

# Die Rolle der HLA Klasse II-Antikörper im Pathomechanismus der transfusionsassoziierten akuten Lungeninsuffizienz

---

**Wiebke Wasel**



**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 2013

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 2013

© 2013 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)

Klinikum Veterinärmedizin  
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik  
Prof. Dr. Andreas Moritz

Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Prof. Dr. Ulrich Sachs

**Die Rolle der HLA Klasse II-Antikörper im  
Pathomechanismus der transfusionsassoziierten  
akuten Lungeninsuffizienz**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

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

eingereicht von

**Wiebke Wasel**

Tierärztin aus Ratingen

Gießen 2012

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

---

Dekan: Prof. Dr. M Kramer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Moritz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Sachs

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2012

*Meinen geliebten Eltern und Geschwistern*

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>1</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>5</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>8</b>
<b>1 EINFÜHRUNG.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>10</b>
<b>2 EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Epidemiologie und Bedeutung der TRALI.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Befunde .....</b>	<b>11</b>
2.2.1 <i>Klinische Befunde .....</i>	<i>11</i>
2.2.2 <i>Radiologische Befunde .....</i>	<i>13</i>
2.2.3 <i>Histologische Befunde .....</i>	<i>14</i>
<b>2.3 Mechanismen der Lungenschädigung bei TRALI.....</b>	<b>15</b>
2.3.1 <i>Priming und Aktivierung der Neutrophilen.....</i>	<i>15</i>
2.3.2 <i>Pathophysiologie der Granulozytenpassage durch das Lungenkapillarbett.....</i>	<i>16</i>
2.3.3 <i>Aktivierung der pulmonalen Endothelzellen .....</i>	<i>18</i>
2.3.4 <i>Zusammenspiel von Endothelzellen und Neutrophilen .....</i>	<i>18</i>
<b>2.4 TRALI-Mechanismen .....</b>	<b>19</b>
2.4.1 <i>TRALI durch leukozytäre Antikörper (immunogene TRALI).....</i>	<i>20</i>
2.4.2 <i>HNA-Antikörper vermittelte TRALI .....</i>	<i>20</i>
2.4.3 <i>HLA Klasse I-Antikörper vermittelte TRALI .....</i>	<i>21</i>
2.4.4 <i>Rolle der HLA Klasse II-Antikörper in TRALI .....</i>	<i>23</i>
2.4.5 <i>TRALI durch andere Auslöser (nicht immunogene TRALI).....</i>	<i>24</i>

2.4.5.1	<i>Bioaktive Lipide</i> .....	24
2.4.5.2	<i>CD40-Ligand</i> .....	25
2.4.5.3	<i>Immunkomplexe</i> .....	26
<b>2.5</b>	<b>Hinweise auf eine antikörperbezogene Ätiologie</b> .....	<b>26</b>
<b>2.6</b>	<b>Schwellenmodell</b> .....	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>31</b>
3.1.1	<i>Antikörper</i> .....	31
3.1.2	<i>Zellkulturmedium</i> .....	31
3.1.3	<i>Lösungen und Puffer</i> .....	32
3.1.4	<i>Chemikalien und Reagenzien</i> .....	33
3.1.5	<i>Vorgefertigte Systeme (Kits)</i> .....	36
3.1.6	<i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	36
3.1.7	<i>Geräte und Instrumente</i> .....	39
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>43</b>
<b>A</b>	<b>IN VITRO-VERFAHREN</b> .....	<b>43</b>
3.2.1	<i>Probensammlung und Probenaufbereitung</i> .....	43
3.2.1.1	<i>Isolierung von Granulozyten aus EDTA-Blut</i> .....	43
3.2.1.2	<i>Isolierung von Monozyten aus EDTA-Blut</i> .....	44
3.2.1.3	<i>Herstellung von Monozytenüberständen</i> .....	45
3.2.1.4	<i>Kultivierung von Nabelschnurzellen</i> .....	46
<b>3.3</b>	<b>Funktionelle Untersuchungen</b> .....	<b>47</b>
3.3.1	<i>ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)</i> .....	47
3.3.1.1	<i>Beschreibung und Versuchsablauf der GRO alpha,- Interleukin 8,-TNFalpha,-und Leukotrien B4-Analytik mittels ELISA:</i> .....	47
<b>3.4</b>	<b>Durchflusszytometrische Untersuchungen</b> .....	<b>48</b>

3.4.1	<i>Bursttest</i> .....	48
<b>3.5</b>	<b>Zellspezifische Untersuchungen</b> .....	<b>49</b>
3.5.1	<i>Permeabilitätstest</i> .....	49
<b>B</b>	<b>TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN</b> .....	<b>51</b>
3.6	<b>Ex vivo-Rattenlungenmodell</b> .....	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>59</b>
4.1	<b>Aufklärung der Zytokin- und LTB4-Produktion von Monozyten</b> .....	<b>59</b>
4.1.1	<i>Funktionelle Untersuchungen</i> .....	59
4.1.1.1	<i>GRO alpha Produktion der Monozyten nach Antikörpersimulation</i> .....	60
4.1.1.2	<i>Interleukin 8 Produktion der Monozyten nach Antikörperstimulation</i> .....	61
4.1.1.3	<i>TNF alpha Produktion der Monozyten nach Antikörpersimulation</i> .....	61
4.1.1.4	<i>Leukotrine B4 Produktion der Monozyten nach Antikörperstimulation</i> .....	62
4.2	<b>Untersuchung der Sauerstoffradikalbildung von neutrophilen Granulozyten durch Monozytenüberstand</b> .....	<b>62</b>
4.2.1	<i>Durchflusszytometrische Untersuchungen</i> .....	62
4.2.1.1	<i>Bursttest</i> .....	62
4.3	<b>Untersuchungen des Einflusses von Monozytenüberständen und neutrophilen Granulozyten auf Endothelzellen</b> .....	<b>64</b>
4.3.1	<i>Zellspezifische Untersuchungen</i> .....	64
4.3.2	<i>Permeabilitätstest</i> .....	64
4.4	<b>Aufklärung des Einflusses von Neutrophilen, Monozyten, Lungenendothelzellen und HLA Klasse II-Antikörper bei der Entstehung einer TRALI und deren Zusammenspiel in diesem Pathomechanismus</b> .....	<b>66</b>

4.4.1	<i>Tierexperimentelle Untersuchungen</i> .....	66
4.4.1.1	<i>Ex vivo-Rattenlungenmodell mit positivem und negativem Monozytenüberstand mit und ohne LPS-Vorstimulation</i> ..	66
4.4.1.2	<i>Ex vivo-Rattenlungenmodell mit Granulozyten, Monozyten und HLA Klasse II-Antikörper mit LPS-Vorstimulation</i> ..	68
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>93</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>95</b>
<b>10.1</b>	<b>Histologische Untersuchung</b> .....	<b>95</b>
10.1.1	<i>Ergebnisse der histologischen Untersuchung</i> .....	95
<b>10.2</b>	<b>Zytokinproduktion nach der Zugabe von adsorbiertem Plasma im ELISA-Testverfahren</b> .....	<b>97</b>
10.2.1	<i>Ergebnisse des ELISA-Testverfahrens</i> .....	97
<b>10.3</b>	<b>Liste der Vorabveröffentlichungen aus dieser Dissertationsschrift</b> .....	<b>98</b>
	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG</b> .....	<b>99</b>

## **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

**Abb.1:** Thoraxaufnahme eines TRALI-Patienten

([www.scielo.br/img/revistas/rba/v59n1/en\\_09f1.jpg](http://www.scielo.br/img/revistas/rba/v59n1/en_09f1.jpg))

**Abb.2:** Granulozytenwanderung durch die Lungenkapillaren (Bux J und Sachs UJ, British Journal of Haematology 2007)

**Abb.3:** Die Pathomechanismen der TRALI (Bux J und Sachs UJ, British Journal of Haematology 2007)

**Abb.4:** Das TRALI-Schwellenmodell (Bux J und Sachs UJ, British Journal of Haematology 2007)

**Abb.5:** Das Ex vivo-Rattenlungenmodell

**Abb.6:** Zytokinkonzentrationen von GROalpha, Interleukin 8, TNFalpha und LTB4

**Abb.7:** Oxidative Burstreaktionen der neutrophilen Granulozyten

**Abb.8:** FITC-Albuminmessung im Apoptosetestverfahren

**Abb.9:** Relative Gewichtszunahme durch Zugabe von Monozytenüberstand

**Abb.10:** Relative Gewichtszunahme durch Zugabe von Monozyten, Granulozyten und HLA Klasse II-Antikörper

**Abb.11:** Leukozyten im Kapillarbett der perfundierten Lungen im Rattenlungenmodell

## **TABELLENVERZEICHNIS**

**Tabelle 1:** Zytokinkonzentrationen nach Adsorption

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Ak	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DPI	Diphenyleneiodoniumchlorid
EDTA	Ethylen-diamine-tetraacetic-acid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell scan- ner
FCS	Fetal Calf Serum
FFP	Fresh Frozen Plasma
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl- Phenylalanin
GRO-alpha	Growth Related Oncogen-alpha
HNA	Human Neutrophil Antigen
HLA	Human Leukocyte Antigen
HUVEC	Humane Umbilicalvenen-Endo- thelzellen
IgG	Immunglobulin G
IL-8	Interleukin-8
Kfc	Kapillärer Filtrationskoeffizient
KRPD	Kreb`s Ringer Phosphate-Dex- trose

---

LPS	Lipopolysaccharid
LTB4	Leukotrien B4
LVP	Left ventricular pressure (Linksventrikulärer Druck)
MACS	magnetic activated-cell-sorter
mIgG	Maus-Immunglobuline G
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	reduziertes Nikotinsäureamid- Adenin-Dinukleotid
NOX	Normoxisches Gasgemisch
PA	Pulmonalarterie
PAP	Pulmonal Arterial Pressure (Pul- monalarterieller Druck)
PBS	phosphate buffered saline
PEEP	Positive Endexpiratory Pressure (Pos. endexpiratorischer Druck)
TNF-alpha	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TRALI	Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz
ROS	reactive oxygen species

# 1 EINFÜHRUNG

## 1.1 Zielsetzung der Arbeit

Den Daten des internationalen Hämovigilanz-Registers zufolge, ist die transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI) heute die führende Ursache für Nebenwirkungen mit Todesfolge bei Bluttransfusionen. Inzwischen weiß man, dass die meisten TRALI-Fälle durch antikörperhaltige, plasmareiche Blutkomponenten, welche von mehrfach schwangeren Blutspenderinnen stammen, ausgelöst werden (Chapman et al., 2006).

Epidemiologisch spielen Antikörper gegen HLA-Klasse I und –Klasse II-Merkmale eine zentrale Rolle bei der Entstehung einer TRALI. In der Mehrzahl der untersuchten TRALI-Fälle wurden lediglich HLA Klasse II-Antikörper nachgewiesen, deren Rolle bzw. deren Wirkungsweg im Pathomechanismus der TRALI jedoch noch weitestgehend ungeklärt ist.

Wir vermuten, dass HLA Klasse II-Antikörper indirekt über Monozyten und deren Aktivierung wiederum zu einer Aktivierung von neutrophilen Granulozyten führen können und möchten dies anhand von in vitro und ex vivo Methoden untersuchen. Zusätzlich soll überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Art, Konzentration und Epitopspezifität des Antikörpers und der TRALI-Reaktion besteht.

## **2 EINLEITUNG**

### **2.1 Epidemiologie und Bedeutung der TRALI**

Bernard beschrieb erstmals 1951 ein nicht kardiogen bedingtes Lungenödem als Folge einer Bluttransfusion. Von Brittingham wurde dieser Transfusionszwischenfall dann 1957 mit Leukozyten-reaktiven Antikörpern in Plasmen in Verbindung gebracht und durch weiterführende Arbeiten 1985 von Popovsky und Moore als distinkte Entität definiert. Der Begriff TRALI (transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz) etablierte sich.

Die Daten des Britischen Hämovigilanzregisters, die seit 1996 regelmäßig publiziert werden, zeigen, dass die TRALI heute die häufigste Nebenwirkung mit Todesfolge ist, die mit Bluttransfusionen in Verbindung gebracht wird (Serious Hazard of Transfusion, SHOT). Dies trifft sowohl auf Großbritannien als auch auf die USA zu (Holness et al., 2004; Stainsby et al., 2007).

Hingegen sind die Todesfälle durch transfusionsassoziierte Infektionen oder die inkorrekte Transfusion infolge Verwechslung deutlich zurückgegangen. Da das Paul-Ehrlich-Institut Meldungen schwerwiegender Transfusionszwischenfälle nicht regelmäßig publiziert, ist nicht sicher, ob diese Zahlen auch auf Deutschland zutreffen. Unabhängig davon ist die TRALI eine schwerwiegende, lebensbedrohliche Komplikation, die immer mehr in den Vordergrund getreten ist.

Zahlreiche Arbeiten haben zu einem besseren Verständnis des Krankheitsbildes der TRALI geführt und dazu beigetragen, dass diese heute sowohl in der medizinischen Forschung als auch in der Klinik steigendes Interesse und Beachtung erlangt hat.

### **2.2 Befunde**

#### *2.2.1 Klinische Befunde*

Klinische Berichte beschreiben eine TRALI mit plötzlich auftretender Lungensymptomatik im direkten Zusammenhang mit der Bluttransfusion. Die Symptome treten für gewöhnlich zwei bis sechs Stunden nach der erfolgten

Transfusion auf. Nicht selten kommt es auch schon akut, während der noch laufenden Bluttransfusion, zum Auftreten einer TRALI (Popovsky et al., 1985; Wallis et al., 2003). Nur selten wird von einem Einsetzen der klinischen Veränderungen noch zwölf oder mehr Stunden nach Transfusion berichtet (Kernoff et al., 1972).

Zu den klinischen Symptomen gehören vor allem schwere Atemnot, Tachypnoe, sowie Hypoxämie und Blutdruckabfall. Auskultatorisch sind oft Rasselgeräusche und ein abgeschwächtes Atemgeräusch feststellbar.

In manchen Fällen wird von Zyanose, Tachykardie und Fieber berichtet, welche allerdings erst einige Stunden nach Bluttransfusion einsetzen. Bei intubierten Patienten zeigt sich oft ein Trachealexsudat mit dem Aussehen von geschlagenem Hühnereiweiß, ein typisches Anzeichen einer schweren TRALI.

Das European Haemovigilance Network (EHN) veröffentlichte im Jahr 2004 gemeinsam mit der Canadian Consensus Conference eine Liste der Diagnosekriterien für eine TRALI (Kleinmann et al., 2004).

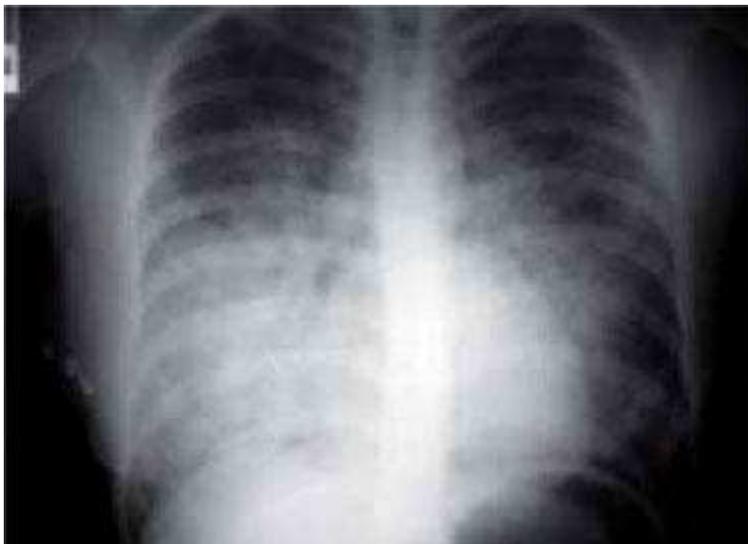
- Akute Atemnot
- Hypoxämie ( $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 < 300$  oder  $\text{O}_2$ -Sättigung  $< 90\%$  oder andere klinische Hinweise auf Hypoxie)
- Keine Hinweise auf zirkulatorische Überladung oder kardiogenes Lungenödem
- Beginn der Symptomatik innerhalb der ersten sechs Stunden nach Abschluss der Transfusion
- Akute Lungeninsuffizienz nicht vorbekannt und keine alternativen Risikofaktoren für eine akute Lungeninsuffizienz (v.a. Aspiration, Polytrauma, Pneumonie, kardiopulmonaler Bypass, Verbrennungen, toxischer Inhalationsschaden, Pankreatitis, Überdosierung von Medikamenten oder Drogenabusus, Ertrinkungsunfall, Schock, schwere Sepsis)

Wenn alle Diagnosekriterien erfüllt sind, gilt eine TRALI als „wahrscheinlich“. Falls Risikofaktoren vorhanden sind, die ebenfalls zu einer akuten Lungeninsuffizienz anderer Genese führen können, ist die Diagnose TRALI als „möglich“ einzustufen. Da es keinen wegweisenden Laborparameter gibt, ist die Diagnose TRALI, gerade bei Patienten mit vorbestehender akuter Lungeninsuffizienz, oft nur schwer zu stellen.

### 2.2.2 Radiologische Befunde

Der radiologische Befund ist besonders ausgeprägt. Er stellt sich deutlich durch seine bilateralen, diffusen Infiltrate beider Lungenhälften dar. Diese charakteristischen Lungenveränderungen können in manchen Fällen bis zu einem kompletten „white-out“ der Lunge reichen.

Abb.1 Thoraxaufnahme eines TRALI-Patienten



Quelle: [www.scielo.br/img/revistas/rba/v59n1/en\\_09f1.jpg](http://www.scielo.br/img/revistas/rba/v59n1/en_09f1.jpg)

### 2.2.3 *Histologische Befunde*

Die histopathologischen Befunde von Patienten mit schwerer, tödlicher TRALI geben einen ersten Anhaltspunkt für die Pathophysiologie dieser Krankheit. Generell ähneln die Befunde denen der Frühphase des „ Akuten Respiratorischen Distress Syndroms “ (ARDS), durch das ein interstitielles und intraalveoläres Ödem (Felbo und Jensen, 1962; Flury und Reutter, 1966; Kernoff et al., 1972; Wolf und Canale, 1976; Popovsky und Moore, 1985; Dry et al., 1999) und die Auswanderung neutrophiler Granulozyten in das Interstitium und den Alveolarraum gekennzeichnet ist (Kernoff et al., 1972; Wolf und Canale, 1976; Silliman et al., 1977; Dry et al, 1999).

Des Weiteren kann eine erhöhte Zahl an Neutrophilen in den Pulmonalkapillaren und den kleinen Pulmonalgefäßen (Felbo und Jensen, 1962; Dry et al., 1999) beobachtet werden (siehe S.95 im Anhang), unter Umständen mit hyaliner Membranentstehung und eine Zerstörung des Lungengerüsts (Wolf und Canale, 1979; Silliman et al., 1997). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen degranulierte neutrophile Granulozyten und einen engen fokalen Kontakt mit zerstörten Endothelzellen der Pulmonalkapillaren (Dry et al., 1999). Diese Befunde lassen die Vermutung zu, dass durch das Zusammenspiel von Endothelzellen und Granulozyten, welche zuvor durch die Transfusion aktiviert wurden, das Endothel nachhaltig geschädigt wird.

Der dadurch resultierende Austritt von proteinreichem Exsudat aus den Gefäßen in den Alveolarraum führt zu einem akuten Lungenödem.

In besonders schweren Fällen können neutrophile Granulozyten von den Kapillaren in die Alveolen auswandern, das Gewebe dort zusätzlich schädigen und die Lungeninsuffizienz verstärken.

## 2.3 Mechanismen der Lungenschädigung bei TRALI

### 2.3.1 *Priming und Aktivierung der Neutrophilen*

Die aktivierten neutrophilen Granulozyten werden als vorrangige Mediatoren für die Endothelial- und Alveolarschädigung gesehen, zu welcher es im Verlauf einer TRALI kommt. Die Neutrophilen werden hierbei durch das entzündliche Geschehen aktiviert.

Diese Aktivierung ist durch die Freisetzung von granulozytären Enzymen und Proteinen und die Synthese von hochreaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) gekennzeichnet.

Ein starker Stimulus ist vermutlich ausreichend, um einen neutrophilen Granulozyten zu aktivieren. Häufig sind es aber zwei oder mehr Stimuli, die zusammentreffen, bevor eine TRALI auftritt. Der erste Stimulus, das sogenannte „Priming“, versetzt den Granulozyten in einen voraktivierten Zustand. Es sorgt also für eine Potenzierung der Antwort auf einen folgenden „aktivierenden Stimulus“.

Die Mehrzahl der TRALI-Patienten leidet bereits an einer Vorerkrankung. Es existieren in-vivo-Untersuchungen, aufgrund derer anzunehmen ist, dass chirurgische Eingriffe und aktive Infektionen ein Priming der neutrophilen Granulozyten verursachen können (Krause et al., 1988; Kawahito et al., 2000; Bass et al., 1986).

Granulozyten reagieren auf das Priming mit einer Polarisierung, durch die es zu einer Versteifung ihrer Membran kommt (Haslett et al., 1985). Dies führt zu einer Retention und somit zu einem Verharren der Granulozyten im Lungenkapillarbett, da sie dieses nicht mehr passieren können. Diese Situation begünstigt die Auswanderung der neutrophilen Granulozyten in die Lunge (Worthen et al., 1987).

Durch dieses Phänomen kommt es zu einem engen Kontakt zwischen den Granulozyten und dem Endothel, wodurch transmembrane Rezeptoren und freigesetzte Mediatoren beider Zelltypen eng miteinander interagieren können. Endothelzellen und sequestrierte Neutrophile, die während ihrer Zirkulation einem Priming unterzogen wurden, können jetzt durch exogene Stimuli, z.B.

aus einer Blutkonserve, aktiviert werden. Solch aktivierende Substanzen sind z.B. Antikörper, Zytokine oder bioaktive Lipide (Berton et al., 1992; Crockett-Torabi et al., 1995).

Untersuchungen haben gezeigt, dass Antikörper gegen neutrophile Granulozyten (HNA-Antikörper) auch in der Lage sind, Neutrophile gleichzeitig zu primen und zu aktivieren, ohne einen zusätzlichen Stimulus (Sachs et al., 2006; Sachs et al., 2004; Kopko et al., 2004; Silliman et al., 2006).

Wenn der Antikörper als alleiniger Stimulus ausreicht, um Granulozyten zu aktivieren, würde dies erklären, warum in wenigen Fällen auch gesunde Personen eine TRALI entwickeln können (Doreen et al., 1998).

### *2.3.2 Pathophysiologie der Granulozytenpassage durch das Lungenkapillarbett*

Das alveoläre Kapillarbett ist ein komplexes Netzwerk aus kurzen Kapillarsegmenten.

