (2002).
138. Sibelius, U., K. Hattar, A. Schenkel, T. Noll, E. Csernok, W.L. Gross, W.J. Mayet, H.M. Piper, W. Seeger, F. Grimminger. Wegener's Granulomatosis:

- anti-proteinase 3 antibodies are potent inducers of human endothelial cell signalling and leakage response. *J Exp Med.* 187: 1- 7 (1998).
139. Ralston, D.R., C.B. Marsh, M.P. Lowe, M. Wewers. Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. *J Clin Invest.* 100: 1416- 1426 (1997).
140. Riede, U.N. Entzündungspathologie. In: U.N. Riede, M. Werner, H.E. Schaefer, ed. *Allgemeine und spezielle Pathologie 5.Auflage*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2004, pp. 207- 220.
141. Lydeyard, P., C. Grossi. Zellen der Immunantwort. In: Roitt, I.M., J. Brostoff, D.K. Male, ed. *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Georg Thieme Verlag New York- Stuttgart, 1991, pp. 11-30.
142. Janeway, C.A., K. Murphy, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik *Immunologie 5.Auflage*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 2002.
143. da Silva, F.M., A.M. Massart-Leen, C. Burvenich. Development and maturation of neutrophils. *Vet Quarterly.* 16: 220- 225 (1994).
144. Kraft, W., U.M. Dürr, M. Fürll, H. Bostedt, K. Heinritzi. Hämatologie. In: Kraft, W., U.M. Dürr, ed. *Klinische in Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Stuttgart, New York, Verlag Schattauer, 1997, pp. 43- 77.
145. Kraft, W., U.M. Dürr. *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Stuttgart, New York, Verlag Schattauer, 1999.
146. Male, D.K., I.M. Roitt. Erworbene (adaptive) und angeborene Immunität. In: Roitt, I.M., J. Brostoff, D.K. Male, ed. *Kurzes Lehrbuch der Immunologie Teilband 1*. Stuttgart- New York, Georg Thieme Verlag, 1991, pp. 1-10.
147. Smith, J.A. Neutrophils, host defense, and inflammation : a double- edged sword. *J Leukoc Biol.* 56: 672- 686 (1994).
148. Brooks, C.J., W.J. King, D.J. Radford, D. Adu, M. McGrath, C.O. Savage. Il-1 beta production by human polymorphonuclear leucocytes stimulated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: relevance to systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol.* 106: 273- 279 (1996).
149. Mayet, W., A. Schwarting, A.P. Barreiros, J. Schlaak, M. Neurath. Anti-PR-3 antibodies induce endothelial IL-8 release. *Eur J Clin Invest.* 29: 973- 979 (1999).

150. Harper, L., J.M. Williams, C.O. Savage. The importance of resolution of inflammation in the pathogenesis of ANCA- associated vasculitis. *Bio Soc Trans.* 32: 502- 506 (2004).
151. Weiss, S.J. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 320: 365- 376 (1989).
152. Savage, C.O.S., A. Rees. Role of neutrophils in vasculitis. In: Williams, H.a., ed. *Immunopharmacology of neutrophils*. London, Academic Press, 1994, pp. 259- 272.
153. Brouwer, E., A.H.L. Mulder, P. Heeringa, H. van der Goor, J.W. Cohen Terveart, J.J. Weening, C.G.M. Kallenberg. Neutrophil activation in vitro and in vivo in Wegener's Granulomatosis. *Kidney Int.* 45: 1120- 1131 (1994).
154. Bainton, D.F. Neutrophilic leukocyte granules: from structure to function. *Adv Exp Med Biol.* 336: 17- 33 (1993).
155. Borregaard, N., K. Lollike, L. Kjeldsen, H. Sengelov, L. Nielsen, M.H. Bainton. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol.* 51: 187- 198 (1993).
156. Sibille, Y., J.S. Lwebuga- Musaka, L. Polomski, W.W. Merrill, D.H. Ingbar, J.B.L. Gee. An in vitro model for polymorphnuclear leukocyte- induced injury to an extracellular matrix. Relative contribution of oxidants and elastase to fibronectin release from amnionic membranes. *Am Rev Respir Dis.* 132: 529- 535 (1985).
157. Weiss, S.J., G.J. Peppin. Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil: characteristics, regulation and potential function in vivo. *Biochem Pharmacol.* 35: 3189- 3197 (1986).
158. Molloy, A.L., C.C. Winerbourn. Release of iron from phagocytosed *Escherichia coli* and uptake by neutrophil lactoferrin. *Blood.* 75: 984- 989 (1990).
159. Doherty, N.S., M.J. Janusz. Neutrophil proteases: their physiological and pathophysiological role. In: Williams, H.a., ed. *Immunopharmacology of neutrophils*. London, Academic Press, 1994, pp. 55- 94.
160. Baldrige, C.W., R.W. Gerhard. The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol.* 103: 235- 236 (1933).

