

Durchflußzytometrische Analyse von Lymphozytensubpopulationen und intrazellulärer Zytokinproduktion aus induziertem Sputum

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Detlef Loppow
aus Hamburg

Hamburg 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 15. September 1997 bis 30. Juni 2002 unter der Leitung von Professor Dr. med. G. Gercken, Universität Hamburg, Fachbereich Chemie, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden unter der Betreuung von Dipl.-Biol. R. A. Jörres im Krankenhaus Großhansdorf, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie und in der Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin Dr. Kramer und Kollegen in Geesthacht durchgeführt. Die Abteilung Durchflußzytometrie wurde geleitet von Dipl.-Biol. M. Böttcher (09/97 - 06/99), Dr. med. R. Dittmer (07/99 - 09/00) und Dr. rer. nat. A. Pahl (ab 10/00).

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. G. Gercken
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. H. Magnussen

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	III
II	Abkürzungsverzeichnis	VIII
1	Einleitung	1
1.1	Gewinnung von Probenmaterial	2
1.2	Anforderungen an die Analytik	5
1.3	Durchflußzytometrie	5
1.3.1	Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen	8
1.3.2	Durchflußzytometrische Leukozytendifferenzierung im induzierten Sputum	9
1.3.3	Durchflußzytometrische Bestimmung eosinophiler Granulozyten im induzierten Sputum	10
1.3.4	Durchflußzytometrische Lymphozytensubtypisierung im induzierten Sputum	11
1.3.5	Durchflußzytometrische Bestimmung intrazellulärer Proteine	11
1.3.5.1	Zytokine - das T _H 1/T _H 2-Paradigma	12
1.3.6	Wirkung von Dithiothreitol auf die immunologische Detektionsreaktion ..	14
1.3.7	Untersuchung der induzierbaren NO-Synthase in Leukozyten des induzierten Sputums	15
1.3.8	Untersuchung der Auswirkungen der IL-2-Inhalationstherapie bei Patienten mit pulmonal metastasiertem Nierenzellkarzinom	16
2	Problemstellung	18
3	Material und Methoden	20
3.1	Biologisches Probenmaterial	20
3.1.1	Induziertes Sputum	20
3.1.1.1	Durchführung der Sputumprovokation	20
3.1.1.2	Aufarbeitung der Sputumproben	22
3.1.2	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit	22

3.1.3	Peripheres Vollblut	23
3.2	Durchflußzytometrische Untersuchungen	23
3.2.1	Kalibrierung der Durchflußzytometer	26
3.2.2	Qualitätskontrolle der Durchflußzytometer	27
3.2.3	Durchflußzytometrische Analyse der Leukozytensubpopulationen im induzierten Sputum	28
3.2.4	Durchflußzytometrische Analyse eosinophiler Granulozyten im induzierten Sputum	29
3.2.5	Durchflußzytometrische Analyse der Lymphozytensubpopulationen im induzierten Sputum	31
3.2.6	Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokine in Lymphozyten des induzierten Sputums	34
3.2.6.1	Stimulation der Zytokinproduktion durch Phorbol ester und Ionomycin	34
3.2.6.2	Verhinderung der Zytokinsekretion durch Monensin	34
3.2.7	Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokine in T-Lymphozyten des induzierten Sputums	35
3.2.8	Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokine in T _H - und T _{C/S} -Lymphozyten des induzierten Sputums	37
3.3	Andere Untersuchungen	40
3.3.1	Zytospinpräparate für die Zelldifferenzierung am Mikroskop	40
3.3.2	Einfluß von Dithiothreitol auf die immunologische Detektionsreaktion	40
3.3.3	Untersuchung der induzierbaren NO-Synthase in Leukozyten des induzierten Sputums	42
3.3.3.1	Durchflußzytometrischer Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in Alveolarmakrophagen des induzierten Sputums	42
3.3.3.2	Immunzytochemischer Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in Alveolarmakrophagen und Granulozyten des induzierten Sputums	43
3.3.4	Untersuchung der Auswirkung der IL-2-Inhalationstherapie bei Patienten mit pulmonal metastasiertem Nierenzellkarzinom	45
3.3.4.1	Studienprotokoll	45
3.3.4.2	Funktionsmessungen	46
3.3.4.3	Durchflußzytometrische Analyse der Zytokinproduktion	47
3.3.4.4	Statistische Analyse	47

3.4	Produkte für die Durchflußzytometrie	48
3.5	Chemikalien und Lösungen	49
3.6	Geräte	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Kalibrierung und Qualitätskontrolle der Durchflußzytometer	51
4.2	Durchflußzytometrische Analyse der Leukozytensubpopulationen im induzierten Sputum	52
4.2.1	Durchflußzytometrische Analyse eosinophiler Granulozyten im induzierten Sputum	53
4.3	Durchflußzytometrische Analyse der Lymphozytensubpopulationen im induzierten Sputum	55
4.4	Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokine in Lymphozyten des induzierten Sputums	56
4.4.1	Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokine in T-Lymphozyten des induzierten Sputums	56
4.4.2	Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokine in T _H - und T _{C/S} -Lymphozyten des induzierten Sputums	57
4.4.3	Durchflußzytometrische Bestimmung der Zytokinproduktion in Sputum-lymphozyten von Patienten mit Asthma bronchiale oder COPD	58
4.5	Einfluß von Dithiothreitol auf die immunologische Detektionsreaktion	60
4.6	Untersuchung der induzierbaren NO-Synthase in Leukozyten des induzierten Sputums	63
4.6.1	Durchflußzytometrischer Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in Alveolarmakrophagen des induzierten Sputums	63
4.6.2	Immunzytochemischer Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in Alveolarmakrophagen und Granulozyten des induzierten Sputums	63
4.7	Untersuchung der Auswirkung der IL-2-Inhalationstherapie bei Patienten mit pulmonal metastasiertem Nierenzellkarzinom	66
4.7.1	Funktionsmessungen bei Patienten mit pulmonal metastasiertem Nierenzellkarzinom	66
4.7.2	Zytokinproduktion in T _H - und T _{C/S} -Lymphozyten des induzierten Sputums von Patienten mit pulmonal metastasiertem Nierenzellkarzinom	66

4.7.3	Zusätzliche Untersuchung eines Patienten nach Beendigung der IL-2-Inhalation	67
5	Diskussion	71
5.1	Durchflußzytometrische Analyse der Leukozytensubpopulationen im induzierten Sputum	72
5.1.1	Durchflußzytometrische Analyse eosinophiler Granulozyten im induzierten Sputum	73
5.2	Durchflußzytometrische Analyse der Lymphozytensubpopulationen im induzierten Sputum	74
5.2.1	Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokine in T-Lymphozyten des induzierten Sputums	75
5.2.2	Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokine in T _H - und T _{C/S} -Lymphozyten des induzierten Sputums	75
5.2.3	Durchflußzytometrische Bestimmung der Zytokinproduktion in Sputum-lymphozyten von Patienten mit Asthma bronchiale oder COPD	76
5.3	Einfluß von Dithiothreitol auf die immunologische Detektionsreaktion	77
5.4.1	Durchflußzytometrischer Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in Alveolarmakrophagen des induzierten Sputums	82
5.4.2	Immunzytochemischer Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in Alveolarmakrophagen und Granulozyten des induzierten Sputums	82
5.5	Untersuchung der Auswirkung der IL-2-Inhalationstherapie bei Patienten mit pulmonal metastasiertem Nierenzellkarzinom	83
5.6	Ausblick	89
6	Zusammenfassung	91
6.1	Abstract	93
7	Literatur	95
8	Anhang	121
8.1	Veröffentlichungen	121
8.1.1	Artikel	121

8.1.1.1	Zur Publikation eingereichte Artikel	121
8.1.2	Vorträge	121
8.1.3	Posterdiskussionen und Poster	122
8.1.4	Bewerbung um Fördermittel	125
8.2	Unterstützung	125

II Abkürzungen

a	Steigung
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase
APC	Allophococyanin
APTEX	Aminopropyltriethoxysilan
b	Achsenabschnitt
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BD	Becton Dickinson (BD Biosciences)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
BW	Bronchiale Spülung (bronchial wash)
CD	Differenzierungsantigen (cluster of differentiation)
CFC	„Coulter Flow Count“ (Suspension definierter Partikelkonzentration)
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
DAG	1,2-Diacylglycerol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol, Clelands Reagenz, 2,3-Dihydroxybutan-1,4-dithiol
ECP	Eosinophilenspezifisches kationisches Protein (eosinophil cationic protein)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCM	Durchflußzytometer
FCS 2	Standard Dateiformat für durchflußzytometrische Meßdaten (flow cytometry standard file 2)
FEV ₁	forciertes Expirationsvolumen in einer Sekunde
FEV ₁ %Soll	Wert des FEV ₁ in Prozent vom Normalwert
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz, Fluoreszenzkanal

FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
HLA	Humane Lymphozyten-Antigene (siehe MHC)
ICC	Immunzytochemie (immunocytochemistry)
ICS	inhalative Corticosteroide (inhaled corticosteroids)
IFN- α	Interferon- α
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
iSP	induziertes Sputum
λ	Wellenlänge
LAK-Zellen	lymphokine activated killer cells
LDH	Laktatdehydrogenase
LMD	Dateiformat für durchflußzytometrische Meßdaten bei Coulter (listmode data)
MCL	Multi-Karussell-Ladeeinrichtung (multi carousel loader)
mean channel	Mittelwert der Fluoreszenzintensität
MESF	Moleküläquivalente löslichen Fluorochroms (molecules of equivalent soluble fluorochrome)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MIU/d	Mega internationale Einheiten pro Tag (mega international units per day)
MPO	Myeloperoxidase
n	Anzahl der Meßwerte
n. s.	nicht signifikant
NO	Stickstoffmonoxid
p	Signifikanzniveau (Fehler erster Art)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PE	R-Phycoerythrin
PEF	peak expiratory flow
PE-CY5	Tandemkonjugat aus PE und Cyanine 5 (Tri-Color [®])
PerCP	Peridininchlorophyllprotein
PI	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate (analog TPA)
PMT	Photoelektronenvervielfacherröhre (photomultiplier tube)

r	Korrelationskoeffizient
R_i	intraclass-Korrelationskoeffizient (intraclass correlation coefficient)
RT	Raumtemperatur
σ	Standardabweichung (standard deviation)
sCD25	löslicher IL-2-Rezeptor (soluble CD25)
SE	Standardfehler (standard error)
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SSC	Seitwärtsstreulicht (sideward scatter)
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (analog. PMA)
Tri	Tri-Color [®] , PE-CY5 Tandemkonjugat
X	arithmetischer Mittelwert (mean)

1 Einleitung

Die Erforschung der Atemwegserkrankungen hat sich während des letzten Jahrzehnts im besonderen Maße den zellulären, biochemischen und molekularbiologischen Vorgängen zugewandt, die diesen Erkrankungen zugrunde liegen. Man hofft, dadurch die Mechanismen der Erkrankung besser zu verstehen, den individuellen Verlauf voraussagen, die Therapie kausal anzusetzen und Therapieeffekte besser bewerten zu können. Zu den wichtigen Aufgaben der Pneumologie zählt die Behandlung entzündlicher Prozesse in der Lunge und in den Atemwegen, an denen eine Vielzahl von Zellen beteiligt sind. Insbesondere die Lymphozyten spielen eine zentrale Rolle in einigen der verbreitetsten Atemwegs- und Lungenerkrankungen. Obwohl diese Erkrankungen vom klinischen Standpunkt aus gut charakterisiert sind, ist das Verständnis der ihnen zugrunde liegenden zellulären Mechanismen nicht ausreichend geklärt. Aus diesem Grunde wird der nicht-invasiven Bestimmung zellulärer und biochemischer Komponenten der Atemwege großes Interesse entgegengebracht. Es könnte sich herausstellen, daß die immunologischen Parameter der herkömmlichen Aufnahme von Symptomen und Lungenfunktionsmessungen überlegen sind, wenn es darum geht, über therapeutische Maßnahmen zu entscheiden.

Neben den herkömmlichen inhalativen Therapien mit β_2 -Sympatomimetika, Theophyllin oder Corticosteroiden sind neue Therapieformen in der Entwicklung, die zum einen mit humanisierten Antikörpern gegen Immunglobulin-E oder Interleukin-5 (IL-5) Metaboliten immunologisch binden, um die Signaltransduktionskette zu unterbrechen und zum anderen modulatorisch mit dem Ziel auf das Immunsystem einwirken, fehlgesteuerte Reaktionen wieder in den „gesunden“ Bereich zu verschieben (immunmodulatory shift). Um diese angestrebten Veränderungen auf zellulärer oder Mediatorebene messen zu können, benötigt man biologisches Probenmaterial des Patienten, und dies nach Möglichkeit wiederholt bzw. nach verschiedenen therapeutischen Interventionen. Diese Anforderung erscheint problematisch insbesondere bei Patienten mit ausgeprägten Atemwegserkrankungen, da die notwendigen invasiven Verfahren mit einem nur begrenzt vertretbaren Risiko oder einer unzumutbaren Belästigung einhergehen. Demzufolge scheint es sinnvoll, neue Analyseverfahren zu etablieren, die Messungen in nicht-invasiv gewonnenem Material ermöglichen.

Als nicht-invasive Verfahren stehen heute vor allem die Messung des exhaliierten Stickstoffmonoxids und die Analyse des induzierten Sputums zur Verfügung. Es ist bekannt, daß sich Veränderungen der Atemwege unter anderem in der Zusammensetzung der Atemwegssekrete widerspiegeln [Keatings 1996] und deren Untersuchung diagnostisch und wissenschaftlich wertvolle Informationen liefern kann [Pizzichini 1997]. Da die absoluten Zellzahlen im Sputum deutlich kleiner sind als in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit, mußten neue Techniken eingeführt werden, um ohne Verlust analytischer Genauigkeit mit den geringen Materialmengen umgehen zu können. Diesen Anforderungen entspricht die Durchflußzytometrie, insbesondere im Fall der Analyse von Lymphozyten und deren Subpopulationen, da sie der lichtmikroskopischen Auswertung angefärbter Zytospinpräparate aufgrund der größeren statistischen Sicherheit überlegen ist und zudem mehrere Parameter einer Zelle simultan erfaßt. Konsequenterweise wurde die durchflußzytometrische Analyse von Lymphozytensubpopulationen in ersten Untersuchungen bereits eingesetzt [Perna 1997] [Vatrella 1998] [Kidney 1994a, 1996a].

Neben der rein deskriptiven Analyse von Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker gewinnt die Analyse der Zellfunktion zunehmend an Bedeutung. Für die Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion ist der Einsatz der Durchflußzytometrie unabdingbar, um z.B. T_H1 - (IFN- γ , IL-2) oder T_H2 - (IL-4, IL-5) Zelltypen in nicht-invasiv gewonnenem Probenmaterial der Atemwege zwecks Kontrolle der Diagnose und Therapie von Atemwegserkrankungen zu charakterisieren.

1.1 Gewinnung von biologischem Probenmaterial

Die Gewinnung und Untersuchung biologischen Probenmaterials kann aus verschiedenen Gründen erforderlich sein. Eine Probenahme kann für die Diagnose einer Erkrankung erforderlich sein oder für die Therapiekontrolle, die regelmäßige Materialentnahmen nach sich zieht. Daraus ergibt sich die Forderung, für den Patienten möglichst wenig belastende Probeentnahmetechniken anzuwenden oder Parameter zu messen, die nicht-invasiv gewonnen werden können.

Viele Parameter werden aus venös entnommenem peripheren Vollblut bestimmt. Für einige Fragestellungen ist die Aussage dieser systemischen Parameter allerdings nicht präzise genug; insbesondere lokale Prozesse können durch eine periphere Blutentnahme nicht erschlossen werden. Um biologisches Material aus den Atemwegen zu gewinnen, gibt es verschiedene Verfahren, denen unterschiedliche medizinische Indikationen zugrundeliegen. Diese Verfahren gehen mit unterschiedlichen Belastungen für den Patienten einher.

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) ist ein etabliertes endoskopisches Verfahren in der pneumologischen Differentialdiagnostik von Lungenerkrankungen insbesondere von Lungengerüsterkrankungen. In Kombination mit Anamnese, Klinik, Röntgenbefunden und Histologie erlaubt die Beurteilung der BAL-Flüssigkeit (BALF) die Einordnung zahlreicher entzündlicher, granulomatöser und tumoröser Lungenerkrankungen. Über die Erfassung einer Grunderkrankung hinaus ermöglicht die Beurteilung zellulärer und azellulärer Bestandteile der BAL sowohl eine Aktivitäts- als auch eine Verlaufsbeurteilung generalisierter Lungengerüsterkrankungen [Costabel, 1993, 1994] [Kleeh 1989, 1990].

Zu den endoskopischen Methoden zählt ebenfalls die bronchiale Spülung (BW, bronchial wash). Bei der BW wird, unter Verschluss der peripheren Atemwege durch einen aufblasbaren Ballon, mit isotoner Kochsalzlösung Sekret selektiv aus den zentralen Bronchien herausgespült. Teilweise wird unter BW auch die erste zurückgewonnene Portion Spüllösung bei der BAL verstanden.

Bereits im 19. Jahrhundert nutzte Gollasch [1889] Sputum zur Charakterisierung von Asthma. Da nicht jeder Mensch spontan Bronchialsekret durch Abhusten aus der Tiefe des Atemtraktes hoch befördern kann - selbst bei Erkrankungen mit erhöhter Sekretproduktion ist dies nicht immer möglich - wurden Methoden entwickelt, um das Abhusten zu induzieren. Bickermann [1958] publizierte eine Methode, bei der 20%iger Propylenglykol in 15%iger Kochsalzlösung inhaliert wurde. Die Sputuminduktion wird heute ausschließlich mit isotoner bzw. hypertonen Kochsalzlösungen durchgeführt [Pin 1992] [Fahy 1993a], deren Inhalation die Produktion von Sputum erleichtern soll. Welche Effekte den Auswurf fördern, ist noch nicht geklärt.

Jonjenjan et al. [1990] machten osmotische Effekte dafür verantwortlich; verstärkte mukoziliäre Reinigung durch aktivierte Flimmerepithelien wurde von Pavia et al. [1979] und Daviskas et al. [1996] angenommen.

Das abgehustete Material kann auf seine zelluläre und biochemische Zusammensetzung hin untersucht werden. Unterschiede zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen bestehen in der Aufarbeitung des Sputums. Entweder wird die gesamte Probe aufgearbeitet [Fahy 1993a], oder die Sputumflocken werden zunächst von Speichel- und Plattenepithelzellkontaminationen getrennt [Gibson 1989]. Efthimiadis et al. [1995] konnten eine bessere Reproduzierbarkeit der Zelldifferenzierungen bei der Aufarbeitung selektierter Sputumflocken zeigen. Sequentielles Sputum, welches mit steigenden Salzkonzentrationen (3-5 %) in aufeinanderfolgenden Inhalationsintervallen gewonnen wurde, zeigt Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung, die auf eine Herkunft aus unterschiedlichen Tiefen der Lunge deuten [Holz 1996, 1998b].

Zahlreiche Krankheiten können durch die Untersuchung von Sputum, welches dazu weder Speichel noch Nasen-Rachen-Sekret enthalten sollte, diagnostiziert werden [Takahashi, 1987]. Die Untersuchung des induzierten Sputums hat in den letzten Jahren vor allem deshalb an Bedeutung gewonnen [Fahy 1993b, 1994] [Keatings, 1996], weil sie eine akzeptable Alternative zum invasiven Verfahren der BAL ist und es ermöglicht, auch bei schwerkranken Patienten bzw. beim gleichen Patienten in kürzeren Abständen Material aus den zentralen Atemwegen für die Analyse zu gewinnen. Es ist allerdings noch nicht geklärt, welche Beziehung im einzelnen die zelluläre und biochemische Zusammensetzung des induzierten Sputums zu den entsprechenden Charakteristika der Bronchien bzw. der Lunge aufweist. Vorläufige Daten deuten darauf hin, daß mit diesem Verfahren krankheitsassoziierte Abweichungen in ähnlicher Weise wie mit BAL [Fahy1995] oder BW [Keatings, 1997] erfaßt werden können.

1.2 Anforderungen an die Analytik

Während die Zelldifferenzierung aus Blut von Hämatologieautomaten übernommen wird, die Zellen aufgrund rein physikalischer Parameter unterscheiden, müssen Proben der BAL und des iSP mittels Zytospinpräparaten am Mikroskop von erfahrenen Mitarbeitern analysiert werden, da die Software der Blutbildautomaten die Messung der stärker heterogenen Proben nicht zuläßt. Die Mikroskopie ist eine arbeitsintensive Methode, hat eine subjektive Komponente und ermüdet den Zähler. Sie ist zeitintensiv, und die Ergebnisse sind mit einer relativ großen statistischen Unsicherheit behaftet, da sie meist auf der Zählung von nur wenigen hundert Zellen basieren. Einige Parameter sind nur immunologisch zu detektieren und bedürfen teilweise der simultanen Erfassung zweier oder dreier immunologischer Markierungen. Selbst der erfahrene Zytologe erreicht hier am Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskop die Grenzen seiner Aufnahmefähigkeit, so daß oft nur semiquantitative Bestimmungen möglich sind. Aufgrund ihrer weitgehenden Möglichkeiten bietet sich daher zur Untersuchung der zellulären Zusammensetzung von Proben des induzierten Sputums und der BAL die Durchflußzytometrie an.

1.3 Durchflußzytometrie

Durchflußzytometrie, eigentlich Durchflußzytofluorometrie, ist die simultane photometrische Messung von Parametern wie Streulicht und Fluoreszenz, die an jeder der einzeln durch einen Laserstrahl fließenden Zellen detektiert werden. Stark vereinfacht kann ein Durchflußzytometer als partikelzählendes, multiparametrisches Photometer beschrieben werden.

Trifft Licht auf Materie, wird es zu einem Teil gestreut. Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht können zur Einschätzung der relativen Zellgröße und der relativen intrazellulären Granularität herangezogen werden. Zusätzlich können bis zu 12 Fluoreszenzparameter von Photoelektronenvervielfacherröhren (PMT) gemessen werden. Das Licht von bis zu drei Lasern kann zur Anregung von vielen verschiedenen Fluorochromen genutzt werden, um eine Kombination zu finden, die von einem System aus optischen Filtern und dichroitischen Spiegeln für die PMTs separiert werden kann. Mittels Immunfluoreszenz können praktisch jedes intrazelluläre

Protein und jeder Oberflächenmarker bestimmt werden, für die Antikörper erhältlich sind. Die Erfassung der Fluoreszenzintensität führt zu Aussagen über die relative Antigendichte auf der Zelloberfläche.

Die Durchflußzytometrie bietet die einzigartige Möglichkeit, für eine statistisch relevante Zellzahl innerhalb weniger Sekunden bis zu 13 Parameter für jede einzelne Zelle erfassen zu können [Baumgarth 2000]. Durch die Messung auf Einzelzell-niveau wird die Heterogenität einer Zellpopulation erfaßt, und es resultieren nicht nur Aussagen über deren durchschnittliches Verhalten. Die Anwendungsmöglichkeiten der Durchflußzytometrie sind entsprechend vielfältig. In der Routinediagnostik wird die Durchflußzytometrie zum Nachweis des HLA-B27-Antigens bei Verdacht auf Morbus Bechterew eingesetzt und die Immunphänotypisierung von Lymphozyten in der Verlaufskontrolle von HIV-infizierten Patienten und der Leukämiediagnostik.

Der totale DNA-, RNA- und Proteingehalt sowie die Vitalität von Zellen können ebenfalls bestimmt werden. Mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden kann sogar der Gehalt an mRNA in Zellen gemessen werden. Die Bestimmung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffintermediate kann für die Untersuchung des „Respiratory Burst“ der entzündlichen Krankheiten des Atemtrakts eine wichtige Rolle spielen [Robertson 1995]. Die Quantität und Aktivität von Organellen in einer Zelle können bestimmt und das mitochondriale Membranpotential gemessen werden. Glutathion und Glutathion-S-Transferase können zur Erfassung des Energiestatus von Zellen herangezogen werden. Die Aktivität vieler intrazellulärer Enzyme wie der β -Galactosidase, der Glucosidase und der Glucuronidase sowie von Esterasen und Phosphatasen kann mit fluorogenen Substraten bestimmt werden [Borth 1995]. Die Messung des intrazellulären pH-Wertes sowie der Kalziumionenkonzentration sind etabliert. Ein Verfahren, um durchflußzytometrisch intrazelluläre Zytokine nachzuweisen, publizierten Krug et al. [1997], die ebenfalls ECP in Eosinophilen nachwiesen [1996 a].

Die Messung erfolgt, indem ein luftgekühlter Argonionen-Laser konzentriertes, monochromatisches Licht hoher Intensität liefert, das durch ein System von Linsen

in spezieller Form auf die Zellen trifft, welche orthogonal zum Licht die sogenannte „Flow Cell“ durchfließen (Abb. 1). Die Zellen sind in der Mitte eines sehr schnell fließenden Mantelstroms aus Trägerflüssigkeit hydrodynamisch fokussiert und passieren als Suspension von einzelnen Zellen in schneller Abfolge den Laserstrahl. Die Partikel oder Zellen interagieren mit dem Laserlicht.