Auf seinem Weg von der arteriellen zur venösen Seite muss ein Granulozyt acht oder mehr Alveolarwände und über 50 kapilläre Segmente überwinden. Annähernd die Hälfte dieser pulmonalen Kapillaren hat einen geringeren Durchmesser als der Granulozyt selbst. Daher ist dieser gezwungen aktiv seine Form zu ändern, bevor er die Kapillare passieren kann (Gabb et al., 1995).

Die Transitzeit eines Granulozyten ist daher abhängig von seiner Deformierungszeit. Diese fällt im Vergleich zu anderen Blutzellen, wie Erythrozyten, relativ lang aus (Erythrozyten: ca. 1,4-4,2 sec.; Granulozyten: ca. 26 sec.). Diese langsame Transitzeit ist die Ursache für die signifikante Akkumulation der Granulozyten in der Lunge (Doerschuk et al., 1999).

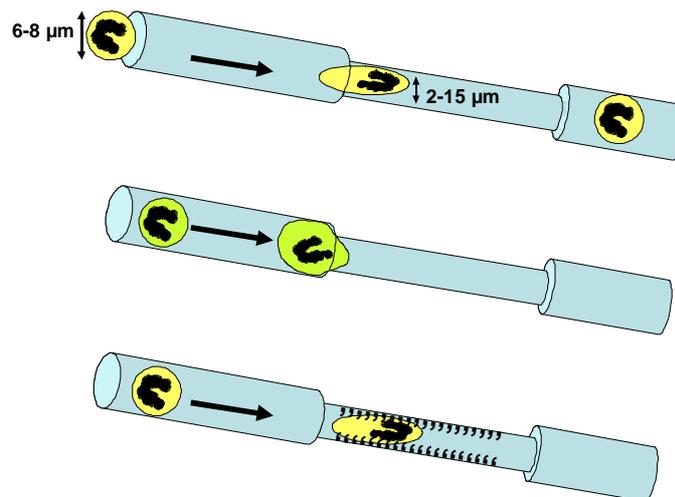
Die pulmonale Zirkulation beherbergt ca. 28 % des gesamten Blutgranulozytenpools (Peters et al., 1998). Bei einem entzündlichen Vorgang wandern die durch Entzündungsmediatoren aktivierten neutrophilen Granulozyten vorzugsweise in das Kapillarbett aus (Loosli und Baker, 1962; Downey et al., 1993; Lee und Downey, 2001).

Wie schon zuvor erwähnt, verliert der Granulozyt durch das sogenannte Priming die Fähigkeit, sich zu verformen. Dieser Verlust ist bedingt durch eine intrazelluläre Polymerisation von Aktinfilamenten, durch die es zu einer

Versteifung der Granulozytenmembran kommt. Dieser Zustand führt zu einem längeren Verweilen der Granulozyten in den Lungenkapillaren (Doerschuk et al., 1999; Burns et al., 2003; Reutershan und Ley, 2004).

Im Falle einer TRALI käme es hier zu einer weiteren Aktivierung der Granulozyten, da diese, bedingt durch den Verlust ihrer Verformbarkeit im Lungenkapillarbett verweilen und somit für aktivierende Substanzen angreifbarer werden. Diese Aktivierung kann er unter anderem durch transfundierte Antikörper oder andere transfundierte Stimuli erfahren. Daraufhin würde er durch Freisetzung bestimmter Substanzen das Endothel schädigen.

Abb. 2: Granulozytenwanderung durch die Lungenkapillaren



Quelle: Bux J und Sachs UJ, British Journal of Haematology 2007

**Passage der neutrophilen Granulozyten durch das Lungenkapillarbett.** Annähernd 50 % aller Lungenkapillaren um die Alveolen haben einen kleineren Durchmesser als ein sphärischer, neutrophiler Granulozyt. (A) Um die Lungenkapillaren passieren zu können, führen Neutrophile aktiv eine Formänderung durch (sog. „Würstchenform“) und sind dadurch gezwungen, zu pausieren. (B) Das Priming von neutrophilen Granulozyten zieht einen zunehmenden Verlust ihrer Fähigkeit, sich zu verformen nach sich. Dies führt zu einer Versteifung und damit zu einem Verharren der Zellen im Kapillarbett und somit zu einer verlängerten Transitzeit („Stiffening“). (C) Durch die Aktivierung des Endothels kommt es zu einer Hochregulierung der Oberflächenliganden, welche wiederum die Granulozytenwanderung beeinflussen.

### 2.3.3 *Aktivierung der pulmonalen Endothelzellen*

Auch das pulmonale Endothel kann durch entsprechende Mechanismen die Ausprägung einer TRALI beeinflussen.

Aktivierte Endothelzellen exprimieren zusätzliche Oberflächenrezeptoren. Diese Hochregulation der Rezeptoren begünstigt die Adhäsion und ein Priming der Granulozyten (Gerritsen und Bloor, 1993; Klein et al., 1995; Scholz et al., 1996; Williams und Solomkin, 1999).

Eine primäre Aktivierung der Endothelzellen ist vermutlich die Voraussetzung für die Entstehung einer TRALI durch transfundierte bioaktive Lipide (Silliman et al., 1998; Silliman et al., 2003).

### 2.3.4 *Zusammenspiel von Endothelzellen und Neutrophilen*

Die Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und pulmonalen Endothelzellen kann letztlich unabhängig davon, welche Zelle von beiden zuvor aktiviert wurde, zum Lungenschaden führen.

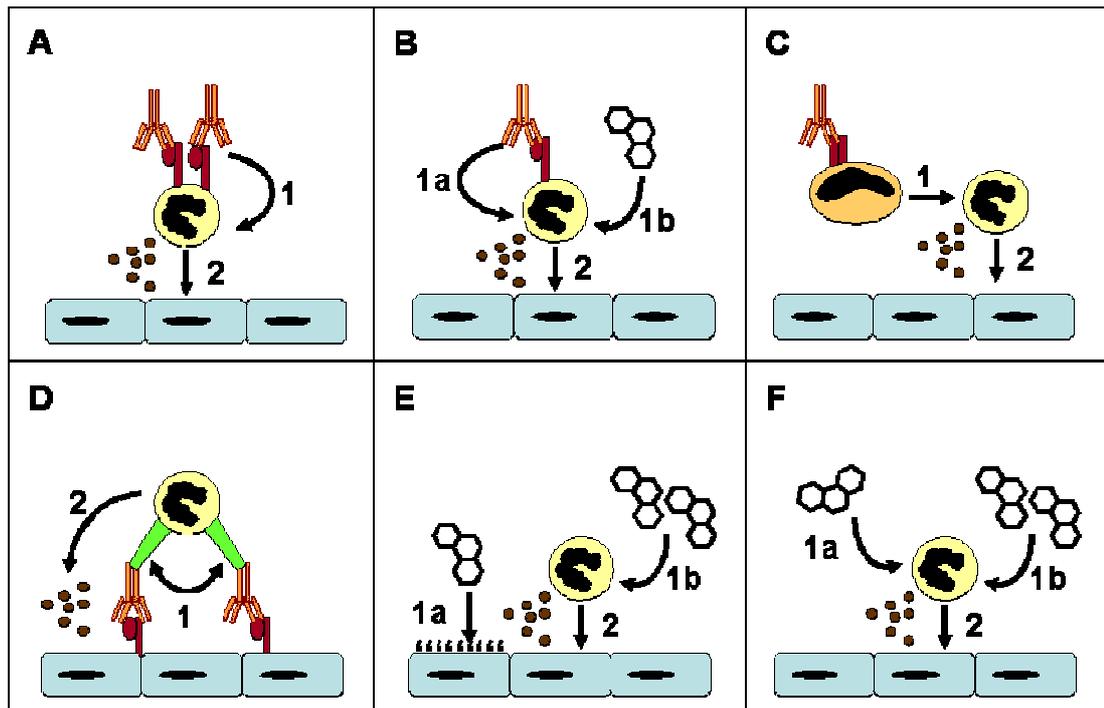
Nach einer Aktivierung des Endothels werden entsprechende Mediatoren freigesetzt, auf welche Neutrophile ebenfalls mit Aktivierung reagieren. Es kommt zur Expression von Integrinen, zur Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren und granulären Komponenten. Diese freigesetzten Mediatoren aktivieren ihrerseits wiederum die endothelialen Zellen. Darauf reagieren diese mit Mobilisierung von Selektinen, einer Hochregulierung von Adhäsionsproteinen und mit einer Produktion von Entzündungsmediatoren. Damit wird wieder die neutrophile Adhäsion und Aktivierung gesteigert (Zarbock A and Ley K., 2008).

Es ist unter anderem dieses Zusammenspiel, welches die Lungenbarriere zusammenbrechen lässt und letztlich dazu führt, dass proteinreiches Exsudat und im späteren Verlauf Neutrophile in den Alveolarraum der Lunge übertreten können. Es ist anzunehmen, dass die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen durch neutrophile Granulozyten hierbei eine zentrale Rolle spielt (Silliman et al., 1997; Sachs et al., 2006; Rattan et al., 1997; Kao et al., 2003).

## 2.4 TRALI-Mechanismen

Der Pathomechanismus, der zu einem Lungenschaden führt, ist abhängig von der Art der Antikörper oder anderen transfundierten Stimuli und dem Zusammenspiel dieser mit anderen Komponenten.

Abb. 3: Die Pathomechanismen der TRALI



Quelle: Bux J und Sachs UJ, British Journal of Haematology 2007

Die Aktivierung der Neutrophilen und die daraus resultierende Freisetzung von toxischen Mediatoren, welche eine Beeinflussung der Endothelzellen zur Folge hat, ist ein Schlüsselmechanismus der TRALI. Epidemiologische, klinische und experimentelle Daten zeigen, dass die Mehrzahl der TRALI-Fälle durch Antikörper induziert wurde, welche sich in den involvierten Blutkomponenten befanden.

Diese Antikörper scheinen Oberflächenepitope auf (A, B) neutrophilen Granulozyten, (C) Monozyten oder (D) endothelialen Zellen zu erkennen.

Die Bindung von HNA oder HLA Klasse-I-Antikörpern an Neutrophile verursacht eine direkte Aktivierung. Die Bindung von HLA-II-Antikörpern an Monozyten induziert vermutlich eine Freisetzung von Mediatoren, welche wiederum neutrophile Granulozyten aktivieren können. Experimentelle Daten zeigen, dass Neutrophile scheinbar indirekt aktiviert werden können, wenn eine Bindung von HLA an Lungenendothelzellen stattfindet. Dies geschieht durch den freien Fc-Teil der Antikörper, welcher eine Bindung mit dem Fc-Rezeptor der Neutrophilen eingeht. Die entstehende Quervernetzung der neutrophilen Granulozyten führt dann zu einer Aktivierung der Granulozyten.

Es gibt Vermutungen, dass auch andere (E, F) biologisch aktiven Substanzen bestimmte Fälle von TRALI verursachen können. Derartige Substanzen sind für gewöhnlich zu schwach, um Neutrophile direkt zu aktivieren. Allerdings könnten diese gemeinsam mit anderen zusätzlichen Faktoren, welche Endothelzellen und Neutrophile aktivieren können, zu einer TRALI führen (siehe Details im Text)

#### 2.4.1 *TRALI durch leukozytäre Antikörper (immunogene TRALI)*

Zu den leukozytären Antikörpern gehören die HLA- und die HNA-Antikörper. Solche Antikörper sind in der Lage, neutrophile Granulozyten gleichzeitig zu primen und zu aktivieren und sind daher sehr effektiv (Sachs et al., 2004; Sachs et al., 2006; Kopko et al., 2004; Silliman et al., 2006).

Daten verschiedener Hämovigilanzregister zur Folge liegt die Zahl von TRALI-Fällen, die durch Antikörper in einer transfundierten Blutkomponente ausgelöst wurden, zwischen 61% und 89% aller registrierten Fälle. Nach den britischen Meldedaten sind 64% davon auf HLA-Antikörper, 26% auf HNA-Antikörper und 10% auf Mischungen dieser Antikörper zurückzuführen. (Yomotovian et al., 1984; Nordhagen et al., 1986; Eastlund et al., 1989; Bux et al., 1996; Santamaria et al., 1998; Leger et al., 1999; Kopko et al., 2001; Davoreen et al., 2003).

Solche leukozytären Antikörper finden sich in der Regel in plasmahaltigen Blutkomponenten, die von Frauen mit mehreren Schwangerschaften in der Anamnese gespendet wurden. Ungefähr 30% der Frauen immunisieren sich während der Schwangerschaft gegen väterliche Merkmale auf den Blutzellen des Kindes. Diese Immunisierung findet im besonderen Maße gegen Antigene des HLA-Systems statt (Clay et al., 1984), aber auch gegen solche des HNA-Systems (Bux und Sachs, 2007).

Das Britische Hämovigilanzregister (SHOT) berichtet in der Zeit von 1999–2005 von 49 TRALI-Fällen, die durch transfundiertes Plasma oder Thrombozytenkonzentrate ausgelöst wurden und deren Spender allesamt Frauen waren (Chapman et al., 2006). Des Weiteren existiert eine prospektive, randomisierte Studie, bei der das Plasma von mehrmals schwangeren Frauen zu einem signifikanten Abfall der Blut-Oxygenierung beim Empfänger geführt hat, nicht aber das Vergleichsplasma männlicher Spender (Palfi et al., 2001).

#### 2.4.2 *HNA-Antikörper vermittelte TRALI*

Antikörper gegen HNA erkennen Antigene auf neutrophilen Granulozyten. Zu diesen Antigenen zählen der niedrig-affine Immunglobulinrezeptor FcγRIIIb (CD16b, HNA-1a, HNA-1b), der Adhäsionsrezeptor NB1 (CD177, HNA-2) und

CTL-2 (HNA-3a). Durch serologische Untersuchungen von TRALI-Patienten konnten in einigen Fällen Antikörper gegen neutrophile Antigene identifiziert werden (Yomotovian et al., 1984; Nordhagen et al., 1986; Leach et al., 1998). Im Haemovigilanzregister sind sie mit annähernd 10% der Fälle aufgelistet.

Wie schon zuvor erwähnt, konnte die Fähigkeit dieser Antikörper, eine TRALI zu verursachen, in einem ex-vivo-Modell gezeigt werden (Seeger et al., 1990; Sachs et al., 2006). Antikörper gegen neutrophile Antigene, besonders HNA-2, HNA-3a und HNA-4a sind fähig, Neutrophile direkt zu aktivieren. Es ist auch anzunehmen, dass dies der führende Mechanismus für die Entstehung einer TRALI ist (Sachs et al., 2006; Sachs et al., 2004; Kopko et al., 2004; Silliman et al., 2006).

D.h., wenn diese Antikörper mit einem plasmahaltigen Blutprodukt transfundiert werden und die Blutzellen des Transfusionsempfängers das korrespondierende Merkmal tragen, kann allein die Antigen-Antikörperbindung zur Aktivierung der Granulozyten führen. Dieses Geschehen würde mit einem „trapping“ der Neutrophilen in der Lunge, einer Granulafreisetzung, einem Endothelschaden und letztlich dem resultierenden transfusionsinduzierten Lungenödem einhergehen.

Es ist anzunehmen, dass sowohl die Antikörperspezifität als auch die Menge und Affinität an transfundierten Antikörpern bei der Entstehung einer TRALI eine Rolle spielen (siehe Schwellenmodell).

HNA-Antikörper, insbesondere der Spezifität HNA-3a, sind stark granulozytenaktivierend und wurden häufig bei schweren TRALI-Fällen nachgewiesen (Reil et al., 2009).

#### *2.4.3 HLA Klasse I-Antikörper vermittelte TRALI*

Im Gegensatz zu HNA-Antikörpern binden HLA-Antikörper der Klasse I nicht nur an neutrophile Granulozyten, die das korrespondierende Merkmal exprimieren, sondern auch an andere kernhaltigen Zellen. Zu solchen Zellen gehören z.B. Endothelzellen. Dies lässt vermuten, dass HLA-Antikörper nicht nur direkt, sondern auch indirekt Granulozyten aktivieren können.

Der Antikörper würde dann primär am HLA-Antigen der Endothelzelle im ersten pulmonalen Kapillarbett, das nach Transfusion erreicht wird, binden. Daraufhin würde eine Bindung des Granulozyten mit seinem freien Fc-Teil stattfinden. Eine Quervernetzung der Fc-Rezeptoren der Granulozyten führt dann zur Aktivierung.

Es gibt bislang nur wenige Untersuchungen zum Mechanismus der MHC Klasse-I-Antikörper, durch die ggf. eine TRALI-Reaktion induziert werden kann. Eine elegante Variante zeigt allerdings den genannten Endothelzell-abhängigen TRALI-Mechanismus in einem in-vivo-Mausmodell (Looney et al., 2006).

Zusätzlich wurde von einem klinischen Fall berichtet, der auf denselben Mechanismus hindeutet (Dykes et al., 2000). Hier kam es bei einem Patienten, der zuvor einer Lungentransplantation unterzogen wurde, nach einer Transfusion zu einer Lungeninsuffizienz ausschließlich des transplantierten Lungenflügels. Nachfolgende Untersuchungen stellten im Spenderblut einen Antikörper gegen HLA-B44 fest. Das korrespondierende Antigen wurde nur auf der transplantierten Lunge expremiert. Das patienteneigene Lungengewebe, auf dem dieses Antigen nicht expremiert wurde, blieb von der Lungeninsuffizienz verschont.

Diesen Berichten nach ist eine F(ab)-abhängige, durch Interaktion der Antikörper und der Neutrophilen entstehende TRALI, unwahrscheinlich. Allerdings gibt es auch einen Fall, der davon berichtet, dass ein Patient mit HLA Klasse-I-Antikörpern nach einer Infusion von Granulozyten eine schwere Lungeninsuffizienz entwickelte (Sachs et al., 2003).

Dieser Fall könnte ein Beispiel für die direkte Aktivierung durch Bindung von HLA Klasse I-Antikörpern an Granulozyten sprechen, da eine Reaktion der Antikörper mit dem Endothel in diesem Falle auszuschließen ist.

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass eine HLA Klasse-I-Antikörper vermittelte TRALI entweder durch eine spezifische Bindung an Endothelzellen mit einer durch das Fc-Fragment induzierten Granulozytenaggregation, durch eine direkte spezifische Bindung der Antikörper an Leukozyten oder durch eine Kombination aus beiden Mechanismen entstehen kann.

#### 2.4.4 Rolle der HLA Klasse II-Antikörper in TRALI

Seit 2001 werden auch HLA-Klasse-II-Antikörper mit TRALI in Verbindung gebracht. Diese wurden zunehmend in Spenderplasmen nachgewiesen, die mit TRALI-Fällen in Verbindung gebracht wurden. Mittlerweile gehören sie zu den am häufigsten nachgewiesenen leukozytären Antikörpern in Bezug auf TRALI (Kopko et al., 2001).

Der biologische Mechanismus, durch den Antikörper gegen HLA-Klasse II-Merkmale eine TRALI verursachen können, ist noch weitgehend ungeklärt. Ein verwirrender Faktor ist, dass Granulozyten, die ja inzwischen nachweislich eine zentrale Rolle im Pathomechanismus der TRALI spielen, keine HLA Klasse II-Antigene exprimieren.

Sie können diese zwar im aktivierten bzw. stimulierten Zustand exprimieren (Gosselin et al., 1993) (genauso wie Endothelzellen hierzu fähig sind), allerdings konnten diese Antigene bei einem untersuchten TRALI-Fall, ausgelöst durch HLA Klasse II-Antikörper, nicht nachgewiesen werden (Kao et al., 2003).

Diese Tatsache stellt die direkte Interaktion zwischen HLA-Klasse-II-Antikörpern und neutrophilen Granulozyten in Frage.

Allerdings exprimieren Monozyten und intraalveoläre Makrophagen HLA Klasse II-Antigene. Eine denkbare Möglichkeit wäre die indirekte Aktivierung der Neutrophilen und/oder Endothelzellen durch die Zytokine, die nach der Bindung von HLA Klasse II-Antikörpern an das Zielantigen auf Monozyten freigesetzt werden (Kopko et al., 2003; Nishimura et al., 2007). Es ist jedoch fraglich und zu klären, ob dieser indirekte Aktivierungsweg nicht zu unspezifisch und zu langsam ist um eine TRALI, die sich binnen weniger Stunden entwickelt, auszulösen (Bux und Sachs, 2007).

Es erscheint unwahrscheinlich, dass Monozyten eine ausreichende Menge an Zytokinen produzieren, um eine signifikante Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und/oder Endothelzellen zu provozieren.

Allerdings ist es ebenso unwahrscheinlich, dass transfundierte Antikörper einen direkten Zugang in den Alveolarraum bekommen, d. h. ein intaktes Lungenendothel in ausreichender Konzentration passieren können, um

genügend Zytokine nach Bindung an Alveolarmakrophagen freizusetzen, um dadurch letztlich Endothelzellen und/oder Granulozyten zu aktivieren.

Wenn jedoch eine Vorschädigung des pulmonalen Endothels vorläge, könnte dies anders aussehen.

Es scheint auch denkbar zu sein, dass die Anwesenheit von HNA- und HLA-Antikörpern eine Vorreiterfunktion für andere Antikörper mit noch unbekanntem Antigen auf anderen Zelltypen, z.B. auf Monozyten dient.

Alloantikörper gegen diese oder andere Zellen könnten dann scheinbar Antikörper-negative TRALI-Fälle erklären. Derartige Antikörper könnten dann sozusagen unter dem Deckmantel anderer Antikörper fungieren.

#### *2.4.5 TRALI durch andere Auslöser (nicht immunogene TRALI)*

Es konnte in einigen Fällen beobachtet werden, dass TRALI auch durch transfundierte Blutkomponenten ausgelöst wurde, welche nur einen sehr geringen Plasmaanteil besaßen. Beispielsweise hat ein Erythrozytenkonzentrat einen Plasmagehalt von 10 ml je 250 ml.

Auch in durchgeführten Nachuntersuchungen plasmahaltiger Komponenten wurde festgestellt, dass diese frei von leukozytären Antikörpern waren.

Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass außer transfundierten Antikörpern auch noch andere Faktoren als Ursache für eine TRALI in Frage kommen.

Seit der in Deutschland generell durchgeführten Leukozytendepletion von zellhaltigen Blutkomponenten ist die seltene Möglichkeit, dass die leukozytären Antikörper des Empfängers die Restleukozyten der Spenderblutkomponente aktivieren, zu vernachlässigen (Restleukozytengehalt in Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten nach Leukozytendepletion  $< 1 \times 10^6$ ).