161. Rotrosen, D., C.L. Yeung, J.P. Katkin. Production of recombinant cytochrome b558 allows reconstitution of the phagocyte NADPH oxidase solely from recombinant proteins. *J Biol Chem.* 286: 14256- 14260 (1993).
162. Wientjes, F.B., G. Panayotou, E. Reeves, A.W. Segal. Interactions between cytosolic components of the NADPH oxidase: p40phox interacts with both p67phox and p47phox. *Biochem J.* 317: 919- 924 (1996).
163. Rotrosen, D., C.L. Yeung, T.L. Leto, H.L. Malech, C.H. Kwong. Cytochrome b558: the flavin- binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science.* 256: 1459- 1462 (1992).
164. Park, J.W., B.M. Babior. Activation of the leucocyte NADPH oxidase subunit p47phox by protein kinase C. A phosphorylation- dependent change in the conformation of the C- terminal end of p47phox. *Biochemistry.* 36: 7474- 7480 (1997).
165. Heyworth, P.G., J.T. Curnutte, W.M. Nauseef, B.D. Volpp, D.W. Pearson, H. Rosen, R.A. Clark. Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47phox and p67phox requires interaction between p47phox and cytochrome b558. *J Clin Invest.* 87: 352- 356 (1991).
166. Hancock, J.T., R. Desikan, S.J. Neill. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans.* 29: 345- 350 (2001).
167. Kreck, M.L., D.J. Uhlinger, S.R. Tyagi, K.L. Inge, J.D. Lambeth. Participation of the small molecular weight GTP- binding protein Rac1 in cell-free activation and assembly of the respiratory burst oxidase. Inhibition by a carboxyl-terminal Rac peptide. *J Biol Chem.* 269: 4161- 4168 (1994).
168. Mizuno, T.K.K., S. Ando, T. Musha, K. Hiraoka, K. Takaiishi, M. Asada, H. Nunoi, I. Matsuda, Y. Takai. Regulation of the superoxide- generating NADPH oxidase by a small GTP- binding protein and its stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins. *J Biol Chem.* 267: 10215- 10218 (1992).
169. Kim, C., M.C. Dinauer. Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidation in response to specific signaling pathways. *J Immunol.* 166: 1223- 1232 (2001).
170. Park, J.B. Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages. *Exp Mol Med.* 35: 325- 335 (2003).