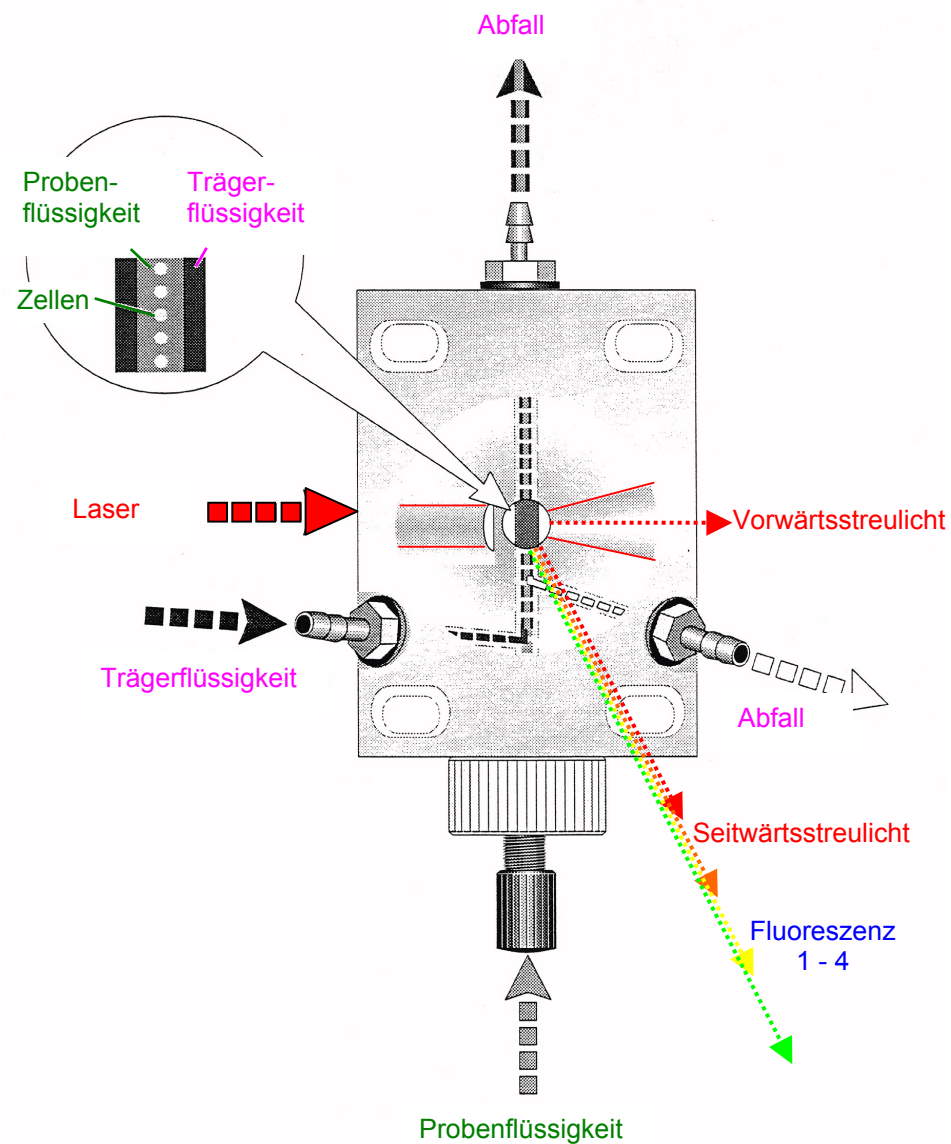


Abbildung 1: Hydrodynamische Fokussierung in der „Flow Cell“. Die Probenflüssigkeit, umgeben vom schnell fließenden Mantelstrom der Trägerflüssigkeit, wird orthogonal vom Laserlicht durchdrungen. Vorwärtsstreulicht wird in Richtung des Laserstrahls detektiert, Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenz im 90°-Winkel zum Probenstrom und zum Laserstrahl.

Streulicht wird in Richtung des Lasers als Vorwärtsstreulicht (FSC) mit einer Diode gemessen. Das FSC ist ein Parameter, der etwas über die relative Größe einer Zelle aussagt. Rechtwinklig zum Laser und ebenfalls orthogonal zum Probenstrom wird

über einen im 45° Winkel montierten dichroitischen Spiegel das Seitwärtsstreulicht (SSC), ein Maß für die relative intrazelluläre Granularität, mit einer PMT gemessen. Die PMT muß in der Lage sein, die kurzen, dicht gedrängten Blitze des emittierten Lichts einzelner Zellen, die bis zu mehreren Tausenden pro Sekunde durch das Sichtfeld fließen, in ihrer Intensität zu erfassen [Ormerod 1994, Shapiro 1995].

Fluorochrome können durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden, welches sie daraufhin als Licht größerer Wellenlänge zu emittieren vermögen. Die photochemische Anregung geschieht durch den Laser. Ein System von optischen Filtern und dichroitischen Spiegeln trennt das Fluoreszenzlicht in verschiedene Wellenlängenbereiche auf. PMTs verstärken die eingehenden Signale. Die Steuerung des Zytometers, Datenerfassung und Auswertung werden von einem PC aus geregelt.

1.3.1 Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen

Die Unterschiede der Signalintensitäten beim Einsatz von Antikörpern gleicher Spezifität von verschiedenen Herstellern sind aufgrund unterschiedlicher Konjugationsgrade groß. Leider gehen aus den Datenblättern allenfalls Bereiche für die Fluorochrom/Protein-Quotienten von Antikörpern hervor. Unterschiede in der Probengewinnung und Probenvorbereitung wie Zentrifugation, Lyse, Fixierung, evtl. Stimulation, DTT-Behandlung etc. beeinflussen die Qualität und Quantität der Antigene auf der Zelloberfläche und können sich in Form von Intensitätsunterschieden niederschlagen. Die Nutzung der Fluoreszenzintensität in der Durchflußzytometrie blieb lange Zeit darauf beschränkt, Zellpopulationen bezüglich der Expression eines Antigens als positiv oder negativ zu unterscheiden. Ein Lymphozyt z.B. kann über seine Epitope als T- oder B-Lymphozyt definiert sein, wird aber beim Gesunden nie beide Antigene besitzen (Ausnahme: einige Leukämieformen). Dieser digitale Ansatz versagt, wenn es keine klare positiv/negativ-Grenze gibt. Oberflächenantigene, deren Expression sich induzieren läßt, können nach Stimulation zeit- oder dosisabhängige Verläufe zeigen [Gessl 1994]. Der Mittelwert der gemessenen Fluoreszenzintensität (mean channel) wird benutzt, um Aussagen darüber zu machen, wie stark eine Zellpopulation ein Antigen exprimiert. Man bestimmt so die relative Antigendichte auf der Zelloberfläche. Die Verwendung des

Mittelwerts setzt eine Normalverteilung der Antigendichte einer Zellpopulation voraus. Das trifft nicht auf jedes Antigen und jede Zellpopulation zu.

Bislang wurden die Expressionsunterschiede durch den mean channel beschrieben. Dieser Parameter erlaubt nicht den Vergleich von Werten, die an zwei Geräten gewonnen wurden. Prinzipiell könnte die Kalibrierung mit einer Standardprobe eine allgemeingültige und die Vergleichbarkeit gewährleistende Einheit einführen. Standardproben in Form von Musterzellen, die einerseits die realen Eigenschaften lebender Zellpopulationen repräsentieren und andererseits den Anforderungen eines homogenen, sich nicht verändernden Standards entsprechen, sind nicht zu verwirklichen. Um mit dem FCM quantitativ Fluoreszenzintensität messen zu können, kalibriert man mit Partikeln, die eine bekannte Anzahl von Fluoreszenzmolekülen auf ihrer Oberfläche besitzen. Idealerweise handelt es sich dabei um die gleichen Fluorochrome (FITC, PE, PE-CY5, etc.), mit denen auch die Antikörper konjugiert sind. Die Meßwerte werden in Moleküläquivalenten löslichen Fluorochroms ausgedrückt (MESF = Molecules of equivalent soluble fluorochrome) und sind dann zwischen verschiedenen Geräten bzw. Laboratorien vergleichbar [Shapiro 1995]. Eine Qualitätskontrolle innerhalb einer Meßserie kann ebenfalls mit Partikeln konstanter Fluoreszenzintensität erfolgen, um Beeinträchtigungen des mean channels durch temperaturbedingte Schwankungen in den empfindlichen Teilen der Hochspannungsversorgung des Lasers und der PMTs auszuschließen.

1.3.2 Durchflußzytometrische Analyse der Leukozytensubpopulationen im induzierten Sputum

Die durchflußzytometrische Leukozytendifferenzierung von Sputumzellen wird inzwischen von mehreren Arbeitsgruppen beherrscht. Vorläufige Ergebnisse wurden mehrfach vorgestellt [Perna 1997] [Vatrella 1998] [Kidney 1994a, 1996a] [Loppow 1998a, b]. Um die unterschiedliche Zellqualität zu verdeutlichen, sind in Abbildung 2 lysiertes peripheres Vollblut, lymphozytenreiche bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit und induziertes Sputum in der gebräuchlichen Darstellung Seitwärtsstreulicht (logarithmisch) gegen CD45-Expression (logarithmisch) gegenübergestellt. Auffällig ist der hohe Anteil an Debris (Zellfragmenten, Zelltrümmern) im induzierten Sputum.

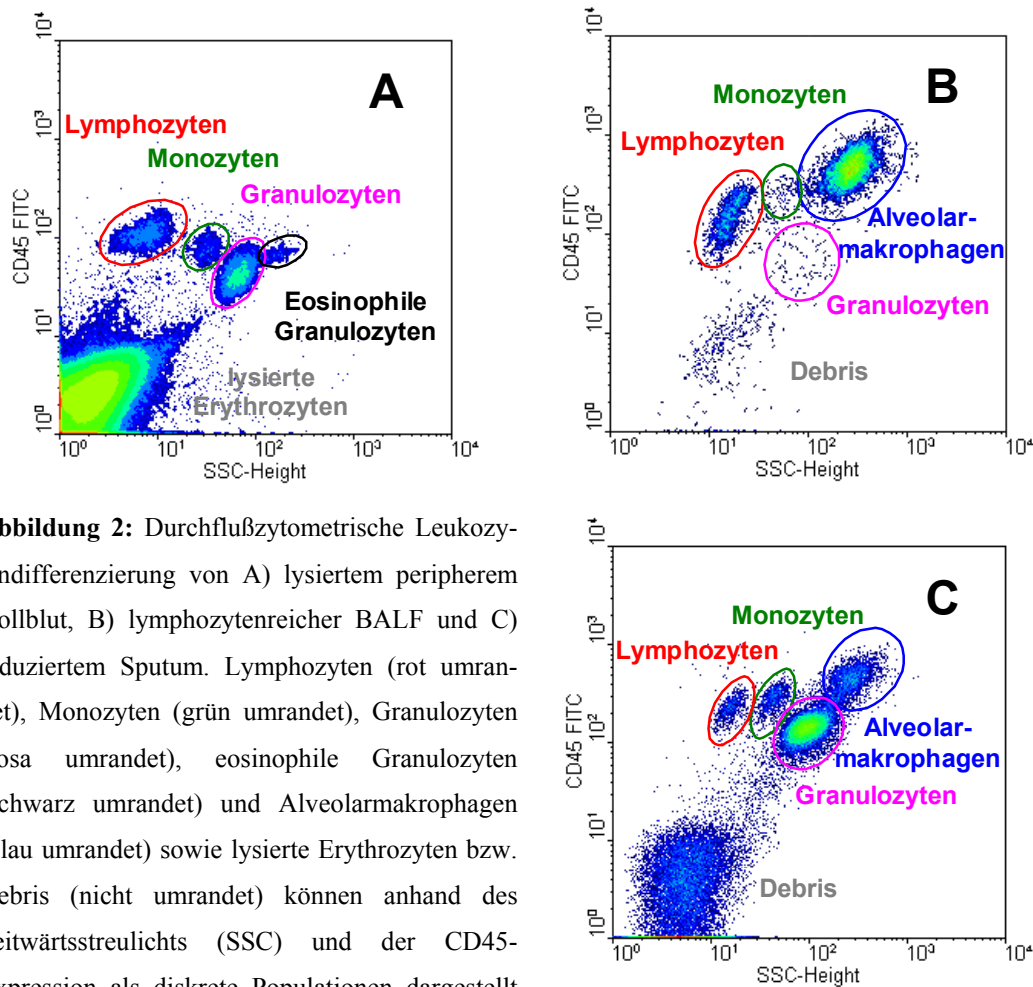


Abbildung 2: Durchflußzytometrische Leukozytendifferenzierung von A) lysiertem peripherem Vollblut, B) lymphozytenreicher BALF und C) induziertem Sputum. Lymphozyten (rot umrandet), Monozyten (grün umrandet), Granulozyten (rosa umrandet), eosinophile Granulozyten (schwarz umrandet) und Alveolarmakrophagen (blau umrandet) sowie lysierte Erythrozyten bzw. Debris (nicht umrandet) können anhand des Seitwärtsstreulichts (SSC) und der CD45-Expression als diskrete Populationen dargestellt werden.

1.3.3 Durchflußzytometrische Bestimmung eosinophiler Granulozyten im induzierten Sputum

Daß das Asthma bronchiale häufig mit einer Sputumeosinophilie einhergeht, ist schon früh beschrieben worden [Gollasch 1889]. Aus diesem Grunde ist die Bestimmung des Anteils der eosinophilen Granulozyten im induzierten Sputum eine wichtige differentialdiagnostische Aufgabe. Der „Cut-off-Wert“, ab dem ein Asthma bronchiale vorliegt, liegt mit 2 - 3 % Eosinophilen im Sputum relativ niedrig [Efthimiadis 1997], und automatisierte Ansätze zur Differenzierung zwischen neutrophilen und eosinophilen Granulozyten im Sputum sind noch nicht etabliert.

1.3.4 Durchflußzytometrische Lymphozytensubtypisierung im induzierten Sputum

Die Immunphänotypisierung von Lymphozyten anhand von Oberflächenmarkern kann wichtige differentialdiagnostische Hinweise liefern. Die Zahl der CD4-positiven T-Helferzellen im Blut unterstützt Therapieentscheidungen im Verlauf einer HIV-Infektion, und ein deutlich erhöhter CD4/CD8-Quotient in der BALF kann auf eine Sarkoidose hinweisen und eine exogen-allergische Alveolitis als eher unwahrscheinlich erscheinen lassen. Es bestand Anlaß zur Hoffnung, daß die Etablierung der Lymphozytensubtypisierung im induzierten Sputum, bei ähnlicher Spezifität und Sensitivität wie in der BALF, mit einem deutlich geringfügigeren Risiko für den Patienten einhergeht und besser toleriert wird [Loppow 2001a].

Die Übertragung der durchflußzytometrischen Methoden zur Lymphozytensubtypisierung von Blut auf Proben der BALF bedurfte einer erheblichen Optimierungsarbeit [Böttcher 1996, 2000]. Probleme bereiten die geringeren Zellzahlen, die geringeren Lymphozytenanteile und die schlechtere Zellqualität. Die Lymphozyten sind nicht über ihr Streulichtverhalten zu identifizieren und müssen über eine Kombination von CD45 und Seitwärtsstreulicht erfaßt werden. Heute werden durchflußzytometrische Methoden zur Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen in der BALF routinemäßig angewandt [Loppow, 2001d][Holz, 2001a]. Für die Übertragung dieser Methoden auf das induzierte Sputum waren Probleme durch wesentlich geringere Zellzahlen, schlechtere Qualität der Zellen, Autofluoreszenz und Schleimstoffe zu erwarten, auch wenn einige der Punkte während der Diplomarbeit [Loppow, 1997] mit dem Schwerpunkt der Leukozytendifferenzierung im Sputum nicht so sehr ins Gewicht fielen.

1.3.5 Durchflußzytometrische Bestimmung intrazellulärer Proteine

Zytoplasmatische Proteine können durchflußzytometrisch nachgewiesen werden. Hierzu werden die Zielproteine zunächst fixiert. Die Fixierung durch ein quervernetzendes Fixativ (z.B. para-Formaldehyd, Glutaraldehyd) muß einerseits die Proteine örtlich so binden, daß sie bei der anschließenden Permeabilisierung der Zellmembran nicht herausgewaschen werden können, andererseits darf die Fixierung

keine für die immunologische Detektion relevanten Proteinstrukturen so verändern, daß die Bindung des Antikörpers an sein Epitop verhindert wird. Dank kommerziell erhältlicher Fertigreagenzien wird die durchflußzytometrische Bestimmung intrazellulärer oder zytoplasmatischer Proteine heute in spezialisierten Routinelaboratorien u.a. zur Immunphänotypisierung von Leukämien eingesetzt. Wissenschaftlich ermöglichte diese Methode u.a. eine weitere Subtypisierung der Lymphozyten. Anhand der von ihnen produzierten Zytokine werden T-Helfer-Lymphozyten dem T_H1-Typ zugeordnet, wenn sie Interferon- γ oder Interleukin-2 produzieren, bzw. dem T_H2-Typ, wenn sie Interleukin-4 oder Interleukin-5 produzieren.

1.3.5.1 Zytokine - das T_H1/T_H2-Paradigma

Unter dem Oberbegriff Zytokine versteht man diverse Gruppen von sezernierten löslichen Proteinen und Peptiden, welche als humorale Regulatoren in nano- bis picomolaren Konzentrationen Funktion und Aktivität von Zellen und Geweben modulieren. Diese Proteine regulieren ebenso Zell-Zell-Interaktionen wie Prozesse mit der extrazellulären Umgebung. Viele Wachstumsfaktoren und Zytokine agieren als Überlebensfaktoren, indem sie z.B. vor Apoptose schützen.

Das T_H1/T_H2-Paradigma wurde postuliert, da murine CD4-positive Zellen aufgrund ihres Zytokinmusters in zwei diskrete Subpopulationen eingeteilt werden konnten [Abbas 1996]. Die T_H1-Zellen produzieren in erster Linie Interferon- γ , Interleukin-2 sowie TNF- β und repräsentieren eine zellvermittelte Immunreaktion, während die T_H2-Zellen in erster Linie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 sowie IL-13 produzieren und eine humorale Immunreaktion einleiten können. Das Konzept der T_H1- und T_H2-Zytokine ist weitgehend akzeptiert, wenngleich es zunehmend relativiert wird, und liegt den meisten wissenschaftlichen Artikeln, die sich mit Zytokinen beschäftigen, zugrunde. Schematisch gesprochen, erzeugen Infektionen mit Viren oder intrazellulären Pathogenen eine T_H1-Antwort, solche mit Parasiten eine T_H2-Antwort.

Im Rahmen dieser Arbeit sind insbesondere die Zytokine Interferon- γ , Interleukin-2, Interleukin-4 und Interleukin-5 wichtig, die von verschiedenen Lymphozytensubpo-

pulationen produziert werden können und denen eine mögliche Rolle als diagnostischer oder therapeutischer Marker zukommen kann [Pauwels 1998][Stirling 2000].

Interferon- γ besteht aus 143 Aminosäuren. Monomere von 20-25 kDa bilden Di- oder Multimere, die hauptsächlich von T_H -, $T_{C/S}$ - und NK-Zellen produziert werden. Seine biologische Aktivität entfaltet IFN- γ , indem es die Aktivierung, das Wachstum und die Differenzierung von T-, B- und NK-Zellen sowie Makrophagen moduliert [Burmester 1998] und somit hauptsächlich antivirale und antiparasitäre Wirkung induziert.

Interleukin-2 besteht aus 133 Aminosäuren (15,4 kDa) und wurde früher T-Zell-Wachstumsfaktor (TCGF) genannt. Es wird von T-Zellen produziert und reguliert die T- und B-Zell-Proliferation sowie die B-Zell-Differenzierung und aktiviert Monozyten [Burmester 1998]. Als zentraler Faktor in der Immunantwort spielt IL-2 eine wichtige Rolle in der anti-entzündlichen Reaktion, der Hämatopoese und in der Tumorbekämpfung [Huland 1992]. IL-2 stimuliert die Synthese von IFN- γ in peripheren Leukozyten und induziert die Sekretion von IL-1, TNF- α und - β .

Interleukin-4 besteht aus 129 Aminosäuren (20 kDa) und weist eine globuläre Struktur mit hydrophobem Kern auf. Das früher als B-Zell-Stimulationsfaktor (BCSF) bezeichnete Zytokin wird von Mastzellen, T-Lymphozyten und Knochenmarks-Stromazellen produziert. IL-4 induziert den Isotyp-Switch von B-Zellen sowie die Sekretion von IgG4 und IgE [Burmester 1998].

Interleukin-5 ist ein N-glycosyliertes antiparalleles disulfidgebundenes Homodimer von ca. 13 kDa, das aus 115 Aminosäuren besteht; es trug früher viele verschiedene Bezeichnungen: „eosinophil differentiation factor / colony stimulation factor“ (EDF / E-CSF), „B-cell growth factor II“ (BCGFII), „B-cell differentiation factor for IgM“ (BCDF μ) und „T-cell replacing factor“ (TRF). Es wird von Mastzellen, T-Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten produziert und induziert deren Differenzierung sowie das B-Zellwachstum [Burmester 1998].

1.3.6 Wirkung von Dithiothreitol auf die immunologische Detektionsreaktion

Die Sputumzellen sind im Sekret der Atemwege eingebettet. Um Einzelzellsuspensionen für weiterführende Untersuchungen zu erhalten, muß das Sekret verflüssigt und müssen die Zellen aus der Matrix viskoser Mukus-Glykoproteine herausgelöst werden. Eine sichere und effektive Methode, um mukusfreie Suspensionen einzelner Zellen zu erhalten, ist die Inkubation mit Dithiothreitol [Tockman 1995]. Unter dem Namen Sputolysin[®] wird Dithiothreitol (DTT) als 10fach-Konzentrat in PBS-Puffer angeboten. DTT spaltet Disulfidbrücken. Das Gleichgewicht der in Abbildung 3 dargestellten Reaktion verschiebt sich zugunsten des stabilen cyclischen Disulfids [Bodanszky 1993].

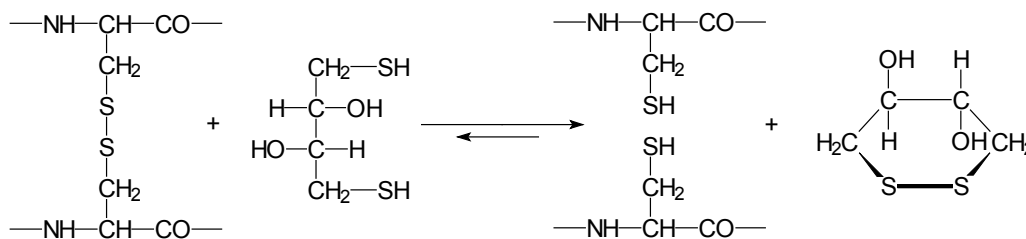


Abbildung 3: Reduktive Disulfidbrückenspaltung mit Dithiothreitol. Das Reaktionsgleichgewicht verschiebt sich zugunsten des stabileren cyclischen Disulfids.

Die reduktive Spaltung von Disulfidbindungen bewirkt eine Auffaltung von Proteinstrukturen. Es ist also damit zurechnen, daß Änderungen der Raumstruktur der antigenen Epitope Auswirkungen auf die immunologische Detektionsreaktion haben. Unter Umständen wird die Dichte der antigenen Epitope auf der Zelle durch DTT verändert. Es gibt nur wenig und zudem widersprüchliche Literatur, die sich mit den Auswirkungen der DTT-Behandlung beschäftigt. Kidney et al. [1996b] untersuchten, ob DTT mit Oberflächenantigenen reagieren könne. Ohne nähere Beschreibung der Daten kamen sie zu dem Schluß, daß die Behandlung von Blutzellen mit DTT keinen durchflußzytometrisch meßbaren Einfluß auf die geprüften Oberflächenmarker hatte. Lediglich die Werte für HLA-DR waren um 18 % reduziert. Dies entsprach aufgrund der durch Disulfidbrücken zusammengehaltenen Untereinheiten des Moleküls den Erwartungen der Autoren. Wu et al. [1997] zeigten bei durchflußzytometrischen Untersuchungen bezüglich der Oberflächenantigene CD11b und CD18, daß die DTT-Methode gegenüber einer Methode des wiederholten Waschens sowohl bei Proben des induzierten Sputums als auch bei peripherem Blut zu signifikant niedrigeren Fluoreszenzintensitäten führte.

Durch die Inkubation der Sputumflocken mit Dithiothreitol versucht man, das Problem der Muzine zu verringern, führt aber gleichzeitig einen neuen Einflußfaktor unbekannter Größe in die Probenvorbereitung ein. Um diesen Einflußfaktor besser einschätzen zu können, wurde schon während der Diplomarbeit eine prospektive Untersuchung an Vollblut begonnen und im Rahmen dieser Arbeit weitergeführt, deren Ergebnisse [Loppow 2000b] in dieser Arbeit kurz zusammengefaßt werden.

1.3.7 Untersuchung der induzierbaren NO-Synthase in Leukozyten des induzierten Sputums

In den letzten zwei Jahren hat die Messung des Stickstoffmonoxids (NO) eine besondere Aufmerksamkeit erlangt [Barnes 1996a], nachdem man zeigen konnte, daß NO in der Ausatemluft nachweisbar ist, und erste Hinweise dafür vorlagen, daß NO an die Art und den Grad einer Atemwegserkrankung gekoppelt sein könnte [Alving 1993][Kharitonov 1994]. NO wird von der induzierbaren NO-Synthase aus L-Arginin produziert, welches ebenfalls das Substrat der Arginase ist. Die induzierbare NO-Synthase spielt insofern eine zentrale Rolle, als sie gegenüber der konstitutiven NO-Synthase in wesentlich weiterem Ausmaß aktiviert werden kann und in Entzündungszellen vorkommt. Die NO-Produktion wird durch die Aktivität und Menge der induzierbaren NO-Synthase bestimmt [Yates 1995]. Da diese beiden Faktoren und somit auch das ausgeatmete NO möglicherweise ein Maß für die Entzündung im Atemtrakt darstellen, kommt der Aufklärung der qualitativen und quantitativen Zusammenhänge zwischen Entzündung und NO-Produktion eine besondere Bedeutung zu.