##### *2.4.5.1 Bioaktive Lipide*

Da es sich bei Blutkonserven um lebende zelluläre Bestandteile handelt, liegt es nahe, dass es bei längerer Lagerung zur Bildung von physiologischen Abbauprodukten kommt. Lyso-Phosphatidylcholine (C16, C18) und Lyso-

Plättchen aktivierender Faktor (PAF), welche ein Abbauprodukt von Membranproteinen darstellen, zählen zu den sogenannten bioaktiven Lipiden.

Diese sollen fähig sein, eine TRALI auszulösen, indem sie über den PAF-Rezeptor an neutrophilen Granulozyten binden und diese primen (Silliman et al., 1994).

Diese Abbauprodukte sind allerdings an die Anwesenheit von Blutzellen gebunden, um entstehen zu können. Daher kommt es bei der Lagerung von zellfreiem Plasma nicht zur Bildung von bioaktiven Lipiden.

Es wurde von einem Patienten berichtet, dessen Serum einen signifikant höheren Anteil an Neutrophil-priming-Aktivität besaß als das Kontrollserum (Silliman et al., 1997) und, das nach einer Transfusion von autologem Blut eine TRALI verursachte (Covin et al., 2004).

In einem Rattenmodell wurden die bioaktiven Lipide von Silliman auf ihre Fähigkeit eine TRALI auszulösen hin untersucht. Die Tiere wurden zunächst mit Lipopolysaccharid (LPS) vorbehandelt, um eine Voraktivierung des Lungenendothels wie bei einer aktiven Infektion zu erreichen. Die vorbehandelten Lungen wurden anschließend mit einem Plasma, gewonnen aus einem gelagertem Erythrozyten-, oder Plasmakonzentrat perfundiert und dadurch eine TRALI erzeugt (Silliman et al., 1994).

Es erfolgte jedoch keine Perfusion mit dem identischen frischen Plasma als negative Kontrolle, um andere im Plasma befindliche Substanzen als TRALI verursachenden Faktor auszuschließen.

In Lungen, bei denen eine Vorbehandlung mit LPS ausblieb, wurde keine TRALI beobachtet.

#### *2.4.5.2 CD40-Ligand*

Der CD40-Ligand (CD40-L) ist ebenfalls ein weiteres Abbauprodukt, welches bei Lagerung von Blutkonserven entstehen kann. CD40L zählt zu den proinflammatorischen Mediatoren der Blutplättchen und kommt zellassoziiert und in gelöster Form (sCD40L) vor.

Er ist, genau wie die biologisch aktiven Lipide auch, nach Lagerung von Blutkonserven nachzuweisen (Phipps et al., 2001). Zudem ist er zum Priming von Neutrophilen befähigt, indem das sCD40L an CD40 bindet, das auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten zu finden ist (Khan et al., 2006).

Durch diese Interaktion von CD40L und CD40 findet ein Priming der neutrophilen Granulozyten statt.

CD40L wird als möglicher Co-Faktor im Pathomechanismus der TRALI in Betracht gezogen, da seine Konzentration in getesteten Blutkonserven, die zu einer TRALI geführt haben, signifikant hoch ausfiel.

Ein in-vitro-Versuch mit humanen Endothelzellen, die mit LPS vorinkubiert wurden, zeigten eine stärkere Zellschädigung in Anwesenheit von Neutrophilen, welche von CD40L geprimed wurden, als bei Zugabe von ungeprimten neutrophilen Granulozyten (Khan et al., 2006).

#### *2.4.5.3 Immunkomplexe*

Die Inkubation von neutrophilen Granulozyten mit Immunkomplexen (ICs) resultiert in einer vermehrten Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) und verursacht eine Apoptose von Endothelzellen (Nishimura et al., 2004).

Bislang ist allerdings die Überlegung, dass Antikörper aus der transfundierten Blutkonserve mit den korrespondierenden freien HNA-, oder HLA-Antigenen im Blutkreislauf des Empfängers ICs bilden und somit die Neutrophilen im Lungenkreislauf primen und aktivieren, eher von spekulativer Natur.

## **2.5 Hinweise auf eine antikörperbezogene Ätiologie**

Der Zusammenhang zwischen einer TRALI und leukozytären Antikörpern wurde, wie schon zuvor erwähnt, erstmals von Brittingham beschrieben. Er berichtet von Leukoagglutininen im Plasma von multitransfundierten Patienten, welche nach Transfusion beim Empfänger zu akuten Lungenreaktionen führten (Brittingham et al., 1957).

Ein schweres Lungenödem wurde in gleicher Weise nach Gabe eines experimentellen Gamma-Globulin-Konzentrates bei einer Testperson verursacht. Dieses Konzentrat wurde aus einem Plasma gewonnen, in welchem leukozytäre und in geringeren Mengen monozytenreaktive Antikörper zu finden waren (Doreen et al., 1998). Es ist anzunehmen, dass dieses Präparat demnach eine hohe Menge an HLA-Klasse-II-Antikörpern besaß.

Abgesehen von diesen experimentellen Ergebnissen existieren einige Fallberichte, in denen in der transfundierten Konserve Antikörper nachgewiesen werden konnten, die mit den Leukozyten des Empfängers reaktiv waren. In zwei langen Serien von untersuchten TRALI-Fällen wurden in 61-89% leukozytäre Antikörper in Spenderplasmen gefunden (Popovsky et al., 1985; Popovsky et al., 2001).

Der Mechanismus der antikörpervermittelten TRALI wurde anhand von Tiermodellen untersucht. In einem ex-vivo-Modell der isolierten Rattenlunge wurde durch die Applikation von HNA-3a-Antikörpern eine vaskuläre Lungenschädigung hervorgerufen (Seeger et al., 1990). Die Ergebnisse dieses Experiments lassen den Schluss zu, dass leukozytäre Antikörper (und eventuell die damit zusammenhängende Komplementaktivierung) in der Lage sind, eine TRALI auszulösen.

Einige Versuche lassen vermuten, dass das Komplement, bei einer durch den Antikörper gegen CD177 (HNA-2a) verursachten TRALI, keine pathologische Bedeutung besitzt und demnach zu vernachlässigen ist (Sachs et al., 2006).

Bei diesen Versuchen wurde die Induktion der TRALI auf die Anwesenheit des entsprechend zu dem Antikörper passenden Antigens zurückgeführt, zumal das Experiment in einer komplementfreien Umgebung durchgeführt wurde.

Alternative Mechanismen, die für die Entstehung einer TRALI verantwortlich sein könnten, werden im späteren Verlauf dieser Arbeit noch untersucht und diskutiert. Allerdings lassen die vorhandenen Daten die Vermutungen zu, dass die Reaktion zwischen Leukozyten-reaktiven Antikörpern des Blutspenders mit

dem Antigen des Blutempfängers der prädominierende Mechanismus der TRALI ist.

## **2.6 Schwellenmodell**

Sobald der Stimulus auf das Endothel und die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten ausreichend stark ist, kann auch bei einem ansonsten gesunden Individuum eine Lungenschädigung entstehen.

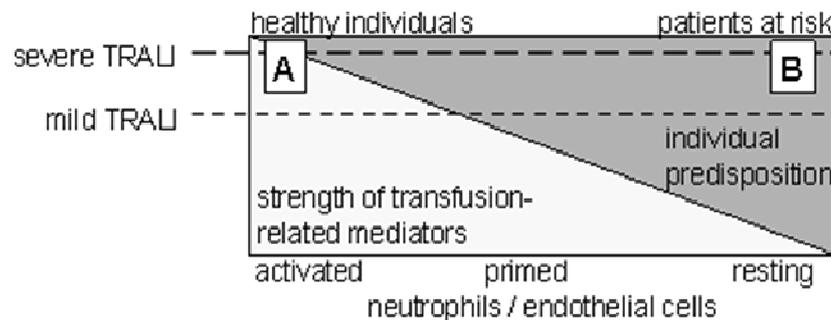
Beweise hierfür liefern TRALI-Berichte von transfundierten Freiwilligen, wie zuvor schon beschrieben. Desweiteren existieren Fälle, bei denen Plasma aus klinischen Gründen bei ansonsten gesunden Individuen eingesetzt wurde und es zur Entwicklung einer TRALI kam.

Derartige Fallbeispiele sind selten. Die Mehrzahl der Patienten, die Transfusionen (besonders Frischplasma) erhalten haben, weisen bedeutsame Begleiterkrankungen auf, von denen einige ein Priming, eine Neutrophilenaktivierung oder eine Schädigung der pulmonalen Endothelzellen zur Folge haben können.

Dies deutet darauf hin, dass TRALI für gewöhnlich bei Patienten mit einer Grunderkrankung häufiger vorkommt als bei gesunden Personen.

Popovsky und Moore weisen in ihren Untersuchungen darauf hin, dass die meisten TRALI-Patienten kurz zuvor (bis zu 48 Stunden vorher) einer Operation unterzogen wurden. Allein dieser Faktor kann schon ein ausreichend starker, zweiter Stimulus in einigen Fällen gewesen sein.

Abb. 4: Das TRALI-Schwellenmodell



Quelle: Bux J und Sachs UJ, British Journal of Haematology 2007

Das TRALI-Schwellenmodell geht davon aus, dass eine bestimmte Schwelle überschritten werden muss, damit eine TRALI ausgelöst werden kann. Die Schwelle einer milden TRALI, bei der eine Sauerstoffzufuhr ausreichend ist, ist niedriger als die einer schweren TRALI, bei welcher ein Patient künstlich beatmet werden muss (horizontale Linie).

Um diese Schwelle zu überschreiten, muss eine bestimmte Anzahl von Faktoren miteinander agieren bzw. vorhanden sein. Diese können sich aus der Summe der exogen zugeführten, d.h. transfundierten Mediatoren (heller Kasten) und den individuellen Prädispositionen des Patienten (grauer Kasten) ergeben.

Die individuelle Disposition beinhaltet die konstitutiven (genetischen) Faktoren und die dynamischen oder akuten Einflüsse, z. B. akute Infektionen und Trauma.

Ein starker exogener, transfusionsbedingter Faktor oder Mediator, wie ein stark neutrophilaktivierender spezifischer Antikörper, kann eine TRALI auslösen, auch wenn der Einfluss der endogenen, individuellen Disposition gering ist (Beispiel A, in einem gesunden Individuum).

Im Gegensatz dazu (Beispiel B, ein Risikopatient, wie ein Sepsispatient mit einem dadurch aktiviertem Lungenendothel) kann eine relativ geringe Menge an exogen zugeführten, transfundierten Mediatoren mit einer niedrigen Neutrophil-Priming-Aktivität ausreichend sein, um den Schwellenwert zu überschreiten.

Einige experimentelle Beweise der „Zweistufen-Theorie“ oder „Mehrstufen-Theorie“ lieferten Untersuchungen bzw. Studien über bioaktive Lipide, wie zuvor erwähnt (Silliman et al., 2003).

Die „Mehrstufen-Theorie“ wurde von Bux und Sachs (2007) noch weiterentwickelt. Deren Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass der neutrophile Granulozyt eine zentrale Rolle im Pathomechanismus der TRALI einnimmt, zu dessen Aktivierung ein Stimulus aus einer oder mehreren Quellen erforderlich ist. Erst wenn ein bestimmter Schwellenwert erreicht ist, kommt es zur Aktivierung und Lungenschädigung.

Abhängig von der Größe der Antwort der Neutrophilen auf einen oder mehrere Stimuli kann die Lungenschädigung milder oder schwerer mit entsprechenden klinischen Auswirkungen ausfallen.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Antikörper

Antikörper	Herkunft
7D8 (gegen CD177)	Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Gießen
MEM 166 (gegen CD177)	Serotec, Düsseldorf
mlgG	Serotec, Düsseldorf
Polyklonaler Rabbit-Anti-Mouse/FITC	DakoCytomation, Hamburg
DR 52	Serotec, Düsseldorf
HLA-Klasse-II-haltiges Humanplasma	DRK-Blutspendedienst West, Hagen

##### 3.1.2 Zellkulturmedium

Zellkulturmedium	Herkunft
EBM 2	Lonza, Basel, Schweiz
RPMI 1460	PAA Laboratories, Cölbe

## 3.1.3 Lösungen und Puffer

Lösung bzw. Puffer	Herkunft
Ammoniumchlorid	8,3g NH <sub>4</sub> Cl, 1g KHCO <sub>3</sub> , 0,037g Na <sub>2</sub> EDTA Triplex, pH = 7,4
Coating-Buffer	1,5g Natriumcarbonat, 2,93g Natriumhydrogencarbonat, 0,2g Natriumazid, 1000ml Aqua dest., pH = 9,6
Dextran	20g Dextran, 400ml PBS, pH = 7,4
Einfriermedium	80% des jeweiligen Zellkulturmediums, 20% DMSO
PBS (ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )	10% PBS (10x), 90% Aqua dest.
Substratlösung	3 ml Aqua dest., 1 Tabl.OPD, 1,25 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Neutralisationspuffer	12,11g TRIS-HCL in 90ml Aqua dest. , pH = 0,9
Elutionspuffer (10fach)	7,51g Glycin in 90ml Aqua dest. , pH = 2,7
KRPD	129 mM NaCl, 1,3 mM MgSO <sub>4</sub> , 22,4 mM NaHCO <sub>3</sub> , 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 4,2 mM KCl, 10mM Glucose, 1,5 mM CaCl <sub>2</sub>
Trypanblaulösung	Serva, Heidelberg
Perfusatlösung IIN	Serag-Wiessner KG, Naila

## 3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Herkunft
Accutase	PAA Laboratories, Cölbe
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Aqua dest.	B.Braun Melsungen, Melsungen
Braunoderm	B.Braun Melsungen, Melsungen
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Dextran	Pharmacia, Freiburg
Diethylether 99,5%	Merck, Darmstadt
DPI	Lonza, Basel, Schweiz
DMSO	Fluka, Buchs, Schweiz
EDTA	Merck, Darmstadt
Electrolytlösung II N	Serag-Wiessner KG, Naila
FCS	PAN Biotech, Carlsbad, Californien, USA
Ficoll-Paque	Amersham Biosciences, Freiburg
FMLP 200 x Stammlösung; 1 mM	Orpegen Pharma, Deutschland
Formaldehyd	Merck, Darmstadt

G-CSF	Endogen, Boston, USA
HCl	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium	Ratiopharm GmbH, Deutschland
Hi Trap™ Protein G HP	Amersham Biosciences, Freiburg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotonische Natriumchlorid-Lösung 0,9%	DeltaSelect GmbH, Pfullingen
KCl	Merck, Darmstadt
Kristall-Violett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
LPS, 25mg, L6011	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nabic 8,4%	Serag-Wissmer, Naila
NaCl	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
NaCl 0,9%	B.Braun Melsungen, Melsungen
NaOH	Merck, Darmstadt
Narcoren	Merck, Hallbergmoos

PBS	Gibco, Grand Island, NY. USA
PMA 200 x Stammlösung; 1,62 mM	Orpegen Pharma, Heidelberg
Protein-G beads	Gerbu Biotechnik GmbH, Wieblingen
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Rotiphorese® SDS-Page	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SDS	ICN, Eschwege
Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Sepharose-Säule	Amersham Biosciences, Freiburg
Streptavidin-HRP	Amersham Biosciences, Freiburg
Sulfosalicylsäure	Merck, Darmstadt
TBS	Gibco, Grand Island, NY. USA
TNF $\alpha$	R&D Systems, Minneapolis, USA
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Xylocain 2%	ASTRA Chemicals GmbH, Wedel/Holstein

Zitronensäure	Merck, Darmstadt
---------------	------------------

### 3.1.5 Vorgefertigte Systeme (Kits)

Kits	Herkunft
Bursttest (Phagoburst®)	Orpegen Pharma, Heidelberg
Gro $\alpha$ -ELISA	BD Biosciences, Heidelberg
IL8-ELISA	BD Biosciences, Heidelberg
LTB4-ELISA	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach
TNF $\alpha$ -ELISA	BD Biosciences, Heidelberg

### 3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Herkunft
3-Wege-Hahn	B.Braun, Melsungen
Einfrierampullen	NUNC, Wiesbaden
Einmalkanülen (0,45mm x 13mm, 0,55mm x 25mm)	BD Microlance 3, Drogheda, Ireland
Eppendorfgesäß 1,8ml	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe

Falcon™-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Filterpapier	Schleicher & Schnell, Dassel
Flachbodenplatte 96-well	Greiner-Bio-One GmbH, Essen
Flachbodenplatte 24-well	Greiner-Bio-One GmbH, Essen
Flachbodenplatte 12-well	Greiner-Bio-One GmbH, Essen
Glaspipette 1, 2, 5, 10, 20	Brand, Wertheim
Kabelbinder	Cimco, Remscheid
Latexhandschuhe, Nobaglove-Latex S, 240mm	NOBA Verbandmittel Danz GmbH, Wetter
Leukoplast 3M	Durapore
Mullkompressen	Fuhrmann Verbandstoffe GmbH, Much
Parafilm®	American Can Company, New York, USA
Pasteurpipetten	Kahlensee, Gießen
Pipettenspitzen (0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen steril (0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl)	Greiner-Bio-One GmbH, Essen
Polyröhrchen	Sarstedt, Nürnbrecht, Niederlande

Rundbodenplatten, 96-well	Greiner-Bio-One GmbH, Essen
Skalpelle, steril	Feather Industries, LTD, Tokio, Japan
Slide-A-Lyser® 10K Dialysis Cassettes	Pierce, Rochford, IL, USA
Schlinggazetupfer	Fuhrmann Verbandsstoffe GmbH, Much
Schüttler Duomax 1030	Heidolph, Kelkheim
Spritzen (1ml, 2ml, 5ml, 10ml)	Braun Melsungen, Melsungen
Ultrazentrifugenröhrchen	Greiner-Bio-One GmbH, Essen
Vacutainer Blutröhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Wägepapier	Schleicher & Schnell, Dassel
Zellkulturflasche mit Filter (250ml)	Greiner-Bio-One GmbH, Essen

## 3.1.7 Geräte und Instrumente

Geräte bzw. Instrumente	Herkunft
Analysenwaage AE 100	Mettler, Zürich, Schweiz
Analysenwaage PJ 6000	Mettler, Zürich, Schweiz
Arterienklemme	Robert Helwig GmbH, Berlin
Anatomische Pinzette, 11021-14	FST Industrie GmbH, Berlin
Chirurgische Pinzette, 11050-10	F-S-T Industrie GmbH, Berlin
CO <sub>2</sub> -Schrank	Heracell, Zürich, Schweiz
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Druckaufnehmer Single Use Pressure Transducer	B.Braun, Melsungen
Dynal Magnetic Particle Separator	Dynal Biotech, Hamburg
Einkanalschreiber	Rikadenki, Freiburg
Elektromechanischer Druckumwandler, Combitrans	B.Braun Melsungen
Farbmonitor	Novita, Braunschweig
Fluoreszenz-Lesegerät FLX 800	Bio-Tek Instruments, Vermont, USA
Gebogene chirurgische Pinzette, 11052-10	F-S-T Industrie GmbH, Berlin

Gefrierschrank (-20°C)	Electrolux, Stockholm, Schweden
Gefrierschrank (-70°C)	Bosch, Gerlingen
Inkubator B15	Heraeus, Hanau
Kleintierventilator	SAR-830/P, Ventilator, Woodland Hills (CA), USA
Klemme, 13-370-16	KLS Martin, Tuttlingen
Klemme, 13-411-16	KLS Martin, Tuttlingen
Kühler, Frigomix BU	B.Braun, Melsungen
Kühlschrank	Electrolux, Nürnberg
Lichtmikroskop Labovert	Leitz, Wetzlar
Lichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
Magnetrührer, Typ RCO	Janke & Kunkel KG, Staufen
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Messverstärker, Plugsy DBA 660	Hugo Sachs, March-Hugstetten
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Peristaltikpumpe Masterflex L/S,	Cole-Parmer Instrument Company, Chicago (IL), USA

pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer	Zeiss, Jena
Plattenphotometer Sunrise	Tecan, Salzburg, Österreich
Plattenzentrifuge, Labofuge GL	Heraeus Christ, Hanau
Plattenzentrifuge, Universal 32	Hettich, Tuttlingen
Rechner	IG, 52X MAX, Karlsruhe
Rotator	Fisher-Scientific, Ingolstadt
Schere klein, 14088-10	F-S-T Industrie GmbH, Berlin
Schere groß, 14013-17	F-S-T Industrie GmbH, Berlin
SDS-Page-Halteapparatur	Keutz, Reiskirchen
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Hanau
Sysmex KX-21N	Sysmex GmbH , Horgen, Zürich
Tintenstrahldrucker	Hewlett Packard, Deskjet 500, Palo Alto, Kalifornien, USA
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen

Ultrazentrifuge Discovery 100	Sorvall, Hanau
Verstärker, Transbridge 4M	World Precision Instruments Germany GmbH, Berlin
Vortexer, Reax 2000	Heidolph, Kehlheim
Wägezelle, U1-G	Hottingen Baldwin Messtechnik, Darmstadt
Wärmepumpe, Thermomix BU	B.Braun, Melsungen
Wärmeschrank	Ehret, Freiburg
Wasserbad, SW 21C	Julabo, Seelbach
Zellcounter	Sysmex Diditana, Hamburg
Zellkulturschrank Hera Cell	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Rotixa/A	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotina 35	Hettich, Tuttlingen

## 3.2 Methoden

### A IN VITRO-VERFAHREN

#### 3.2.1 Probensammlung und Probenaufbereitung

##### 3.2.1.1 Isolierung von Granulozyten aus EDTA-Blut

Die Isolierung der Granulozyten erfolgte durch Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten.

Hierbei macht man sich die unterschiedliche Sedimentation der Blutzellen im Dichtegradienten zu Nutze. Granulozyten und Erythrozyten sedimentieren aufgrund ihrer Dichte schneller als mononukleäre Zellen, welche sich in der oberen Gradientenschicht sammeln.

Bei dieser Methode werden zu 10 ml EDTA-Spenderblut jeweils 2,5 ml einer 5 %-igen Dextranlösung zugegeben, das Röhrchen dreimalig geschwenkt, mit Parafilm verschlossen und 30 Minuten in Schräglage bei 37°C inkubiert. Die Schräglage dient der Beschleunigung der Erythrozytensedimentation.

Während der Inkubation wurden für 10 ml EDTA-Blut je 2,5 ml einer Ficoll-Paque Lösung in jeweils zwei Polyröhrchen vorgelegt und der leukozytenhaltige Überstand vorsichtig auf die vorgelegte Ficoll-Paque Lösung geschichtet. Die Überschichtung erfolgte mit Hilfe einer 2 ml Plastikpasteurpipette. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 296g für 20 Minuten ohne Bremse bei Raumtemperatur.

Nach Zentrifugation befanden sich Granulozyten und Erythrozyten im Pellet der Probe, während sich die Lymphozyten und Monozyten in der darüber liegenden Interphase befanden. Der plasmahaltige Überstand und die Thrombozyten lagen oberhalb der Interphase. Der Überstand und die Interphase wurde abgesaugt.