171. Babior, B.M. The respiratory burst oxidase. *Adv Enzym.* 65: 49- 95 (1992).
172. Mc Phail, L.S., S.L. Strum, P.A. Leone, S. Sozanni. The neutrophil respiratory burst mechanism. In: Coffey, ed. *Granulocyte responses to cytokines*. New York, Marcel Dekker Inc., 1992, pp. 47- 76.
173. Thelen, M., B. Dewald, M. Baggiolini. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol Rev.* 73: 797- 811 (1993).
174. Ridley, A.J. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* 11: 471- 477 (2001).
175. Goodman, E.B., D.C. Anderson, A.J. Tenner. C1q triggers neutrophil superoxide production by an unique CD-18-dependent mechanism. *J Leukoc Biol.* 58: 168- 176 (1995).
176. Ruiz, S., A.H. Henschen-Edman, A.J. Tenner. Localisation of the site on the complement component C1q required for the stimulation of neutrophil superoxide production. *J Biol Chem.* 270: 30627- 30634 (1995).
177. Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik. *Immunologie 5.Auflage*, 2002.
178. Pabst, J.M. *Immunopharmacology of neutrophils*. London, Academic Press, 1994.
179. Kuijpers, T.W., A.T.J. Tool, C.E. van der Schoot, L.A. Ginsel, J.J.M. Onderwater, D. Roos, A.J. Verhoeven. Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal and use of surface markers for neutrophil activation. *Blood.* 78: 1105- 1111 (1991).
180. Niessen, H.W.M., A.J. Verhoeven. Differential upregulation of specific and azurophilic granule membrane markers in electropermeabilized neutrophils. *Cell Signal.* 4: 501- 508 (1993).
181. Cockwell, P., C.J. Brooks, D. Adu, C.O. Savage. Interleukin-8: A pathogenetic role in antineutrophil cytoplasmatic autoantibody- associated glomerulonephritis. *Kidney Int.* 55: 852- 863 (1999).
182. Ohta, N., S. Fukase, M. Aoyagi. Serum levels of soluble adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in patients with Wegener's granulomatosis. *Auris Nasus Larynx.* 28: 311- 314 (2001).
183. Torheim, E.A., A. Yndestad, V. Bjerkeli, B. Halvorsen, P. Aukrust, S.S. Froland. Increased expression of chemokines in patients with Wegener's

- granulomatosis- modulating effects of methylprednisolone in vitro. *Clin Exp Immunol.* 140: 376- 383 (2005).
184. Grimminger, F., U. Sibelius, W. Seeger. Amplification of LTB<sub>4</sub>-generation in AM-PMN-cocultures: transcellular 5-lipoxygenase-metabolism. *Am J Physiol.* 261: L195- L203 (1991).
185. Ford-Hutchinson, A.W. Leukotriene B<sub>4</sub> in inflammation. *Crit Rev Immunol.* 10: 1- 12 (1990).
186. Henderson, W.R. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med.* 121: 684- 697 (1994).
187. Zhou, H.L., M. Chabot-Fletcher, J.J. Foley, H.M. Sarau, M.N. Tzimas, J.D. Winkler, T.J. Torphy. Association between leukotriene B<sub>4</sub>-induced phospholipase D activation and degranulation of human neutrophils. *Biochem Pharmacol.* 46: 139- 148 (1993).
188. McDonald, P.P., S.R. McColl, P. Braquet, P. Borgeat. Autocrine enhancement of leukotriene synthesis by endogenous leukotriene B<sub>4</sub> and platelet-activating factor in human neutrophils. *Br J Pharmacol.* 11: 852- 860 (1993).
189. Hatzelmann, A., R. Fruchtmann, K.H. Mohrs, S. Raddatz, R. Müller-Peddinghaus. Ca<sup>2+</sup>-Ionophore A23187-stimulated secretion of azurophilic granules in human polymorphonuclear leucocytes is largely mediated by endogenously formed leukotriene B<sub>4</sub>. *Biochem Pharmacol.* 48: 31- 39 (1994).
190. Rola-Pleszcynski, M., L. Bouvrette, D. Gingras, M. Girard. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that mediates leukotriene B<sub>4</sub>-induced immunoregulation. *J Immunol.* 139: 513- 517 (1987).
191. Stankova, J., M. Rola-Pleszcynski. Leukotriene B<sub>4</sub> stimulates c-fos and c-jun gene transcription and AP-1 binding activity in human monocytes. *Biochem J.* 282: 625- 629 (1992).
192. Brigham, K.L., B. Meyrick. Interactions of granulocytes with the lungs. *Circ Res.* 54: 623- 635 (1984).
193. Grimminger, F., H.D. Walmrath, W. Seeger, H.G. Lasch. Granulozyten-Endothel- Interaktion. *Hämostaseologie.* 14: 7- 15 (1994).