Die Regulation der NO-Synthase besitzt gemeinsame Strecken mit der Regulation von Zytokinen, die für die entzündliche Reaktion bedeutsam sind. Es gibt Hinweise darauf, daß T_H1 -Zytokine die NO-Synthase aktivieren [Corraliza 1995] und die Arginase hemmen, während T_H2 -Zytokine die Arginase aktivieren und die NO-Synthase hemmen sollen [Barnes 1996b]. So wird bei Makrophagen aus dem Knochenmark der Maus die NO-Synthase durch IFN- γ induziert, während IL-4, IL-10 und PGE₂ die Induktion unterdrücken. PGE₂ und die T_H2 -Zytokine IL-4 und IL-10 induzierten Arginase, das T_H1 -Zytokin IFN- γ hingegen nicht [Modolell 1995]. Die Messung der T_H1/T_H2 -Zytokine kann somit möglicherweise helfen, die

Konkurrenz von NO-Synthase und Arginase um das gemeinsame Substrat L-Arginin zu beschreiben. Desweiteren erscheint auch die Messung entsprechender Regulatoren, z.B. des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B, erfolgversprechend, da es Hinweise dafür gibt, daß Corticosteroide unter anderem auf die nukleären Transkriptionsfaktoren einwirken und auf diese Weise einen Teil ihrer antientzündlichen Wirkung entfalten. Diese Hypothese würde auch die Beobachtung erklären, daß Corticosteroide sowohl die Entzündung hemmen als auch die Menge des ausgeatmeten NO senken. Gegen die Messung des ausgeatmeten NO als Routinemethode spricht, daß diese apparativ sehr aufwendig ist; die Messung der NO-Synthase in den Sputumzellen ist möglicherweise besser geeignet, da der wesentliche analytische Aufwand in ein automatisiertes Labor verlagert werden kann.

1.3.8 Untersuchung der Auswirkungen der IL-2-Inhalationstherapie bei Patienten mit pulmonal metastasiertem Nierenzellkarzinom

Die intravenöse oder subcutane Applikation von Interleukin-2 ist als Immuntherapie bei fortgeschrittenen Tumoren etabliert [Rosenberg 1987, 1994][Sondel 1988][Atzpodien 1990]. Mit dem Ziel, pulmonale Metastasen direkt zu behandeln und damit die Effektivität der Immuntherapie zu erhöhen, setzen einige Zentren zusätzlich die IL-2-Inhalation ein [Bubenik 2000]. Der normale systemische Therapieansatz, dessen Kombination mit der IL-2-Inhalation [Nakamoto 1997][Huland 2000a][Lorenz 1996], aber auch die exklusive Inhalationstherapie [Huland 2000a][Lorenz 1996] können zur Remission pulmonaler Metastasen beim Nierenzellkarzinom führen und den Überlebenszeitraum der Patienten verlängern [Motzer 2000][Huland 2000b].

Einige Arbeiten haben die anti-Tumor-Eigenschaften von IL-2 charakterisiert [Sondel 1988][Lorenz 1996][Zissel 1996], zum Teil unter Einbeziehung der Daten zum Einsatz respiratorischer Symptome [Lorenz 1996][Ardizzoni 1994] als auch der Eosinophilie im Blut [Sedgwick 1990] oder in der BALF [Zissel 1996]. Eosinophilie wird als Hauptsymptom beim Asthma bronchiale angesehen, obwohl sie *per se* nicht spezifisch ist, so daß die Assoziation von IL-2 mit respiratorischen Symptomen, wie beispielsweise einem Dosis-limitierenden Husten [Lorenz 1996], eine gezielte Untersuchung der respiratorischen Nebenwirkungen der IL-2-Inhalationstherapie nahelegt.

Unter dem Gesichtspunkt, daß die am meisten verbreitete Form des Asthmas, das extrinsische Asthma, als eine T_H2-dominierte Erkrankung angesehen wird [Durham 2000][Tournoy 2002], die immunstimulatorische Wirkung von IL-2 aber auf seine T_H1-Effekte zurückgeführt wird [Lucey 1996], erscheint die Untersuchung besonders spannend. Die Analyse muß neben der Erhebung der klassischen Lungenfunktionsparameter auch neue, nichtinvasive Parameter der Atemwegsentzündung wie beispielsweise die Sputumzusammensetzung [Jayaram 2000][Holz 2000] und das exhalierte Stickstoffmonoxid (NO) [Silkoff 1999][Kharitonov 2001] mit einschließen, die als informativ vor allem für die Diagnose und Therapiekontrolle beim Asthma bronchiale gelten.

2 Problemstellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Ausarbeitung durchflußzytometrischer Analyseverfahren, um Zellen des induzierten Sputums phänomenologisch bezüglich ihrer Oberflächenantigene und funktionell anhand ihrer Fähigkeit zur intrazellulären Zytokinproduktion zu untersuchen.

Nachdem zunächst der Ansatz der Leukozytendifferenzierung von der BALF auf Sputum übertragen werden konnte, sollte nun die Lymphozytensubtypisierung anhand der Oberflächenantigene für Sputumproben etabliert werden. Besondere Aufmerksamkeit sollte dem Aufbau der Gating-Strategien und der Kalkulation der Checksummen zur Kontrolle der Plausibilität zukommen - beides essentielle Voraussetzungen für die Interpretation der Daten. Bei ausreichend großer Fallzahl galt es die Frage zu beantworten, inwieweit differentialdiagnostisch ausreichend große Unterschiede zwischen Proben von Patienten mit verschiedenen definierten Krankheitsbildern nachweisbar sind. Um die Validität der Lymphozytensubtypisierung sicherzustellen, sollte der Effekt des bei der Aufarbeitung der Sputumproben eingesetzten Dithiothreitol auf die immunologische Detektionsreaktion mit den wichtigsten Antikörpern anhand der Veränderung der Fluoreszenzintensität untersucht werden. Da der Effekt an Zellen untersucht werden mußte, die ohne vorherige DTT-Behandlung zugänglich waren, wurde peripheres Blut als Modell des induzierten Sputums eingesetzt.

Im Mittelpunkt der Arbeit steht der Aufbau von Methoden zur durchflußzytometrischen Messung funktioneller Unterschiede zwischen Zellen im Hinblick auf das T_H1/T_H2 -Paradigma. So sollten Methoden zur Messung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase als indirektem Marker dieses Gleichgewichtes und der intrazellulären Zytokine in stimulierten T-Lymphozyten aus Sputumproben etabliert und sodann auf T_H - und $T_{C/S}$ -Lymphozyten übertragen werden. Die Untersuchung definierter Patientengruppen sollte klären, inwieweit sich die Zytokinprofile von Patienten mit Asthma bronchiale oder COPD unterscheiden.

Als weitere Aufgaben sollten verschiedene durchflußzytometrische Verfahren zur Differenzierung eosinophiler und neutrophiler Granulozyten im induzierten Sputum verglichen werden, da die etablierte durchflußzytometrische Leukozytendifferenzierung eosinophile und neutrophile Granulozyten nicht unterscheiden kann.

Einige der entwickelten Nachweisverfahren fanden eine Anwendung in klinischen Studien. Der immunzytochemische Nachweis der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase in Alveolarmakrophagen und Granulozyten des induzierten Sputums wurde in einer klinischen Studie bei Patienten mit chronischer Bronchitis unter inhalativer Steroidtherapie eingesetzt, die durchflußzytometrische Messung des intrazellulären Zytokinprofils konnte in einer prospektiven Studie eingesetzt werden, um die Modulation der Zytokinproduktion durch inhaliertes Interleukin-2 bei Patienten mit pulmonal metastasiertem Nierenzellkarzinom in Blut und Sputum zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Biologisches Probenmaterial

Alle in dieser Arbeit untersuchten Proben stammen von freiwilligen Spendern, Patienten oder gesunden Kontrollpersonen, die das Forschungslabor des Vereins zur Förderung der Pneumologie bzw. das Pneumologische Forschungsinstitut am Krankenhaus Großhansdorf für Vortests bzw. reguläre Visiten klinischer Studien besucht haben. Für die Materialverwendung zur Methodenentwicklung sowie die beiden klinischen Studien „inhalatives Steroid bei Patienten mit chronischer Bronchitis“ bzw. „Zusatzuntersuchungen bei Patienten mit pulmonal metastasiertem Nierenzellkarzinom unter inhalativer Interleukin-2-Therapie“ lagen Voten der Ethikkommission des Landes Schleswig-Holstein vor; ebenso für alle in den o.g. Institutionen durchgeführten klinischen Studien.

3.1.1 Induziertes Sputum

Bei mehr als 200 Freiwilligen, gesunden Probanden und Patienten aus der Forschungsabteilung des Krankenhauses Großhansdorf wurde Sputum nach einer Standardmethode gewonnen [Holz 1998b, c].

Bei den anfänglich durchgeführten Vorversuchen kam es lediglich darauf an, eine möglichst große Menge Material vom Probanden zu erhalten. In der Regel wurde 3%ige Kochsalzlösung zur Inhalation verwandt. Da Änderungen der eingesetzten Salzkonzentration keinen signifikanten Einfluß auf die Zusammensetzung des Sputums haben [Popov 1995], konnten auch Proben vermessen werden, die nach Inhalation von vier- oder fünfprozentiger Kochsalzlösung erhalten wurden. Für alle vergleichenden Untersuchungen wurden standardisierte Protokolle eingesetzt.

3.1.1.1 Durchführung der Sputumprovokation

Nach kurzer Anamnese wurde zunächst eine Lungenfunktionsmessung durchgeführt. Wichtigste Parameter waren das forcierte Expirationsvolumen innerhalb einer Sekunde (FEV_1) und dessen prozentuales Verhältnis zum Sollwert ($FEV_1\%$ Soll), der sich aus Alter, Größe und Gewicht berechnete. Aus Sicherheitsgründen wäre keine

Provokation durchgeführt worden, wenn das FEV_1 weniger als 80 Prozent des Sollwertes betragen hätte. Dem Sicherheitsaspekt kommt bei der Provokation mit hypertoner Kochsalzlösung besondere Bedeutung zu. Boushey et al. [1996] berichteten, daß bei einem Ausgangswert von mehr als 80 % des Soll- FEV_1 nur 2 % der Probanden einen Abfall von mehr als 20 % zeigten, während bei einem Ausgangswert von weniger als 80 % des Soll- FEV_1 36 % der Probanden einen Abfall von mehr als 20 % erlitten. Desweiteren ist bekannt, daß nur ca. 5 % der Bevölkerung an Asthma bronchiale leiden, aber ca. 20 % eine sogenannte unspezifische Überempfindlichkeit der Atemwege aufweisen, so daß während der Sputuminduktion möglicherweise mit einer Bronchokonstriktion zu rechnen ist. Präventiv wurden jedem Probanden nach der ersten Lungenfunktionsmessung zwei Hübe Sultanol (200 µg) aus einem Dosieraerosol gegeben. Hierbei handelte es sich um ein β_2 -Sympatomimetikum, dessen Schutzfunktion vor einer Bronchokonstriktion bei Asthmatikern während der Sputuminduktion belegt ist [Popov 1995].

Eine zweite Lungenfunktionsmessung wurde 10 min nach der Gabe von Sultanol durchgeführt. Die hieraus erhaltenen Werte wurden als Ausgangswert für die nachfolgenden Messungen genommen. Ein Abfall von mehr als 20 % bezüglich des FEV_1 führte zum Abbruch der Sputuminduktion. Die Probanden atmeten sodann für 5 min Raumlufte mit 3%iger, ultraschallvernebelter Kochsalzlösung ein. Während der Inhalation trugen sie eine Nasenklammer. Eine weitere Lungenfunktionsmessung wurde durchgeführt, der nochmals ein 5-minütiges Inhalationsintervall folgte. Nach einer abschließenden Lungenfunktionsmessung sollte Sputum produziert werden. Die Probanden wurden gebeten, sich die Nase zu putzen, den Mund mehrmals kräftig mit Wasser zu spülen, zu gurgeln und zwei bis drei Schluck Wasser zu trinken, um die Kontamination mit Nasen-Rachen-Sekret zu verringern. Durch Husten versuchten sie, Sekret aus den Bronchien hochzubefördern. Der Auswurf wurde in Petrischalen gesammelt. Unter dem Mikroskop wurden die Sputumflocken manuell von Speichel- und Plattenepithelkontaminationen befreit [Pin 1992] und in ausgewogene Reaktionsgefäße überführt.

3.1.1.2 Aufarbeitung der Sputumproben

Das Gewicht der Sputumflocken wurde bestimmt, und diese wurden mit der doppelten Menge an Sputolysin-Gebrauchslösung (6,5 mM DTT, 100 mM Phosphatpuffer, pH 7) versetzt und für 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Alle 5 min wurden die Zellen mittels Vortexer mäßig gemischt. Die Proben wurden mit dem 20fachen des Flockengewichtes an PBS-Puffer versetzt und mit Hilfe des Vortexers homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 600 x g für 10 min wurden die Zellen vom Überstand befreit und in PBS/BSA resuspendiert. 20 µl wurden für die Zellzählung abgenommen, mit 5 µl Trypanblau versetzt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. 10 µl wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt; Vitalität und Zellzahl pro ml Zellsuspension wurden berechnet. Für das Zytospinpräparat wurde ein Aliquot von 20.000-40.000 Zellen mit PBS/BSA auf ein Volumen von 100 µl gebracht. Je nach Zellzahl wurde die verbleibende Zellsuspension mit 400-1000 µl PBS/BSA versetzt und für die durchflußzytometrischen Untersuchungen entweder innerhalb von zwei Stunden bei 2-8°C in die Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin Dr. Kramer und Kollegen nach Geesthacht transportiert oder für die Zytokinmessung zunächst für 4 Stunden in Großhansdorf stimuliert.

3.1.2 Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit

Für Vorversuche, die zunächst eine größere Zellzahl erforderten, wurde in einzelnen Fällen bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit eingesetzt, die für die Diagnose im zytologischen Labor des Krankenhauses Großhansdorf nicht mehr benötigt wurde.

Die BAL wird in der Regel nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie durchgeführt [Costabel, 1993]. Im Anschluß an eine Prämedikation erfolgt eine flexible Bronchoskopie in Lokalanästhesie (Lidocain). Da Lidocain die Vitalität und Funktion der Zellen beeinflusst, wird es vor der Durchführung der BAL ggf. abgesaugt [Kleeh 1989]. Nach Erreichen der „Wedge-Position“ und Verschuß des Mittellappenbronchus werden 100 mL auf 37°C erwärmte physiologische Kochsalzlösung in Portionen von jeweils 20 mL instilliert und aspiriert. Im Idealfall erwartet man eine Rückgewinnungsrate zwischen 50 und 70 % [Kleeh 1990].

3.1.3 Peripheres Vollblut

Venöses peripheres Vollblut (EDTA bzw. NH_4 -Heparin) von freiwilligen Probanden wurde für Vorversuche eingesetzt.

3.2 Durchflußzytometrische Untersuchungen

Die durchflußzytometrischen Untersuchungen wurden in der Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin Dr. Kramer und Kollegen in Geesthacht bis Oktober 1999 an drei *Epics XL-MCL* Geräten der Firma Beckmann Coulter (ehemals Coulter Electronics), bestückt mit einem Argonionen-Laser, dessen Anregungswellenlänge bei $\lambda = 488 \text{ nm}$ liegt, und 4 Fluoreszenzdetektoren durchgeführt. Ab Oktober 1999 kamen zwei FACSCalibur der Firma BD Biosciences (ehemals Becton Dickinson) zum Einsatz, bestückt mit einem Argonionen-Laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$), einer Laserdiode ($\lambda = 635 \text{ nm}$) und 4 Fluoreszenzdetektoren.

Die Akquisition der Daten erfolgte bei den Coulter-Geräten mit der System-2-Software, bei den BD-Geräten mit CellQuest. Ausgewertet wurden alle FCS-Daten mit der System 2 Software von Coulter. Die in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper waren mit den in Tabelle 1 gezeigten Fluorochromen markiert.

Fluorochrom	Abkürzung	Anregung $\lambda_{\text{max}} [\text{nm}]$	Emission $\lambda_{\text{max}} [\text{nm}]$	Farbe
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	495	520	grün
R-Phycoerythrin	PE	495, 540, 564	575	gelb
Propidiumiodid	PI	342, 495	639	orange
Peridinchlorophyllprotein	PerCP			rot
Peridinchlorophyllprotein-Cyan-5.5	PerCP-Cy5.5			rot
Phycoerythrin-Cyan-5	PE-CY5	488	660-670	rot
Allophycoerythrin	APC	650	660	rot

Tabelle 1: Eingesetzte Fluorochrome sowie Maxima der Wellenlängen für die Anregung und die emittierten Fluoreszenzen.

Aus dem Verlauf der Spektren ergaben sich bestimmte Filterkombinationen für das Coulter Durchflußzytometer (Abb. 4). Das Vorwärtsstreulicht wurde in der FSC-Diode erfaßt, das SSC, mit $\lambda > 488 \text{ nm}$, über einen dichroitischen Spiegel zur SSC-

PMT reflektiert. Ein Filter blockte das im Verhältnis zur Fluoreszenz viel intensivere Streulicht mit $\lambda < 488 \text{ nm}$ ab und ließ nur Licht größerer Wellenlängen passieren. Ein weiterer dichroitischer Spiegel reflektierte Licht mit $\lambda < 550 \text{ nm}$ zur FL 1 PMT, deren untere Grenze des Spektralbereiches durch einen Filter auf $\lambda = 525 \text{ nm}$ festgelegt wurde. Die grüne Fluoreszenz von FITC wurde bei $525 < \lambda < 550 \text{ nm}$ gemessen. Über weitere dichroitische Spiegel und optische Filter wurde das Licht separiert, so daß die gelbe Fluoreszenz von PE in der FL 2 PMT bei $575 < \lambda < 600 \text{ nm}$, die orange von PI in der FL 3 PMT bei $625 < \lambda < 650 \text{ nm}$ und die rote von PE-CY5 in der FL 4 PMT bei $\lambda > 675 \text{ nm}$ gemessen wurden. Das eingesetzte PE-CY5-Tandemkonjugat TriColor[®] bestand aus einem PE-Trägermolekül, das nach Anregung seine Energie an Cyan-5-Farbstoffe weitergab, die an das Trägermolekül angekoppelt waren.

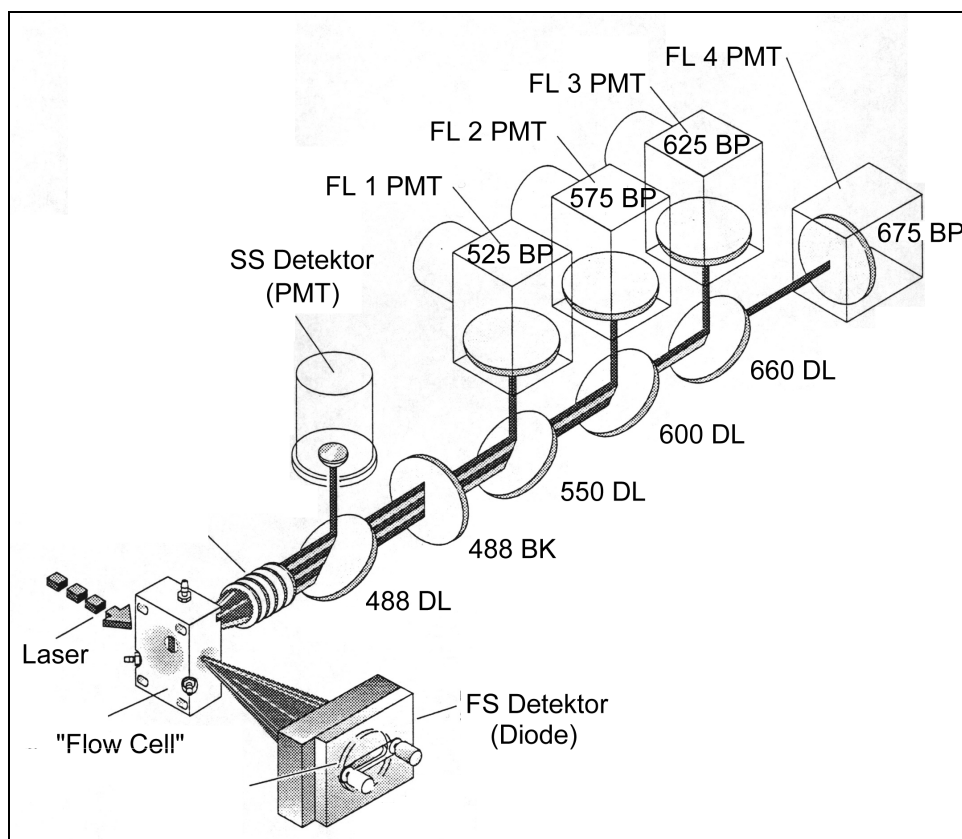


Abbildung 4: Strahlengang und Filterkonfiguration im Epics XL

Beim Epics XL konnten die Filter ausgetauscht werden. So konnte ein Polarisationsfilter in den Strahlengang gebracht werden, so daß eosinophile Granulozyten anhand ihres erhöhten depolarisierten Seitwärtsstreulichts detektiert werden

konnten [Wong 1995]. Der zugrundeliegende physikalische Ansatz ist einfach [de Grooth 1987], unterliegt aber einem Patent der Firma Abbott und wird in deren modernsten Blutbildautomaten Cell-Dyn 3000 und 3500 eingesetzt. Zirkulär polarisiertes Licht, welches rechtwinklig zum ursprünglichen Strahl gestreut wird, erscheint als linear polarisiertes Seitwärtsstreulicht (Abb. 5). Ein Teil des gesammelten 90°-Streulichtes ist immer mehrfach gestreut worden. Je häufiger es gestreut wird, desto größer ist der Anteil an depolarisiertem Licht [Shapiro 1995]. Die Granula der Eosinophilen tragen zu einer sehr häufigen Streuung bei; entsprechend hoch ist der zu ihrer Charakterisierung genutzte Anteil an depolarisiertem SSC.

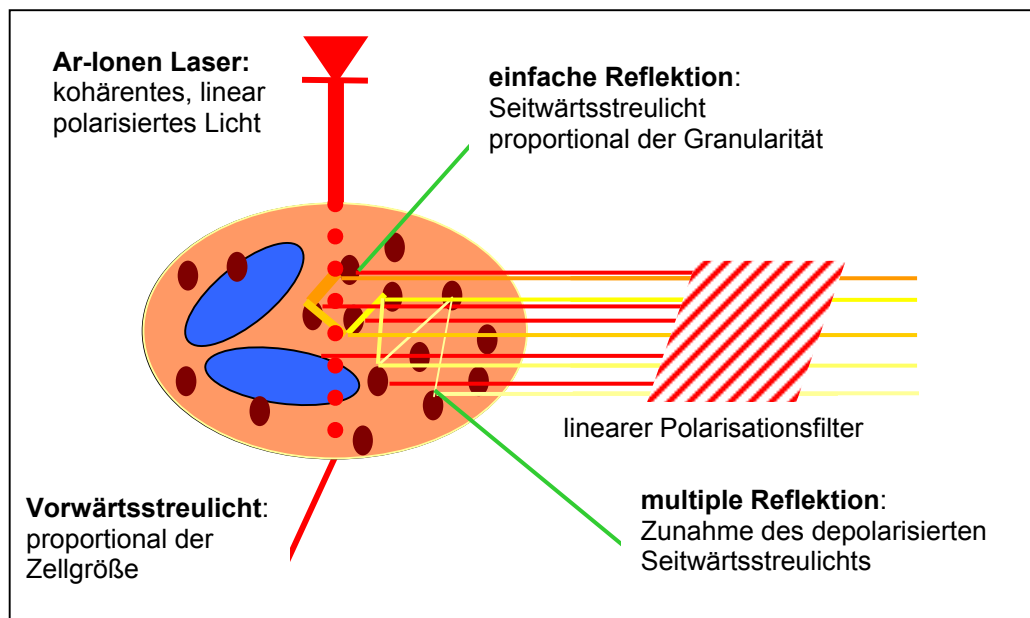


Abbildung 5: Beugung und Streuung am eosinophilen Granulozyten

Die Filterkonfiguration mit dem Polarisationsfilter (Sonderanfertigung für Forschungszwecke von Dr. H. J. Eigner, Coulter, Krefeld) am Coulter Epics XL, dessen Laserlicht zirkulär polarisiert ist, wird in Abbildung 6 dargestellt. Ein dichroitischer Spiegel reduzierte die Lichtintensität des durchgehenden Lichts um 50 %. Erst der nächste dichroitische Spiegel ließ Licht von $\lambda < 488 \text{ nm}$ nicht mehr passieren, reflektierte aber kürzere Wellenlängen zur FL 1 PMT. Ein Polarisationsfilter ließ nur das depolarisierte SSC zur Messung hindurch. Die anderen Filter wurden so versetzt, daß FITC in der FL 2 PMT und PE in der FL 3 PMT erfaßt wurden. PE-CY5 wurde weiterhin in der FL 4 PMT gemessen.

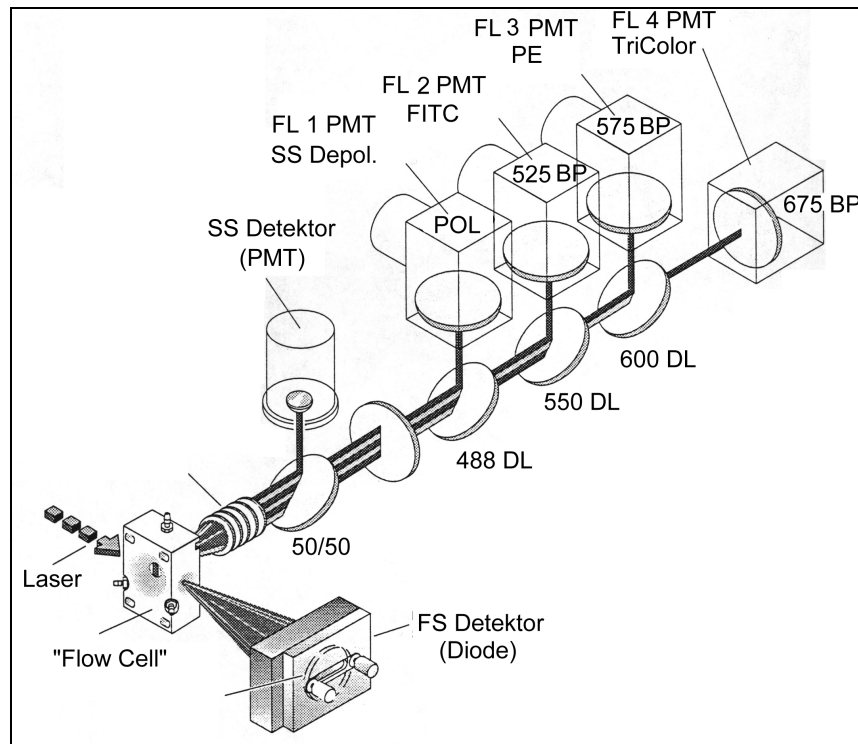


Abbildung 6: Coulter Epics XL mit Polarisationsfilter. Ein 50/50 Filter reduzierte die Lichtintensität, das depolarisierte Seitwärtsstreulicht wurde in FL 1 gemessen, FITC und PE verschoben sich um eine PMT nach rechts, TriColor blieb unverändert in FL 4.