Das Pellet wurde dann mit 2 ml einer 0,15 molaren Ammoniumchloridlösung resuspendiert und die übrig gebliebenen Erythrozyten durch eine fünfminütige Inkubation auf Eis lysiert.

Die Erythrozytenreste wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS (ohne Ca., Mg., pH 7,4) und Zentrifugation bei 132g entfernt.

Zum Zählen am Leukocounter wurden die Zellen in einem Röhrchen gepoolt und in insgesamt 2 ml PBS resuspendiert. Die Granulozyten wurden nach erfolgter Zellzahlbestimmung auf die festgelegte Zellzahl für den Versuch eingestellt, entsprechend in Medium verdünnt, und später zu den Ansätzen hinzugefügt.

Die Isolierung der Granulozyten und somit die Durchführung der Experimente erfolgte stets am Tag der Blutabnahme, da Granulozyten bereits durch Kontakt mit der Röhrchenwand aktiviert werden können.

### *3.2.1.2 Isolierung von Monozyten aus EDTA-Blut*

Zu 20 ml PBS-Lösung wurden 20 ml EDTA-Blut hinzugeführt. Nachfolgend wurden 15 ml einer Ficoll–Paque-Lösung vorgelegt und vorsichtig mit dem Gemisch aus EDTA-Blut und Ficoll–Paque-Lösung überschichtet. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 463g ohne Bremse befanden sich die Granulozyten und Erythrozyten in einem Pellet am Boden, die Monozyten und Lymphozyten in der Interphase und im Überstand das Plasma und die Thrombozyten.

Die milchige Interphase wurde nun vorsichtig mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in ein neues spezielles Röhrchen gegeben. Mit einer PBS–EDTA-Lösung wurde der Inhalt auf 50 ml aufgefüllt und anschliessend 10 min bei 101g bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand nachfolgend abgesaugt. Dieser Waschschrift wurde in gleicher Weise wiederholt.

Das Pellet wurde in 300 µl PBS–EDTA–BSA-Lösung aufgenommen und resuspendiert. Aus diesen 300 µl wurden 10 µl entnommen, mit der PBS-EDTA–BSA-Lösung 1:10 verdünnt, um mit diesem Aliquot eine erste Zellzahlbestimmung vorzunehmen.

Die restlichen 290 µl Zellsuspension wurden abzentrifugiert und die vorhandenen Zellen, in Abhängigkeit von der Zellzahl, mit CD14 Beads (MACS, Miltenyi, Biotec) versetzt (1 x 10<sup>7</sup> Zellen in 80 µl PBS / EDTA / BSA + 20 µl CD14 Beads), um die Monozyten von den Lymphozyten zu trennen. Der

magnetisch wirksame Antikörper CD14 bindet hierzu an den CD14 Rezeptor des Monozyten.

Nach 15 Minuten Inkubationzeit bei 4°C, erfolgte ein Waschschriff mit 5 ml der PBS –EDTA–BSA-Lösung für 5 Minuten bei 463g.

Das Pellet wurde anschließend in 500 µl derselben Lösung aufgenommen und konnte am AutoMax, aufgrund der CD 14 Beads markierten Monozyten, separiert werden. Diese Separation geschieht aufgrund einer magnetischen Wirkung.

Durch die Separation durch den AutoMacs konnte nun die erneute Zellzahlbestimmung am Sysmex vorgenommen werden. Hierzu wurde die Probe 1: 2 verdünnt, indem 35 µl Probe mit 35 µl PBS verdünnt wurden. Durch Messung des Aliquots konnte die genaue Monozytenzahl bestimmt werden.

### 3.2.1.3 Herstellung von Monozytenüberständen

Für die Herstellung der Monozytenüberstände wurden 96-Well Rundbodenplatten (Greiner-Bio-One) verwendet. Pro Ansatz bzw. pro Well wurden 150.000 Monozyten in 100µl RPMI1640 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) Medium verdünnt. Zu diesen Monozyten wurden 200 µl des entsprechenden Plasmas (20%) zugeführt. Das Verhältnis von Monozytensuspension- und Plasmamenge betrug 1:3 pro Well. Insgesamt befanden sich 300 µl in jedem Ansatz.

Die Platte wurde 20 Stunden bei 37°C über Nacht im CO<sub>2</sub>-Schrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zentrifugation in der Plattenzentrifuge und die anschließende Abnahme der Monozytenüberstände vorgenommen.

Die Lagerung der Überstände fand bei -70°C statt.

Es wurde „gematchter“ Überstand, d.h. Monozyten mit merkmalspassendem Antikörper im Plasma hergestellt. Hier konnte demnach eine Antigen–Antikörper-Bindung stattfinden. Entsprechend wurde auch „ungematchter“ Überstand hergestellt. In diesem Fall passten die Merkmale des Monozyten nicht zu denen des Antikörpers im Plasma. Demnach konnte keine Antigen–Antikörper-Bindung während der Inkubation erfolgen.

### 3.2.1.4 Kultivierung von HUVEC

#### *Auftauen der Zellen:*

Die Zellen wurden nach Lagerung im flüssigen Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, daraufhin mit 8 ml RP MI-Wachstumsmedium (RPMI1640-Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/ Streptomycin), durch Zentrifugation bei 1600 U / pM, gewaschen und anschließend der entstandene Überstand verworfen. Die gewaschenen Zellen wurden mit 8 ml mit zuvor auf 37°C erwärmtem EBM2-Medium aufgenommen.

#### *Kultivierung von HUVEC in Flachbodenflaschen:*

Die Zellen wurden bei 37°C und CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank kultiviert. Die Kultivierung der HUVEC-Zellen erfolgte in serumhaltigem EBM2-Medium und es wurden i.d.R. 250 ml Flachbodenflaschen mit 12 ml Medium verwendet.

Anhand des Farbumschlages des EBM2-Mediums von rosa nach gelb konnte der Grad der Anreicherung von sauren Stoffwechselprodukten festgestellt werden. Je nach Färbung wurde das übersäuerte Medium mit einer sterilen Pipette unter der Sterilbank abgenommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Vor Zugabe wurde dieses im Brutschrank bei 37°C erwärmt.

Täglich wurde die Konfluenz der Zellen unter dem Lichtmikroskop beurteilt und falls diese 90 % betrug, konnten die Zellen entweder experimentell eingesetzt werden oder es musste eine „Splittung“ vorgenommen werden.

Um die Zellen zu splitten, musste vorerst das Medium abgenommen werden und der Zellrasen mit physiologischer Kochsalzlösung gespült werden, indem 12 ml NaCl in die Flachbodenplatte pipettiert und diese nach mehrmaligem Schwenken wieder entnommen wurden. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal in gleicher Weise wiederholt.

Die gewaschenen Zellen wurden anschließend mit 1 ml 0,15 molaren Accutase versetzt. Dieses Enzym führt zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden. Nach drei Minuten Inkubation wurden durch Klopfen die letzten Adhäsionen gelöst. In die Flasche wurden dann 12 ml frisches EBM2-Medium gegeben und mit der 0,15 molaren Accutaselösung gut durchmischt. Von dieser Zelllösung

wurden dann 6 ml in eine neue Flachbodenplatte gegeben und zusätzlich jeweils nochmal 6 ml in die alte und neue Kulturflasche gegeben, so dass sich in der neuen Flachbodenplatte 12 ml und in der alten 13ml Kulturmedium befanden. Diese wurden dann wieder in den CO<sub>2</sub>-Schrank bei 37°C kultiviert.

### 3.3 Funktionelle Untersuchungen

#### 3.3.1 ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*)

##### *Testprinzip der ELISA-Analytik:*

Im Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay können Antigenmengen quantitativ bestimmt werden. Es handelt sich um eine indirekte Methode, welche auf dem sogenannten „Sandwich“-Prinzip basiert. Hierbei wird das zu untersuchende Antigen von zwei verschiedenen Antikörpern gebunden. Zum einem von dem sogenannten „Capture-AK“, welcher an der Bodenplatte haftet und dann spezifisch das zu detektierende Antigen bindet. Anschließend findet die Bindung mit dem zweiten, dem sogenannten „Detektion-Antikörper“ statt, welcher an das bereits gebundene Antigen spezifisch bindet. Dieser Antikörper ist biotinmarkiert. Das Biotin des zweiten Antikörpers wird von einer Streptavidin-markierten Peroxidase gebunden, oxidiert dadurch ein Testsubstrat und führt so zu einer Färbung, deren Intensität proportional zur ursprünglichen Antigenmenge ist. Diese wird daraufhin mittels Photometer quantifiziert. Anhand der Intensität des Farbumschlages lässt sich, in Relation zu einer Standardkurve, die Menge des gebundenen Antigens berechnen.

##### *3.3.1.1 Beschreibung und Versuchsablauf der GRO alpha,-Interleukin 8,- TNFalpha,-und Leukotrien B4-Analytik mittels ELISA:*

Für die GROalpha, Interleukin 8 und TNF alpha Bestimmung wurde mit dem BD OptEIA™Set Human GROalpha, IL-8 und TNF gearbeitet. Für die Leukotrien B4 Bestimmung wurde der Correlate-EIA Leukotrien B4 Enzyme Immunoassay Kit von Assay Designs verwendet.

Die Durchführung erfolgte anhand der Arbeitsanleitung bzw. Durchführungsempfehlung des Herstellers.

### 3.4 Durchflusszytometrische Untersuchungen

#### 3.4.1 Bursttest

##### *Testprinzip der Sauerstoffradikalmessung:*

Die durchflusszytometrische Untersuchung der oxidativen Burstreaktion von Granulozyten wurde mit dem kommerziellen Bursttest-Kit (Phagoburst®, Orpegen Pharma, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Zellen wurden durch verschiedene Stimulantien, wie PMA („high stimulus“) und fMLP („low stimulus“) zur Sauerstoffradikalbildung angeregt. Die Bildung der reaktiven Sauerstoffradikale (Oxidativer Burst) kann durch Zugabe und Oxidation von DHR 123 als fluorogenes Substrat verfolgt werden. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt mit einer Lysing Solution. Ein Waschschrift mit Waschlösung und die darauffolgende Zugabe einer DNA-Färbelösung diente dem Ausschluss von Zellaggregationsartefakten. Die Erfassung des Prozentsatzes oxidierender Zellen und deren mittlere Fluoreszenzintensität (Enzymaktivität) erfolgt durchflusszytometrisch am FACS.

##### *Beschreibung der Sauerstoffradikalbestimmung:*

Nach Isolierung und Ermittlung der Granulozytenzahl wurde die entsprechende Granulozytenmenge in 0,2% BSA/PBS verdünnt und in Falcon-Glasröhrchen gegeben. Pro Ansatz wurden 500.000 Granulozyten in einem Volumen von 100µl verwendet. Anschließend wurden 30 µl Monozytenüberstand zu den Granulozyten gegeben und fünf Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Als positive Kontrolle diente ein Ansatz mit dem Antikörper MEM 166 gegen CD 177 und im negativen Testansatz wurde mIgG verwendet. Die Volumina dieser Ansätze entsprachen denen der restlichen Testansätze.

Nach dieser Inkubationszeit wurden 5 µl fMLP (fMLP 200 X Stammlösung, 1 mM, Orpegen Pharma, Deutschland), welches zuvor 1:200 in 0,2% BSA-Lösung verdünnt wurde, zu den Ansätzen hinzu gegeben. Daraufhin erfolgt eine Inkubation von 15 min erneut bei 37°C im Wasserbad. Das Substrat wird während dieser Inkubationsphase in 1 ml Waschlösung gelöst und bis zum Gebrauch dunkel gelagert.

Im Anschluss an die Inkubation werden die Probenansätze mit je 20 µl Substratlösung versetzt. Für die Oxidationsphase erfolgt eine weitere Inkubation von 10 min im Wasserbad bei 37°C. Das Volumen der Testansätze wird mit 300 µl 0,2% BSA/PBS-Gemisch ergänzt und im direkten Anschluss am FACS gemessen.

### **3.5 Zellspezifische Untersuchungen**

#### *3.5.1 Permeabilitätstest*

##### *Testprinzip des Permeabilitätstests:*

Diese Methode basiert auf einer 24-Loch-Transmigrationsplatte, in der das obere Kompartiment durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 3,0 µm von dem unteren Kompartiment getrennt ist. Im ersten Schritt werden humane Nabelschnurendothelzellen auf dem oberen Kompartiment ausgesät und konfluent wachsen gelassen. Mikroskopisch wird geprüft, ob das Endothel konfluent gewachsen ist.

Zur Quantifizierung wird hier das FITC-markierte Albumin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) verwendet, welches unter normalen Bedingungen nicht membrangängig ist. Im Falle einer Membrandurchlässigkeit kann das Albumin anschließend im unteren Kompartiment photometrisch bestimmt und anhand dessen die Permeabilität des Endothels beurteilt werden.

##### *Beschreibung des Permeabilitätstests:*

48 Stunden vor Testbeginn wurden 300.000 humane Nabelschnurzellen (HUVEC, Lonza, Basel, Schweiz) in das obere Kompartiment der Transmigrationsplatte ausgesät.

Nach ausreichender Konfluenz wurde das Medium vier Stunden vor Teststart gewechselt. Die Zellen wurden hierfür zweimal mit serumfreien RPMI1640 Medium (PAA, Pasching, Österreich) gewaschen und dann mit 200 µl von diesem Medium pro Ansatz versetzt. Zusätzlich wurden 600 µl in das untere Kompartiment gegeben.

Nach 4 Stunden wurden die zuvor über Ficoll-Paque isolierten Granulozyten zu den entsprechenden Ansätzen zugegeben. Hierzu wurden 150.000 Granulozyten in 100µl serumfreien Medium (RPMI 1640) aufgenommen und pro Ansatz pipettiert. Im direkten Anschluss kamen 100 µl des zu testenden Monozytenüberstandes hinzu.

Nach einer Inkubationsphase von 45 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden für die positive Kontrolle 0,2 U / ml Thrombin in die dafür vorgesehenen Ansätze gegeben. Das Thrombin wurde entsprechend in 100 µl verdünnt und hiervon wurden 50 µl in das obere Kompartiment pipettiert. Direkt im Anschluss wurde FITC-Albumin in alle Ansätze in einer Konzentration von 20 µg/ml zugegeben. Das FITC-Albumin wurde in Tris-HCl und PBS zu gleichen Teilen verdünnt.

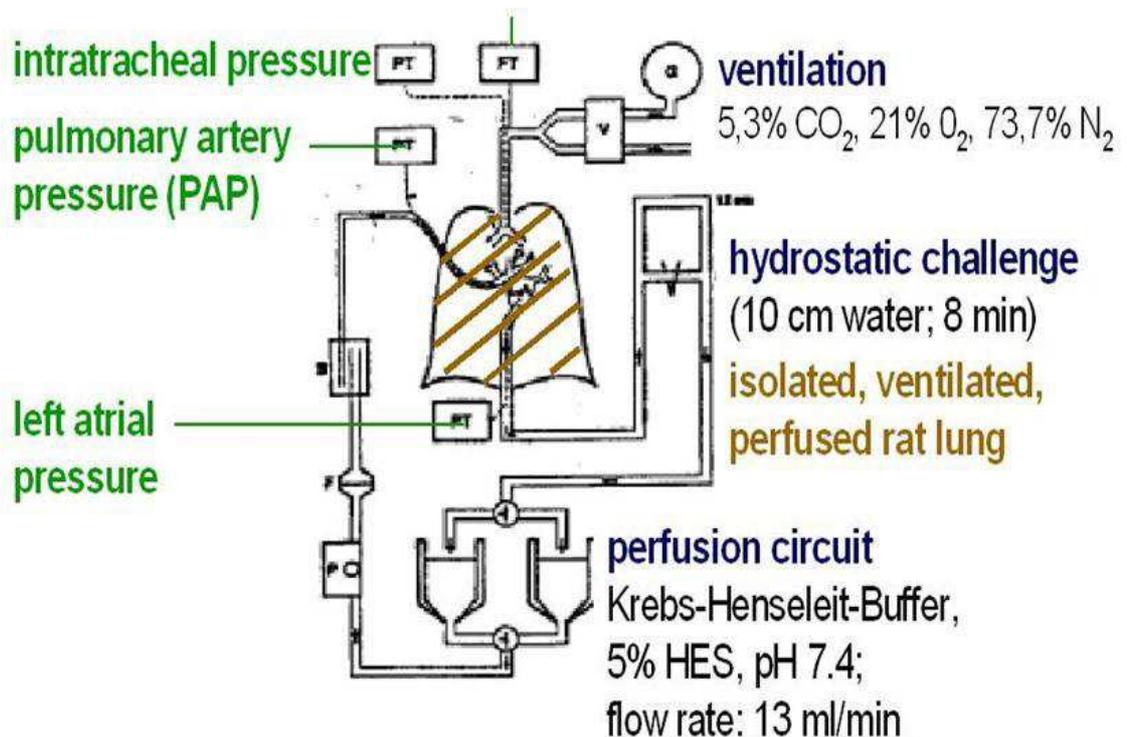
Die quantitative Bestimmung von FITC-Albumin im unteren Kompartiment erfolgte anschließend im Plattenphotometer (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) in der fünften, zehnten, dreißigsten und sechzigsten Minute. Die Messung wurde in Triplets bei einer Wellenlänge von 50 nm durchgeführt.

Zusätzliche Testungen erfolgten nach Zugabe von 50 µM DPI, welches verwendet wurde, um die NADPH-Oxidase zu blockieren, womit die Freisetzung von Sauerstoffradikalen verhindert wurde.

## B TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

### 3.6 Ex vivo-Rattenlungenmodell

Abb.5: Rattenlungenmodell



Quelle: Seeger et al., Blood 1990

#### *Testprinzip des Organmodells:*

Das Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Rattenlunge wurde mehrfach beschrieben (Seeger W et al; 1990, Seeger W et al; 1995, Sachs UJ et al; 2006). Durch das Experiment am isolierten Organ wird eine Beeinflussung durch humorale, zentrale oder metabolische Einflüsse ausgeschlossen. Während des Versuchs wurden der pulmonalarterielle Druck, der venöse Druck, das relative Gewicht und der Ventilationsdruck gemessen. Diese Parameter wurden während der Versuchsreihe kontinuierlich aufgezeichnet.

*Vorbereitung des Perfusionssystems:*

Das System wurde vor jedem Versuch bei 60°C mit Detergentien und anschließend mit destilliertem Wasser maschinell gereinigt.

Zusätzlich erfolgte nach Aufbau des Systems eine Spülung aller Schläuche mit 2 l Aqua dest., 2 l physiologischer Kochsalzlösung und einem Liter Perfusionslösung.

Zum Ende des Spülvorganges wurde das Schlauchsystem vollständig mit der Perfusionslösung gefüllt, auf 4°C gekühlt und von Luftblasen befreit.

*Perfusionssystem:*

Die Perfusion erfolgte über eine Schlauch-Peristaltikpumpe mit einem pulsativen Flow. Diese sorgte dafür, dass 14 ml/min Perfusionslösung während des Versuches durch das System flossen. Bei dem Perfusat handelte es sich um Perfusionslösung II/N (Serag-Wiessner KG, Naila, Deutschland), welche vor Versuchsbeginn mit Hilfe von Nabic 8,4%-Lösung (Fluka) auf einen pH-Wert zwischen 7,3 und 7,35 eingestellt wurde.

Ausgehend von zwei doppelwandigen Vorratsbehältnissen durchfloss die Perfusionslösung zunächst die Pumpe. Zur Vermeidung einer pulmonalarteriellen Luftembolie wurde hinter die Pumpe eine Blasenfalle eingebaut, um Luftblasenfreiheit sicherzustellen. Danach passierte die Perfusionsflüssigkeit einen Wärmeaustauscher, um dann über den pulmonalarteriellen Zufluss in die Pulmonalarterie zu gelangen.

Nach Lungenpassage erfolgte der linksventrikuläre Abfluss über ein Kaskadensystem, durch das eine Widerstandsregulierung möglich war. Der Kreislauf endete wieder in den doppelwandigen Vorratsbehältern, welche einen Wechsel des Perfusats ohne Perfusionsunterbrechung der Lunge möglich machten.

70 ml Perfusatflüssigkeit befanden sich in dem doppelwandigen Glasvorratsbehältnis und 70 ml im Schlauchsystem, welches selbst aus mit Konnektionsstücken verbundenen PVC- und Silikonschläuchen bestand.

Demnach befanden sich insgesamt 140 ml Perfusatlösung während eines Versuches im Kreislaufsystem.

#### *Präparation der Lunge:*

Der Versuch wurde vom Regierungspräsidium Gießen unter dem Aktenzeichen V 54-19 c 20-15 (1) GI 20/8 Nr.65/2010 genehmigt. Bei den Versuchstieren handelte es sich um CD-Ratten männlichen Geschlechts mit einem Gewicht zwischen 300 und 400g.

Zur Versuchsvorbereitung wurde dem Versuchstier eine Injektionsnarkose mit einem Gemisch aus 0,6 ml Narcoren (Merial GmbH, 85399 Hallbergmoos, Deutschland) und 0,4 ml NaCl (Serag-Wiessner KG) behutsam intraperitoneal verabreicht. Initial wurde mit 0,3 ml begonnen und dann ggf. in 0,05 ml Schritten nachgegeben. Nach erreichter tiefer Bewusstlosigkeit wurde das Versuchstier in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert, und es erfolgte die lokale Betäubung im Kehlkopfbereich mit 0,5 ml Xylocain 2 % (ASTRA Chemicals GmbH, Wedel/Holstein, Deutschland), welches subkutan verabreicht wurde. Zusätzlich erfolgte eine Antikoagulation mit 0,4 ml Heparin-Natrium-25000-ratiopharm (Ratiopharm GmbH, Deutschland) mit 1000 IU/kg, ebenfalls subkutan verabreicht. Nachfolgend wurde der Cervikal-, Thorax-, und Abdominalbereich mit Braunoderm (Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) desinfiziert.

Die Narkosesituation wurde durch kontinuierliche Überprüfung der Vitalreflexe, wie Lidreflex und Zwischenzehenreflex, kontrolliert.

Zunächst erfolgte nach dem Hautschnitt die Freilegung der Trachea unter Schonung der großen Gefäße und des Nervus vagus. Die freigelegte Trachea wurde nun kaudal des Kehlkopfes von ventral durch Querinzision eröffnet und mit einem Tubus (1mm) intubiert. Zuvor wurde die Trachea mit einem Faden unterfahren, mit diesem nun der Tubus fixiert wurde. Die Beatmung mit NOX-

Gas wurde mit einer Beatmungsfrequenz von 64 Atemzügen in der Minute, bei einem Atemzugvolumen von 4 ml / kg und einem positiven endexpiratorischen Druck von 1,5 cm Wassersäule (PEEP) durchgeführt.