194. Reutershahn, J., K. Ley. Bench to bedside review: Acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. *Crit Care Med.* 8: 453-461 (2004).
195. Chignard, M., V. Balloy. Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Physiol.* 279: L1083- L 1090 (2000)
196. Parsey, M.V., R. Tuder, E. Abraham. Neutrophils are major contributors to intraparenchymal lung IL-1 beta expression after hemorrhage and endotoxemia. *J Immunol.* 160: 1007- 1013 (1998).
197. Mukae, H., N. Matsumoto, J. Ashitani, H. Mashimoto, J.Kadota, M. Nakazato, S. Kohno, S. Matsukura. Neutrophil-related cytokines and neutrophil products in bronchoalveolar lavage fluid of a patient. *Eur Respir J.* 9: 1950-1954 (1996).
198. Burns, A. Pulmonary vasculitis. *Thorax.* 53: 220- 227 (1998).
199. Hoffman, G.S., J.M.G. Sechler, J.I. Gallin, J.H. Shelhamer, A. Suffredini, F.P. Ognibene, R.J. Baltaro, T.A. Fleisher, R.Y. Leavitt, W.D. Travis, M.F. Barile, M. Tsokos, R.P. Holman, S.E. Straus, A.S. Fauci. Bronchoalveolar lavage analysis in Wegener's Granulomatosis. *Am Rev Respir Dis.* 143: 401-407 (1991).
200. Kinoshita, M., S. Ono, H. Mochizuki. Neutrophils mediate acute lung injury in rabbits: role of neutrophil elastase. *Eur Surg Res.* 32: 337-346 (2000).
201. Zeiher, B.G., S. Matsuoka, K. Kawabata, J.E. Repine. Neutrophil elastase and acute lung injury: prospects for silvestat and other neutrophil elastase inhibitors as therapeutics. *Crit Care Med.* 30: 281-287 (2002).
202. Tamakuma, S., M. Ogawa, N. Aikawa, T. Kubota, H. Hirasawa, A. Ishizaka, N. Taenaka, C. Hamada, S. Matsuoka, T. Abiru. Relationship between neutrophil elastase and acute lung injury in humans. *Pulm Pharmacol Ther.* 17: 271-279 (2004).
203. Chabot, F., J.A. Mitchell, J.M.C. Gutteridge, T.W. Evans. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J.* 11: 745-757 (1998).
204. Boyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol.* S5: 9-15 (1976).

205. Seeger, W., D. Walmrath, M. Menger, H. Neuhofer. Increased lung vascular permeability after arachidonic acid and hydrostatic challenge. *J Appl Physiol.* 61: 1781 (1986).
206. Ermert, L., M. Ermert, A. Althoff, M. Merkle, F. Grimminger, W. Seeger. Vasoregulatory prostanoid generation proceeds via cyclooxygenase-2 in noninflamed rat lungs. *J Pharmacol Exp Ther.* 286: 1309- 1314 (1998).
207. Haynes, J., A.E. Taylor, D. Dixon, N. Voelkel. Microvascular hemodynamics in the sickle red blood cell perfused isolated rat lung. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 264: H484- H489 (1993).
208. Mc Murtry, I.F., A.B. Davidson, J.T. Reeves, R.T. Grover. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonist in isolated rat lung. *Circ Res.* 38: 99- 104 (1976).
209. Seeger, W., U. Schneider , B. Kreuzler, E. von Witzleben, D. Walmrath, F. Grimminger, J. Neppert. Reproduction of transfusion-related acute lung injury in an ex vivo lung model. *Blood.* 76: 1438-1444 (1990).
210. Gaar, K.A., A.E. Taylor, L.J. Owens, A.C. Guyton. Pulmonary capillary pressure and filtration coefficient in the isolated perfused lung. *Am J Physiol.* 213: 910-914 (1967).
211. Wangenstein, D., E. Lysaker, P. Savaryn. Pulmonary capillary filtration and reflection coefficients in the adult rabbit. *Microvasc Res* 14: 81-97 (1977).
212. Sachs, U.J.H., K. Hattar, N. Weissmann, R.M. Bohle, T. Weiss, U. Sibelius, J. Bux. Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood.* 107 (2006).
213. Xiao, H., P. Heeringa, P. Hu, Z. Liu, M. Zhao, Y. Aratani, N. Maeda, R.J. Falk, J.C. Jennette. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest.* 110: 955- 963 (2002).
214. Garwicz, D., A. Lindmark, T. Hellmark, M. Gladh, J. Jögi, U. Gullberg. Characterization of the processing and granular targeting of human proteinase 3 after transfection of the rat RBL or the murine 32D leukemic cell lines. *J Leukocyte Biol.* 61: 113- 123 (1997).
215. Van der Geld, Y.M., T. Hellmark, D. Selga, P. Heeringa, M.G. Huitema, P.C. Limburg, C.G. Kallenberg. Rats and mice immunized with chimeric