3.2.1 Kalibrierung der Durchflußzytometer

Zur Kalibrierung des Durchflußzytometers wurden Dako FluoroSpheres eingesetzt. Sie bestanden aus „Blank Beads“ und fluoreszenzmarkierten „Calibration Beads“, die 5 Partikelpopulationen mit verschiedenen Fluoreszenzintensitäten, ausgedrückt in MESF, umfassen. Dako Beads emittierten Licht im kontinuierlichen Spektrum. Sie waren an Beads mit definierter Anzahl von FITC-, PE- und PE-CY5-Molekülen kalibriert, so daß eine direkte Angabe der Anzahl MESF für diese Fluorochrome möglich war (Tabelle 2).

	FL 1 FITC	FL 2 PE	FL 4 PE-CY5
1	Blank	Blank	Blank
2	2500	1500	900
3	6500	4400	2100
4	19000	14500	6900
5	55000	43800	22100
6	150000	131200	77100

Tabelle 2: Dako FluoroSpheres

MESF für Beads in FL 1, FL 2 und FL 4.

Je ein Tropfen Blank Beads und Calibration Beads wurden in ein 5 ml fassendes Polystyrolröhrchen gegeben, mit 1 ml PBS versetzt, gut durchmischt und unter den entsprechenden Geräteeinstellungen vermessen. Alle Partikel hatten den gleichen Durchmesser von 3,2 µm. Anhand ihres Streulichtverhaltens waren die Beads im

Scattergramm nicht zu unterscheiden. Legte man jedoch ein elektronisches Fenster (gate) um die Beadpopulation im Scattergramm (Abb. 7 a) und ließ sich nur diese Ereignisse in einer logarithmischen Auftragung der Fluoreszenzintensität für FL 1 (FITC) gegen die Anzahl der Ereignisse darstellen, so war die Unterscheidung möglich (Abb. 7 b).

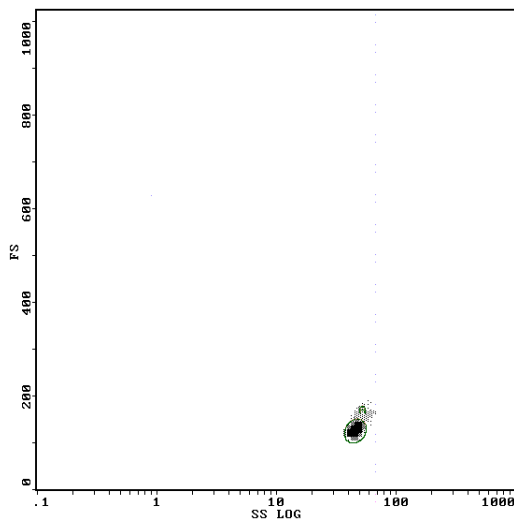


Abbildung 7a: Alle Dako-Beads werden im Gate A anhand des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts erfasst.

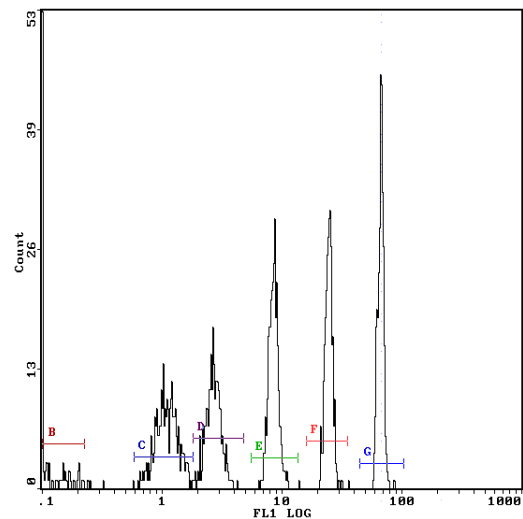


Abbildung 7b: Darstellung der 6 Bead-Populationen unterschiedlicher Fluoreszenzintensität in FL 1 gegen die Anzahl der Ergebnisse.

Unter optimalen Bedingungen ergaben sich 5 von den Blank Beads in Region B gut zu trennende Signale (Abb. 7 b, Region C-G). Die mean channels aus Region C-G wurden gegen die Anzahl MESF aus Tabelle 2 (Spalte 1) doppelt-logarithmisch aufgetragen, und die lineare Regression wurde berechnet. Unter den gleichen Geräteeinstellungen durchgeführte Messungen konnten anhand der so ermittelten Regressionsfunktion ebenfalls in MESF umgerechnet werden.

3.2.2 Qualitätskontrolle der Durchflußzytometer

Zur Qualitätskontrolle wurden Coulter FluoroSpheres eingesetzt; hierbei handelte es sich um Latexpartikel mit definierter Fluoreszenzintensität. Ein Tropfen Coulter FluoroSpheres wurde mit 1 ml 0,01 M PBS versetzt, gut durchmischt und anschließend am FCM vermessen. Die ermittelten mean channels wurden anhand der aus der Kalibrierung erhaltenen Regressionsfunktion in MESF umgerechnet. Aus 20 an verschiedenen Tagen erhobenen Meßwerten wurden Mittelwert und Standardabweichung und daraus der Vertrauensbereich für nachfolgende Messungen bestimmt.

3.2.3 Durchflußzytometrische Analyse der Leukozytensubpopulationen im induzierten Sputum

Für die Analyse wurden jeweils 100 µL Probe mit der den Herstellerempfehlungen entsprechenden Menge fluoreszenzmarkiertem CD45-Antikörpers für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, mit 500 µL PBS versetzt und vermessen. Die durchflußzytometrische Leukozytendifferenzierung wurde anhand der CD45-Expression und des Seitwärtsstreulichts vorgenommen (Abb. 8) [Loppow 1998a, 1998b].

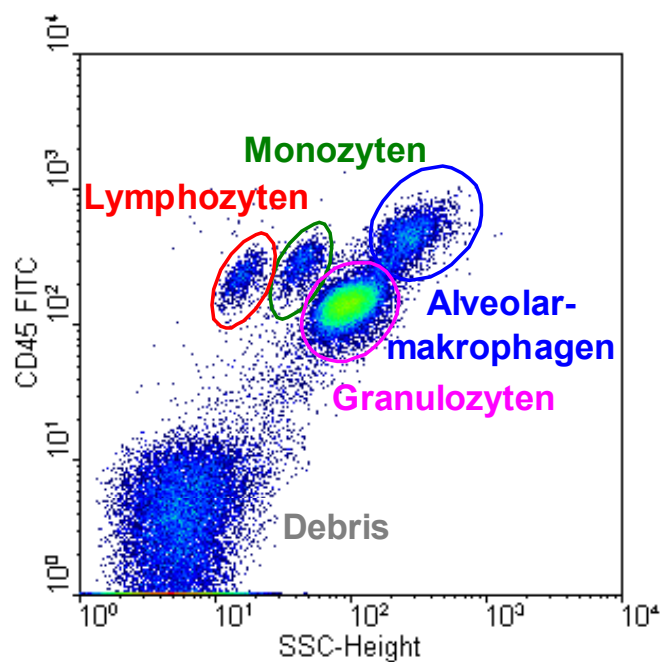


Abbildung 8: Durchflußzytometrische Leukozytendifferenzierung von Lymphozyten (rot umrandet), Monozyten (grün umrandet), Granulozyten (rosa umrandet) und Alveolarmakrophagen (blau umrandet) anhand des Seitwärtsstreulichts (SSC) und der CD45-Expression.

Alveolarmakrophagen, Monozyten, Lymphozyten und die Population der Granulozyten können so unterschieden werden. Zur Kontrolle wurden am Lichtmikroskop 500 nicht-plattenepitheliale Zellen ausgezählt. Unterschieden wurden Makrophagen, Lymphozyten sowie eosinophile und neutrophile Granulozyten (Abb. 9).

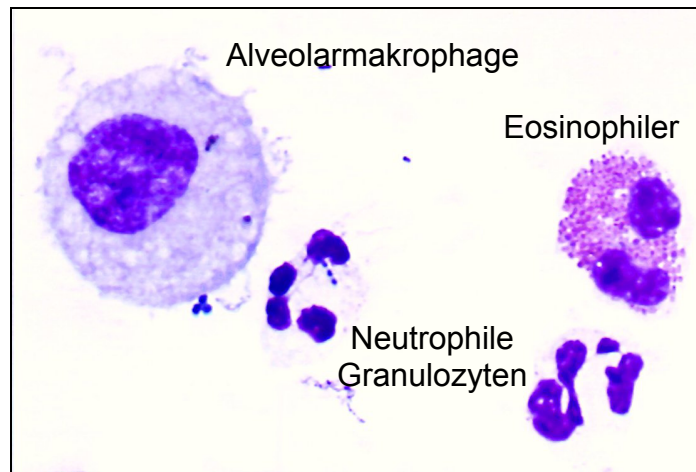


Abbildung 9: May-Grünwald-Giemsa gefärbte Sputumzellen (100-fache Vergrößerung).

3.2.4 Durchflußzytometrische Analyse eosinophiler Granulozyten im induzierten Sputum

Verschiedenen Methoden zur Detektion eosinophiler Granulozyten aus peripherem Vollblut sind in der Literatur beschrieben [Thurau 1996] und wurden bei Sputumproben bereits eingesetzt. Allerdings lieferte weder die Detektion anhand der Autofluoreszenz noch der immunologische Nachweis anhand der Expression von CD49d befriedigende Ergebnisse [Loppow 1998c]. Deshalb wurde eine weitere Methode zum Nachweis eosinophiler Granulozyten in dieser Arbeit eingesetzt: die Detektion anhand ihres erhöhten depolarisierten Seitwärtsstreulichts [Shapiro 1995]. Die Filterkonfiguration des Coulter Epics XL wurde entsprechend Abbildung 6 geändert. Induziertes Sputum von 14 Patienten mit Asthma bronchiale oder dem Verdacht auf Asthma bronchiale sowie zwei Patienten mit COPD wurde nach Standardmethoden gewonnen. Es erfolgte eine Standard-Zelldifferenzierung von 500 nicht-plattenepithelialen Zellen anhand von May-Grünwald-Giemsa gefärbten Zytospinpräparaten [Loppow 2000c, d]. Je 100 μL Probe wurde mit CD14 FITC, CD16 PE und CD45 PE/CY5 (Volumina entsprechend Herstellerangaben) für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert, mit 500 μL PBS versetzt und vermessen. Zunächst wurden die Zellen anhand morphologischer Parameter (log SSC vs. lin FSC) von Zelltrümmern unterschieden (Abb. 10 a). Aus den immunologisch intakten CD45-positiven Zellen (Abb. 10 b) wurden die Granulozyten nochmals anhand morphologischer Kriterien eingegrenzt (Abb. 10 c). CD14-positive Monozyten werden ausgeschlossen (Abb. 10 d), und anhand des erhöhten depolarisierten Seitwärtsstreulichts konnten eosinophile und neutrophile Granulozyten unterschieden werden (Abb. 10 e).

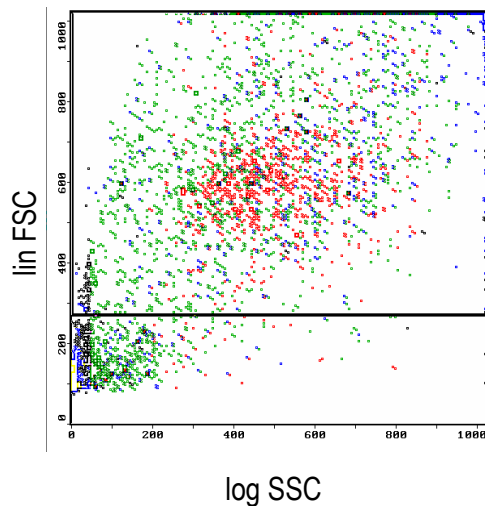


Abbildung 10a: Durchflußzytometrische Differenzierung zwischen Zellen (schwarz umrandet) und Debris anhand morphologischer Parameter (Seitwärts- SSC vs. Vorwärtsstreulicht FSC).

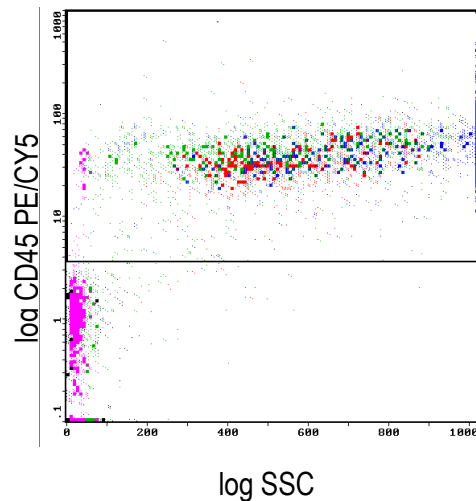


Abbildung 10b: Auswahl immunologisch und morphologisch intakter Leukozyten (schwarz umrandet) anhand des Seitwärtsstreulichts (SSC) und der CD45-Expression.

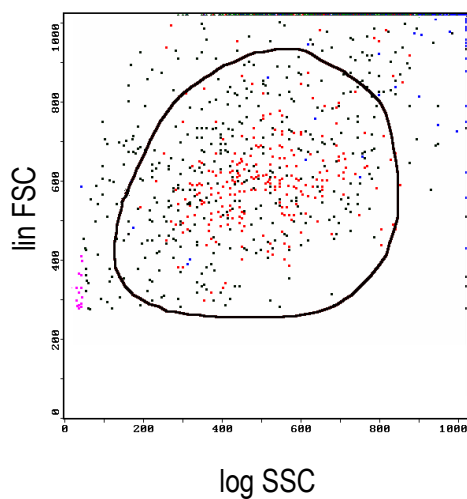


Abbildung 10c: Auswahl der Granulozyten (schwarz umrandet) unter den immunologisch und morphologisch intakten Leukozyten anhand rein morphologischer Parameter (Seitwärts- SSC vs. Vorwärtsstreulicht FSC).

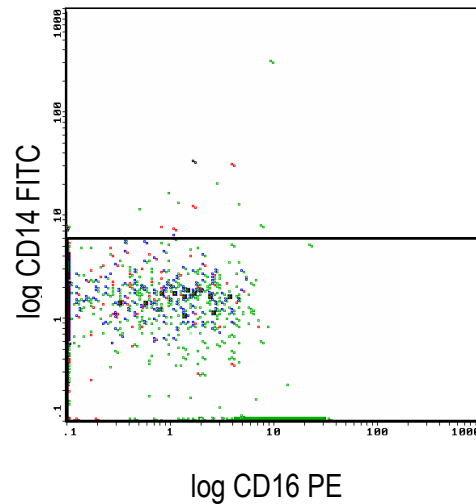


Abbildung 10d: Ausschluß der CD14-positiven Monozyten (obere Bildhälfte) unter den immunologisch und morphologisch intakten Granulozyten anhand der CD16- und CD14-Expression.

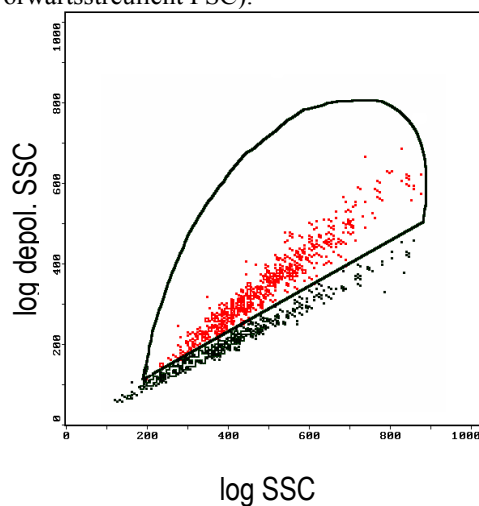


Abbildung 10e: Differenzierung zwischen eosinophilen (rot) und neutrophilen Granulozyten (schwarz) unter den immunologisch und morphologisch intakten, monozytenfreien Granulozyten anhand des Seitwärts- und depolarisierten Seitwärtsstreulichts.

3.2.5 Durchflußzytometrische Analyse der Lymphozytensubpopulationen im induzierten Sputum

Die Subtypisierung von Lymphozyten aus dem induzierten Sputum wurde analog der Analyse der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit durchgeführt [Böttcher 2000] [Loppow 1999, 2001d]. Proben von 13 gesunden Probanden, 43 Patienten mit Asthma bronchiale und 21 mit leichtgradiger COPD wurden in die Studie eingeschlossen. Jede Sputumprobe, ca. 5×10^5 Zellen, wurde in 3-5 Aliquots von 1×10^5 Zellen aufgeteilt und mit fluorochrommarkierten Antikörpern (Tabelle 3) 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 27 Proben mit 1 mL PBS versetzt und am Coulter EPICS XL gemessen, oder alternativ (50 Proben) mit 500 μ L FACSFlow versetzt und am BD FACS Calibur vermessen.

Protokoll	Fluoreszenz 1	Fluoreszenz 2	Fluoreszenz 3	Fluoreszenz 4
Coulter	FITC	PE	leer	PE/CY5 bzw. PI
Vitalität	CD45 [♦]	-	-	PI
T _H	CD3 [♥]	CD4 [♥]	-	CD45 [♥]
T _S	CD3 [♥]	CD8 [♥]	-	CD45 [♥]
B	CD2 [♦]	CD19 [♦]	-	CD45 [♥]
NK	CD3 [♥]	CD16 [♦] + CD56 [♦]	-	CD45 [♥]
BD	FITC	PE oder PI	PerCP oder PE/CY5	APC
Vitalität	CD45 [♦]	PI	-	-
T _H +T _S	CD3 [♦]	CD8 [♦]	CD45 [♦]	CD4 [♦]
B+NK	CD3 [♦]	CD16 [♦] + CD56 [♦]	CD45 [♦]	CD19 [♦]
HLA-DR [*]	CD3 [♦]	HLA-DR [*]	CD45 [♦]	-

Tabelle 3: Eingesetzte Antikörper mit dem Coulter- oder BD-Durchflußzytometer

Hersteller: [♦] = Immunotech, [♥] = Caltag (via Medac), [♦] = Coulter, ^{*} = BD

Bei der durchflußzytometrischen Analyse wurden die immunologisch intakten Lymphozyten zunächst anhand der CD45-Expression und des Seitwärtsstreulichts identifiziert (Abb. 11 a). Mindestens 500 Ereignisse wurden in diesem Gate registriert. Die anhand der Streulichteigenschaften als morphologisch intakt angesehenen Zellen (Abb. 11 b) wurden dann in Diagrammen für die Parameter Vitalität (Abb. 11 c, Propidiumiodid), T-Helferzellen (Abb. 11 d, CD3, CD4), T-Suppressorzellen (Abb. 11 e, CD3, CD8), Natürliche Killerzellen (Abb. 11 f, CD3, CD16+CD56) und B-Zellen (Abb. 11 g, CD3, CD19) dargestellt. Propidiumiodid kann in Zellen mit geschädigter Membran eindringen und dann in die DNA interkalieren. Dadurch kommt es zu einer Steigerung der Rotfluoreszenz, anhand derer geschädigte und tote Zellen im FCM von intakten zu unterscheiden sind.

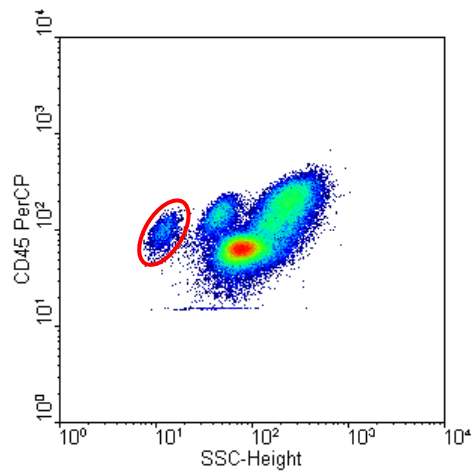


Abbildung 11a: Durchflußzytometrische Identifikation der Lymphozyten (rot umrandet) anhand morphologischer (Seitwärtsstreulicht, SSC) und immunologischer (CD45-Expression) Kriterien.

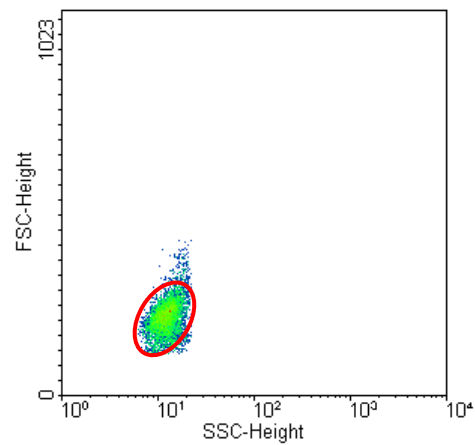


Abbildung 11b: Eingrenzung der morphologisch intakten Lymphozyten (rot umrandet) unter den immunologisch und morphologisch detektierten anhand des Seitwärts- (SSC) und Vorwärtsstreulichts (FSC).

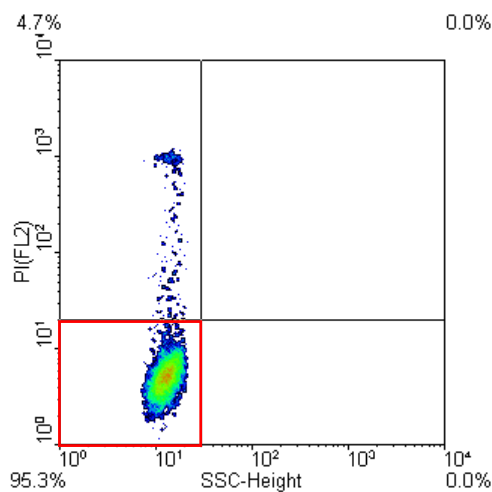


Abbildung 11c: Identifikation der vitalen morphologisch und immunologisch intakten Lymphozyten (□) als PI-negative Zellen.

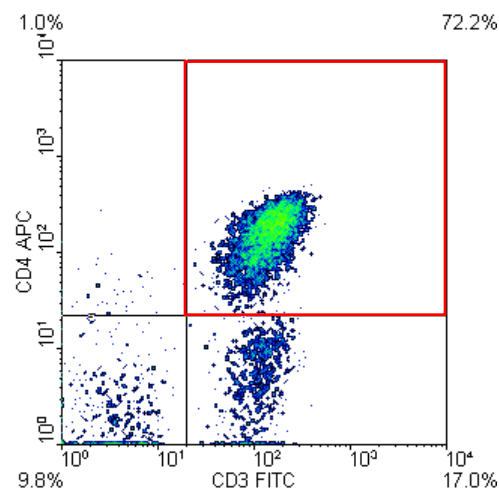


Abbildung 11d: Identifikation der T-Helferzellen (□) als CD3- und CD4-positive Zellen unter den morphologisch und immunologisch intakten Lymphozyten.

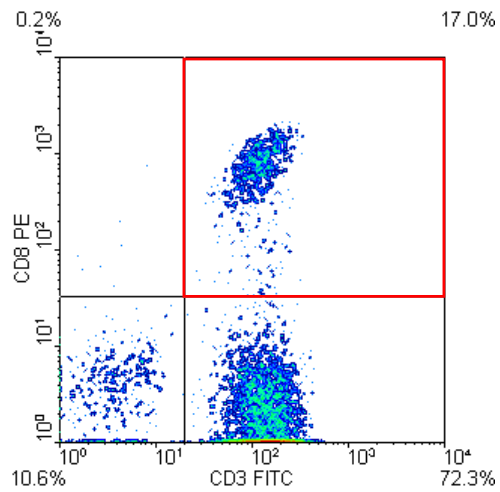


Abbildung 11e: Identifikation der T-Suppressorzellen (□) als CD3- und CD8-positive Zellen unter den morphologisch und immunologisch intakten Lymphozyten.

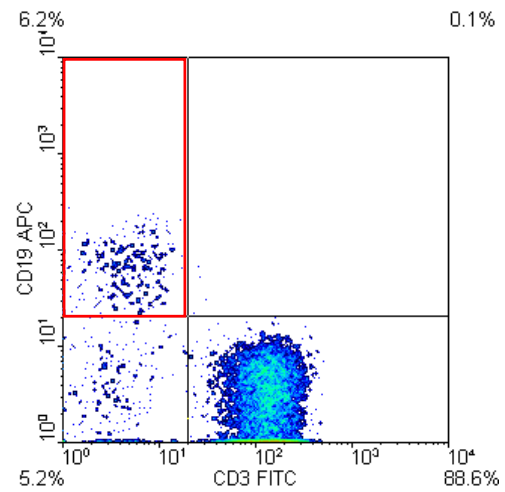


Abbildung 11f: Identifikation der B-Lymphozyten (□) als CD3-negative und CD19-positive Zellen unter den morphologisch und immunologisch intakten Lymphozyten.