Nach Intubation und regelmäßiger Beatmung erfolgte die sorgfältige Präparation von Haut und Muskulatur und im weiteren Verlauf die Eröffnung des Bauchraumes mittels Laparotomie im epigastrischem Winkel. Der Processus xiphoideus wurde mit einer Klemme gefaßt und der Bauchschnitt parallel entlang der Rippenbögen erweitert. Es erfolgte die Perforation des Diaphragmas, dessen Ablösen entlang der Rippenbögen und dessen Fixierung durch eine Klemme nach kaudal vorgenommen wurde. Dies ermöglichte die Eröffnung der Pleurahöhlen ohne Beschädigung der Lungen. Im Anschluss folgte eine paramediane Sternotomie mit Fixierung beider Thoraxhälften.

Danach wurde der Thymus stumpf abgetragen und der Herzbeutel eröffnet. Im weiteren Verlauf wurde die Herzspitze mittels Klemme fixiert und die linke Herzkammer durch einen kleinen Entlastungsschnitt eröffnet. Bei schlagendem Herzen wurde die Pulmonalarterie samt Aorta vorsichtig mit einem Bindfaden unterfahren und umschlungen. Nach Eröffnung der Pulmonalarterie durch Querinzision erfolgte das Einführen des Katheters. Mit einer Ligatur des zuvor gelegten Bindfadens wurde der Katheter in der Pulmonalarterie fixiert. Nach Fixierung des Pulmonalkatheters wurde die Herzspitze abgetrennt und somit die beiden Herzventrikel eröffnet. Dies ermöglichte einen guten Abfluß des Perfusats, um eine Schädigung der Lunge durch Stauung zu vermeiden. Danach trat der Tod des Tieres ein.

Ab diesem Zeitpunkt wurde die Rattenlunge mit auf 4°C gekühltem Perfusat durchspült. Für einen regelmäßigen Fluss des Perfusats von 9 ml / min sorgte die Schlauch-Peristaltikpumpe. Unter ständiger Perfusion und Ventilation wurde das Geschlinge, welches aus Trachea, Lunge und Herz bestand, aus dem umgebendem Mediastinum herausgelöst. Dies erfolgte behutsam von kranial nach kaudal entlang der Wirbelsäule.

Nun konnte das Organpaket in die Wägezelle eingehängt werden. Nach dem Einführen des Katheters in den linken Ventrikel wurde dieser mit Hilfe einer Bindfadenligatur, die zuvor ums Herz gelegt wurde, fixiert. Der venöse Katheter konnte nun mit dem abführenden Teil des Schlauchsystems verbunden werden. Zusätzlich wurde ein doppelwandiges Glasbehältnis, in welches ein feuchtes Tuch gelegt wurde, unter das Organpaket plaziert. Dieses diente der zusätzlichen Erwärmung und Feuchthaltung der isolierten Organe.

Das Organpaket befand sich ab diesem Zeitpunkt in einem künstlichen Kreislaufsystem, welcher den Herz-Lungen-Kreislauf der Ratte ersetzen sollte.

Es erfolgte zunächst eine Spülung der Lungen mit einem Liter Perfusionslösung bei noch offenem Perfusionskreislauf, um verbliebene Blutrückstände zu entfernen. Danach wurde das System mit 140 ml frischem Perfusat gefüllt und der Kreislauf geschlossen.

Das Perfusat trat durch den Pulmonalkatheter ein und floss durch den venösen Katheter (2 mm) ab. Der pulmonalarterielle Druck wurde auf 10-12 mm Hg eingestellt. Hier diente die Herzbasis als Referenzpunkt. Der Druck im linksventrikulären Ausflusstrakt wurde auf 0,5-0,8 mm Hg, mit dem Lungenhilum als Referenzpunkt, eingestellt. Zusätzlich wurde ein positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 1,5 festgelegt.

Anschließend erfolgte die Erwärmung des gesamten Systems durch die Umspülung der doppelwandigen Vorrats-Glasbehälter mit erwärmter Flüssigkeit durch eine Thermopumpe. Die Temperatur wurde auf 39°C gehalten. Danach erfolgte eine langsame Steigerung der Perfusionsgeschwindigkeit auf 14 ml/min. Des Weiteren wurde eine pH-Wertkontrolle durchgeführt und ggf. fand eine Regulierung des Wertes durch Zugabe von Natriumbikarbonat oder neutraler Pufferlösung statt, bis der gewünschte Wert von 7,3-7,35 erreicht wurde.

Jedem Versuch wurde eine Steady-State-Phase von 20 Minuten vorgeschaltet. Nur wenn die Werte der Lunge (Gewicht und Drücke) über diese Phase hinweg

konstant blieben, wurden die Daten des Versuchs in der Auswertung berücksichtigt.

Für diese Versuchsreihe wurden ausschließlich Lungen mit einer homogenen, weißen Oberfläche, welche frei von Atelektasen oder Infiltrationen waren, verwendet.

#### *Beatmungssystem:*

Ein Harvard-Kleintierventilator (SAR-830/P, Ventilator, Woodland Hills CA, USA) gewährleistete eine regelmäßige Beatmung mit einer Frequenz von 64 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 12 ml. Über ein PEEP-System wurde die Expiration geregelt. Der endexpiratorische Druck betrug für diese Versuchsreihe 1,5 cm Wassersäule. Es wurde normoxisches Gas (21% O<sub>2</sub>, 5,3% CO<sub>2</sub>, 91,7% N<sub>2</sub>) verwendet.

#### *Substanzapplikation:*

Die zu untersuchenden Substanzen wurden über einen Injektionsstopfen, welcher sich vor dem pulmonalarteriellen Katheter befand, injiziert. Die Zugabe von größeren Mengen über 6 ml erfolgte durch entsprechenden Austausch von Perfusat aus dem doppelwandigen Vorratsgefäß.

Je nach Versuchsansatz wurden nach der ersten Kaskade, welche auf die Steady-State-Phase folgte, in der 30. Minute 100 Mio. neutrophile Granulozyten und / oder 10 Mio. Monozyten durch den Injektionsstopfen appliziert. Die Blutzellen wurden zuvor in 1 ml PBS aufgenommen.

Die Zugabe von 7 µM fMLP (Orpegen Pharma, Deutschland), 6 ml Monozytenüberstand sowie 75 µg 7D8 (Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Gießen) erfolgte bei entsprechender Versuchsreihe ebenfalls gemeinsam mit der Blutzellsuspension durch den Injektionsstopfen.

14 ml des entsprechend zu untersuchenden Plasmas wurden durch Austausch der selbigen Menge an Perfusatlösung dem Versuchskreislauf zugeführt.

In der Versuchsreihe mit LPS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurde der narkotisierten Ratte 2 h vor Versuchsbeginn 2 mg/kg der entsprechenden Substanz intraperitoneal verabreicht.

*Probenentnahme:*

Der pH-Wert sollte sich während des Versuches zwischen 7,3 und 7,35 befinden. Versuche mit abweichenden pH-Werten wurden aus der Versuchsreihe ausgeschlossen. Während eines Versuches wurden stündlich über einen Dreiwegehahn Perfusatproben entnommen, um eine pH-Wert-Kontrolle durchzuführen.

*Beschreibung des Versuchsablaufes:*

Nach der Narkotisierung und Präparation des Versuchstieres mit anschließender Entnahme des entsprechenden Organpaketes und dessen Einschalten in das System erfolgte der einmalige Austausch von 140 ml frischem Perfusat. Um den Fluss nicht zu unterbrechen, wurden zwei Glasbehältnisse in das System geschaltet und nun das zurückgehaltene frische Perfusat durch ein Regelschaltssystem in den Kreislauf geleitet. Das bislang verwendete Perfusat wurde ebenfalls über diese Regelschaltung abgeleitet.

Die Temperaturerhöhung des Perfusats auf 39°C erfolgte im direkten Anschluss. Des Weiteren wurde die Fließgeschwindigkeit auf 14 ml/min hochgefahren. Anschließend wurden die entsprechenden Drücke kontrolliert und auf die festgelegten Werte eingestellt.

Nach der Abfolge dieser Einstellungen wurde der Versuch mit einer Steady-State-phase von ca. 20 min begonnen. Während dieser erfolgte die Gewichtseichung anhand eines 1 Gramm-Gewichts zur Ermittlung des relativen Gewichts des Organpaketes.

Die Steady-State-Phase wurde mit der ersten Druckerhöhung von 10 cm Wassersäule auf venöser Seite mit Hilfe des Kaskadensystems beendet. Hierzu

wurde das Perfusat durch Abklemmen an entsprechender Stelle im Schlauchsystem durch eine Wasserfalle geleitet, welche genau 10 cm betrug. Eine Kaskadenphase betrug genau 12 min mit 2 min Vor- und Nachlaufzeit. Diese Druckerhöhung erfolgte, um den Zustand des Lungenendothels zu überprüfen.

Nach der ersten Kaskade erfolgte die Zugabe der zu untersuchenden Substanzen. Je nach Fragestellung erfolgte die zweite Zugabe nach der zweiten Kaskade. Insgesamt wurden während eines Versuches fünf Kaskaden vorgenommen, also eine fünfmalige Druckerhöhung auf das Organpaket durchgeführt.

Jeder Versuch lief über mindestens 120 min. Die Zeitabstände zwischen den einzelnen Kaskaden wurden gleich gehalten. Nach Beendigung eines Versuches wurde die Gewichts Differenz in Gramm zwischen Versuchsbeginn und Versuchsende ermittelt. Anhand dieser konnte die Flüssigkeitseinlagerung in die Lunge bzw. der Lungenendothelschaden quantitativ bewertet werden.

#### *Registrierung der Parameter:*

Während jedes Versuchs wurden die zur Auswertung benötigten Parameter, wie pulmonalarterieller Druck (PAP), linksventrikulärer Druck (LVP), das relative Organgewicht (g), der Ventilationsdruck (VP) und der positive endexpiratorische Druck (PEEP) kontinuierlich aufgenommen. Der pulmonalarterielle und der linksventrikuläre Druck konnten mit Hilfe von im Schlauchsystem liegender Katheter, die mit einem elektromechanischen Druckwandler verbunden waren, gemessen werden. Der Beatmungsdruck wurde auf gleiche Weise erfasst. Die Signale wurden von dem Druckwandler über einen Messverstärker an einen verbundenen Computer weitergeleitet und aufgezeichnet.

Da die Lunge während des Versuches in einer Wägezelle eingehangen war, konnten hier ebenfalls über einen Messverstärker die Werte des Lungengewichtes von dem Computer aufgenommen werden. Die Werte dieser

Parameter dienen der Auswertung der Versuchsreihe anhand des Modells der isolierten, perfundierten und ventilierten Rattenlunge.

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Aufklärung der Zytokin- und LTB<sub>4</sub>-Produktion von Monozyten**

#### *4.1.1 Funktionelle Untersuchungen*

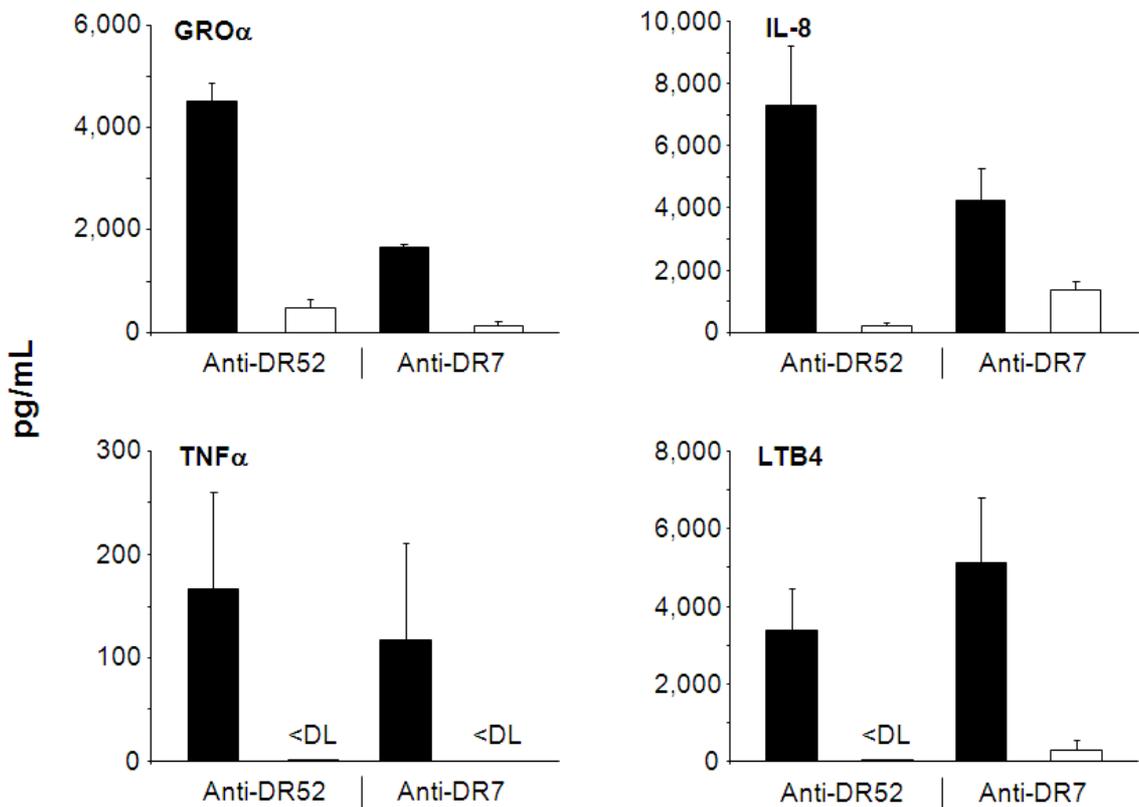
Die Monozyten wurden von gesunden Spendern des Institutes für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Uniklinikums Giessen-Marburg gewonnen. Bei den Blut Spendern handelte es sich um Personen mit bekanntem HLA Klasse II-Antigenmuster. Es wurden insgesamt neun Spender mit jeweils einem Plasma, dessen Antikörper zu dem Antigenmuster des Spenders passten (positiver Überstand) und einem von den Antigenmerkmalen abweichenden Plasma (negativer Überstand) getestet. Um eine größere Aussagekraft der Testergebnisse zu erzielen, wurden den einzelnen Spenderpersonen zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten Blut abgenommen und der Test durchgeführt.

Um diese Monozytenüberstände herzustellen, wurden pro Ansatz 150.000 Monozyten mit einer festgelegten Menge des entsprechenden Plasmas inkubiert. Die Überstände wurden anschließend bei -70°C gelagert.

Ob merkmalspositive Monozyten mit dem entsprechenden Antikörper, hier HLA Klasse II Antikörper der Spezifität Anti-DR52 und Anti-DR7, eine stärkere Produktion von Zytokinen zeigen als merkmalsnegative Monozyten, wurde anhand eines kommerziellen ELISA-Tests vergleichend untersucht.

Sowohl die Zytokinkonzentrationen als auch die Konzentration von LTB<sub>4</sub> wurden für den positiven (schwarzer Balken) und negativen Monozytenüberstand (weißer Balken) in pg/ml angegeben.  $P < 0,01$  für die Experimente mit positiven und negativen Monozytenüberstand.  $<DL$  unter der Nachweisgrenze (siehe Abb. 6).

Abb. 6: Zytokinkonzentrationen von GROalpha, IL-8, TNFalpha und von LTB4 des positiven und negativen Monozytenüberstandes, untersucht im ELISA-Testverfahren



Quelle: Sachs UJ, Wasel W et al; Blood 2011

HLA Klasse II Antikörper verursachen eine Aktivierung gematchter Monozyten. Merkmalspositive, „matched“ (schwarze Balken) und merkmalsnegative, „unmatched“ (weiße Balken) humane Monozyten wurden zuvor mit humanem Anti-DR52 oder Anti-DR7 inkubiert. Der entstandene Überstand wurde daraufhin nach 6 Stunden Inkubationszeit auf die Anwesenheit von Zytokinen und LTB4 hin untersucht.  $P < 0.01$  zwischen „matched“ und „unmatched“ Experimente für alle Gruppen. <DL, unter der Nachweisgrenze. N= 4 pro Gruppe

#### 4.1.1.1 GRO alpha Produktion der Monozyten nach Antikörpersimulation

Im ELISA-Testverfahren zeigten sich Unterschiede in den GRO alpha-Konzentrationen, abhängig von der Zugabe des Monozytenüberstandes. In den Versuchen mit positivem Monozytenüberstand wurde eine mittlere GROalpha-Konzentration von  $4440 \pm 340$  pg/ml gemessen und in den Versuchansätzen mit

negativem Überstand eine mittlere Konzentration von  $460 \pm 160$  pg/ml, hergestellt mit dem HLA Klasse II Antikörper DR52.

In den Monozytenüberständen mit dem für die Herstellung verwendeten HLA Klasse II Antikörper DR7 konnte im positiven Überstand eine mittlere Konzentration von  $1640 \pm 30$  pg/ml und vergleichend dazu im negativen eine mittlere Konzentration  $120 \pm 40$  pg/ml nachgewiesen werden (siehe Abb.6).

#### *4.1.1.2 Interleukin 8 Produktion der Monozyten nach Antikörperstimulation*

In den Konzentrationsbestimmungen von Interleukin 8 zeigten sich ebenfalls Unterschiede, abhängig von der Zugabe des jeweiligen Monozytenüberstandes. Die Monozyten zeigten eine stärkere Produktion von Interleukin 8, wenn ein Antikörper im Plasma zu dem Antigenmerkmal des Monozyten passte (im positiven Überstand), als in Anwesenheit eines Antikörpers im Plasma, welcher vom Antigenmuster des Monozyten abwich (mit negativem Überstand).

Im positivem Überstand, hergestellt aus dem HLA Klasse II Antikörper DR52 und Merkmals-positiven Monozyten wurde eine mittlere Konzentration von  $7250 \pm 1900$  pg/ml und mit Merkmals-negativen Monozyten eine mittlere Interleukin 8-Konzentration von  $200 \pm 33$  pg/ml gemessen (siehe Abb.6). In dem positiven Überstand von DR7 betrug die mittlere Konzentration  $4216 \pm 1033$  pg/ml und im negativen Monozytenüberstand mit DR7 erhielten wir eine mittlere Konzentration von  $1350 \pm 283$  pg/ml.

#### *4.1.1.3 TNF alpha Produktion der Monozyten nach Antikörpersimulation*

Im TNF alpha ELISA wiesen die Konzentrationen gleiche Tendenzen wie in den zuvor genannten ELISA-Testverfahren auf. Allerdings fiel die TNF alpha Produktion der Monozyten im Vergleich zu den mittleren Konzentrationen von Interleukin 8 und GRO alpha insgesamt deutlich niedriger aus.

Für den positiven Überstand mit DR52 wurden mittlere Konzentrationen von  $166 \pm 92$  pg/ml gemessen und für den mit DR7 eine Konzentration von  $116 \pm 93$  pg/ml (siehe Abb.6). Bei beiden negativen Monozytenüberständen war keine Produktion von TNF alpha feststellbar.

#### 4.1.1.4 *Leukotrine B4 Produktion der Monozyten nach Antikörperstimulation*

Auch in diesem ELISA-Verfahren zeigten sich die antikörperabhängigen Leukotrine B4 Konzentrationsunterschiede.

Die positiven Überstände mit DR52 wiesen einen mittleren Konzentrationswert von  $3346 \pm 1080$  pg/ml auf (siehe Abb.6). Die mittlere Konzentration aus den Versuchen mit negativen Monozytenüberständen befand sich unter der Nachweisgrenze. Die positiven Überstände mit DR7 ergab eine mittlere Konzentration von  $5093 \pm 1653$  pg/ml und die mittlere Konzentration der negativen Monozytenüberstände mit DR7 betrug  $293 \pm 226$  pg/ml.

## 4.2 **Untersuchung der Sauerstoffradikalbildung von neutrophilen Granulozyten durch Monozytenüberstand**

### 4.2.1 *Durchflusszytometrische Untersuchungen*

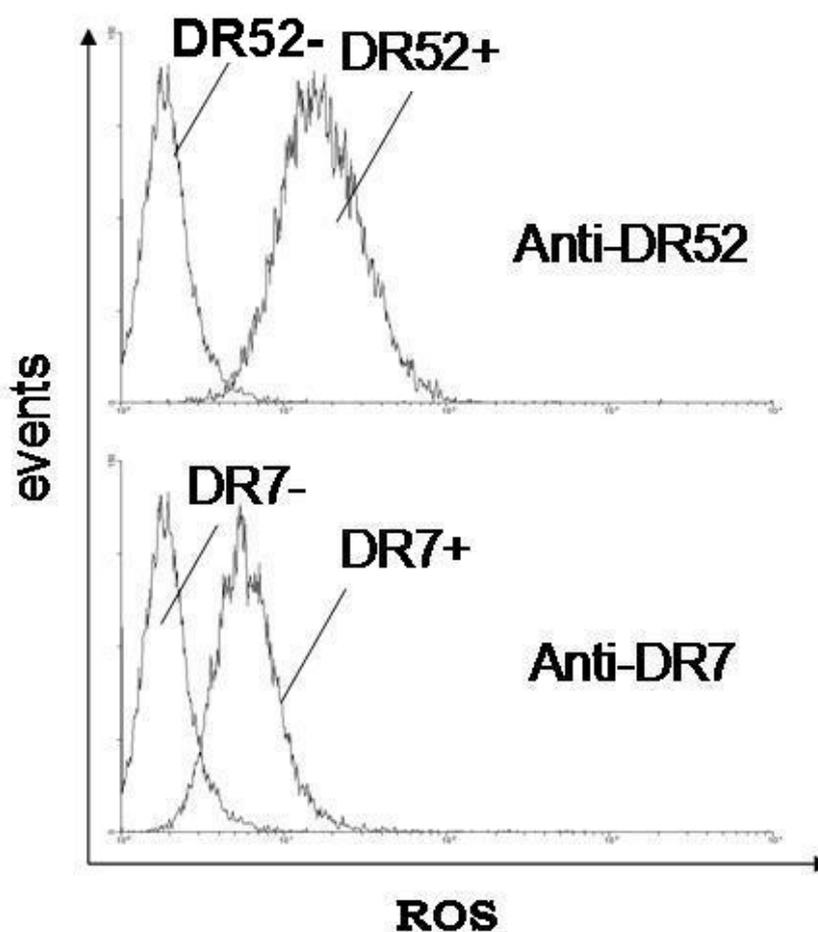
Für diese durchflusszytometrische Untersuchung wurde ein kommerzielles Bursttest-Kit verwendet. Die untersuchten Blutzellen wurden unmittelbar vor Testbeginn von gesunden Spendern im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Uniklinikums Giessen-Marburg gewonnen. Als Untersuchungsmaterial dienten die hergestellten Monozytenüberstände aus den funktionellen Untersuchungsmethoden. Es wurden Granulozyten mit positivem Überstand (Antikörper passte zum Antigen des Monozyten) und negativem Überstand (Antikörper passte nicht zum Antigen des Monozyten) inkubiert, mit den entsprechenden Substanzen des Testkit versetzt und am FACS-Calibur durchflusszytometrisch untersucht.