- human/mouse proteinase 3 produce autoantibodies to mouse PR3 and rat granulocytes. *Ann Rheum Dis* 66: 1679- 1682 (2007).
216. Grandel, U., M. Reutemann, L. Kiss, M. Buerke, L. Fink, E. Bournelis, M. Heep, F. Grimminger, U. Sibelius. Staphylococcal alpha-toxin provokes neutrophil-dependent cardiac dysfunction: role of ICAM-1 and cystoleukotrienes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 282(3): H1157- 65 (2002).
217. Minamiya, Y., H. Saito, N. Takahashi, H. Kawai, M. Ito, Y. Hosono, S. Motoyama, J. Ogawa. Polymorphnuclear leukocytes are activated during atelectasis before lung reexpansion in rats. *Shock* 30: 81- 86 (2008).
218. Mayet, W.J., A. Schwarting, T. Orth, R. Duchmann, K.H. Meyer zum Büschenfelde. Antibodies to proteinase 3 mediate expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *Clin Exp Immunol*. 103: 259- 267 (1996).
219. Hewins, P., J.M. Williams, M.J. Wakelam, C.O. Savage. Activation of Syk in neutrophils by antineutrophil cytoplasm antibodies occur via Fc gamma receptors and CD 18. *J Am Soc Nephrol*. 15: 796- 808 (2004).
220. Kettritz, R., M. Choi, W. Butt, M. Rane, S. Rolle, F.C. Luft, J.B. Klein. Phosphatidylinositol 3-kinase controls antineutrophil cytoplasmic antibodies-induced respiratory burst in human neutrophils. *J Am Soc Nephrol*. 13: 1740- 1749 (2002).
221. Deguchi, Y., N. Shibata, S. Kishimoto. Enhanced expression of the tumor necrosis factor/cachetin gene in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol*. 81: 311- 314 (1990).
222. Arimura, Y., S. Minoshima, Y. Kamiya, U. Tanaka, K. Nakabayashi, K. Kitamoto, T. Nagasawa, T. Sasaki, K. Suzuki. Serum myeloperoxidase and serum caytokines in anti-myeloperoxidase antibody-associated glomerulonephritis. *Clin Nephrol*. 40: 256- 264 (1993).
223. Schreiber, A., A. Busjahn, F.C. Luft, R. Kettritz. Membrane expression of proteinase 3 is genetically determined. *J Am Soc Nephrol*. 14: 68- 75 (2003).
224. Rarok, A.A., C.A. Stegeman, P.C. Limburg, C.G.M. Kallenberg. Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis. *J Am Soc Nephrol*. 13: 2232- 2238 (2002).
225. Halbwachs-Mecarelli, L., G. Bessou, P. Lesavre, S. Lopez, V. Witko-Sarsat. Bimodal distribution of proteinase 3 (PR3) surface expression reflects a