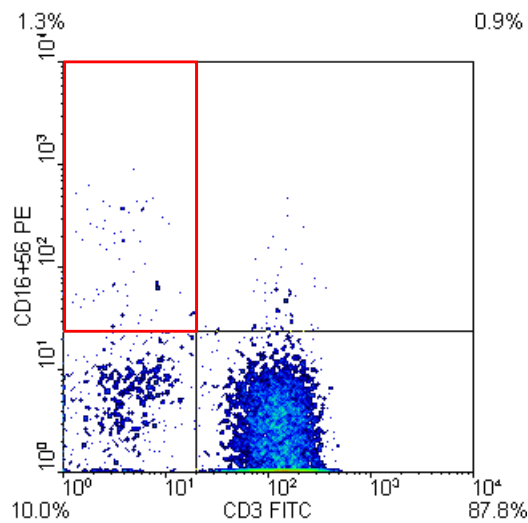


Abbildung 11g: Identifikation der NK-Zellen (□) als CD3-negative und CD16+56-positive Zellen unter den morphologisch und immunologisch intakten Lymphozyten.

3.2.6 Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokine in Lymphozyten des induzierten Sputums

Die Konzentration von Zytokinen in Lymphozyten ist sehr gering, da die Proteine sofort nach ihrer Synthese ausgeschüttet werden. Der durchflußzytometrischen Messung fluoreszenzmarkierter intrazellulärer Zytokine in Lymphozyten aus peripherem heparinisierten Vollblut, BALF oder induziertem Sputum geht daher eine 4-stündige Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat und Ionomycin voraus. Gleichzeitig wird die Sekretion der produzierten Zytokine durch Monensin unterdrückt, so daß sich die Zytokine in der Zelle ansammeln können [Jung 1993].

3.2.6.1 Stimulation der Zytokinproduktion durch Phorbolester und Ionomycin

Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA oder TPA, 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat, Molekulargewicht 616,84 g/mol, $C_{36}H_{56}O_8$) und Ionomycin (Calciumsalz aus *Streptomyces globatus*) dienen als Stimulans der Zytokinproduktion. PMA und andere Phorbolester imitieren den Effekt von 1,2-Diacylglycerol (DAG), da sie in ihrer Struktur DAG ähneln, und binden mit hoher Affinität an die Proteinkinase C (PKC) [Castagna 1982]. Die Bindung dieser Lipid-Aktivatoren an die N-terminale regulatorische Untereinheit der PKC führt zu Konformationsänderungen, die für die Translokalisierung der PKC zur Zellmembran und für die Aktivierung der Kinase verantwortlich sind. Danach wird die PKC proteolytisch gespalten und von der Zelle schnell beseitigt. Ionomycin verstärkt die Aktivierung durch Zufuhr von Ca^{2+} -Ionen [Liu 1998a].

3.2.6.2 Verhinderung der Zytokinsekretion durch Monensin

Monensin ist ein Polyether-Antibiotikum, das in Kulturen von *Streptomyces cinnamonensis* aus 5 Acetat-, 4 Propionat- und 3 Butyrat-Einheiten an einem Multienzymkomplex synthetisiert wird (Abb. 12, $C_{36}H_{62}O_{11}$; 670,90 g/mol). Wegen seiner Fähigkeit, ein- und teilweise zweiwertige Kationen durch biologische und künstliche Membranen zu transportieren, wird *Monensin* zu den Ionophoren gerechnet. Der durch Monensin verursachte Ioneneinstrom in den Golgi-Apparat führt zur dessen Zerstörung, so daß die in der Zelle produzierten Proteine nicht mehr sezerniert werden können.

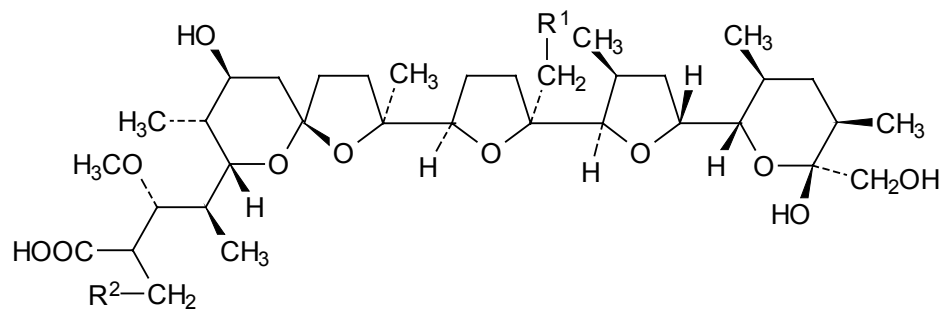


Abbildung 12: Monensin

3.2.7 Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokine in T-Lymphozyten des induzierten Sputums

Am Coulter[®] Epics[®] XL wurde die intrazelluläre Zytokinproduktion von Sputum-T-Lymphozyten entwickelt [Loppow 2000e, 2000f]. Nach der Aufarbeitung liegt das Sputum als Zellsuspension in PBS/BSA vor. Dieses wurde aliquotiert und in RPMI 1640 für 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ mit PMA (20 ng/mL) und Ionomycin (1 µg/mL) stimuliert. Monensin (5 µM) blockierte die Proteinsekretion im stimulierten und im unstimulierten Ansatz. Nach Inkubation mit Antikörpern gegen CD3 und CD45 für 15 min bei RT im Dunkeln wurden die Zellen mit 100 µL Fix&Perm Reagenz A versetzt und für 15 min fixiert. Nach einem Waschschrift mit 4 mL PBS bei 300 x g wurde das Zellpellet mit 100 µL Fix&Perm Reagenz B zur Permeabilisierung und mit Antikörpern gegen IFN-γ, IL-2 und IL-4 bzw. den entsprechenden Isotypkontrollen versetzt und 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 4 mL PBS bei 300 x g wurde das Zellpellet in 500 µL PBS aufgenommen und am Durchflußzytometer analysiert.

Zunächst wurden die Leukozyten anhand der Kombination von Seitwärtsstreulicht und CD45-Expression identifiziert (Abb. 13 a). Die morphologisch intakten Lymphozyten (Abb. 13 b, Region B, rot) wurden dann in Histogrammen als Zytokin-positive bzw. Isotypkontroll-negative Zellen versus CD3-Expression dargestellt (Abb. 13 c-e), um den Anteil an Zytokin-positiven T-Lymphozyten im Quadranten H2 zu bestimmen.

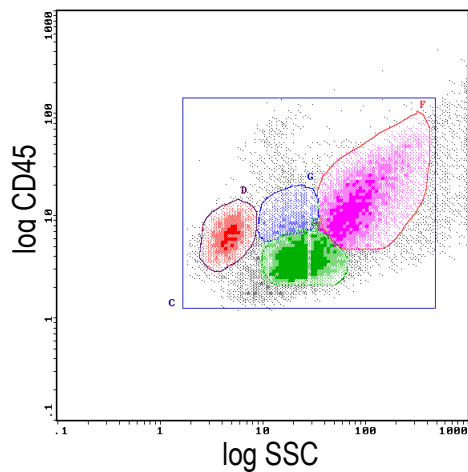


Abbildung 13a: Durchflußzytometrische Differenzierung der Leukozyten (□) anhand morphologischer (Seitwärtsstreulicht, SSC) und immunologischer (CD45-Expression) Parameter. Lymphozyten sind rot, Monozyten blau, Granulozyten grün und Makrophagen rosa dargestellt.

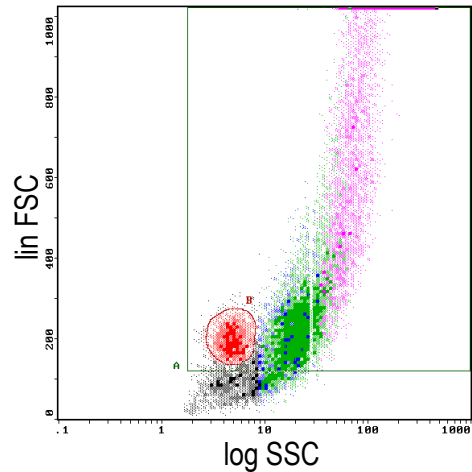


Abbildung 13b: Identifikation der morphologisch intakten Lymphozyten (rot) unter den immunologisch intakten Leukozyten anhand morphologischer Parameter (Seitwärts- (SSC) vs. Vorwärtsstreulicht (FSC)).

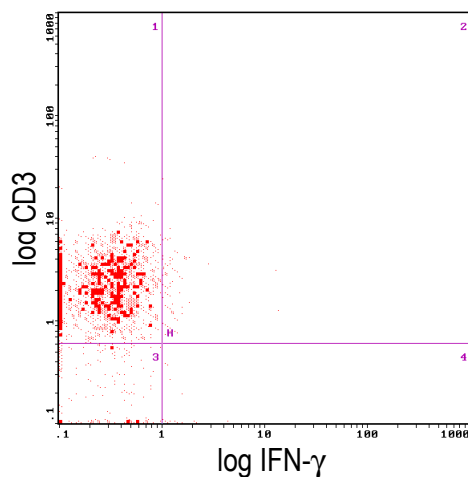


Abbildung 13c: IFN- γ -Produktion unstimulierter CD3-positiver T-Lymphozyten.

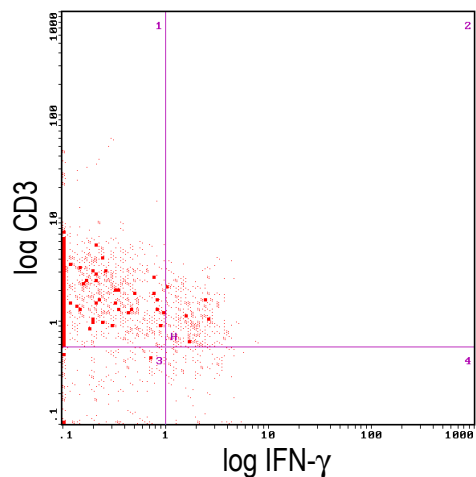


Abbildung 13d: IFN- γ -Produktion PMA- und Ionomycin-stimulierter CD3-positiver T-Lymphozyten.

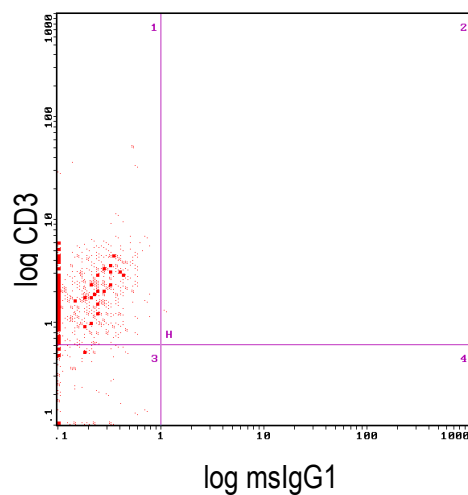


Abbildung 13e: Maus-IgG1-Isotypkontrollansatz PMA und Ionomycin stimulierter CD3-positiver T-Lymphozyten, um den Anteil der unspezifischen Bindung zu bestimmen.

3.2.8 Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokine in T_H- und T_C/S-Lymphozyten des induzierten Sputums

Am BD FACS Calibur wurde das intrazelluläre Zytokinprofil von Lymphozyten aus dem induzierten Sputum wie folgt bestimmt: Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 20 ng/mL PMA und 1 µg/mL Ionomycin 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, während die Proteinsekretion durch 5 mM Monensin im stimulierten und unstimulierten Ansatz verhindert wurde. Nach der Fixierung durch 100 µL Fix&Perm Reagenz A für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen mit 4 mL PBS 5 min bei 300 x g gewaschen. Die Zellen wurden mit 100 µL Fix&Perm Reagenz B zur Permeabilisierung und mit fluorochrommarkierten Antikörpern gegen die Zelloberflächenantigene CD3 und CD8 sowie gegen die intrazellulären Zytokine IFN-γ und IL-4, bzw. IL-2 und IL-5 versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 4 mL PBS für 5 min bei 300 x g wurden die Zellen mit 500 µL PBS versetzt und anschließend vermessen [Loppow 2001e, f, g].

Die Lymphozyten wurden zunächst anhand ihres Streulichtverhaltens identifiziert (Abb. 14 a). Die CD3-positiven T-Zellen (Abb. 14 b) wurden dann in Diagrammen der Zytokinproduktion versus CD8-Expression dargestellt, und zwar für stimulierte (Abb. 14 c, e, g, i) und unstimulierte Ansätze (Abb. 14 d, f, h, j).

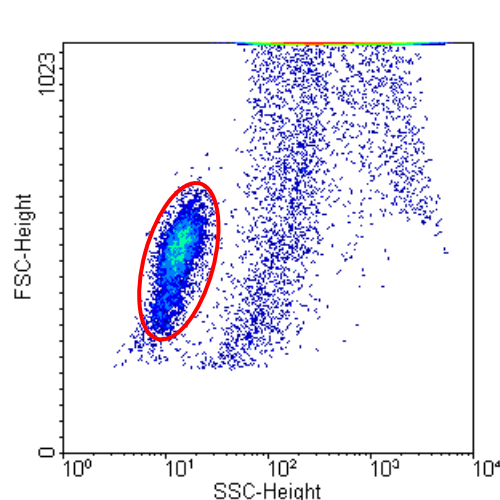


Abbildung 14a: Durchflußzytometrische Identifikation der Lymphozyten (rot umrandet) anhand morphologischer Kriterien (Seitwärtsstreulicht (SSC) vs. Vorwärtsstreulicht (FSC)).

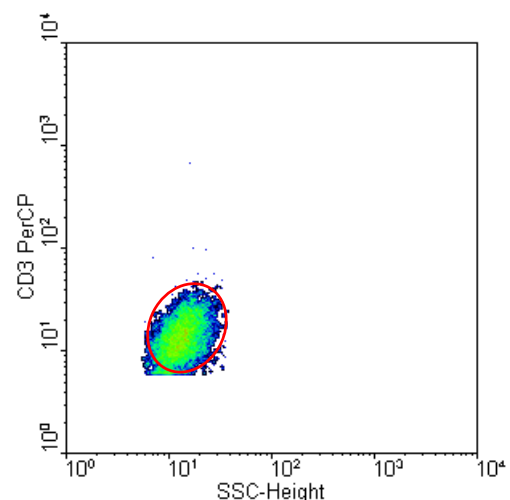


Abbildung 14b: Selektion der immunologisch intakten CD3-positiven T-Lymphozyten (rot umrandet) unter den morphologisch intakten Lymphozyten.

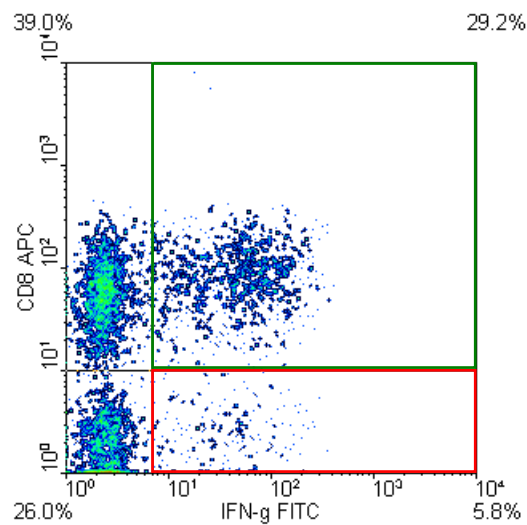


Abbildung 14c: IFN- γ -positive Helfer- (, CD8-negativ) und Suppressorzellen (, CD8-positiv) unter den morphologisch und immunologisch intakten T-Lymphozyten nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.

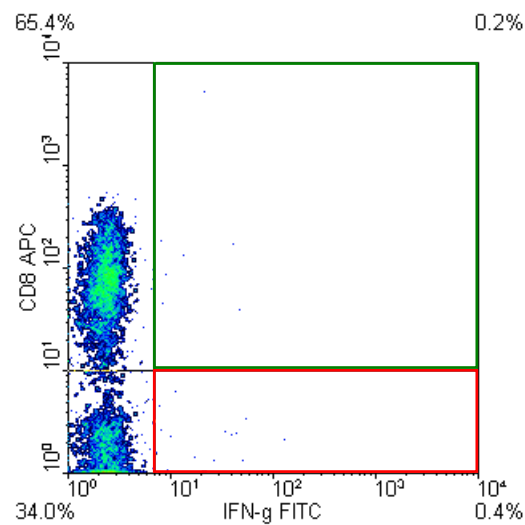


Abbildung 14d: IFN- γ -positive Helfer- (, CD8-negativ) und Suppressorzellen (, CD8-positiv) unter den morphologisch und immunologisch intakten T-Lymphozyten im unstimulierten Ansatz.

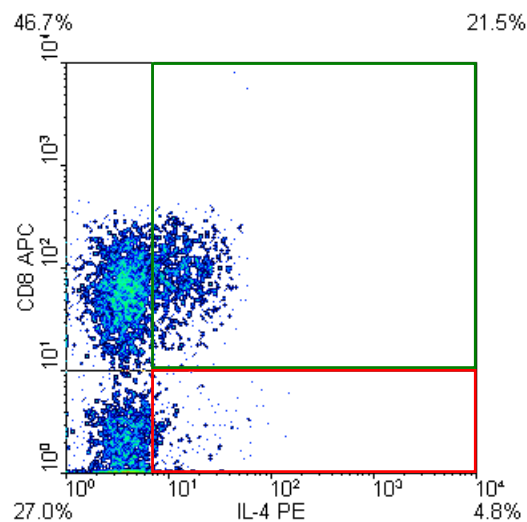


Abbildung 14e: IL-4-positive Helfer- (, CD8-negativ) und Suppressorzellen (, CD8-positiv) unter den morphologisch und immunologisch intakten T-Lymphozyten nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.

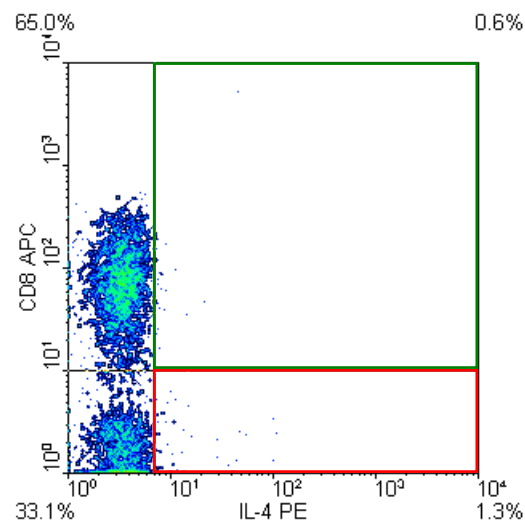


Abbildung 14f: IL-4-positive Helfer- (, CD8-negativ) und Suppressorzellen (, CD8-positiv) unter den morphologisch und immunologisch intakten T-Lymphozyten im unstimulierten Ansatz.

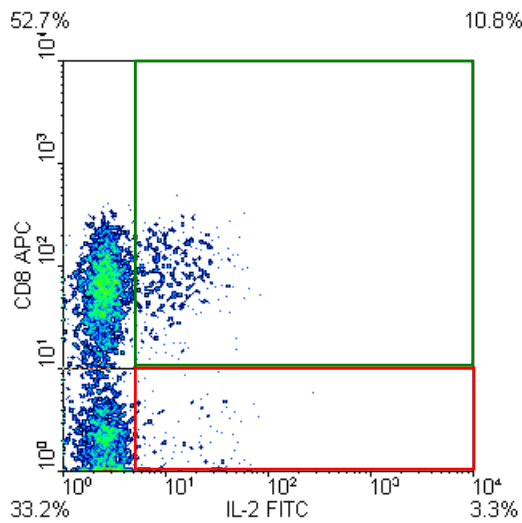


Abbildung 14g: IL-2-positive Helfer- (, CD8-negativ) und Suppressorzellen (, CD8-positiv) unter den morphologisch und immunologisch intakten T-Lymphozyten nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.

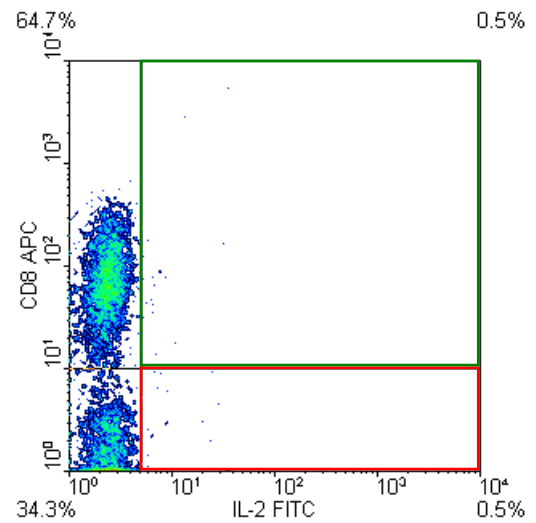


Abbildung 14h: IL-2-positive Helfer- (, CD8-negativ) und Suppressorzellen (, CD8-positiv) unter den morphologisch und immunologisch intakten T-Lymphozyten im unstimulierten Ansatz.

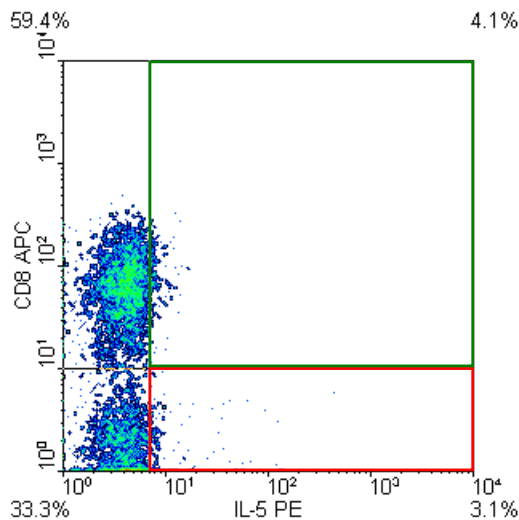


Abbildung 14i: IL-5-positive Helfer- (, CD8-negativ) und Suppressorzellen (, CD8-positiv) unter den morphologisch und immunologisch intakten T-Lymphozyten nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.

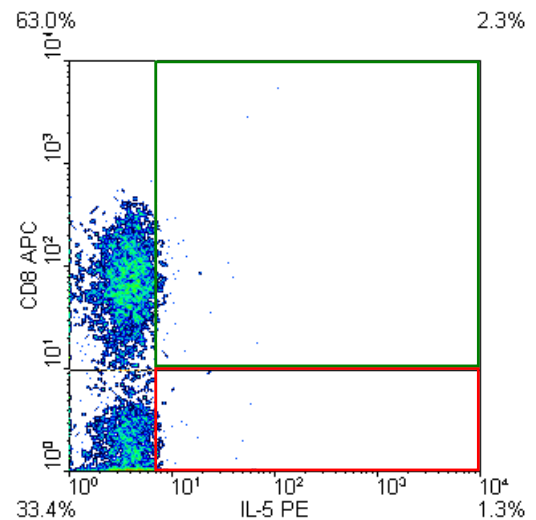


Abbildung 14j: IL-5-positive Helfer- (, CD8-negativ) und Suppressorzellen (, CD8-positiv) unter den morphologisch und immunologisch intakten T-Lymphozyten im unstimulierten Ansatz.

3.3 Andere Untersuchungen

3.3.1 Zytospinpräparate für die Zelldifferenzierung am Mikroskop

Von der Sputumzellsuspension mit 20.000 - 40.000 Zellen in 100 µl PBS/BSA wurde ein Zytospinpräparat angefertigt (75 x g, 5 min). Das luftgetrocknete Präparat wurde 5 min in Aceton/Methanol (1:1, v/v) fixiert, anschließend getrocknet und mit einer May-Grünwald-Giemsa-Färbung für die Zelldifferenzierung vorbereitet [Boon 1986] [Bake 1994]. Die Inkubationszeit in der Färbelösung betrug 20 min. Um überschüssige Färbelösung abzuspielen, wurde das Präparat einmal kurz in Methanol getaucht. Die fertigen Zytospinpräparate wurden am Lichtmikroskop ausgezählt, wobei nach Möglichkeit 500 nicht-plattenepitheliale Zellen erfaßt wurden. Zusätzlich wurde eine Qualitätsbeurteilung von 0 (nicht zu differenzieren) bis 2 (sehr gut zu differenzieren) in 0,5er-Schritten notiert.

3.3.2 Einfluß von Dithiothreitol auf die immunologische Detektionsreaktion

Für die Untersuchung des Effektes von DTT auf die Fluoreszenzintensität der für die Immunphänotypisierung von induziertem Sputum notwendigen Antikörper wurde peripheres Blut als Modell für das induzierte Sputum eingesetzt, da der Effekt an Zellen untersucht werden mußte, die ohne vorherige DTT-Behandlung zugänglich waren. Venöses peripheres Blut wurde morgens von 15 freiwilligen, klinisch gesunden Spendern (10 Frauen / 5 Männer; Alter 20-45 Jahre) mit normalem Blutbild abgenommen. Die Koagulation des Blutes wurde mit EDTA verhindert. Je 100 µL Blut wurden mit 250 µL Sputolysin® (0,1 % oder 6,5 M DTT in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,0; Calbiochem, Bad Soden) analog zur Standard-Sputum-aufarbeitung (finale Konzentration 0,07 % DTT) [Holz 1998b, c][Richter 1999] oder 250 µL PBS für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend zweimal mit 4 mL PBS gewaschen und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen für 10 min bei RT (25°C) mit verschiedenen Volumina (nach Herstellerangaben) fluoreszenzmarkierter Antikörper inkubiert (Tabelle 4). Nach Lyse der Erythrozyten mit dem Coulter® Multi-Q-Prep (Coulter Electronics GmbH, Krefeld) wurden die durchflußzytometrischen Messungen unter standardisierten Bedingungen am Coulter® EPICS® XL-MCL durchgeführt. Alle Messungen wurden in doppelten Ansätzen durchgeführt, um die Intraassay-Variabilität zu bestimmen. Im

Durchschnitt (Minimum) wurden 8698 (4122) Granulozyten für die Untersuchung von CD16, 1526 (497) Monozyten für die von CD14 und 4850 (1337) Lymphozyten für die Untersuchung aller anderen Antikörper gezählt.