#### 4.2.1.1 *Bursttest*

Humane Neutrophilensuspension wurde mit positiven und negativen Überständen inkubiert, welche durch Vorinkubation von Monozyten mit humanen HLA Klasse II Antikörpern (match oder unmatched) gewonnen worden. Hier wurden wieder die Antikörper der Spezifität Anti-DR52 und Anti-DR7 mit jeweils merkmalsnegativen und merkmalspositiven Monozyten verwendet. Nach der Zugabe von fMLP erfolgte die Messung der oxidativen Burstaktivität von

Neutrophilen mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Im Bursttest konnte festgestellt werden, dass die neutrophilen Granulozyten, welche mit dem positiven Überstand inkubiert wurden, eine höhere mittlere Fluoreszenzintensität zeigten als die neutrophilen Granulozyten, welche mit dem negativen Überstand inkubiert wurden. Das heißt, je höher die mittlere Fluoreszenzintensität, desto stärker die Ausschüttung bzw. Produktion an Sauerstoffradikalen von Seiten der Granulozyten. (siehe Abb.7)

Abb. 7: : Oxidative Burstreaktionen der neutrophilen Granulozyten



Quelle: Sachs UJ, Wasel W et al; Blood 2011

**Positiver Monozytenüberstand, sowohl von DR52 (MFI=170±20) als auch von DR7 (MFI=52±11) verursacht eine stärkere Aktivierung bzw stärkere oxidative Burstaktivität der Neutrophilen als der jeweilige negative Überstand. Die mittlere Fluoreszenzintensität der negativen Monozytenüberstände von DR52 ergibt eine MFI von 12±5 und für die Versuche mit DR7 7±4. Die Bilder sind repräsentativ für n=7 unabhängige Versuchen**

### **4.3 Untersuchungen des Einflusses von Monozytenüberständen und neutrophilen Granulozyten auf Endothelzellen**

#### *4.3.1 Zellspezifische Untersuchungen*

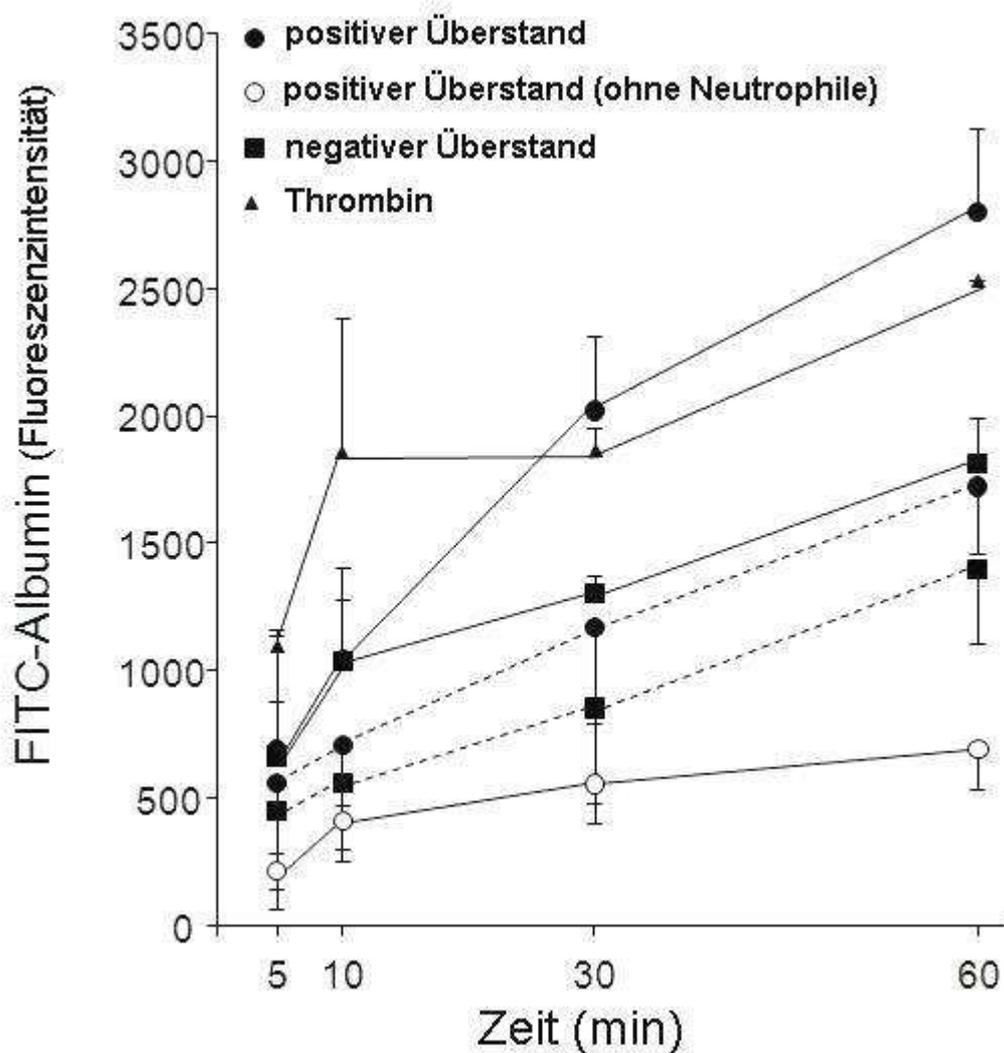
Auch in diesen Testverfahren dienten wieder die hergestellten Monozytenüberstände (negativ und positiv) aus den funktionellen Untersuchungsmethoden als Untersuchungsmaterial. Die für die Untersuchungen verwendeten neutrophilen Granulozyten wurden auch hier unmittelbar vor Testbeginn von gesunden Spendern im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Uniklinikums Giessen-Marburg gewonnen. Die getesteten humanen Nabelschnurzellen wurden bis zum Untersuchungsbeginn bei -70°C in Stickstoff gelagert.

#### *4.3.2 Permeabilitätstest*

Für diese Untersuchungsmethode wurden HUVECs auf Transwellplatten ausgesät und solange kultiviert bis eine ausreichende Wachstumskonfluenz erreicht war. FITC-markiertes Albumin, Neutrophile und Monozytenüberstand wurde dem oberen Kompartiment zugeführt. Die Anwesenheit von FITC-Albumin wurde zu festgesetzten Zeitpunkten im unteren Kompartiment gemessen. Die Experimente wurden auch in dieser Untersuchungsmethode wieder vergleichend mit positivem und negativem Monozytenüberstand durchgeführt. Thrombin diente als Positivkontrolle. Die Experimente wurden in Anwesenheit von Diphenyleneiodoniumchloride (DPI), welches die Oxidaseaktivität von NADPH blockiert (unterbrochene Linie), zusätzlich durchgeführt.

In dieser Testmethode konnte eine höhere Permeabilität der Zellen in den Ansätzen mit positivem Überstand festgestellt werden. In den Ansätzen, in welche negativer Überstand hinzugegeben wurde, diffundierte weniger FITC-markiertes Albumin hindurch, d.h. die Permeabilität der Zellen fiel hier niedriger aus. (siehe Abb.8)

Abb. 8: FITC-Albuminmessung im Permeabilitätstestverfahren



Quelle: Sachs UJ, Wasel W et al; Blood 2011

**Neutrophile, welche durch Monozytenüberstand aktiviert wurden sind, beeinflussen die Barrierefunktion von HUVECs.**

Die Experimente mit positivem und negativem Monozytenüberstand sind durch die Symbole Kreise und Vierecke gekennzeichnet. Thrombin wurde als Positivkontrolle verwendet (Dreiecke). Experimente in Anwesenheit von DPI sind durch eine unterbrochene Linie dargestellt. Versuche mit positiven Überstand, aber ohne Zugabe von neutrophilen Granulozyten sind durch leere Kreise gekennzeichnet.  $P < 0.01$  für positiven Überstand im Vergleich zu negativem Überstand.  $N=5$  für jedes einzelne Experiment.

#### **4.4 Aufklärung des Einflusses von Neutrophilen, Monozyten, Lungenendothelzellen und HLA Klasse II-Antikörper bei der Entstehung einer TRALI und deren Zusammenspiel in diesem Pathomechanismus (Abb. 9/10)**

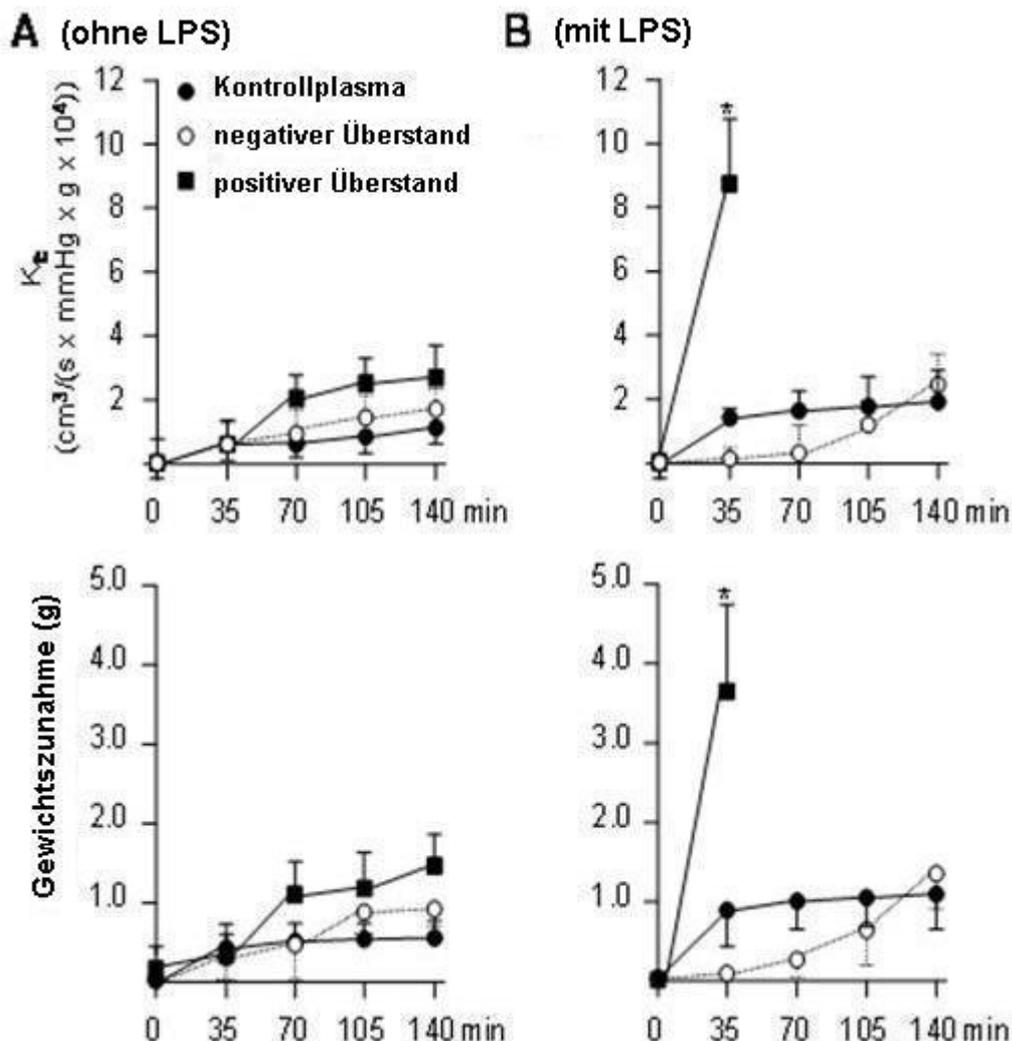
##### *4.4.1 Tierexperimentelle Untersuchungen*

Die Untersuchungen am isolierten Rattenlungenmodell wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Norbert Weissmann, University of Giessen and Marburg Lung Center (UGMLC) durchgeführt. Als Untersuchungsmaterial dienten neutrophile Granulozyten und Monozyten, welche kurz vor Testbeginn im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Uniklinikums Giessen-Marburg von freiwilligen, gesunden Blutspendern gewonnen und isoliert wurden. Die humanen Blutzellen wurden in PBS resuspendiert und unmittelbar nach Gewinnung dem geschlossenen Kreislaufsystem zugeführt. Die Plasmen mit den humanen Antikörpern gegen HLA Klasse II wurden bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zum Testbeginn gelagert. Als zusätzliches Untersuchungsmaterial diente fMLP und LPS, welches zuvor aliquotiert und bis zum Testeinsatz bei  $-20^{\circ}\text{C}$  im Institut aufbewahrt wurde. Desweiteren wurden auch in diesem Testverfahren der positive und negative Monozytenüberstand eingesetzt.

##### *4.4.1.1 Ex vivo-Rattenlungenmodell mit positivem und negativem Monozytenüberstand mit und ohne LPS-Vorstimulation*

Die Lungen wurden mit neutrophilen Granulozyten und Monozytenüberstand perfundiert. (A) In den Versuchen, bei denen keine Vorstimulation mit LPS stattfand, kam es sowohl bei dem Zusatz von negativen als auch von positivem Überstand zu keinem signifikanten Gewichtsanstieg ( $P > 0,05$ ). (B) Dieser erfolgte allerdings bei der Zugabe von neutrophilen Granulozyten und positivem Überstand, wenn zuvor eine Stimulation mit LPS erfolgte. Es kam zu einem signifikanten Gewichtsanstieg der Lunge sowie einem Anstieg des Kfc in  $t=35\text{min}$  ( $P < 0,01$ ). Dieser Effekt blieb in den Versuchen mit Granulozyten und negativem Überstand über den Beobachtungszeitraum von 140 min aus (siehe Abb.9).

Abb. 9: Relative Gewichtszunahme durch Zugabe von Monozytenüberstand



Quelle: Sachs UJ, Wasel W et al; Blood 2011

HLA Klasse II Antikörper verursachen TRALI in einem *ex vivo* Rattenlungenmodell.

(A) Keine signifikante Gewichtsänderung bzw Anstieg des kapillären Filtrationskoeffizienten ( $K_{fc}$ ) der perfundierten Rattenlungen bei nicht erfolgter Vorstimulation mit LPS ( $P = 0.05$ ) für positiven verglichen mit negativem Überstand in  $t=140$  min. (B) Nach Vorstimulation der Ratten mit LPS, 2h vor Lungenexenteration, ist ein signifikanter Gewichtsanstieg und Anstieg des  $K_{fc}$  in  $t=35$  min in Anwesenheit von positivem Monozytenüberstand festzustellen ( $P < 0.01$ ).

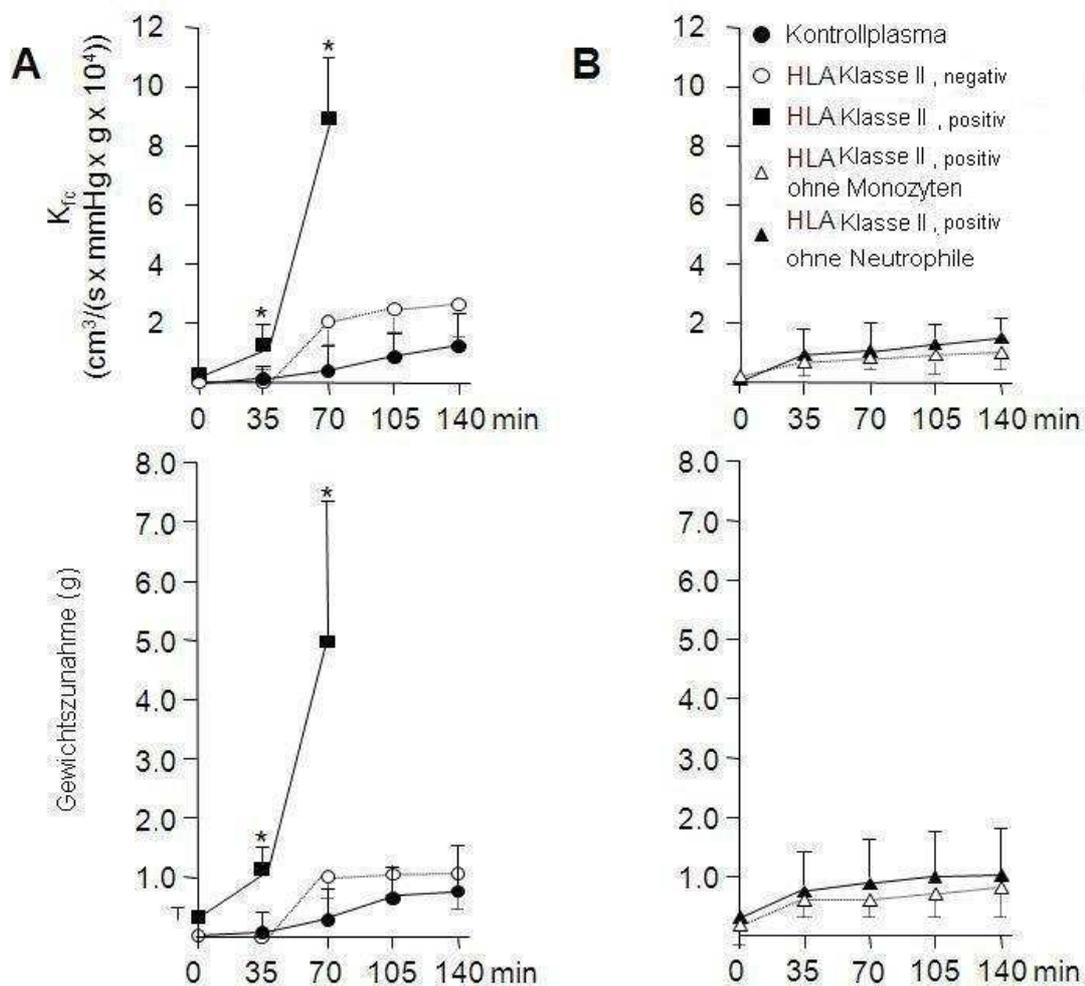
N=7 für jedes Experiment.

#### 4.4.1.2 *Ex vivo-Rattenlungenmodell mit Granulozyten, Monozyten und HLA Klasse II-Antikörper mit LPS Vorstimulation*

In den Versuchen, in denen humane neutrophile Granulozyten, Monozyten und HLA Klasse II Antikörper, welche nicht zum Antigenmuster des Monozyten passten, eingesetzt wurden, war kein Gewichtsanstieg und kein Anstieg von Kfc der Rattenlunge festzustellen (A, offene Kreise). In den Versuchsansätzen, in denen derselbe Antikörper und neutrophile Granulozyten, aber mit Monozyten, dessen Antigenmuster zum Antikörper passte, eingesetzt wurde, erfolgte in t=35min sowohl ein Gewichtsanstieg als auch ein Anstieg des Kfc in t=70 (A, schwarze Vierecke;  $P < 0,01$ ).

Der Gewichtsanstieg der Rattenlunge blieb aus, wenn keine Zugabe von humanen Neutrophilen (B, schwarze Dreiecke) oder humanen Monozyten (B, weiße Dreiecke) in den Kreislauf erfolgte (siehe Abb.10).

Abb. 10: Relative Gewichtszunahme durch Zugabe von Monozyten, Granulozyten und HLA Klasse II-Antikörper mit Vorstimulation



Quelle: Sachs UJ, Wasel W et al; Blood 2011

HLA Klasse II Antikörper verursachen TRALI in einem *ex vivo* Rattenlungenmodell in der Anwesenheit von humanen Neutrophilen und zum Antigen passenden humanen Monozyten.

(A) Anwesenheit von Neutrophilen, HLA Klasse II Antikörpern und merkmalsnegativen Monozyten, welche kein passendes Antigen tragen (offener Kreis). Anwesenheit desselbigen Antikörpers, Neutrophilen aber merkmalspositiven Monozyten mit passendem Antigenmuster (schwarze Vierecke;  $P < 0.1$ ).

(B) Keine Zugabe von humanen Neutrophilen (offene Dreiecke) oder humane Monozyten (schwarze Dreiecke).  $N=3$  für jedes Experiment

## 5 DISKUSSION

Aufgrund der Tatsache, dass in der Mehrzahl der bislang untersuchten TRALI-fälle HLA Klasse II Antikörper nachgewiesen worden (Kopko et al., 2001), wurde in der vorliegenden Arbeit der pathophysiologische Mechanismus der durch HLA Klasse II Antikörper ausgelösten TRALI untersucht.

Ein solcher ist nach bisherigem Wissensstand und vorliegenden Untersuchungen mit der Zwischenschaltung von humanen Monozyten naheliegend (Kopko et al., 2001, Kopko et al., 2003). Es wurde vermutet, dass HLA Klasse II-Antikörper über die Bindung von Monozyten zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten führen, welche letztlich zur Schädigung des Lungenendothels und nachfolgend zum Auftreten eines Lungenödems beitragen.

Hier besteht die Möglichkeit, dass HLA Klasse II Antikörper an Monozyten, welche die entsprechenden Antigene exprimieren, binden können und dadurch eine Freisetzung von potenten, aktivierenden Zytokinen und dem Entzündungsmediator LTB<sub>4</sub> induzieren. Dieser mögliche indirekte Aktivierungsweg über die Zwischenschaltung von Monozyten steht im Einklang mit kürzlich veröffentlichten Berichten, welche die vermehrte Expression von intrazellulären Zytokinen und LTB<sub>4</sub> (Kopko et al., 2003; Nishimura et al., 2007) von Seiten der Monozyten, wenn diese mit HLA Klasse II Antikörpern inkubiert werden, beschreiben.

HLA Klasse I und HNA Antikörper, welche in Verbindung mit TRALI stehen, können direkt an Oberflächenantigene von neutrophilen Granulozyten binden. Man geht davon aus, dass entweder eine Rezeptorvernetzung oder eine direkte Rezeptoraktivierung eine Signalkette zur Folge hat, welche wiederum eine Aktivierung von Granulozyten hervorruft und letztlich in einer Beeinflussung der Permeabilität des Lungenendothels endet (Sachs et al., 2006; Kehler et al., 2009; Sachs et al., 2004; Greinacher et al., 2010).

Dieser Mechanismus ist allerdings nicht auf HLA Klasse II Antikörper übertragbar, da HLA Klasse II Antigene üblicherweise nicht auf der Zelloberfläche von Neutrophilen zu finden sind.

Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass besonders GROalpha und Interleukin 8 zu solchen potenten Aktivatoren von Neutrophilen zählen, da diese eine starke Freisetzung von Sauerstoffradikalen und sekundärer Granula von Seiten des neutrophilen Granulozyts führen ( Metzner et al., 1995; Wyman et al., 2002; Baggiolini et al., 1989) . LTB4 ist ebenfalls ein wichtiger Vertreter, welcher durch aktivierte Monozyten freigesetzt wird und Neutrophile sowohl rekrutieren, als auch primen kann (Crooks et al., 1989).

Alle drei Substanzen (GROalpha, IL-8, LTB4) konnten in hoher Konzentration in dem hergestellten Monozytenüberstand nach Inkubation mit merkmalspassenden HLA Klasse II Antikörpern nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass diese Substanzen letztlich für die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten in einer HLA Klasse II-abhängigen TRALI verantwortlich sind.

Entgegen unserer Erwartungen konnte TNFalpha nur in einer sehr geringen Konzentration im Monozytenüberstand nachgewiesen werden. Wir nehmen an, dass die Tatsache, dass unsere Untersuchungen in einer Plättchenfreien Umgebung stattgefunden haben, ein Grund für diese Beobachtung ist. Dies erscheint uns plausibel, da P-Selektin, welches auf der Zelloberfläche von aktivierten Thrombozyten zu finden ist, als ein relevanter Aktivator für die Freisetzung von TNFalpha durch Monozyten identifiziert worden ist (Koike et al., 2000).

Desweiteren konnten wir anhand unserer Untersuchungen zeigen, dass die aktivierenden Substanzen, welche nach Inkubation von Monozyten mit HLA Klasse II Antikörpern von Monozyten freigesetzt werden, die oxidative Burstreaktion bei neutrophilen Granulozyten hervorrufen können. Hierbei kommt es von Seiten der Granulozyten zur Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffradikalen, wenn diese durch bestimmte Substanzen stimuliert werden. Diese reaktiven Sauerstoffradikale wurden durchflusszytometrisch am FACS gemessen.

Mit den ELISA-Testverfahren und der durchflusszytometrischen Untersuchung konnten wir die beiden ersten möglichen Schritte des indirekten Aktivierungsweges über Monozyten nachweisen, also die Ausschüttung von potenten Aktivatoren aus Monozyten und die Freisetzung von reaktiven

Sauerstoffradikalen aus Granulozyten. Der letzte Schritt in diesem Aktivierungsweg ist die Permeabilitätserhöhung des Lungenendothels, welche letztlich bei TRALI zu einem Lungenödem führt.

Diese Permeabilitätsveränderung zeigten wir in einer weiteren *in vitro* Versuchsmethodik, wobei die Anwesenheit von Neutrophilen und Monozytenüberständen eine erhöhte Permeabilität von Endothelzellen induzierte. Dieser Effekt blieb durch die Zugabe von DPI, welches die ROS-Synthese der NADPH-Oxidase hemmt, d.h. eine Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffradikalen behindert, aus. Diese Beobachtung weist auf eine zentrale Rolle der ROS in diesem Untersuchungsmodell hin. Wie schon in Untersuchungen zuvor beschrieben, scheint die Produktion von ROS zu einer Störung der endothelialen Barriere bei TRALI zu führen (Sachs et al., 2006). In unseren *in vitro* Versuchen konnte durch ROS die transendotheliale Permeabilität in kultivierten Endothelzellen und eine erhöhte Durchlässigkeit von FITC markiertem Albumin festgestellt werden. Diese Versuchsergebnisse stehen im Einklang mit anderen Untersuchungen, dass eine oxidative Stresssituation die Lungenpermeabilität erhöht, was durch *in vitro* Versuche nachgewiesen werden konnte (Shasby et al., 1985; Holman et al., 1990).

Auch in einigen *ex vivo* Versuchen konnte in zuvor durchgeführten Experimenten ein pulmonales Ödem ausgelöst werden. Hierbei fand eine Perfusion von ROS oder Xanthine/Xanthine Oxidase (welche Sauerstoffradikale umsetzt) in isolierten Lungen von Meerschweinchen (Johnson et al., 1989) und Kaninchen statt (Barnard et al., 1992; Seeger et al., 1995).

Den letzten Schritt des indirekten Aktivierungsweges über Monozyten, also die Permeabilitätsveränderung des Lungenendothels und damit die Entstehung eines Ödems versuchten wir, außer mit den *in vitro* Versuchen, ebenfalls anhand einer *ex vivo* Untersuchungsmethode zu zeigen. Mit Hilfe unseres *ex vivo* Rattenlungenmodells konnten wir zeigen, dass Monozytenüberstand in der Anwesenheit von Neutrophilen eine TRALI auslöst. Dies konnte aber in der Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten nicht gezeigt werden. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass Substanzen, welche durch die Bindung zwischen Monozyten und Antikörpern freigesetzt werden, potente Aktivatoren von Neutrophilen sind. Dieses Ergebnis unterstützt die zuvor in den *in vitro*

Versuchen beschriebene Wichtigkeit bzw. Wahrscheinlichkeit der ersten beiden Schritte des Aktivierungsweges.

Die aktivierten Neutrophilen verursachten sowohl in dem oben genannten in vitro-Versuch als auch in den ex vivo Versuchen eine Permeabilitätserhöhung in der Lunge. Die transfundierten HLA Klasse II Antikörper induzierten in unserem ex vivo Rattenlungenmodell schwere Lungenödeme in einer klinisch relevanten Zeit in Anwesenheit von Monozyten und neutrophilen Granulozyten.

Eine wichtige Beobachtung bei der Nachahmung einer TRALI Reaktion im ex vivo Rattenlungenmodell war, dass bei der Zugabe von humanem Plasma, Monozyten und Neutrophilen eine neutrale Phase von >1h eintrat. Dies konnte in den Versuchen mit direkter Zugabe von Monozytenüberstand und Neutrophilen, was einen Reaktionsweg überspringen würde, nicht beobachtet werden. Diese Beobachtungen könnten zu unserer Annahme passen, dass sich eine TRALI nur entwickelt, wenn eine kritische Konzentrationschwelle an Neutrophil aktivierenden Substanzen, welche durch Monozyten freigesetzt worden sind, überschritten wird.

Desweiteren konnte in der Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten keine Entstehung einer TRALI beobachtet werden, es kam also zu keinem Lungenödem bzw. Gewichtszunahme der Lunge. Diese Beobachtung unterstreicht einmal mehr die angenommene wichtige und zentrale Rolle der neutrophilen Granulozyten im Pathomechanismus der TRALI.

Aktivierte Neutrophile sind nach dieser Entdeckung für die Entstehung einer TRALI zwingend notwendig, da diese für das Zusammenbrechen der endothelialen Barriere der Lunge, wie zuvor schon angesprochen, verantwortlich sind.

Unsere Experimente schließen nicht aus, dass auch eine Entstehung der TRALI durch direkte Bindung der HLA Klasse II-Antikörper an Neutrophile möglich ist.

Es existieren in vitro Untersuchungen, die diesen direkten Aktivierungsweg, also die Möglichkeit der Expression von HLA Klasse II Antikörpern auf Neutrophilen durch stimulierende Substanzen (z.B. IFN- $\gamma$ , IL-3 und GM-CSF), denkbar erscheinen lassen (Mudzinski et al., 1995; Reinisch et al., 2003). Die durchgeführten Experimente in den genannten Arbeiten konnten zwar zeigen, dass GM-CSF (aber nicht G-CSF) oder IFN- $\gamma$  in Patienten eine Expression von

HLA Klasse II auf neutrophilen Granulozyten bewirken kann, jedoch scheint dies nur in einem sehr engen Zeitfenster möglich zu sein. Auch auf den Neutrophilen von Patienten mit Wegener Granulomatose soll eine HLA Klasse II Expression stattfinden (Hänsch et al., 1999) und unter ganz bestimmten Bedingung auch eine Expression auf aktivierten Endothelzellen (Pober et al., 1986).

Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass Patienten eine TRALI erlitten, bei der es zur HLA Klasse II Expression auf diesen beiden Zelltypen kam. Nach unserem Kenntnisstand gibt es hierfür aber keine Belege bei klinischen Fällen in der Literatur.

Einige zur Verfügung stehende Untersuchungen an Patientengut untermauern unsere Theorie der indirekten Aktivierung von Neutrophilen durch Monozyten.

Zum einem konnte in einem Autopsiefall, welcher auf die Anwesenheit von HLA-DR auf Endothelzellen von Alveolarkapillaren und auf Neutrophilen untersucht wurde, kein Hinweis auf das HLA Klasse II Antigen gefunden werden (Kao et al., 2003). Desweiteren haben HLA Klasse II Antikörper in einem in vivo Experiment bei einem gesunden, männlichen Probanden eine TRALI ausgelöst (Flesch und Neppert, 2002). Zusätzlich wurde davon berichtet, dass sich eine Monozytopenie in TRALI-Patienten entwickelt hat, welche mit HLA Klasse II Antikörpern in Zusammenhang gebracht wurde (Flesch und Neppert, 2002; Wallis et al., 2003).

Im Gegensatz zu Beobachtungen, in denen die HNA Antikörper ( Seeger et al., 1990; Sachs et al., 2006) selbst, auch ohne einen zusätzlichen Stimulus fähig waren, eine TRALI in einem ex vivo Rattenlungenmodell zu verursachen, war es in unseren Versuchen nicht möglich, eine TRALI durch HLA Klasse II Antikörper ohne die Voraktivierung des Rattenlungenendothels mit LPS auszulösen.

Es ist anzunehmen, dass Zellumlagerungen des Endotheliums, zu der es durch die Voraktivierung kommt, hierbei eine wichtige Rolle spielen. Da wir in unserer Versuchsreihe nur zwei polyklonale HLA Klasse II Antikörper verwendet haben, ist nicht sicher zu sagen, ob dies ein generelles Phänomen der HLA Klasse II Antikörper ist. Eine weitere Erklärung wäre, dass die Fähigkeit, eine TRALI ohne weiteren Stimulus auszulösen, abhängig von der Bindung bestimmter

Epitop(e) des entsprechenden Antigens ist, was in unseren Antiseren einfach nicht berücksichtigt werden konnte. Der letztgenannte Aspekt kann nicht ausschließen, dass nicht auch eine gesunde Person durch HLA Klasse II Antikörper eine TRALI erleiden kann (Flesch und Neppert, 2002).

Es ist davon auszugehen, dass die Entwicklung der TRALI einem Schwellenmodell folgt (Bux und Sachs, 2007). Mehrere Faktoren definieren die Schwelle, auch unterliegt diese den genetischen und medizinischen Konditionen des einzelnen Individuums. Abhängig von der Höhe der Schwelle und der Stärke der transfundierten Faktoren (z.B. Antikörper), kommt es zur Entwicklung einer TRALI oder nicht. Das bedeutet, dass es rein spekulativ ist, ob eine indirekte Aktivierung der Neutrophilen weniger stark ist als eine direkte Aktivierung durch eine Antikörperbindung.

Wenn diese Annahme jedoch richtig ist, müsste die Schwelle, die für HLA Klasse II Antikörper notwendig ist, um eine TRALI auszulösen, höher sein als für HNA-vermittelte TRALI. Diese kann aber letztlich durch die Aktivierung des vaskulären Endothels (Albelda et al., 1994), welche entweder durch die Vorstimulation mit LPS stattfindet, oder aber durch eine Verstärkung des Antikörpereffektes durch die Produktion von Chemokinen der Monozyten erreicht werden.

Eine kürzlich erschienene Publikation spricht Thrombozyten eine relevante Rolle im pathophysiologischen Mechanismus der TRALI, induziert durch monoklonale Antikörper gegen MHC I, zu. Diese Annahme wurde anhand eines Mausmodells untersucht (Looney et al., 2009).

Es ist denkbar, dass auch eine Aktivierung von Monozyten durch Thrombozyten, im Falle einer TRALI, unter bestimmten Gegebenheiten in vivo verursacht werden kann. Diesen Faktor halten wir für durchaus denkbar, gerade weil wir in unserer Versuchsreihe Hinweise auf die Möglichkeit einer Thrombozytenbeteiligung bei der Auslösung einer TRALI nicht ausblenden können. Die Tatsache, dass TNF alpha als ein potenter Stimulus gilt, wir aber dieses Interleukin nur in geringer Konzentration in unseren Methoden nachweisen konnten, lässt gewisse Fragestellungen offen. Die Beteiligung von Thrombozyten halten wir für untersuchungsrelevant.

Zusammenfassend weisen unsere Untersuchungen darauf hin, dass Antikörper gegen HLA Klasse II fähig sind, eine TRALI über eine Monozytenaktivierung auszulösen, welche letztlich zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten führt. Diese Daten bekräftigen unsere kürzliche Annahme eines Schwellenmodells der TRALI und untermauern die Wichtigkeit für ein HLA Klasse II Screening in untersuchten TRALI Fällen. Desweiteren unterstützen unsere Daten die Präventionsmaßnahme, Plasma von Frauen, die bereits schwanger waren, von der Plasmaspende auszuschließen, um die Zahl der TRALI Fälle zu minimieren.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI) ist die Haupttodesursache bei Bluttransfusionen in den USA und anderen Nationen. Über 90% aller untersuchten TRALI-Fälle, welche aus Originalarbeiten sowie dem Hämovigilanzregister stammen, zeigen einen Nachweis von HLA-Antikörpern im Spenderplasma und das Vorhandensein des korrespondierenden Antigens beim Empfänger. Hierbei handelte es sich in einer Vielzahl der Fälle um Antikörper gegen HLA-Klasse II-Merkmale. Das korrespondierende Antigen tragen aber weder Granulozyten noch Endothelzellen, was eine direkte Aktivierung dieser Zellen ausschließt. Beide Zelltypen können zwar theoretisch im aktivierten Zustand HLA-Klasse II-Antigene exprimieren, aber in vivo gibt es bislang keine Hinweise bzw. Belege hierfür. Ein alternativer Mechanismus über die Aktivierung von Monozyten wurde daher in Erwägung gezogen.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir anhand von in vitro und ex vivo Untersuchungsmethoden einen indirekten Aktivierungsweg der TRALI über Monozyten nachweisen. Den Monozyten kann dadurch eine zentrale Rolle im Pathomechanismus der HLA Klasse II-induzierten TRALI zugeschrieben werden. Monozyten wurden durch die Inkubation mit korrespondierenden HLA Klasse II Antikörpern aktiviert. In diesem aktiviertem Zustand waren sie fähig, Zytokine freizusetzen, die neutrophile Granulozyten aktivieren, die wiederum zu einer Störung der endothelialen Lungenbarriere führten.

In unserem ex vivo Rattenlungenmodell führte die HLA Klasse II-antikörperabhängige Monozytenaktivierung in einer klinisch relevanten Zeit zu einem ausgeprägtem Lungenödem, wenn das Lungenendothel zwei Stunden vor Versuchsbeginn mit LPS voraktiviert wurde und neutrophile Granulozyten anwesend waren. Unsere Daten lassen die Vermutung zu, dass in einer Vielzahl der TRALI-Fälle Monozyten zelluläre Schlüsselfiguren sind und dass HLA Klasse II Antikörper TRALI durch eine Kaskade auslösen, welche durch eine Monozytenaktivierung eingeleitet wird. Desweiteren lassen die Daten den Schluss zu, dass die TRALI-Pathogenese einem Schwellenmodell folgt. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen den kürzlich gefassten Entschluss, mehrfach schwangere Frauen von der Plasmaspende auszuschließen.

## 7 SUMMARY

Transfusion-related acute lung injury (TRALI) is the leading cause of transfusion-associated death in the United States and other countries. In about 90% of all TRALI cases, human leucocyte antibodies have been identified in the implicated blood donor and the cognate antigens were found on the recipients' blood cells.

Most of these antibodies are HLA class II antibodies. The corresponding antigens are usually not expressed on neutrophils or endothelial cells. This fact excludes a direct activation of neutrophils by these antibodies. Both types of cells are theoretically able to express HLA class II molecules on their surface in an activated state. However, there are no *in vivo* data proving this. Of note, it remains unclear how HLA class II-antibodies can induce TRALI.

Alternative mechanisms leading to TRALI have been proposed, but the available evidence strongly suggests that donor leucocyte antibodies may initiate a reaction cascade via monocytes.

In this study, we identify by *in vitro* and *ex vivo* experimental methods, human monocytes as a primary target in HLA class II induced TRALI. Because of these findings, monocytes gain a central role in HLA class II induced TRALI.

Monocytes become activated with matched HLA class II-antibodies and are capable of activating neutrophils which, in turn, lead to a disturbance of the endothelial barrier. In our *ex vivo* rodent model, HLA class II antibody-dependent monocyte activation induced a severe pulmonary edema in a relevant period of time, whenever neutrophils are present and the endothelium was preactivated by LPS.

Our experimental data suggest that in most TRALI cases, monocytes are cellular key players, because HLA class II antibodies induce TRALI by a reaction cascade, which starts with an activation of monocytes.

Furthermore, our data support the previous assumption that TRALI pathogenesis follows a threshold model. The experimental data of this work support the current decision to avoid plasma from immunized donors, such as women with a history of pregnancy, from future donation.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

**Albelda SM**, Smith CW, Ward PA.

Adhesion molecules and inflammatory injury.

FASEB J. 1994;8(8):504-512.

**Baggiolini M**, Walz A, Kunkel SL.

Neutrophil-activating peptide-1/Interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils.

J Clin Invest. 1989;84(4):1045-9.

**Bass DA**, Olbrantz P, Szejda P, Seeds MC, McCall CE.

Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with infection.

J Immunol 1986;136:860-6.

**Bernard RL**, Matalon S.

Mechanisms of extracellular reactive oxygen species injury to the pulmonary microvasculature.

J Appl Physiol 1992;72:1724-9.

**Berton G**, Laudanna C, Sorio C, Rossi F.

Generation of signals activating neutrophil functions by leukocyte integrins: LFA-1 and gp 150/95, but not CR3, are able to stimulate the respiratory burst of human neutrophils.

J Cell Biol 1992;116:1007-17.

**Boyum A.**

Isolation of leucocytes from human blood. Further observations, Methylcellulose, dextran and ficoll as erythrocyte aggregating agents.

Scand J Clin Lab Invest Suppl 1968; 97:31-50.

**Brittingham TE.**

Immunologie studies on leukocytes.

Br J Haematol 2007;136:788-99.

**Burns AR, Smith CW, Walker DC.**

Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung.

Physiol Rev 2003;83:309-36.

**Bux J, Sachs UJ.**

The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury.

Br J Haematol 2007;136:788-99.

**Bux J.**

Challenges in the determination of clinically significant granulocyte antibodies and antigens.

Transfus Med Rev 1996;10:222-32.

**Chapman CE, Stainsby D, Jones H, Love E, Massey E, Win N, Navarrete C, Lucas G, Soni N, Morgan C, Choo L, Cohen H, Williamson LM;**

Serious Hazards of Transfusion Steering Group. Ten years of hemovigilance reports of transfusion-related acute lung injury in the United Kingdom and the impact of preferential use of male donor plasma.

Transfusion 2009;49:440-52.

**Clay M, Kline W, Mc Cullough J.**

The frequency of granulocyte-specific antibodies in postpartum sera and a family study of the 6B antigen.

Transfusion 1984;24:252-55.

**Covin RB, Ambruso DR, England KM, Kelher MR, Mehdizadehkashi Z, Boshkov LK, Masuno T, Moore EE, Kim FJ, Silliman CC.**

Hypotension and acute pulmonary insufficiency following transfusion of autologous red blood cells during surgery: A case report and review of the literature.

**Crockett-Torabi E**, Sulenbarger B, Smith CW, Fantone JC.

Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules.

J immunol 1995;154:2291-302.

**Crooks SW and Stockley RA**. Leukotrien B4 .

Int J Biochem Cell Biol 1989;30:173-8.

**Davoren A**, Curtis BR, Shulman IA, Mohrbacher AF, Bux J, Kwiatkowska BJ, McFarland JG, Aster RH.

TRALI due to granulocyte-agglutinating human neutrophil antigen-3a (5b) alloantibodies in donor plasma: a report of 2 fatalities.

Transfusion 2003; 43:641-5.

**Doerschuk CM**.

Neutrophil rheology and transit through capillaries and sinusoids.

Am J Respir Crit Care Med 1999;159:1693-5.

**Doreen MC**, Ouwehand WH, Verhoeven AJ, et al.

Adult respiratory distress syndrome after experimental intravenous gamma-globulin concentrate and monocyte-reactive IgG antibodies.

Lancet 1998;352:1601-2.

**Dry SM**, Bechard KM, Milford EL, Churchill WH, Benjamin RJ.

The pathology of transfusion-related acute lung injury.

Am J Clin Pathol 1999;112:216-21.

**Dykes A**, Smallwood D, Kotsimbos T, Street A.

Transfusion-related acute lung injury (TRALI) in a patient with a single lung transplant.

Br J Haematol 2000;109:674-6.

**Eastlund T**, Mc Grath PC, Britten A, Prapp R.

Fatal pulmonary transfusion reaction to plasma containing donor HLA antibody.

Vox Sang 1989;57:63-6.

**Felbo M**, Jensen KG.

Death in childbirth following transfusion of leukocyte-incompatible blood.

Acta Haematol 1962;27:113-9.

**Flesch BK**, Neppert J.

Transfusion related acute lung injury caused by human leucocyte antigen class II antibody.

Br J Haematol 2002;116:673-6

**Flury R**, Reutter F.

[Lethal anaphylactic shock during the transfusion of a thrombocyte concentrate].

Schweiz Med Wochenschr 1966;96:918-20.

**Gebb SA**, Graham JA, Hanger, Godbey PS, Capen RL, Doerschuk CM, Wagner WW Jr.

Sites of leukocyte sequestration in the pulmonary microcirculation.

J Appl Physiol 1995;79:493-7.

**Gerritsen ME**, Bloor CM.

Endothelial cell gene expression in response to injury. FASEB J 1993;7:523-32.

**Gosselin EJ**, Wardwell K, Rigby WF, Guyre PM.

Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3.

J Immunol 1993;151:1482-90.

**Greinacher A**, Wesche J, Hammer E, Füll B, Völker U, Reil A, Bux J.

Characterization of the human neutrophil alloantigen-3a.

Nat Med 2010;16:45-8.

**Hänsch GM**, Radsak M, Wagner C, Reis B, Koch A, Breitbart A, Andrassy K.

Expression of major histocompatibility class II antigens on polymorphonuclear neutrophils in patients with Wegener's granulomatosis.

Kidney Int 1999;55:1811-8.

**Haslett C**, Guthrie LA, Kopaniak MM, Johnston RB Jr, Henson PM.

Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide.

Am J Pathol 1985;119:101-10.

**Holman RG and Maier RV.**

Oxidant-induced endothelial leak correlates with decreased cellular energy levels.