- constitutive heterogeneity in the polymorphonuclear neutrophil pool. *FEBS Letters*. 374: 29- 33 (1995).
226. Witko- Sarsat, V., P. Lesavre, S. Lopez, G. Bessou, C. Hieblot, B. Prum, L.H. Noel, L. Guillevin, P. Ravaud, I. Sermet-Gaudelius, J. Timsit, J.-P. Grünfeld, L. Halbwachs-Mecarelli. A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis. *J Am Soc Nephrol*. 10: 1224- 1233 (1999).
227. Van Rossum, A.P., A.A. Rarok, M.G. Huitema, G. Fassina, P.C. Limburg, C.G.M. Kallenberg. Constitutive membrane expression of proteinase 3 (PR3) and neutrophil activation by anti-PR3 antibodies. *J Leukoc Biol*. 76: 1162- 1170 (2004).
228. Schreiber, A., F.C. Luft, R. Kettritz. Membrane proteinase 3 expression and ANCA-induced neutrophil activation. *Kidney Int*. 65: 2172- 2183 (2004).
229. Harper, L., H.P. Cockwell, A. Dwoma, C. Savage. Neutrophil priming and apoptosis in anti- neutrophil cytoplasmic autoantibody- associated vasculitis. *Kidney Int*. 59: 1729- 1738 (2001).
230. Clancy, R.M., C.A. Dahinden, T.E. Hugli. Arachidonate metabolism by human polymorphonuclear leukocytes stimulated by N-formyl-Met-Leu-Phe or complement C5a is independent of phospholipase activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 80: 7200-7206 (1983).
231. Keogan, M.T., V.L.M. Esnault, A.J. Green, C.M. Lockwood, D.L. Brown. Activation of normal neutrophils by anti-neutrophil cytoplasm antibodies. *Clin Exp Immunol*. 90: 228-234 (1992).
232. Bhatia, M., S. Moochhala. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*. 202: 145- 156 (2003).
233. Liu, H., D. Zhang, B. Zhao, J. Zhao. Superoxide anion, the main species of ROS in the development of ARDS induced by oleic acid. *Free Radic Res*. 38: 1281-1287 (2004).
234. Piotrowski, W.J., J. Marczak. Cellular sources of oxidants in the lung. *Int J Occup Med Environ Health*. 13: 369-85 (2000).
235. Halliwell, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*. 31: 261-272 (1999).

236. Satoh, M., S. Fujimoto, Y. Haruna, S. Arakawa, H. Horike, N. Komai, T. Sasaki, K. Tsujioka, H. Makino and N. Kashihara. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxidase synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal.* 288: F1144- F1152 (2005).
237. Ware, L.B., Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Sem Resp Crit Care.* 27: 337- 349 (2006).
238. Lu, X., A. Garfield, G.E. Rainger, C.O. Savage, G.B. Nash. Mediation of endothelial cell damage by serine proteases, but not superoxide, released from antineutrophil cytoplasmic antibody-stimulated neutrophils. *Arthritis Rheum.* 54: 1619- 1628 (2006).
239. Leavell, K.J., M.W. Peterson, T.J. Gross. The role of fibrin degradation products in neutrophil recruitment to the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 14: 53-60 (1996).
240. Kawabata, K., T. Hagio, S. Matsumoto, S. Nakao, S. Orita, Y. Aze, H. Ohno. Delayed neutrophil elastase inhibition prevents subsequent progression of acute lung injury induced by endotoxin inhalation in hamsters. *Am J Respir Crit Care Med.* 161: 12013-2018 (2000).
241. Snider, G.L., E.C. Lucey, T.G. Christensen, P.J. Stone, J.D. Calore, A. Catanese, C. Franzblau. Emphysema and bronchial secretory cell metaplasia induced in hamsters by human neutrophil products. *Am Rev Respir Dis.* 129: 155-160 (1984).
242. Amitani, R., R. Wilson, A. Rutman, R. Read, C. Ward, D. Burnett, R.A. Stockley, P.J. Cole. Effect of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 4: 26- 32 (1991).
243. Suter, P.M., S. Suter, E. Girardin, P. Roux-Lombard, G.E. Grau, J.M. Dayer. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon and elastase in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock or sepsis. *Am Rev Respir Dis.* 145: 1016-1022 (1992).
244. Speer, C.P., M.J. Pabst, H.B. Hedegaard, R.F. Rest, R.B. Jr. Johnston. Enhanced release of oxygen metabolites by monocyte-derived macrophages