Antikörper	Klon	Zielpopulation in dieser Studie	Hersteller
CD14 PE	RMO22	Monozyten	<i>Immunotech</i>
CD16 PE	3G8	Granulozyten	<i>Immunotech</i>
CD19 FITC	SJ 25-C1	B Lymphozyten	<i>Caltag</i>
CD2 FITC	39C1.5	T Lymphozyten	<i>Immunotech</i>
CD3 FITC	UCHT1	T Lymphozyten	<i>Immunotech</i>
CD4 PE	13B8.2	T _H Lymphozyten	<i>Immunotech</i>
CD45 FITC	J.33	Leukozyten (Lymphozyten)	<i>Immunotech</i>
CD56 PE	B159	NK Lymphozyten	<i>Immunotech</i>
CD8 PE	B9.11	T _{C/S} Lymphozyten	<i>Immunotech</i>
HLA-DR FITC	I30	aktivierte Lymphozyten	<i>Coulter</i>

Tabelle 4: Antikörper (inkl. Klon und Hersteller) und Zellen, die durch sie identifiziert wurden

Die Leukozytenpopulationen wurden anhand ihrer morphologischen Eigenschaften, d.h. Seitwärtsstreulicht (logarithmisch) versus Vorwärtsstreulicht (linear), identifiziert (Abb. 15). Dieser Ansatz wurde an Stelle von Seitwärtsstreulicht gegen CD45-Expression gewählt, um für alle Oberflächenmarker eine einheitliche Gatingstrategie einsetzen zu können, unabhängig von möglichen Veränderungen in der CD45-Expression.

Die morphologisch identifizierte Population der Monozyten (Abb. 15, Gate C) wurde für die Bestimmung von CD14 herangezogen, die der Granulozyten (Abb. 15, Gate A) für CD16 und die der Lymphozyten (Abb. 15, Gate B) für alle anderen untersuchten Oberflächenantigene (Tabelle 4). Da die Spender nicht immer alle verfügbar waren, variierte die Anzahl der Proben, die für die Untersuchung der jeweiligen Antikörper eingesetzt wurden (Tabelle 11). Die Kalibrierung des Durchflußzytometers ist unter 3.2.1 beschrieben.

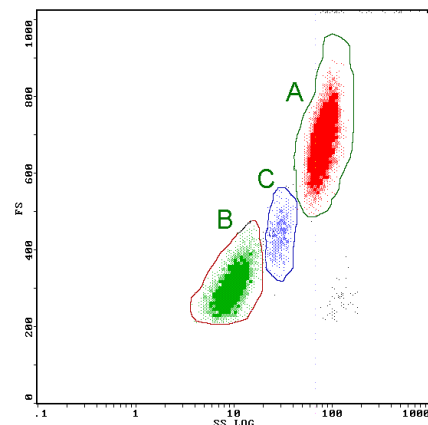


Abbildung 15: Identifikation der Leukozyten (A: Granulozyten, B: Lymphozyten, C: Monozyten) anhand morphologischer Parameter (Seitwärts- vs. Vorwärtsstreulicht).

Für die statistische Analyse wurden durchgehend die Mittelwerte der doppelten Ansätze eingesetzt. Die individuellen Mittelwerte der 15 Probanden wurden für den Vergleich der Zelldifferenzierung herangezogen. Prozentuale Anteile und MESF wurden als Mittelwert $\pm$ SE angegeben. Die Veränderung der Fluoreszenzintensität wurde als Mittelwert $\pm$ SD der prozentualen Differenz zwischen DTT und PBS-Werten relativ zu den PBS-Werten angegeben. Der Vergleich zwischen DTT und PBS-Behandlung wurden mit dem gepaarten t-Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für ein Wahrscheinlichkeitsniveau von $p < 0,05$ angenommen. Die Intraassay-Reproduzierbarkeit der doppelten Ansätze wurde durch einfache Varianzanalyse (ANOVA) unter Einbeziehung des Intraclass-Korrelationskoeffizienten (R_i) ermittelt. In gleicher Weise wurde der Effekt von DTT versus PBS in Form von R_i ausgedrückt.

3.3.3 Untersuchung der induzierbaren NO-Synthase in Leukozyten des induzierten Sputums

Der Nachweis der induzierbaren NO-Synthase erfolgte in Alveolarmakrophagen und Granulozyten aus induziertem Sputum mit zwei verschiedenen Methoden.

3.3.3.1 Durchflußzytometrischer Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in Alveolarmakrophagen des induzierten Sputums

Für den durchflußzytometrischen Nachweis wurden 100 μ L Sputumzellsuspension mit 100 μ L Fix&Perm Reagenz A zur Fixierung für 10 min bei RT inkubiert, mit 4 mL PBS für 5 min bei 300 x g gewaschen und nach Abnahme des Überstandes mit 100 μ L Fix&Perm Reagenz B zur Permeabilisierung für weitere 10 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 4 mL PBS für 5 min bei 300 x g wurden die Zellen mit 100 μ L iNOS-FITC (1:100 mit PBS verdünnt) bzw 5 μ L IgG2a-FITC Isotypkontrolle, sowie 10 μ L CD16-PE und 5 μ L CD45 TriColor versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Identifikation der Granulozyten bzw. Alveolarmakrophagen erfolgte anhand des Seitwärtsstreulichts und der CD45-Expression (Abb. 8). CD16-negative Alveolarmakrophagen bzw. CD16-positive neutrophile Granulozyten wurden dann hinsichtlich der Fluoreszenzintensität der iNOS bzw. Isotypkontrolle untersucht.

3.3.3.2 Immunzytochemischer Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in Alveolarmakrophagen und Granulozyten des induzierten Sputums

Unter Immunzytochemie (ICC) versteht man die immunologische Detektion von Zelloberflächenantigenen oder Proteinen auf bzw. in Zellen, die auf einem Objektträger als Ausstrich-, Zytospin- oder Adhäsionspräparat gebunden sind. Die eingesetzten Antikörper können mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sein, die eine direkte Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop ermöglichen, oder mit Enzymen konjugiert sein, die durch eine weitere Enzym-Substratreaktion farbige Komplexe bilden, die dann unter dem Lichtmikroskop ausgewertet werden können.

Verglichen mit der Durchflußzytometrie hat die Immunzytochemie den Vorteil, daß die Zellmorphologie direkt sichtbar bleibt und nicht in abgeleiteten Größen (Vorwärtsstreulicht = Zellgröße; Seitwärtsstreulicht = Zellgranularität) wiedergegeben wird. Die Nachteile gegenüber der Durchflußzytometrie überwiegen jedoch. In erster Linie ist die geringere statistische Sicherheit aufgrund der geringeren Anzahl ausgezählter Ereignisse zu nennen und das Fehlen jeglicher Möglichkeit zur Automatisierung.

Der immunzytochemische Nachweis der induzierbaren NO-Synthase mittels APAAP-Technik war im Labor etabliert und erste Daten bereits in Abstraktform publiziert [Weng 1997a, b]; [Holz 1998a, d]. Aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit wurde die Methode grundlegend überarbeitet und fand schließlich ihren Einsatz in einer Studie, die den Effekt von inhalativen Corticosteroiden bei Patienten mit chronischer Bronchitis untersuchte [Loppow 2001c].

Für den immunzytochemischen Nachweis der induzierbaren NO-Synthase wurden zunächst APTEX-beschichtete Objektträger hergestellt. Matrandobjektträger wurden 5 min in Aceton gespült, dann 5 min in 2% Aminopropyltriethoxysilan in Aceton inkubiert, 2 min mit Leitungswasser gespült und anschließend über Nacht bei RT getrocknet.

19 Patienten (13 Männer / 6 Frauen) Raucher oder Ex-Raucher (> 20 Packyears) mit chronischer Bronchitis wurden in die Studie eingeschlossen. Das exhalierete NO

wurde gemessen und induziertes Sputum (3, 4, 5 % NaCl für jeweils 10 min) bei den Visiten 2-5 gewonnen. Die Fraktionen wurden separat aufgearbeitet, und für die Zelldifferenzierung wurden für jede Fraktion zwei Zytospinpräparate hergestellt, die für die Auswertung rechnerisch gewichtet gepoolt wurden [Pin 1992][Holz 1998b, c] [Richter 1999]. Die drei Sputumfraktionen wurden für die immunzytochemischen Untersuchungen vor der Herstellung der 6 Zytospinpräparate auf APTEX-beschichteten Objektträgern Zellzahl-gewichtet gepoolt und bei -80°C bis zur Analyse gelagert.

Die Objektträger wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Die Zellen wurden mit einem Fettstift umrandet, so daß die aufgebrachten Lösungen stets die Zellen benetzten. Alle Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer unter ständigem Schwenken durchgeführt. Die Zellen wurden 3 min mit Tris-Puffer rehydriert, dann wurde versucht, die unspezifische Bindung durch 10 min Inkubation mit Serum free Blocking System[®] zu reduzieren. Nach kurzer Spülung mit Tris-Puffer wurde mit monoklonalem Maus-anti-human-iNOS-Antikörper (Transduction Laboratories via Dianova, Hamburg), IgG2a als Isotypkontrolle oder HLA-DR-Antikörper als Positivkontrolle für 30 min inkubiert, bevor erneut kurz mit Tris-Puffer gespült und 30 min mit EnVision[®] zur Signalverstärkung inkubiert wurde. Nach kurzer Spülung mit Tris-Puffer wurde 10 min mit frisch angesetzter NewFuchsin[®] Substratlösung (alle DAKO, Hamburg) inkubiert, erneut kurz mit Tris-Puffer gespült und mit Mayers Hämaunlösung für 30 s gegengefärbt. Nach ausgiebiger Spülung mit Tris-Puffer wurde ein Deckglas mit Glycerylgelatine aufgebracht. Anschließend wurden am Lichtmikroskop jeweils 400 nicht-plattenepitheliale Zellen differenziert. Die Leukozyten wurden zusätzlich als positiv oder negativ für iNOS oder die Isotypkontrolle eingestuft. Die Ergebnisse wurden als prozentuale Anteile von Makrophagen, neutrophilen oder eosinophilen Granulozyten angegeben, die positiv für iNOS waren, abzüglich der entsprechenden Anteile, die positiv für die Isotypkontrolle waren (Hintergrund).

3.3.4 Untersuchung der Auswirkung der IL-2-Inhalationstherapie bei Patienten mit pulmonal metastasiertem Nierenzellkarzinom

Bei Patienten, die aufgrund eines pulmonal metastasierten Nierenzellkarzinoms eine IL-2-Inhalationstherapie begannen, wurden respiratorische Symptome, Lungenfunktion, Atemwegsempfindlichkeit, exhalierendes NO und Sputumzusammensetzung (insbesondere Eosinophilie) untersucht und mit den bekannten Symptomen eines chronischen Asthma bronchiale verglichen. Zusätzlich wurde die intrazelluläre Zytokinproduktion im Blut und Sputum untersucht, um lokale und systemische Veränderungen des Immunsystems nach IL-2-Gabe zu erfassen und somit einen Einblick in den Mechanismus der anti-Tumor-Wirkung von IL-2 zu gewinnen.

Zehn Patienten (3 Frauen / 7 Männer; mittleres Alter $\pm$ SD: 63 ± 11 Jahre; FEV₁: 106 ± 6 %Soll [Quanjer 1993]; Karnofsky Index: 85 ± 7) mit pulmonal metastasiertem Nierenzellkarzinom wurden untersucht (Tabelle 14; Abb. 26). Ein Patient berichtete von einer nicht dokumentierten Vorgeschichte eines Asthma bronchiale, und zwei zeigten einen positiven Hautpricktest gegen mindestens ein verbreitetes Allergen. Ein Patient war zum Zeitpunkt des Studienbeginns aktiver Raucher, 6 waren Ex-Raucher, die jedoch ≥ 20 Jahre vor Studienbeginn aufgehört hatten, mit im Mittel 10 Packyears. Alle Patienten wurden vor Beginn der IL-2-Therapie aufgrund des Nierenzellkarzinoms nephrektomiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der von der Ethikkommission der Ärztekammer Schleswig-Holstein genehmigten Studie.

3.3.4.1 Studienprotokoll

Die Untersuchungen erfolgten vor Beginn der Therapie (Ausgangswert), 8,5 (6 - 10) Tage (Median, Spannweite) nach Beginn der Therapie und 21 (16-29) Tage später. Die Tagesdosis an rekombinantem IL-2 (Proleukin[®], Chiron, Emeryville, CA) betrug 36 MIU/d bei 9 Patienten und wurde bei zwei Patienten nach der zweiten Visite auf 18 MIU/d reduziert. Ein Patient erhielt 18 MIU/d von Anfang an. Fünf Patienten begannen mit rein inhalativer Applikation und starteten mit der subkutanen Gabe von 1/11 der täglichen Gesamtdosis erst nach der zweiten Visite, während alle anderen diese subkutane Injektion von Anfang an durchführten. Acht Patienten wurden nach

der zweiten Visite zusätzlich mit IFN- α subkutan behandelt (3 x 6 MIU pro Woche; Roferon[®], Hoffman-La Roche Inc., Nutley, NJ). Die Patienten inhalierten 5mal pro Tag, mit einem Tag pro Woche Pause [Huland 1997], unter Verwendung eines atemgetriggerten Verneblers, der die Totraumdeposition minimierte (Jetair δ 20, Salvia Lifetec, Kronberg, Deutschland).

Bei jeder Visite erfolgten die folgenden Untersuchungen in dieser Reihenfolge: Der klinische Status und die Symptome wurden von einem Arzt abgefragt, Blutproben abgenommen, das exhalierete NO und die Lungenfunktion gemessen, sowie die Methacholinprovokation und Sputuminduktion durchgeführt. Salbutamol (200 μ g) wurde nach der letzten Methacholindosis inhaliert.

3.3.4.2 Funktionsmessungen

Mit einem elektronischen Spirometer wurden das forcierte expiratorische Volumen in einer Sekunde (FEV₁) und die forcierte Vitalkapazität (FVC) unter standardisierten Bedingungen gemessen [ATS 1995]. Bei jeder Visite wurde nach dem Auftreten von Symptomen (Husten, Auswurf, Dyspnoe) gefragt. Die Atemwegsempfindlichkeit auf inhaliertes Methacholin wurde nach einem etablierten Protokoll ermittelt [Jörres 1997]. Sie entsprach der Methacholinkonzentration (PC₂₀FEV₁), die einen 20 %igen Abfall des FEV₁ verursachte. Eine Atemwegsüberempfindlichkeit lag vor, wenn PC₂₀FEV₁ < 8 mg/mL war [Jörres 1997][ATS 2000].

15 min vor der Sputuminduktion inhalierten die Patienten 200 μ g Salbutamol zum Schutz vor einer möglichen Bronchokonstriktion. Die eigentliche Induktion erfolgte mit 3%iger ultraschallvernebelter Kochsalzlösung, die die Patienten für 10 min inhalierten [Holz 2000]. Die optisch dichteren Sputumflocken wurden vom Speichel getrennt und mit Sputolysin[®] homogenisiert. Zwei unabhängige Untersucher führten die Zelldifferenzierungen an May-Grünwald-Giemsa gefärbten Zytospinpräparaten anhand von ≥ 400 nicht-plattenepithelialen Zellen durch. Histamin in den Sputumüberständen wurde mittels ELISA (IBL Immunobiological Laboratories, Hamburg, Deutschland) bestimmt.

Zur Messung des exhaliierten NO wurde ein Sievers NOA 280-Analysator eingesetzt, dessen Kalibrierung bei jeder Messung überprüft wurde. Die Patienten atmeten gegen einen Widerstand aus, um das Gaumensegel zu schließen und nasale NO-Kontaminationen zu verhindern. Der Plateauwert bei einer Flußrate von 50 mL/s [Silkoff 1999] wurde rechnerisch aus Messungen bei verschiedenen Flußraten ermittelt.

3.3.4.3 Durchflußzytometrische Analyse der Zytokinproduktion

Die intrazelluläre Zytokinproduktion von Lymphozyten aus Blut [Jung 1995] und Sputum wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Dabei repräsentierten IL-2 und IFN- γ T_H1-Zytokine und IL-4 und IL-5 T_H2-Zytokine. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium aufgenommen. Ein Aliquot wurde für 4 h mit PMA (20 ng/mL) plus Ionomycin (1 μ g/mL) stimuliert, während die Sekretion durch Monensin (5 μ M) blockiert wurde. Nach Fixierung und Permeabilisierung (Fix&Perm, Caltag, Burlingame, CA) wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD3, CD8 sowie die ausgewählten Zytokine (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) inkubiert. T_H-Lymphozyten wurden als CD3-positive und CD8-negative Zellen definiert, da PMA zu einem transienten Verlust des CD4-Epitopes führt [Picker 1995]. Die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Messungen (BD FACS Calibur) wurden als prozentuale Anteile der T-Zellen ausgedrückt, die positiv für ein Zytokin waren und negativ (T_H) oder positiv (T_{CS}) für CD8.

3.3.4.4 Statistische Analyse

Daten wurden als Mediane und Interquartilbereiche angegeben. Die drei Visiten wurden mit Friedman's nichtparametrischer ANOVA verglichen; p-Werte werden explizit angegeben und als statistisch signifikant angenommen, wenn $p < 0,05$.

3.4 Produkte für die Durchflußzytometrie

Produkt	Kat. Nr.	Hersteller / Vertrieb
CD2 FITC	0442	Beckmann Coulter, Krefeld
CD3 FITC	1281	Beckmann Coulter, Krefeld
CD3 FITC	345764	BD-Biosciences, Heidelberg
CD3 PerCP	345766	BD-Biosciences, Heidelberg
CD3 PerCP-Cy5.5	340949	BD-Biosciences, Heidelberg
CD3 APC	345767	BD-Biosciences, Heidelberg
CD4 PE	0449	Beckmann Coulter, Krefeld
CD4 APC	345771	BD-Biosciences, Heidelberg
CD8 PE	0452	Beckmann Coulter, Krefeld
CD8 APC	345775	BD-Biosciences, Heidelberg
CD14 PE	0650	Beckmann Coulter, Krefeld
CD16 PE	1238	Beckmann Coulter, Krefeld
CD16 TriColor	MHCD1606	Caltag, Hamburg
CD19 PE	1285	Beckmann Coulter, Krefeld
CD45 FITC	0782	Beckmann Coulter, Krefeld
CD45 TriColor	MHCD4506	Caltag, Hamburg
CD45 PerCP	345809	BD-Biosciences, Heidelberg
CD45 PerCP-Cy5.5	340953	BD-Biosciences, Heidelberg
CD49d FITC	1404	Beckmann Coulter, Krefeld
CD56 PE	1324	Beckmann Coulter, Krefeld
Dako FluoroSpheres		Dako, Hamburg
Fix&Perm	GAS004	Caltag, Hamburg
Flow-Count	7547053	Beckmann Coulter, Krefeld
Flow-Set	6605359	Beckmann Coulter, Krefeld
HLA-DR PE	6602920	Beckmann Coulter, Krefeld
IFN- γ FITC	340449	BD-Biosciences, Heidelberg
IgG1 (Maus) FITC	0639	Beckmann Coulter, Krefeld
IgG1 (Maus) PE	0670	Beckmann Coulter, Krefeld
IgG2a (Maus) FITC	0640	Beckmann Coulter, Krefeld
IL-2 FITC	340448	BD-Biosciences, Heidelberg
IL-4 PE	340451	BD-Biosciences, Heidelberg
IL-5 PE	559332	BD-Biosciences, Heidelberg
Lyse-Reagenz	7546946	Beckmann Coulter, Krefeld
MultiTEST CD3/CD8/CD45/CD4	342417	BD-Biosciences, Heidelberg
MultiTEST CD3/CD16+56/CD45/CD19	342416	BD-Biosciences, Heidelberg
Propidiumiodid		Beckmann Coulter, Krefeld
Simultest CD3/HLA-DR	340048	BD-Biosciences, Heidelberg

3.5 Chemikalien und Lösungen

Produkt	Hersteller / Vertrieb
Aminopropyltriethoxysilan	Sigma, Deisenhofen
BSA (bovine serum albumine)	Sigma, Deisenhofen
Entellan	Merck, Darmstadt
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblau	Merck, Darmstadt
PBS, 10x-Konzentrat	GIBCO BRL, Berlin
RPMI 1640 Medium	GIBCO BRL, Berlin
Sputolysin [®] (enthält DTT in PBS)	Calbiochem, Bad Soden
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen

Lösungen für die Sputumaufarbeitung

PBS (10 ml; pH 7,2 - 7,4)

1 ml 10x-PBS wurden mit dH₂O auf 10 ml aufgefüllt.

PBS / BSA 1% (10 ml)

100 mg BSA wurden mit PBS auf 10 ml aufgefüllt.

Sputolysin-Gebrauchslösung

0,5 ml Sputolysin wurden mit dH₂O auf 5 ml aufgefüllt.

Lösungen für die May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Färbelösung (20x) Giemsas Azur-Eosin-Methylenblau

Phosphatpuffer für die Zellfärbung (pH 6,5 - 6,8)

Lsg. A: 0,5 M Na₂HPO₄ * H₂O (87 g/l)

Lsg. B: 0,5 M KH₂PO₄ (69 g/l)

Puffer: 16 ml Lsg. A und 32 ml Lsg. B wurden mit dH₂O auf 1 l aufgefüllt.

Färbelösung (1x) Frisch anzusetzen!

5 ml Färbelösung (20x) wurden mit Puffer auf 100 ml aufgefüllt.

3.6 Geräte

Produkt	Bezeichnung	Hersteller / Vertrieb
Brutschrank		Heraeus, Hanau
Durchflußzytometer	Epics XL-MCL	Beckmann Coulter, Krefeld
Durchflußzytometer	FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Eppendorfszentrifuge	Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Hämatologieautomat	Sysmex SE 9000	Digitana, Hamburg
Kühlzentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Laborzentrifuge	Labofuge GL	Heraeus/Christ, Hanau
Lyse-Gerät	Multi-Q-Prep	Coulter Electronics, Krefeld
Mikroskop	Laborlux S	Leica, Wetzlar
Neubauer Zählkammer		Intermed, Geesthacht
Ultraschallvernebler	NE-U12	Omron, Tokyo (Japan)
Vortex	REAX 2000	Heidolph
Zytospin-Zentrifuge	Cytospin 3	Shandon, Astmoore (England)

4 Ergebnisse

4.1 Kalibrierung und Qualitätskontrolle der Durchflußzytometer

Alle durchflußzytometrischen Messungen wurden auf Geräten durchgeführt, die den Anforderungen der Routinediagnostik einer ISO 9002-zertifizierten Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin entsprachen und einer täglichen Qualitätskontrolle unterlagen. Die Kalibrierung des Durchflußzytometers wird am Beispiel der in Abbildung 7 b (vergl. 3.2.1) dargestellten Daten erläutert. Die mean channel der Dako-Beads wurden doppelt logarithmisch gegen die MESF-Werte (siehe Tabelle 2, Spalte 2) aufgetragen (Abb. 16), und die lineare Regression wurde berechnet. Anhand der Funktion konnten alle unter gleichen Bedingungen ermittelten Fluoreszenzintensitäten in MESF umgerechnet werden. Über die Blank-Beads wurde der Grenzwert (threshold), der Fluoreszenz von Nicht-Fluoreszenz trennt (225 MESF), ermittelt sowie die Zahl von Fluoreszenzmolekülen, die im kleinsten Kanal (zero channel) erfaßt wurde (215 MESF).

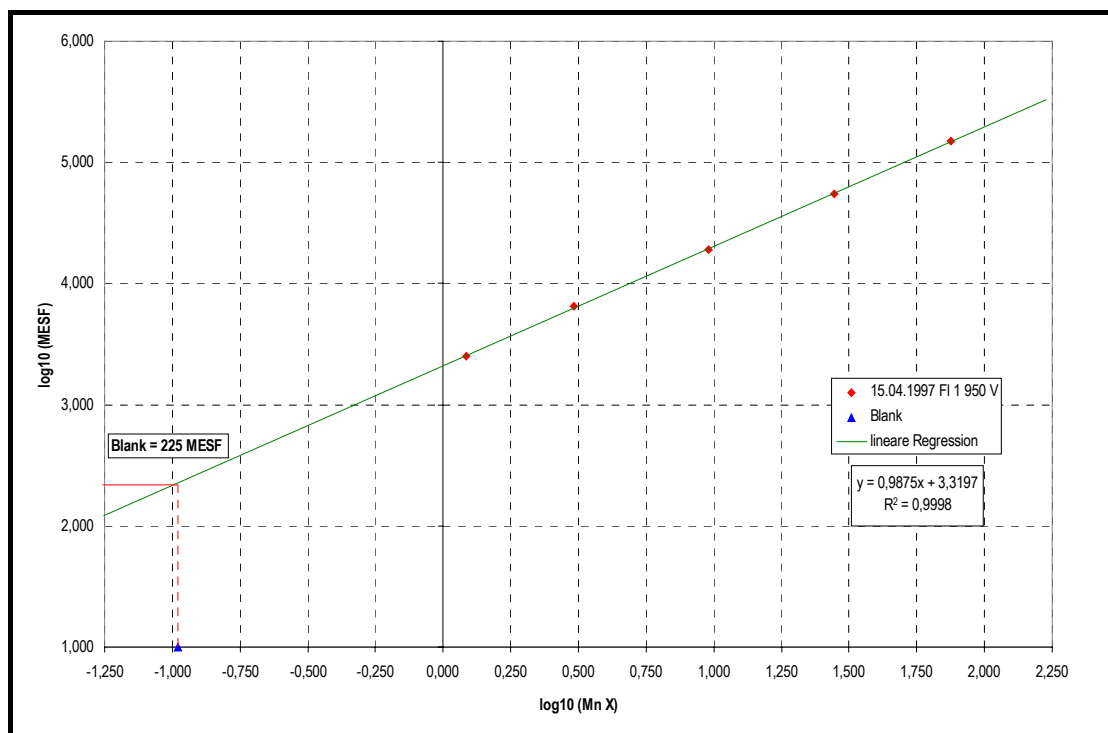


Abbildung 16: Ermittlung der linearen Regressionsfunktion aus der Kalibrierung mit Dako-Beads. Die mean channel (Mn X) der Fluoreszenzintensität der Dako-Beads (rote Quadrate) wurden doppelt logarithmisch gegen die MESF-Werte aufgetragen, und die Regression wurde berechnet. Über die Blank-Beads (blaues Dreieck) wurde der Grenzwert, der Fluoreszenz von Nicht-Fluoreszenz trennt (225 MESF), ermittelt.