Am Rev Respir Dis 1990;141:134-40.

**Holness L**, Knippen MA, Simmons L, Lachenbruch PA.

Fatalities caused by TRALI.

Transfus Med Rev 2004;18:184-8.

**ISBT Working Party on Granulocyte Immunobiology, et al.**

Recommendations of the ISBT Working Party of Granulocyte Immunobiology for leucocyte antibody screening in the investigation and prevention of antibody-mediated transfusion-related acute lung injury.

Vox Sang 2009; 96:266-9.

**Johnson A**, Phillips P, Hocking D, Tsan MF, Ferro T.

Protein kinase inhibitor prevents pulmonary edema in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Am J Physiol 1989;256(4 Pt 2):H1012-H1022.

**Kao GS**, Wood IG, Dorfman DM, Milford EL, Benjamin RJ.

Investigation into the role of anti-HLA class II antibodies in TRALI.

Transfusion. 2003;43:185-91.

**Kawahito K**, Kobayashi E, Ohmori M, Harada K, Kitoh Y, Fujimura A, Fuse K.

Enhanced responsiveness of circulatory neutrophils after cardiopulmonary bypass: Increased aggregability and superoxide producing capacity.

Artif Organs 2000;24:37-42.

**Kehler MR**, Masuno T, Moore EE, et al.

Plasma from stored packed red blood cells and MHC class I antibodies causes acute lung injury in a two-event in vivo rat model.

Blood 2009;113(9):2079-2087.

**Kernhoff PB.**, Durrant IJ, Rizza CR, Wright FW.

Severe allergic pulmonary oedema after plasma transfusion.

Br J Haematol 1972;23:777-81.

**Khan SY**, Kelher MR, Heal JM, Heal JM, Blumberg N, Boshkov LK, Phipps R, Gettings KF, McLaughlin NJ, Silliman CC.

Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components , primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury.

Blood 2006;108:2455-62.

**Klein CL**, Bittinger F, Sharke CC, Wagner M, Köhler H, Walgenbach S, Kirkpatrick CJ.

Effects of cytokines on the expression of cell adhesion molecules by cultured human omental mesothelial cells.

Pathobiology 1995;63:204-12.

**Kleinmann S.**, Caulfield T, Chan P, et al.

Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury; statement of a consensus panel.

Transfusion 2004;44:1774-89.

**Koike J**, Nagata K, Kudo S, Tsuji T, Irimura T.

Density-dependent induction of TNF-alpha release from human monocytes by immobilized P-selectin.

FEBS Lett 2000;477:84-8

**Kopko PM**, Curtis BR, Kelher M, et al.

Merging the pathogenesis of transfusion-related acute lung injury: The priming activity of the 5b (HNA-3) antibody (abstract).

Transfusion 2004;44 (Suppl):22A.

**Kopko PM**, Popovsky MA, MacKenzie MR, Paglieroni TG, Muto KN, Holland PV.

HLA class II antibodies in transfusion-related acute lung injury.

Transfusion 2001;41:1244-8.

**Kopko PM.**

Leukocyte antibodies and biologically active mediators in the pathogenesis of transfusion-related acute lung injury.

Curr Hematol Rep 2004;3:456-61.

**Krause PJ**, Maderazo EG, Bannon P, Kosciol K, Malech HM.

Neutrophil heterogeneity in patients with blunt trauma.

J Lab Clin Med 1988;112:208-15.

**Leach M**, Vora AJ, Jones DA, Lucas G.

Transfusion-related acute lung injury (TRALI) following autologous stem cell transplant for relapsed acute myeloid leukaemia: A case report and review of the literature.

Transfus Med 1998;8:333-7.

**Lee WL**, Downey DB.

Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury.

Am J Respir Crit Care Med 2001;164:896-904.

**Looney MR**, Nguyen JX, Hu Y, van Zifle JA, Lowell CA, Matthay MA.

Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury.

J Clin Invest 2009;119:3450-61.

**Looney MR**, SU X, Van Ziffle JA, Lowell, C.A, and Matthay, M.A.

Neutrophils and their Fc gamma receptor are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury.

J Clin Invest 2006;116:1615-23.

**Loosli CG**, Baker RF.

Acute experimental pneumococcal (Type 1) pneumonia in the Mouse: The migration of leucocytes from the pulmonary capillaries into the alveolar spaces as revealed by the electron microscope.

Trans Am Clin Climatol Assoc 1962;74:15-28.

**Matsumoto S**, Takei M, Moriyama M, Imanishi H.

Enhancement of Ialike antigen expression by interferon-gamma in polymorphonuclear leukocytes.

Chem Pharm Bull (Tokyo) 1987;35:436-39.

**Metzner B**, Barbisch M, Parlow F, Kownatzki E, Schraufstatter I, Norgauer J. Interleukin-8 und GRO alpha prime human neutrophils for superoxide anion production and induce up-regulation of N-formyl peptide receptors.

J Invest Dermatol 1995;104:789-91.

**Mudzinski SP**, Christian TP, Guo TL, Cirenza E, Hazlett KR, Gosselin EJ.

Expression of HLA-DR (major histocompatibility complex class II) on neutrophils from patients treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from mobilization of stem cells.

Blood 1995;86:2452-3.

**Nishimura M**, Hashimoto S, Takanashi M, Okazaki H, Satake M, Nakajima K. Role of anti-human leucocyte antigen class II alloantibody and monocytes in development of transfusion-related acute lung injury.

Transfus Med 2007;17:129-34.

**Nishimura M**, Ishikawa Y, Satake M.

Activation of polymorphonuclear neutrophils by immune complex: Possible involvement in development of transfusion-related acute lung injury.

Transfus Med 2004;14:359-67.

**Nordhagen R**, Conradi M, Dromtorp SM.

Pulmonary reaction associated with transfusion of plasma containing anti-5b.

Vox Sang 1986;51:102-7.

**Palfi M**, Berg S, Ernerudh J, Berlin G.

A randomized controlled trial of transfusion –related acute lung injury : Is plasma from multiparous blood donors dangerous?

Transfusion 2001;41:317-22.

**Peters AM**.

Just how big is the pulmonary granulocyte pool?

Clin Sci (Lond. 1998;94:7-19.

**Phipps RP**, Kaufman J, Blumberg N.

Platelet derived CD154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion.

Lancet 2001;357:2023-4.

**Pober JS**, Collins T, Gimbrone TMA Jr, Libby P, Reiss CS.

Inducible expression of class II major histocompatibility complex antigens and the Immunogenicity of vascular endothelium.

Transplantation 1986; 41:141-6.

**Popovsky MA**, Haley NR.

Further characterization of transfusion-related acute lung injury: Demographics, clinical and laboratory features, and morbidity.

Immunohematol 2001;17:157-9.

**Popovsky MA**, Moore SB.

Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury.

Transfusion 1985;25:573-7.

**Rattan V**, Sultana C, Shen Y, Kalra VK.

Oxidant stress-induced transendothelial migration of monocytes is linked to phosphorylation of PICAM-1.

Am J Physiol 1997;273:E453-61.

**Reil A**, Keller-Stanislawski B, Gunay S, Bux J.

Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors.

Vox Sang 2008;95:313-7.

**Reinisch W**, Lichtenberger C, Steger G, Tillinger W, Scheiner O, Gangl A, Maurer D, Willheim M.

Donor dependent, interferon-gamma induced HLA-DR expression on human neutrophils in vivo.

Clin Exp Immunol 2003;133:476-84.

**Reutershan J**, Ley K.

Bench-to- bedside review: Acute respiratory distress syndrome-how neutrophils migrate into the lung.

Crit Care 2004;8:453-61.

**Sachs UJ**, Bux J.

TRALI after the transfusion of crossmatch-positive granulocytes.

Transfusion 2003;43:1683-6.

**Sachs UJ**, Chavakis T, Fung L, Lohrenz A, Bux J, Reil A, Ruf A, Santoso S. Human alloantibody anti-Mart interferes with Mac-1-dependent leukocyte adhesion.

Blood 2004;104:727-34.

**Sachs UJ**, Hattar K, Weissmann N, Bohle RM, Weiss T, Sibelius U, Bux J.  
Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model.  
Blood 2006;107:1217-9.

**Sachs UJ**, Wasel W, Bayat B, Bohle RM, Hattar K, Berghöfer H, Reil A, Bux J, Bein G, Santoso S, Weissmann N.  
Mechanism of transfusion-related acute lung injury induced by HLA class II antibodies.  
Blood 2011; 117:669-77.

**Santamaria A**, Moya F, Martinez C, Martino R, Martinez-Pérez J, Muñoz-Díaz E.  
Transfusion-related acute lung injury associated with an NA1-specific antigranulocyte antibody.  
Haematologica 1998; 83:951-2.

**Scholz D**, Devaux B, Hirche A, Pötzsch B, Kropp B, Schaper W, Schaper J.  
Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture.  
Cell Tissue Res 1996;284:415-23.

**Seeger W**, Hansen T, Rössig R, Schmehl T, Schütte H, Krämer HJ, Walmrath D, Weissmann N, Grimminger F, Suttorp N.  
Hydrogen peroxide-induced increase in lung endothelial permeability-effect of adenylate cyclase stimulation and phosphodiesterase inhibition.  
Microvasc Res 1995;50:1-17.

**Seeger W**, Schneider U, Kreuzler B, von Witzleben E, Walmrath D, Grimminger F, Neppert J  
Reproduction of transfusion-related acute lung injury in an ex vivo lung model.  
Blood 1990;76:1438-44.

**Shasby DM**, Lind SE, Shasby SS, Goldsmith JC, Hunninghake GW.

Increases in albumin transfer across cultured endothelium: alterations in cell shape and calcium homeostasis.

Blood 1985;65:605-614.

**Silliman CC**, Bjornsen AJ, Wyman TH, Kelher M, Allard J, Bieber S, Voelkel NF.

Plasma and lipids from stored platelets cause acute lung injury in an animal model.

Transfusion 2003;43:633-40.

**Silliman CC**, Clay KL, Thurman GW, Johnson CA, Ambruso DR.

Partial characterization of lipids that develop during the routine storage of blood and prime the neutrophil NADPH oxidase.

J Lab Clin Med 1994;124:684-94.

**Silliman CC**, Curtis BR, Kopko PM, Khan SY, Kelher MR, Schuller RM, Sannoh B, Ambruso DR.

Donor antibodies to HNA-3a implicated in TRALI reactions prime neutrophils and cause PMN-mediated damage to human pulmonary microvascular endothelial cells in a two-event, in vitro model.

Blood 2006;109:1752-5.

**Silliman CC**, Paterson AJ, Dickey WO, Stroneck DF, Popovsky MA, Caldwell SA, Ambruso DR.

The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: A retrospective study.

Transfusion 1997;37:719-26.

**Silliman CC**, Voelkel NF, Allard JD, Elzi DJ, Tuder RM, Johnson JL, Ambruso DR.

Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model.

J Clin Invest 1998;101:1458-67.

**Silliman CC.**

The two-event model of transfusion-related acute lung injury.

Crit Care Med 2006;34:S124-31.

**Stainsby D, Tinegate HN, Thompson CL, Jones H.**

Where and when is blood transfused? An observational study of the timing and location of red cell transfusions in the north of England. Vox Sang. 2007;93:229-32.

Vox Sang 1957;2:242-8.

**Wallis JP.**

Transfusion-related acute lung injury (TRALI) under-diagnosed and under-reported.

Br J Anaesth 2003;90:573-6.

**Williams MA, Solomkin JS.**

Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning.

J Leukoc Biol 1999; 65:725-36.

**Wolf CF and Canale VC.**

Fatal pulmonary hypersensitivity reaction to HLA incompatible blood transfusion: report of a case and review of the literature.

Transfusion 1976;16:135-40.

**Worthen GS, Haslett C; Rees AJ, Gumbay RS, Henson JE, Henson PM.**

Neutrophil-mediated pulmonary vascular injury. Synergistic effect of trace amount of lipopolysaccharide and neutrophil stimuli on vascular permeability and neutrophil sequestration in the lung.

Am Rev Respir Dis 1987;136:19-28.

**Wyman TH, Bjornsen AJ, Elzi DJ, Smith CW, England KM, Kelher M, Silliman CC.**

A two-insult in vitro model of PMN-mediated pulmonary endothelial damage: requirements for adherence and chemokine release.

Am J Physiol Cell Physiol 2002; 283:C1592-C1603.

**Yomotavian R**, Kline W, Press C, Clay M, Engman H, Hammerschmidt D, McCullough J.

Severe pulmonary hypersensitivity associated with passive transfusion of a neutrophil-specific antibody.

Lancet 1984;1(8371) :244-6.

**Zarbock A and Ley K.**

Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium.

Am J Pathol 2008;172:1-7.

## 9 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Gießen.

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Ulrich Sachs für die immer und jederzeit freundliche, kompetente und motivierende Unterstützung, für sein Vertrauen in meine Person und für die nicht nur lehrreichen, sondern auch unterhaltsamen Gespräche. Seine wissenschaftliche und menschliche Kompetenz war mir immer eine Stütze und machte meine Arbeit überhaupt möglich.

Dieser Dank gilt auch meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Moritz. Dankbar bin ich für die immer freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit und interessanten Tipps.

Mein herzlichster Dank richtet sich an Frau Heike Berghöfer, die mir zu jeder Zeit und mit äußerster Geduld, Ruhe und Humor zur Seite stand. Die Durchführung vieler Versuche wäre ohne ihre Hilfe nur schwer möglich gewesen. Ich bedanke mich bei ihr nicht nur für die innerbetriebliche, sondern auch private Unterstützung. Es war eine Freude mit ihr über diese Zeit nicht nur ein Labor, sondern auch Erfahrungen, Wissen und Erlebnisse teilen zu dürfen, woraus eine schöne Freundschaft entstanden ist.

An dieser Stelle danke ich auch der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Sentot Santoso und deren immer freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit und Unterstützung in jeglicher Fragestellung. Mein besonderer Dank gilt hier Dr. Behnaz Bayat, Silke Werth und Dr. Sentot Santoso.

Bei meiner Arbeitsgruppe möchte ich mich insbesondere bei Sabine Jessen bedanken, die mir die Arbeit durch zahlreiche unterstützende Gespräche erleichtert und erheitert hat. Auch danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Norbert Weissmann und deren Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit.

Mein größter und innigster Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern für die uneingeschränkte Unterstützung, Verständnis, Hilfe, Aufmunterung und jederzeit offene Tür. Sie haben mir dadurch all dies ermöglicht. An dieser Stelle bedanke ich mich speziell bei meinem Bruder Sven für sein Durchhaltevermögen bei zahlreichen Telefonaten am Computer.

Bei meinen Freunden bedanke ich mich für die Unterstützung, hier speziell bei Fabian Dux, der sich sogar an den Weihnachtsfeiertagen Zeit für mich nahm.

Bei Sebastian Plössl bedanke ich mich für seine uneingeschränkte Liebe und starke Schulter in der Endphase dieser Arbeit.

Mein herzlichster Dank gilt all jenen, nicht namentlich aufgeführten Personen, die mir Unterstützung und Verständnis haben zukommen lassen!

## 10 ANHANG

### 10.1 Histologische Untersuchung

Einige ausgewählte Lungen wurden im direkten Anschluss des ex vivo Experimentes, noch im Kreislauf befindlich, mit Formaldehyd (4,5%; pH7,2) durch die Trachea perfundiert. Die Fixation fand über Nacht im Kühlraum statt. Die Gewebeproben wurden anschließend in Parafin gebettet und Gewebeproben von 5 µm Schnittstärke angefertigt.

Die Hematoxylin-Eosin-Färbung der Präparate fand im Institut für Pathologie der Universitätskliniken des Saarlandes (Homburg/Saar) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Bohle statt.

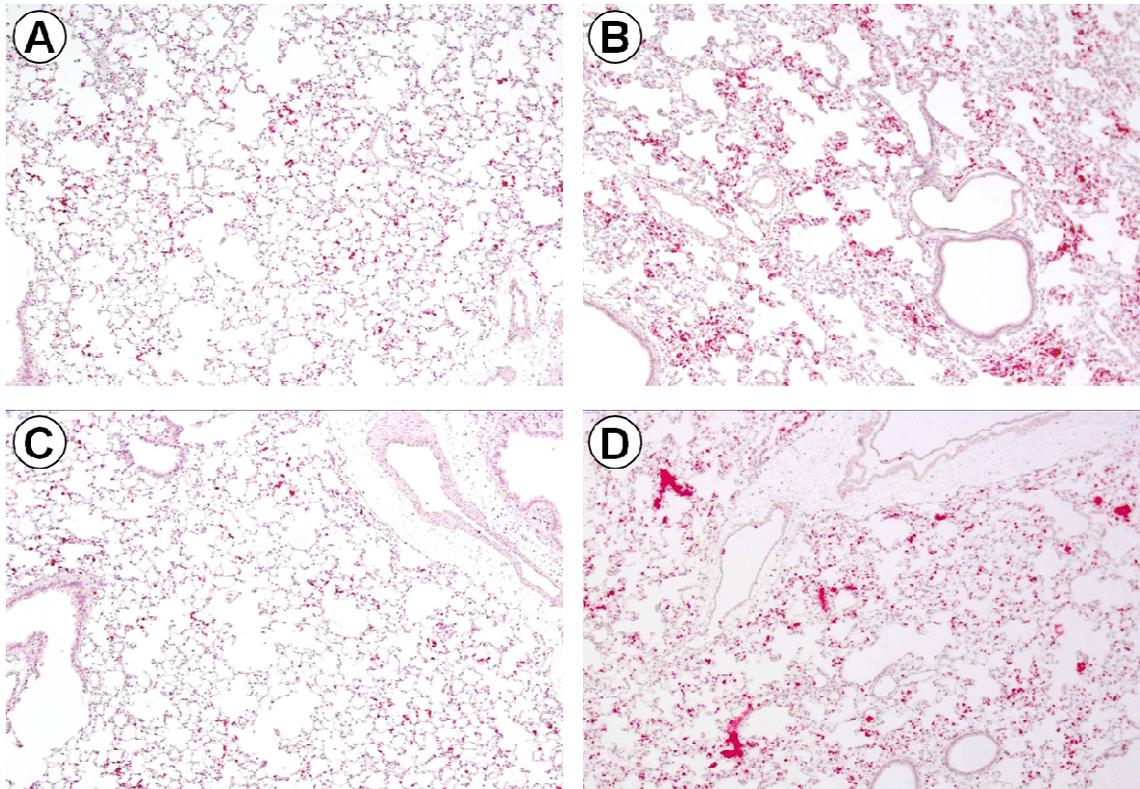
#### *10.1.1 Ergebnisse der histologischen Untersuchung*

Die Ergebnisse der histologischen Schnitten zeigen, dass eine vermehrte Leukozytenansammlung im Lungenkapillarbett der Ratte in den Versuchen mit neutrophilen Granulozyten und positivem Monozytenüberstand (B) und in der Versuchsreihe mit neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Plasma, dessen HLA Klasse II-Antikörper zu den Antigenmerkmalen der Monozyten passten, zu erkennen ist (D).

Die Lungen der Versuchsreihe mit Neutrophilen und negativen Monozytenüberstand (A), als auch die Lungen, welche mit Neutrophilen, Monozyten und Plasma, dessen HLA Klasse II-Antikörper nicht zu den Monozytenmerkmalen passten (C), wiesen deutlich weniger Leukozytenansammlungen auf (siehe Abb.12).

Da die Ergebnisse zur Bewertung nicht herangezogen wurden, sind diese nur im Anhang ausgeführt.

Abb.12: Leukozyten im Kapillarbett der perfundierten Lungen, Rattenlungenmodell



(A) Granulozyten mit „unmatch“ Überstand, (B) Granulozyten mit „match“ Überstand, (C) Granulozyten und Monozyten mit HLA Klasse II-Antikörpern, welche nicht zum Merkmal der Monozyten passen, (D) Granulozyten und Monozyten mit merkmalspassenden HLA Klasse II-Antikörpern

## 10.2 Zytokinproduktion nach der Zugabe von adsorbiertem Plasma im ELISA-Testverfahren

Alle Zytokinbestimmungen (Interleukin 8, GRO alpha, TNF alpha) anhand der ELISA-Methode, wurden vergleichend mit einem merkmalspositiven Plasma, welches zuvor eine hohe Zytokinausschüttung des Monozyten hervorgerufen hat und der adsorbierten Variante dieses Plasmas nochmals durchgeführt. Die Adsorption erfolgte mit Protein G. Daraufhin wurde die IgG-Konzentration kontrolliert.

Da die Ergebnisse zur Bewertung nicht herangezogen wurden, sind diese nur im Anhang ausgeführt.

### 10.2.1 Ergebnisse des ELISA-Testverfahrens

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zytokinkonzentrationen nach erfolgter Adsorption geringer ausfallen. Dies gilt sowohl für die Zytokinkonzentrationen nach Inkubation mit DR 52 als auch mit DR7. Da dieser Versuch nur einmalig durchgeführt wurde, wurden die Ergebnisse nicht zur Bewertung herangezogen und daher nur im Anhang zu finden.

Tabelle 1: Zytokinkonzentrationen nach Adsorption

	DR52 (pg/ml)	DR52 adsorbiert(pg/ml)	DR7(pg/ml)	DR7 adsorbiert(pg/ml)
GROalpha	10.086	383	1210	0
IL-8	8.000	0	2600	0
TNFalpha	179	0	230	0

### 10.3 Liste der Vorabveröffentlichungen aus dieser Dissertationsschrift

*Teile der hier vorgelegten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht:*

Sachs UJ, Wasel W, Bayat B, Bohle RM, Hattar K, Berghöfer H, Reil A, Bux J, Bein G, Santoso S, Weissmann N

Mechanism of transfusion-related acute lung injury induced by HLA class II antibodies.

Blood 2011; 117:669-77.

*Die Kandidatin hat zudem Ergebnisse zu folgenden Arbeiten beigetragen:*

Sachs UJ, Link E, Hofmann C, Wasel W, Bein G

Screening of multiparous women to avoid transfusion-related acute lung injury: a single center experience.

Transfus Med 2008; 18:348-54.

Sachs UJ, Weissmann N, Wasel W

Supernatants from stored leukodepleted packed red blood cells regularly exhibit changes in their (lyso-) phosphatidylcholine composition and do not cause TRALI in an ex vivo rat lung model.

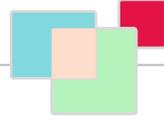
Vox Sang 2010; 99:456.

## **EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form oder auszugsweise im Rahmen einer anderen Prüfung noch nicht vorgelegt worden.

Gießen, den 26. Januar 2011

gez. Wiebke Wasel



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
**STAUFBENBERGRING 15**  
**D-35396 GIESSEN**

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

ISBN: 978-3-8359-6031-2



9 783835 196031 2