- exposed to proteolytic enzymes: activity of neutrophil elastase and cathepsin G. *J Immunol.* 133: 2151- 2156 ( 1984).
245. Aoshiba, K., K. Yasuda, S. Yasui, J. Tamaoki, A. Nagai. Serine proteases increase oxidative stress in lung cells. *Am J Physiol.* 281: L556- L564 (2000).
246. Kettritz, R. Untersuchungen zu zellulären Mechanismen bei ANCA-assoziierten nekrotisierenden Vaskulitiden. Grundlagen der Aktivierung und der Apoptose neutrophiler Granulozyten. *Habilitationsschrift der Medizinischen Fakultät der Humboldt- Universität Berlin* (2000).

## **VI.1. Eigene Publikationen zum Promotionsthema**

### **Originalarbeiten**

1. Hattar, K., S. Oppermann, C. Ankele, N. Weissmann, R. Schermuly, R.M. Bohle, R. Moritz, B. Krögel, W. Seeger, F. Grimminger, U. Sibeliu. cANCA induce neutrophil- mediated lung injury – a model of acute Wegener’s Granulomatosis. *Eur Respir J.* 36: 187- 195 (2010).

### **Abstracts und veröffentlichte Vorträge**

1. Hattar, K., S. Oppermann, U. Grandel, N. Weissmann, W. Seeger, F. Grimminger, U. Sibeliu. cANCA induzieren eine pulmonale Schrankenstörung durch Aktivierung granulozytären NADPH- Oxidase – ein Modell des akuten pulmonalen M. Wegener. *Vortrag und Posterabstract ,111. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), 2.- 6.04. 2005, Wiesbaden Auszeichnung des Posterabstract P701 mit dem Posterpreis für „Pneumologie“*
2. Hattar, K., S. Oppermann, U. Grandel, C. Ankele, N. Weissmann, R. Schermuly, R.M. Bohle, W. Seeger, F. Grimminger, U. Sibeliu. Anti-PR3-Antibodies induce neutrophil- mediated lung injury – an experimental model of acute Wegener’s Granulomatosis. *Kidney Blood Press Res.* 28: 161 (2005).

## VII. Anhang

### VII.1. Liste verwendeter Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
AAPVCK	Ala(2)-Pro Val Chloromethyl Keton = spezifischer Elastaseinhibitor
AAV	ANCA-assoziierte Vaskulitis
ACR	American College of Rheumatologists
AGP7	Azurophile Granuloproteine 7
ANCA, cANCA	Anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper
ALI	Akutes Lungenversagen
Anti-PR3	monoklonaler Antikörper gegen Proteinase 3
ARDS	Akutes Atemnotsyndrom
AZU	Azurodicin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BVAS	Birmingham vasculitis activity score
CatG	Cathepsin G
CHC	Chapel hill international consensus conference
CRP	C-reaktives Protein
CSS	Churg-Strauss-Syndrom
CYC	Cyclophosphamid
DAH	Diffuse alveoläre Hämorrhagie
DIE	Disease extension index
DPI	Diphenyleiodonium
EC	Endothelzellen
EUVAS	European vasculitis study group
FACS	fluorescence-associated cellsorter
FLAP	5- Lipoxygenase-aktivierendes Protein
GC	Glukokortikoide
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender

	Faktor
GN	Glomerulonephritis
HE-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
HNE/ NE	Humane neutrophile Elastase
IL	Interleukin
KfC	kapillärer Filtrations-Koeffizient
LT	Leukotrien
LVP	Linksventrikulärer Druck
MK-886	Spezifischer Inhibitor von FLAP
MOPC-21	Mouse IgG1, kappa monoclonal
MPA	Mikroskopische Polyangiitis
MPO	Myeloperoxidase
mPR3	membrangebundene Proteinase 3
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAP	Pulmonal-arterieller Druck
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PSV	Primäre systemische Vaskulitis
PR3	Proteinase 3
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPGN	Rasch-progrediente Glomerulonephritis
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SOD	Superoxid-Dismutase
SRMA	Steril-eitrige Meningitis-Arteriitis
SSV	Sekundäre Systemische Vaskulitis
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
VP	Ventilationsdruck
WG	Wegener'sche Granulomatose

## VII.2. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die die Durchführung meiner Doktorarbeit überhaupt ermöglicht haben.

Vielen Dank an Herrn Prof. Ulf Sibelius für das interessante Promotionsthema und die komplikationslose Integration in seine Arbeitsgruppe. Ich wurde sehr freundlich aufgenommen, und der Einstieg in die Arbeit wurde mir dadurch sehr leicht gemacht hat. Vielen Dank für jegliche Anregung, die mich stets ein Stück vorangebracht haben.

Ein großes Dankeschön an Frau Dr. Katja Hattar, die mir immer eine zuverlässige Ansprechpartnerin war. Vielen Dank für all die Stunden am PC und am Telefon, die für die Fertigstellung meiner Arbeit von Nöten waren.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Rüdiger Gerstberger für die Übernahme meiner Betreuung auf tiermedizinischer Seite. Ich weiß, dass die Betreuung externer Arbeiten kein Zuckerschlecken ist: umso mehr weiß ich das Engagement und die Geduld zu schätzen, die mich dazu motiviert haben, diese Arbeit fertigzustellen. DANKE!!!

Danke an Frau Tina Heep, die mich sehr geduldig in die praktische Arbeit am Lungenmodell eingearbeitet hat und stets für Fragen zur Verfügung stand. Hier sei auch Frau Karin Quanz dankend erwähnt, da sie mir oft mit Rat und Tat zur Seite stand.

Desweiteren bedanke ich mich herzlich bei Frau Bettina Schmidt, ohne deren Mitarbeit ich meine Untersuchungen nicht hätte durchführen können. Danke an alle Blutspender, die wir zu früher Morgenstunde anzapfen durften.

Danke an Herrn Prof. Rainer-Maria Bohle und sein Team für die gute und kollegiale Zusammenarbeit und auch an Herrn Prof. Norbert Weissmann und Herrn Prof. Ralph Schermuly, die mich besonders auf technischer Seite unterstützten.

Herzlichen Dank an meine Eltern, die mir als großes Beispiel vorangegangen sind und mich auch über das Finanzielle hinaus immer unterstützt haben.

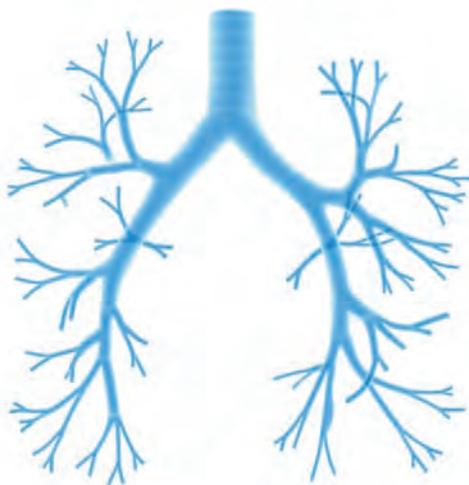
Last but not least: danke Lumpi-Schatz! Du mußtest meine Launen oft genug ertragen, und hast trotzdem immer an mich geglaubt. Du bist der Beste- ich liebe Dich!

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**

#### **VII.4. Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündliche Auskünfte 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.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENGRING 15  
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5775-6



9 783835 195775 6

Foto hinten: © Sebastian Kaulitzki - Fotolia.com

Foto vorne: © Serg Myshkovsky - Fotolia.com