Die Qualitätskontrolle mit Coulter FluoroSpheres zeigte, daß das Gerät die Fluoreszenzintensität über den dargestellten Zeitraum (Oktober 2001) im Bereich der 2σ -Grenzen der Vorperiode konstant hielt (Abb. 17).

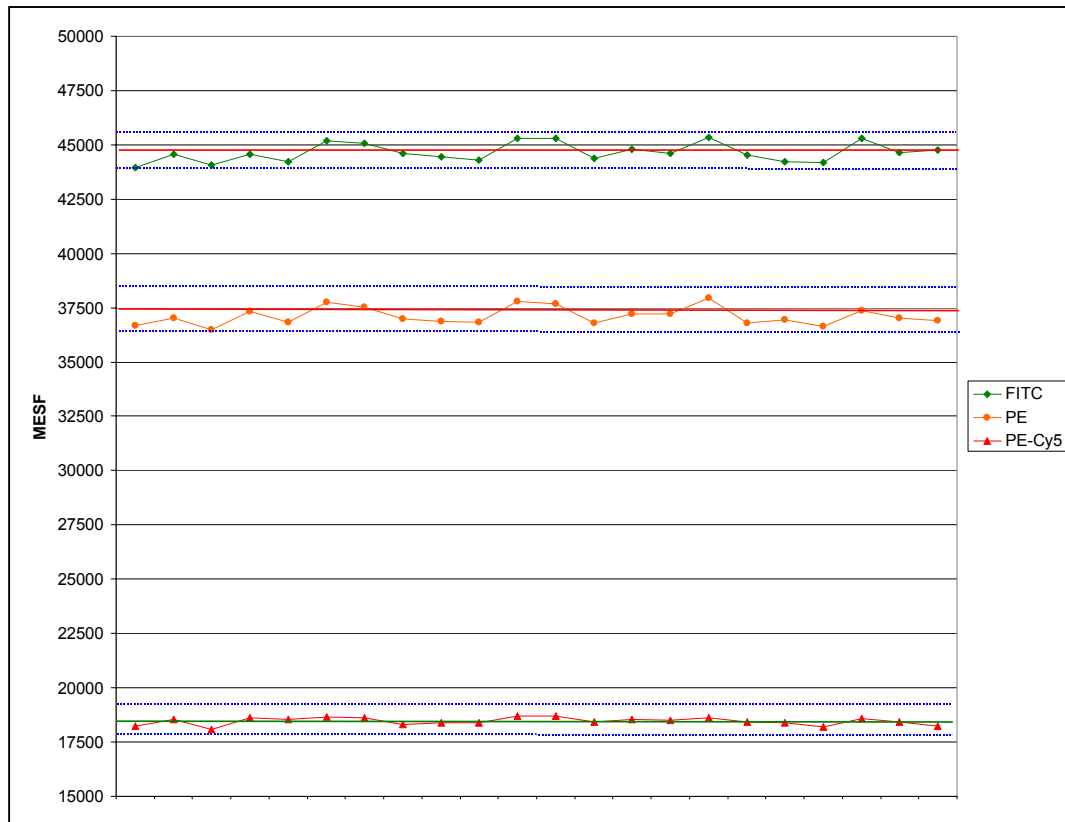


Abbildung 17: Regelkarte für die Qualitätskontrolle im Oktober 2001 mit den aus der Vorperiode ermittelten Mittelwerten (durchgezogene Linien in rot bzw. grün) sowie oberen und unteren Warngrenzen (gepunktete blaue Linien). Die Fluoreszenzintensität der Coulter FluoroSpheres in den Fluoreszenzkanälen für FITC (grüne Quadrate), PE (orange Punkte) und PE-Cy5 (rote Dreiecke) wurde anhand der täglichen Kalibrationsfunktion in MESF umgerechnet und für jeden Arbeitstag des Monats eingetragen.

4.2 Durchflußzytometrische Analyse der Leukozytensubpopulationen im induzierten Sputum

Die durchflußzytometrische Analyse der Leukozytensubpopulationen von 40 Sputumproben anhand des Seitwärtsstreulichtes sowie der CD45-Expression wurde mit der Zelldifferenzierung von May-Grünwald-Giemsa gefärbten Zytospinpräparaten am Lichtmikroskop verglichen. Die Ergebnisse hinsichtlich der Alveolar-makrophagen, Neutrophilen und Lymphozyten korrelierten statistisch signifikant linear ($Y = a \times X + b$) mit den Standardzelldifferenzierungen am Mikroskop (Tabelle 5). Diese Ergebnisse wurden bereits in der Diplomarbeit ausführlich dargestellt [Loppow 1997], und die durchflußzytometrische Analyse der Leukozytensub-

populationen beschränkt sich in dieser Arbeit auf die Detektion der eosinophilen Granulozyten.

Zellen	FCM [%]		Mikroskop [%]		Statistische Kenngrößen			
	MW	SE	MW	SE	a	b	r	p
Lymphozyten	3,5	0,3	2,3	0,3	0,32	1,10	0,39	< 0,020
Makrophagen	50,1	3,0	54,7	3,5	0,65	0,59	0,79	< 0,001
Neutrophile	38,9	3,2	34,2	3,6	0,65	0,54	0,83	< 0,001

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardfehler der prozentualen Anteile der Leukozytenpopulationen für 40 Leukozytendifferenzierungen am Durchflußzytometer und am Mikroskop sowie statistische Kenngrößen (a = Steigung, b = Achsenabschnitt, r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanzniveau) der Korrelationen zwischen den beiden Methoden.

4.2.1 Durchflußzytometrische Analyse eosinophiler Granulozyten im induzierten Sputum

Eosinophile Granulozyten von 16 Probanden wurden anhand des erhöhten depolarisierten Seitwärtsstreulichtes identifiziert und mit der Zelldifferenzierung von May-Grünwald-Giemsa-gefärbten Zytospinpräparaten am Lichtmikroskop verglichen. Tabelle 6 zeigt Mittelwerte, Standardabweichungen und die statistischen Kenngrößen der linearen Korrelation (Abb. 18).

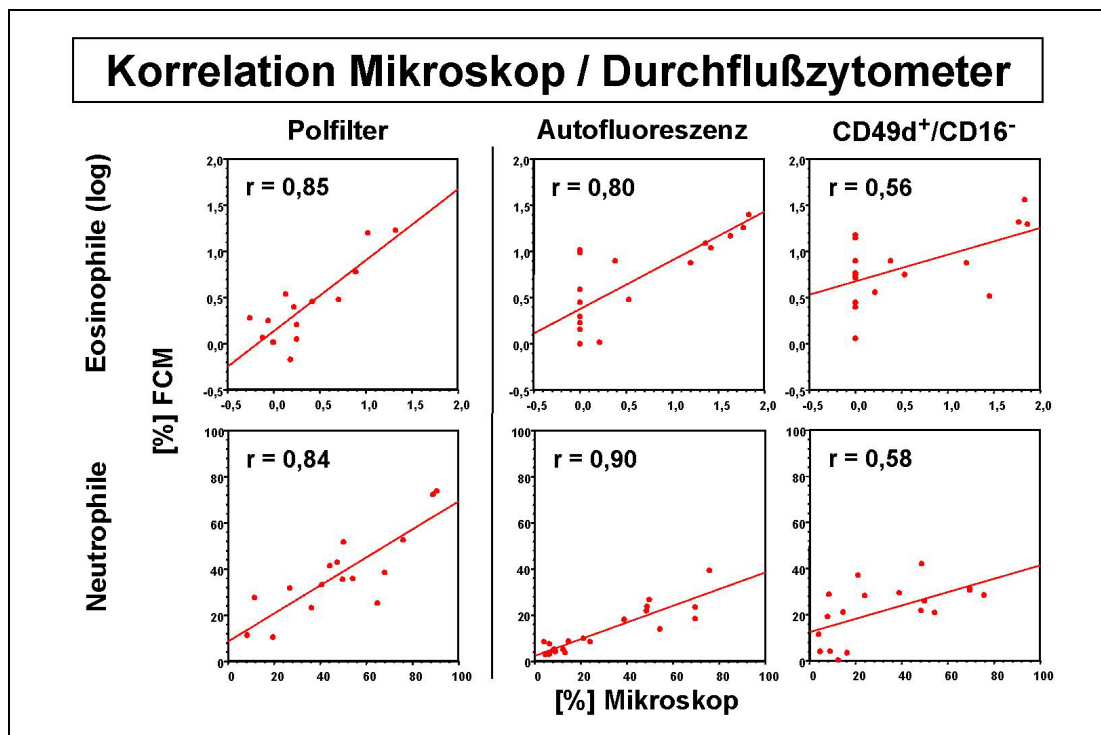


Abbildung 18: Korrelation der durchflußzytometrischen Messungen (FCM) der Granulozyten mit dem Polfilter, anhand der Autofluoreszenz und mittels immunologischer Marker (CD49d, CD16) mit der herkömmlichen Auswertung am Lichtmikroskop. Die prozentualen Anteile der eosinophilen (logarithmisch transformiert) und neutrophilen Granulozyten beziehen sich auf die Sputumleukozyten.

Zum Vergleich sind zusätzlich Daten angegeben, bei denen die Eosinophilen aufgrund ihrer erhöhten Autofluoreszenz (Abb. 19) bei 6 gesunden Probanden, 9 Patienten mit Asthma bronchiale und 4 mit COPD (FEV_1 $3,6 \pm 0,3$ L) bzw. anhand immunologischer Merkmale (Abb. 20) als CD49d-positive und CD16-negative Zellen bei 6 gesunden Probanden, 8 Patienten mit Asthma bronchiale und 3 mit COPD, (FEV_1 $3,6 \pm 0,3$ L) bestimmt wurden [Loppow 1998c].

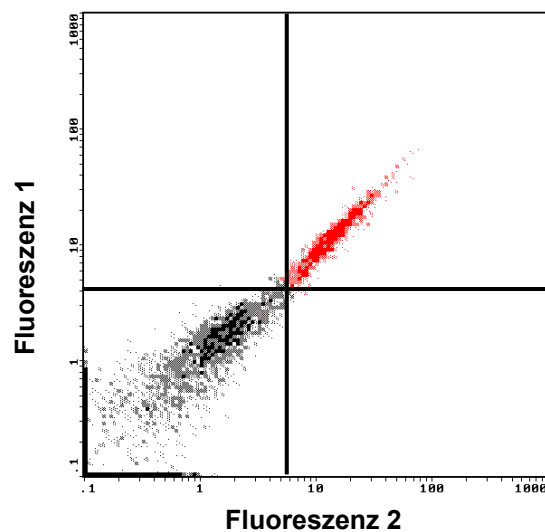


Abbildung 19: Detektion eosinophiler Granulozyten (rot) anhand ihrer Autofluoreszenz in den Fluoreszenzen 1 (FITC) und 2 (PE).

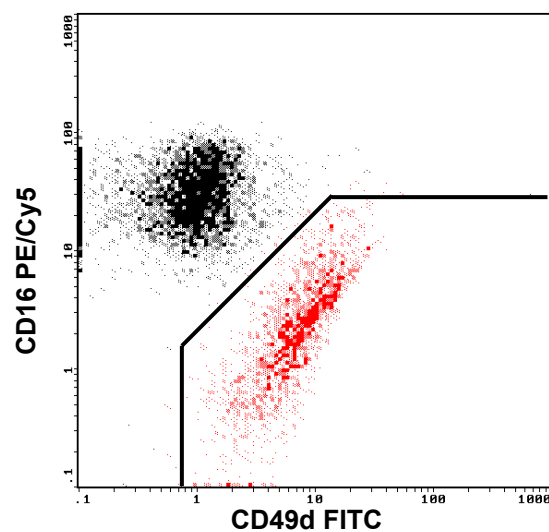


Abbildung 20: Detektion eosinophiler Granulozyten (rot) als CD49d-positive und CD16-negative Granulozyten.

Zellen	Mikroskop [%]	Durchfluß- zytometer [%]	Regressionsgerade		
			a	b	r
Polfilter					
Eosinophile	3,9 ± 1,4	3,9 ± 1,3	0,77	0,14	0,85
Neutrophile	48,5 ± 6,3	38,0 ± 4,5	0,61	8,56	0,84
Autofluoreszenz					
Eosinophile	16,5 ± 5,6	9,1 ± 2,2	0,53	0,38	0,80
Neutrophile	28,8 ± 5,7	12,7 ± 2,3	0,36	2,36	0,90
CD49d ⁺ /CD16 ⁻					
Eosinophile	14,7 ± 6,0	9,7 ± 2,2	0,29	0,68	0,56
Neutrophile	33,2 ± 5,9	22,9 ± 2,7	0,29	12,44	0,58

Tabelle 6: Prozentuale Anteile und Standardfehler der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten nach durchflußzytometrischer Messung mit dem Polfilter, anhand der Autofluoreszenz und mittels immunologischer Marker (CD49d, CD16) im Vergleich mit der herkömmlichen Auswertung am Lichtmikroskop sowie statistische Kenngrößen der linearen Regression: Steigung (a), Achsenabschnitt (b) und Korrelationskoeffizient (r).

4.3 Durchflußzytometrische Analyse der Lymphozytensubpopulationen im induzierten Sputum

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 77 Sputumproben hinsichtlich der Lymphozytensubpopulationen analysiert. In der Durchflußzytometrie ist es nicht wie in der Chromatographie möglich, Vergleichssubstanzen zuzusetzen, um Ergebnisse zu überprüfen. Lediglich zur Bestimmung absoluter Zellzahlen können Partikel-Suspensionen als interner Standard eingesetzt werden [Böttcher 1997]. Man behilft sich mit der Überprüfung der Plausibilität der Ergebnisse. Bei der Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen im Vollblut werden Checksummen angewandt, die als Plausibilitätskontrolle dienen [Cavelly 1993]. Nachdem die Lymphozyten mit der Kombination von CD45-Expression und Seitwärtsstreulicht immunologisch identifiziert sind, muß die Summe der T_H - (CD3- und CD4-positiven Lymphozyten) und $T_{C/S}$ -Zellen (CD3- und CD8-positiven Lymphozyten) der Anzahl der reifen T-Zellen (CD3-positiven Lymphozyten) entsprechen. Ebenso müssen alle Lymphozyten durch die Summe der reifen T-Zellen (CD3-positiv), reifen B-Zellen (CD19-positiv) und natürlichen Killerzellen (CD3-negativ und CD16- oder CD56-positiv) erfaßt werden. Die Summe der prozentualen Anteile der T_H - und $T_{C/S}$ -Zellen sollte den prozentualen Anteil der reifen T-Zellen $\pm 5\%$ repräsentieren. Entsprechend sollte die Summe der prozentualen Anteile der reifen T-, reifen B- und Natürlichen Killerzellen annähernd 100 % aller Lymphozyten $\pm 5\%$ betragen.

Im Mittel betrug die Lymphozytenvitalität 84 %. Über alle 77 Messungen wichen die Checksummen um 1,8 % bei der Summe der T_H - und $T_{C/S}$ -Lymphozyten und um 5,9 % bei der Summe der T-, B- und NK-Zellen von den erwarteten Werten ab (Tabelle 7). Die entsprechenden Differenzen für die Messungen mit dem Coulter-Durchflußzytometer und Coulter- bzw. Caltag-Antikörpern waren 2,2 und 10,1 %, mit dem BD-Gerät und BD-Antikörpern 1,5 und 3,6 %. Tabelle 7 zeigt zum Vergleich Daten für BALF [Dauber 1992] und Blut [Majori 1997] aus der Literatur.

Lymphozyten		Vitalität	T	T_H	T_{C/S}	NK	B	T_H+T_{C/S}	T+B+NK
		[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
MW	(n=77)	84,4	88,6	63,6	23,3	2,3	3,3	86,8	94,1
Coulter	(n=27)	86,2	85,4	60,5	22,7	2,0	2,6	83,2	89,9
BD	(n=50)	83,1	90,3	65,3	23,5	2,5	3,6	88,8	96,4
SEM		1,8	0,8	1,8	1,8	0,3	0,4	1,0	0,6
Coulter		2,2	1,6	2,1	2,2	0,5	0,7	2,1	1,2
BD		2,7	0,8	2,5	2,6	0,3	0,5	0,9	0,4
BALF [Dauber]		-	92,0	49,0	38,0	0,2	1,7	87,0	93,9
Blut [Majori]		-	73,4	41,2	32,7	-	12,3	73,9	85,7

Tabelle 7: Mittelwerte der prozentualen Anteile der Lymphozytensubpopulationen sowie Checksummen für die Messungen von insgesamt 77 Sputumproben am BD und Coulter Durchflußzytometer. Zum Vergleich sind Werte aus Veröffentlichungen für bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) und Blut angegeben.

4.4 Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokine in Lymphozyten des induzierten Sputums

Die intrazelluläre Zytokinproduktion wurde zunächst in reifen T-Lymphozyten des induzierten Sputums am Coulter EPICS XL-MCL mit Antikörpern von Caltag etabliert, bevor am BD FacsCalibur mit BD-Antikörpern Messungen in T_H- und T_{C/S}-Lymphozyten durchgeführt wurden.

4.4.1 Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokine in T-Lymphozyten des induzierten Sputums

Der Anteil Zytokin-positiver Lymphozyten im stimulierten Ansatz war signifikant größer als im unstimulierten. Die mittels Isotypkontrollen bestimmte unspezifische Bindung betrug weniger als 2 %. Die Tabelle 8 zeigt Mediane und Quartile.

Zytokin	Proben	Stimuliert	Unstimuliert	p	Isotypkontrolle
	[#]	[%]	[%]		[%]
IFN-γ	20	42,5 (19,8; 56,9)	27,7 (6,0; 36,3)	0,0005	1,59 (0,69; 1,83)
IL-2	18	9,8 (4,3; 13,8)	2,7 (0,9; 7,0)	0,0016	1,93 (1,44; 3,21)
IL-4	18	13,1 (5,3; 16,5)	5,8 (3,0; 11,2)	0,0033	1,79 (1,24; 3,10)

Tabelle 8: Mediane und Quartile der prozentualen Anteile Zytokin- bzw. Isotypkontrollantikörper-positiver T-Lymphozyten des induzierten Sputums nach Stimulation mit PMA und Ionomycin sowie unstimuliert. Das Signifikanzniveau (p) des Vergleiches unstimuliert versus PMA-Stimulation (Wilcoxon's matched-pairs signed-ranks test).

4.4.2 Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokine in T_H- und T_{C/S}-Lymphozyten des induzierten Sputums

Die Produktion von IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-5, welche in stimulierten Lymphozyten nachgewiesen werden konnte, wurde in insgesamt 29 Sputumproben untersucht. Die prozentualen Anteile Zytokin-positiver Lymphozyten waren nach Stimulation - im Vergleich zu unstimulierten Zellen - statistisch signifikant ($p < 0,05$) erhöht (Tabelle 9). T_{C/S}-Lymphozyten wiesen deutlich höhere Anteile von IFN- γ und IL-4 produzierenden Zellen auf als T_H-Zellen.

	Unstimuliert	Stimuliert		
Zytokin	T = T _H + T _{C/S}	T = T _H + T _{C/S}	T _H (78 % der T)	T _{C/S} (22 % der T)
	[%]	[%]	[%]	[%]
IFN-γ	1,5 (0,8; 3,0)	25,5 (13,2; 38,3)	17,2 (9,1; 25,0)	44,0 (32,0; 61,5)
IL-2	1,9 (1,3; 2,9)	9,2 (5,0; 16,8)	10,1 (4,4; 14,3)	16,4 (7,7; 25,6)
IL-4	2,0 (1,1; 3,5)	12,3 (7,7; 19,7)	7,9 (5,8; 15,5)	26,2 (16,0; 35,0)
IL-5	2,3 (1,7; 3,9)	6,5 (4,5; 12,6)	6,2 (4,0; 10,9)	7,5 (4,2; 19,5)

Tabelle 9: Mediane und Quartile der prozentualen Anteile Zytokin-positiver T-, T_H- und T_{C/S}-Lymphozyten des induzierten Sputums nach Stimulation mit PMA und Ionomycin sowie unstimuliert in insgesamt 29 Sputumproben.

4.4.3 Durchflußzytometrische Bestimmung der Zytokinproduktion in Sputumlymphozyten von Patienten mit Asthma bronchiale oder COPD

Unter den o.g. Patienten waren 7 mit der gesicherten Diagnose eines Asthma bronchiale (1 Frau / 6 Männer; mittleres Alter: 51 Jahre; FEV₁: 79 %Soll) und 8 mit COPD (1 Frau / 7 Männer; mittleres Alter: 64 Jahre; FEV₁: 61 %Soll), deren Zytokinproduktion in den Lymphozytensubpopulationen untersucht wurde.

Die basale Produktion von IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-5 in reifen T-Zellen lag bei den Asthmatikern ohne Corticosteroide (n = 2) höher als bei den Asthmatikern unter Corticosteroidtherapie (n = 5; Tabelle 10), Patienten mit COPD oder gesunden Kontrollpersonen (Abb. 21). Zwischen Patienten mit Asthma bronchiale unter Corticosteroidtherapie und Patienten mit COPD bestand kein Unterschied in der basalen Produktion der untersuchten Zytokine. Die Produktion von IL-4 in T_H-Zellen nach Stimulation war bei Patienten mit COPD höher als bei Patienten mit Asthma bronchiale (p < 0,05), die von IFN- γ in T_{C/S}-Zellen nach Stimulation hingegen war bei Patienten mit Asthma bronchiale höher (Abb. 22).

Zytokin	T [%]		T _H [%]		T _{C/S} [%]	
	Ø	ICS	Ø	ICS	Ø	ICS
IFN- γ	12,5	2,9	14,7	3,1	4,0	3,1
IL-2	11,9	1,9	12,9	1,7	7,1	3,0
IL-4	14,4	2,3	16,8	2,2	5,0	2,4
IL-5	8,8	3,0	9,9	3,2	4,1	2,7

Tabelle 10: Effekt inhalativer Corticosteroide (ICS) auf die Mittelwerte der basalen prozentualen Anteile Zytokin-positiver T-, T_H- und T_{C/S}-Lymphozyten von Patienten mit Asthma bronchiale.

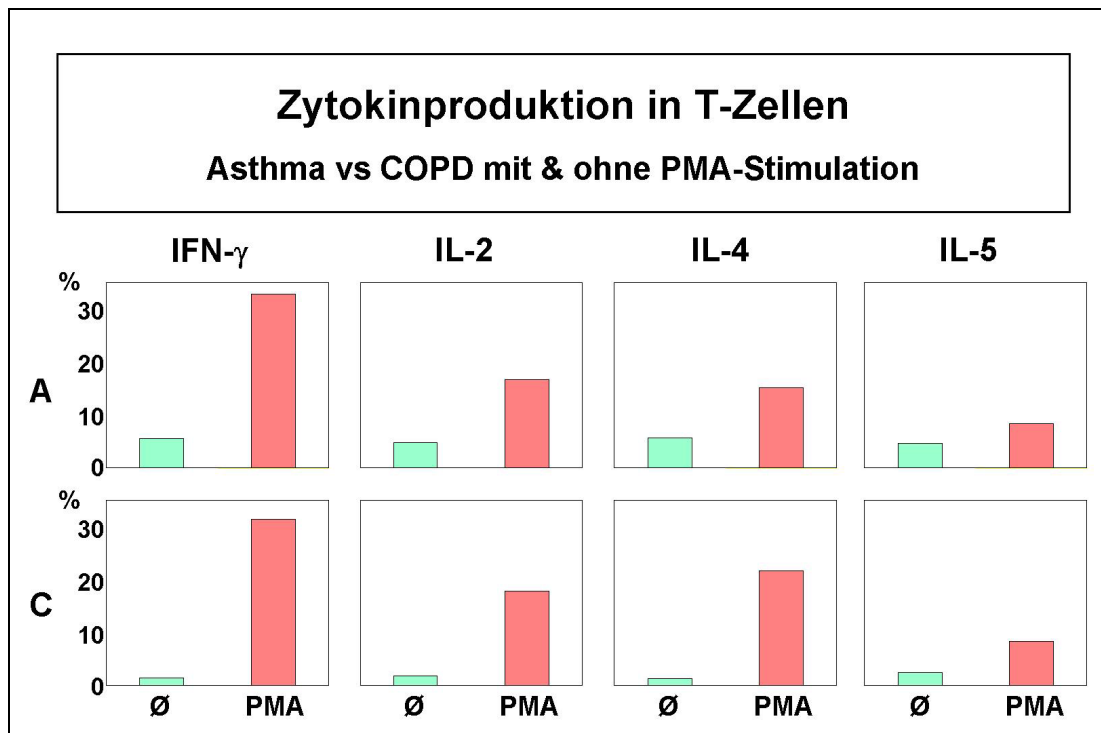


Abbildung 21: Mittelwerte der prozentualen Anteile Zytokin-positiver T-Zellen von Patienten mit Asthma bronchiale (A) oder COPD (C) sowohl basal (grün) als auch nach Stimulation mit PMA und Ionomycin (rot).

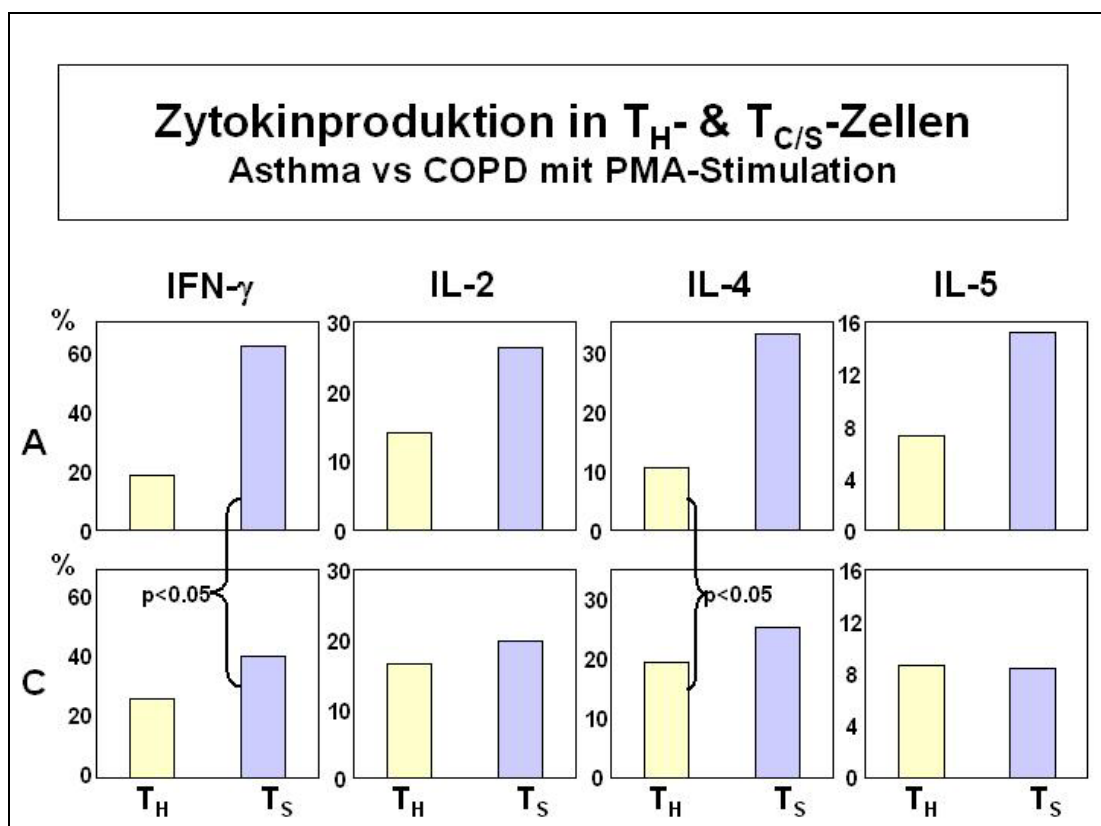


Abbildung 22: Mittelwerte der prozentualen Anteile Zytokin-positiver T_H - (gelb) und $T_{C/S}$ -Zellen (blau) von Patienten mit Asthma bronchiale (A) oder COPD (C) nach Stimulation mit PMA und Ionomycin. Das Signifikanzniveau p ist für statistisch signifikante Unterschiede angegeben.

4.5 Einfluß von Dithiothreitol auf die immunologische Detektionsreaktion

Die Behandlung mit DTT verursachte im Vergleich zu der mit PBS statistisch signifikante Veränderungen der prozentualen Anteile der Leukozyten bei der durchflußzytometrischen Zelldifferenzierung. Nach DTT fanden sich durchschnittlich 2,1 % mehr Monozyten, 2,7 % mehr Granulozyten und 3,4 % weniger Lymphozyten (Tabelle 11, $p < 0,001$). Die Zelldifferenzierungen waren gut reproduzierbar, wie die korrespondierenden Intraclass-Korrelationskoeffizienten (R_i) belegen. Jedoch waren im Fall der CD14-positiven Monozyten nach DTT zwei Ausreißer und bei den CD2-positiven Lymphozyten nach PBS ein Ausreißer zu verzeichnen. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) ergaben sich auch für die prozentualen Anteile der für den entsprechenden Antikörper-positiven Zellen im Vergleich zwischen DTT- und PBS-Behandlung (Tabelle 11). Nach DTT waren die prozentualen Anteile der CD16-positiven Granulozyten und der CD56- bzw. HLA-DR-positiven Lymphozyten um 1,2, 1,1 und 1,7 % erhöht, während die der CD2-, CD3-, CD4-, CD45- und CD8-positiven Lymphozyten um 3,7, 4,3, 4,5, 1,5 und 1,1 % vermindert waren. Die Unterschiede der CD14-positiven Monozyten (3,0 %) und der CD19-positiven Lymphozyten (-0,4 %) waren nicht statistisch signifikant. Die Reproduzierbarkeit der doppelten Ansätze (R_i) reichte von 0,69 bis 1,0, außer für CD14-positive Monozyten nach DTT und CD2-positive Lymphozyten nach PBS (beide: $R_i < 0,5$).

Die Effekte der DTT-Behandlung in Relation zur der mit PBS zeigten sich auch in niedrigen R_i (Tabelle 11) speziell für CD14, CD2, CD45 und HLA-DR. Betrachtet man die Fluoreszenzintensität, so führte die DTT-Behandlung zu einer statistisch signifikanten Erhöhung ($p < 0,001$) bei den CD16-positiven Granulozyten und zu Verminderungen bei CD2- bzw. CD45 positiven Lymphozyten sowie CD14-positiven Monozyten (Tabelle 11). Bei CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 und HLA-DR gab es keine statistisch signifikanten Veränderungen. Die doppelten Ansätze zeigten eine hohe Reproduzierbarkeit bezogen auf die Fluoreszenzintensität ($R_i > 0,7$, Tabelle 12). Die mittleren Effekte der DTT-Behandlung auf die Fluoreszenzintensität sind in Abbildung 23 dargestellt. Tabelle 12 zeigt den Vergleich zwischen DTT- und PBS-behandelten Proben ausgedrückt als R_i . Besonders hervorzuheben ist die Reduktion der Fluoreszenzintensität bei den CD2-positiven Lymphozyten.

Zellen	Art	n	R _i	R _i	MW ± SEM	MW ± SEM	R _i	R _i	MW ± SEM	MW ± SEM
			PBS	DTT	PBS [%]	DTT [%]	PBS	DTT	PBS [MESF]	DTT [MESF]
Monozyten	Leukozyten	13	0,92	0,89	7,6 ± 0,6	9,7 ± 0,7 **	-	-	-	-
Granulozyten	Leukozyten	15	0,94	0,99	61,7 ± 1,9	64,4 ± 1,9 **	-	-	-	-
Lymphozyten	Leukozyten	15	0,99	0,98	32,8 ± 1,2	29,3 ± 1,6 **	-	-	-	-
CD14 pos.	Monozyten	13	0,92	0,17 [§]	76,1 ± 2,6	79,1 ± 1,5	0,97	0,82	185896 ± 6547	172263 ± 5607 **
CD16 pos.	Granulozyten	15	0,96	0,99	93,3 ± 1,0	94,5 ± 1,0 *	0,92	0,91	365269 ± 22470	418443 ± 24517 **
CD19 pos.	Lymphozyten	10	0,99	0,90	10,3 ± 1,2	10,0 ± 1,1	0,88	0,87	22176 ± 568	21874 ± 564
CD2 pos.	Lymphozyten	13	0,47 [§]	0,98	76,7 ± 1,9	73,0 ± 2,0 *	0,99	0,87	28938 ± 775	16387 ± 348 **
CD3 pos.	Lymphozyten	10	0,99	1,00	70,8 ± 2,5	66,5 ± 3,1 *	0,95	0,97	97063 ± 3295	95965 ± 3160
CD4 pos.	Lymphozyten	10	0,99	0,73	41,5 ± 1,9	37,0 ± 2,4 *	0,82	0,88	48154 ± 2755	46898 ± 2853
CD45 pos.	Lymphozyten	12	0,89	0,93	96,5 ± 0,4	95,0 ± 0,6 *	0,98	0,97	149545 ± 2319	147558 ± 2317 **
CD56 pos.	Lymphozyten	14	0,96	0,98	13,5 ± 1,5	14,6 ± 1,7 *	0,72	0,83	8441 ± 284	8583 ± 350
CD8 pos.	Lymphozyten	10	0,98	0,99	24,5 ± 1,9	23,5 ± 2,0 *	0,96	0,97	87452 ± 3229	89764 ± 3176
HLA-DR pos.	Lymphozyten	12	0,69	0,88	13,4 ± 0,6	15,1 ± 0,6 *	0,95	0,94	148021 ± 8717	148432 ± 8570

Table 11: Korrelationskoeffizienten, prozentuale Anteile AK-positiver Zellen und Fluoreszenzintensität von DTT- und PBS-behandelten doppelten Probenansätzen.

Zellen	Art	R _i (% Anteile)	R _i (FI)
CD14-positiv	Monozyten	0,58	0,77
CD16-positiv	Granulozyten	0,91	0,82
CD19-positiv	Lymphozyten	0,95	0,90
CD2-positiv	Lymphozyten	0,54	- 0,84
CD3-positiv	Lymphozyten	0,77	0,97
CD4-positiv	Lymphozyten	0,70	0,83
CD45-positiv	Lymphozyten	0,40	0,96
CD56-positiv	Lymphozyten	0,96	0,81
CD8-positiv	Lymphozyten	0,97	0,91
HLA-DR-positiv	Lymphozyten	0,39	0,97

Tabelle 12: Intraclass-Korrelationskoeffizienten für prozentuale Anteile und Fluoreszenzintensität der DTT- und PBS-behandelten Proben.

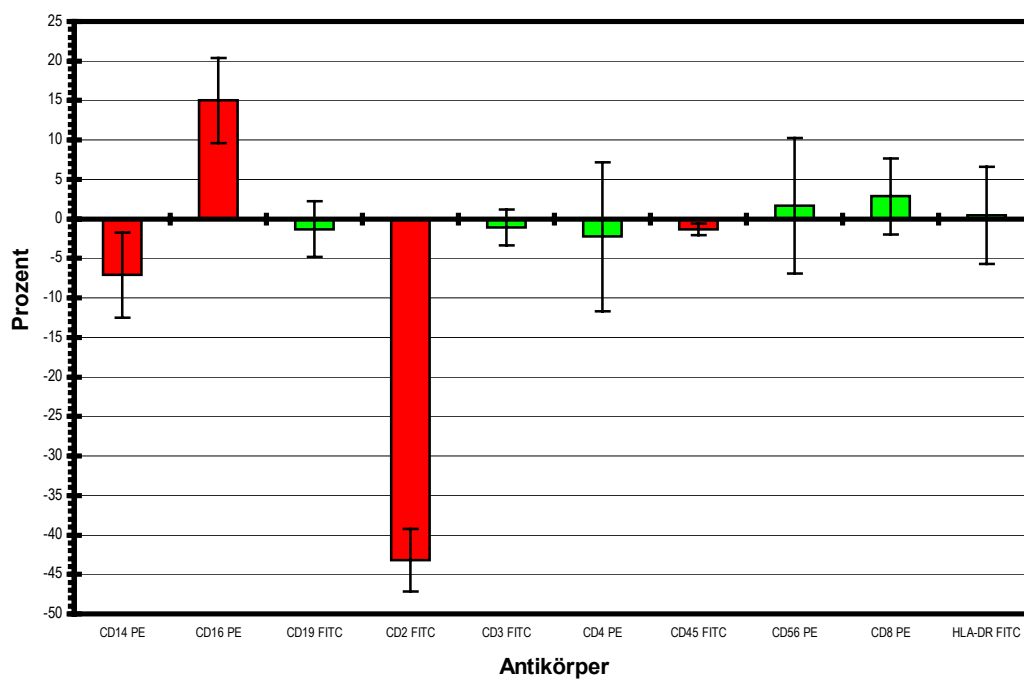


Abbildung 23: Mittlere Effekte ($\pm$ SD = interindividuelle Streuung) der DTT-Behandlung auf die Fluoreszenzintensität der untersuchten Marker.

4.6 Untersuchung der induzierbaren NO-Synthase in Leukozyten des induzierten Sputums

Die induzierbare NO-Synthase wurde zum einen durchflußzytometrisch, zum anderen immunzytochemisch in Alveolarmakrophagen und Granulozyten des induzierten Sputums nachgewiesen.

4.6.1 Durchflußzytometrischer Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in Alveolarmakrophagen des induzierten Sputums

Die durchflußzytometrischen Untersuchungen der induzierbaren NO-Synthase in Alveolarmakrophagen ließen nur minimale Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen Isotypkontrolle und iNOS-Antikörper erkennen (Abb. 24).

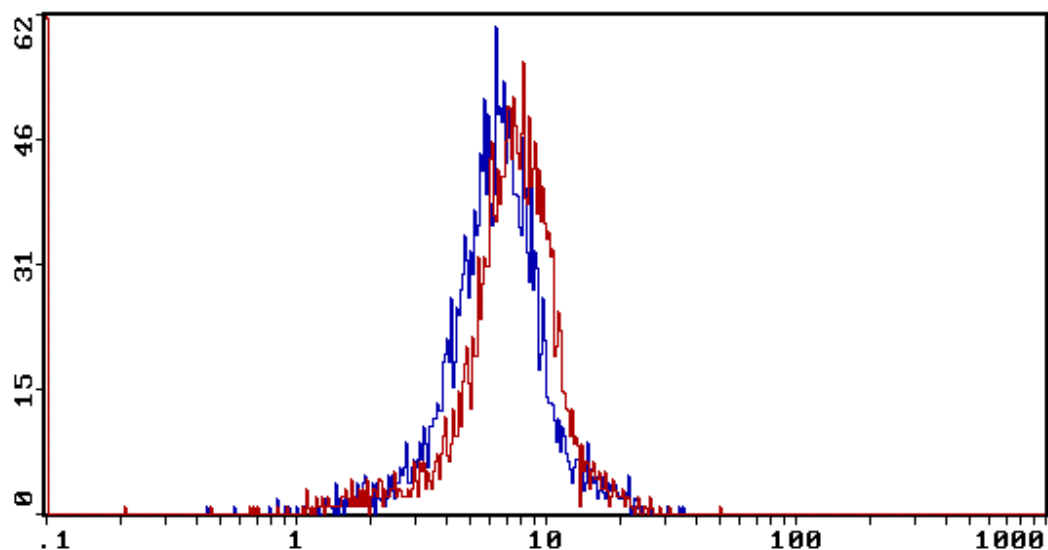


Abbildung 24: Fluoreszenzintensität der iNOS-positiven (rot) bzw. IgG2a-positiven (Isotypkontrolle, blau) Alveolarmakrophagen im induzierten Sputum.

4.6.2 Immunzytochemischer Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in Alveolarmakrophagen und Granulozyten des induzierten Sputums

In dieser Arbeit wurde eine Methode zum immunzytochemischen Nachweis der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in Alveolarmakrophagen und Granulozyten aus dem induzierten Sputum etabliert und in einer klinischen Studie eingesetzt [Loppow 2001c]. Die Abbildung 25 a-f zeigt a+b) Zellen nach Hämalaunfärbung, c) Isotypkontrolle, d) HLA-DR Positivkontrolle und e+f) iNOS-positive Zellen, wie sie

nach Optimierung der immunzytochemischen Nachweismethode typischerweise aussahen und für die Studie ausgewertet wurden.

Keiner der in dieser Studie untersuchten Parameter, so auch die induzierbare NO-Synthase in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten des induzierten Sputums, zeigte statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Ausgangswerten und den Messungen vor den Behandlungsphasen mit Placebo oder Verum. Außerdem gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede nach der Placebobehandlung (Tabelle 13). Nach der vierwöchigen Behandlungsphase mit 1000 µg/d Fluticason war als einzige statistisch signifikante Veränderung die niedrigere absolute Zellzahl im induzierten Sputum zu verzeichnen ($p < 0,05$).

	Placebo			Verum	
	Basal	vor	nach	vor	nach
FEV ₁ [%Soll]	81,7 ± 2,7	80,5 ± 3,0	81,6 ± 2,7	79,9 ± 2,9	81,6 ± 3,6
FEV ₁ /VC [%]	67,5 ± 1,7	67,5 ± 2,1	68,6 ± 2,1	66,4 ± 2,0	67,5 ± 2,1
Exhalirtes NO [ppb] [†]	15,6 (1,2)	14,1 (1,1)	13,4 (1,1)	12,8 (1,2)	12,4 (1,1)
Blut-Eosinophile [%]	2,2 (1,1)	2,3 (1,1)	2,1 (1,2)	2,3 (1,1)	2,1 (1,1)
<u>Sputum</u>					
Makrophagen [%]	41,3 (1,1)	38,3 (1,1)	42,5 (1,1)	39,4 (1,1)	43,6 (1,1)
Neutrophile [%]	46,0 (1,1)	49,3 (1,1)	50,8 (1,1)	49,1 (1,1)	45,1 (1,1)
Eosinophile [%]	1,3 (1,3)	1,3 (1,3)	1,0 (1,4)	1,1 (1,3)	0,8 (1,4)
Lymphozyten [%]	0,9 (1,2)	1,1 (1,2)	0,9 (1,2)	0,9 (1,1)	0,9 (1,2)
Abs. Zellzahl [x 10 ⁶ /mL]	11,5 (1,2)	14,2 (1,2)	10,6 (1,2)	12,3 (1,2)	7,7 (1,1) [§]
LDH [IU/L]	40,0 (1,2)	48,4 (1,2)	41,2 (1,2)	42,5 (1,2)	44,0 (1,1)
ECP [µg/L]	211 (1,2)	282 (1,3)	204 (1,3)	251 (1,2)	199 (1,2)
Elastase [µg/L]	668 (1,2)	762 (1,2)	851 (1,2)	718 (1,2)	710 (1,2)
IL-8 [µg/L]	24,2 (1,2)	33,2 (1,1)	26,0 (1,2)	30,6 (1,1)	27,9 (1,1)
iNOS+ Makrophagen [%]	6,6 (1,2)	5,7 (1,3)	5,8 (1,4)	4,5 (1,3)	5,8 (1,2)
iNOS+ Neutrophile [%]	1,4 (1,3)	1,6 (1,4)	1,6 (1,3)	1,6 (1,3)	1,3 (1,4)

Tabelle 13: Lungenfunktion, exhalirtes NO und Sputumkomposition basal sowie vor und nach den Behandlungsphasen mit Placebo oder Verum. Geometrische Mittelwerte und SEM (in Klammern), mit Ausnahme von FEV₁ und FEV₁/VC, bei denen arithmetische Werte angegeben sind. § statistisches Signifikanzniveau $p < 0,05$, [†] Plateaukonzentration des exhalirten NO bei einer Flußrate von 50 mL/s. Prozentuale Anteile iNOS-positiver Zellpopulation bezogen auf die jeweilige Zellpopulation.

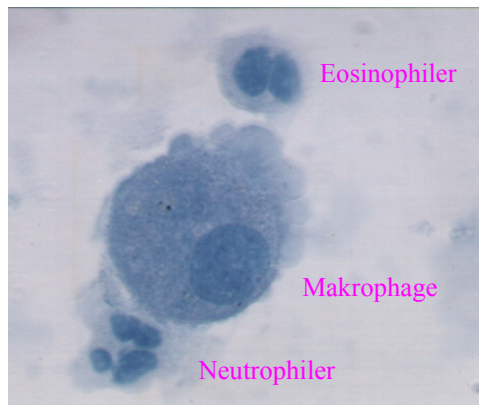


Abbildung 25a: Hämalaunfärbung: Eosinophiler, Makrophagen und Neutrophiler.

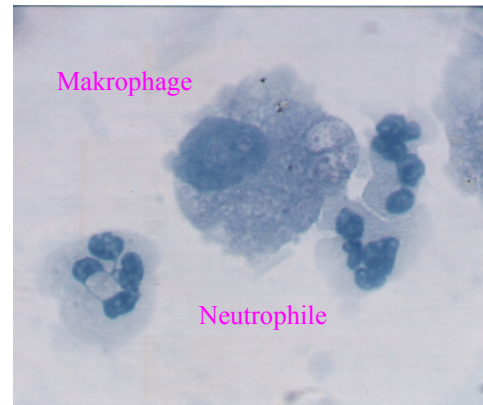


Abbildung 25b: Hämalaunfärbung: Makrophage und drei neutrophile Granulozyten

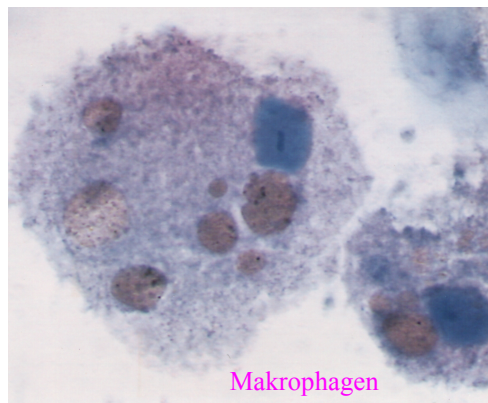


Abbildung 25c: IgG2a-Isotyokontrolle: negative Makrophagen mit Einschlüssen.

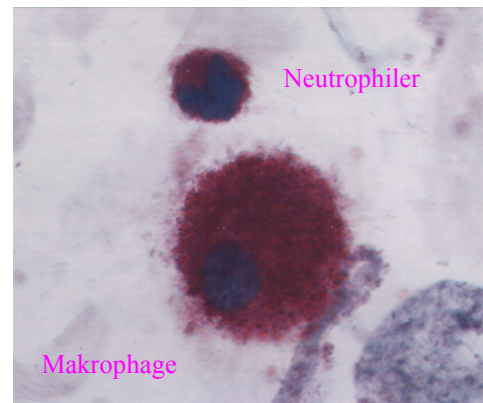


Abbildung 25d: HLA-DR-Positivkontrolle: positiver Neutrophiler und positiver Makrophage.

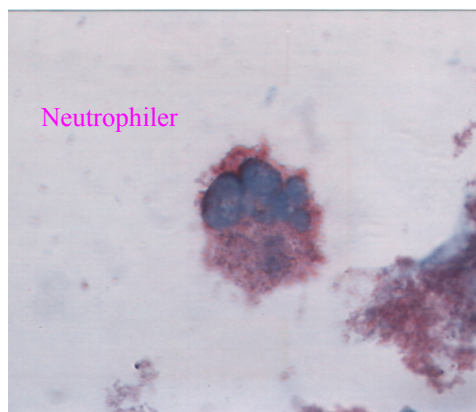


Abbildung 25e: iNOS-positiver neutrophiler Granulozyt.

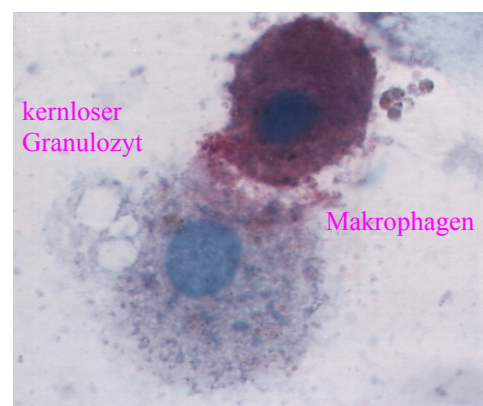


Abbildung 25f: iNOS-positiver Makrophage, negativer Makrophage und kernloser Granulozyt.

4.7 Untersuchung der Auswirkungen der IL-2-Inhalationstherapie bei Patienten mit pulmonal metastasiertem Nierenzellkarzinom

4.7.1 Funktionsmessungen bei Patienten mit pulmonal metastasiertem Nierenzellkarzinom

Die Patienten berichteten im Verlauf der Therapie über eine Zunahme der Symptome Husten ($p = 0,012$) und Dyspnoe ($p = 0,034$). Ebenso wurden durch die IL-2-Therapie FEV₁-Änderungen hervorgerufen ($p = 0,0011$, Tabelle 14, Abb. 26), während die der FVC keine statistische Signifikanz erreichten ($p = 0,17$). Der PC₂₀FEV₁ nahm im Verlauf der Visiten ab ($p = 0,0088$; Abb. 26), während das exhalierte NO ($p = 0,0075$; Abb. 26) ebenso wie der prozentuale Anteil der Eosinophilen im Sputum ($p = 0,00034$; Abb. 26) anstiegen. Der prozentuale Anteil der Neutrophilen im Sputum änderte sich (siehe Tabelle 14) unter der IL-2-Therapie statistisch signifikant im Gegensatz zu dem der Makrophagen ($p = 0,093$) und Lymphozyten ($p = 0,88$). Die Histaminkonzentration im Sputumüberstand stieg an ($p = 0,016$) ebenso der prozentuale Anteil der Eosinophilen im Blut ($p = 0,00030$), während Lymphozyten ($p = 0,17$) und Serum-IgE ($p = 0,46$) unverändert blieben. Keine der Variablen zeigte Unterschiede zwischen den Patienten, die bereits vom ersten Tag der IL-2-Therapie 1/11 der Tagesdosis subkutan spritzten und denjenigen, die mit der subkutanen IL-2-Applikation erst nach der 2. Visite begannen (Abb. 29).

4.7.2 Zytokinproduktion in T_H- und T_{C/S}-Lymphozyten des induzierten Sputums von Patienten mit pulmonal metastasiertem Nierenzellkarzinom

Die intrazelluläre Zytokinproduktion in T_H- oder T_{C/S}-Lymphozyten aus Blut oder Sputum zeigte Unterschiede zwischen den Visiten nur nach Stimulation (Tabelle 15). Der prozentuale Anteil der IFN- γ - bzw. IL-4-produzierenden T_H-Zellen aus dem Blut nahm statistisch signifikant ab, während der der IL-5-produzierenden T_{C/S}-Zellen aus dem Blut zunächst zu- und dann wieder abnahm. Im Sputum nahm der prozentuale Anteil der IFN- γ -produzierenden T_{C/S}-Zellen statistisch signifikant zu.

4.7.3 Zusätzliche Untersuchung eines Patienten nach Beendigung der IL-2-Inhalationstherapie

Ein Patient (Nr. 2, Abb. 26) konnte 2 Monate nach Abbruch der Therapie nochmals gemessen werden. Dieser Patient hatte unter IL-2-Therapie deutlich mit Veränderungen von FEV₁, PC₂₀FEV₁, NO, Eosinophilie im Sputum und Histamin im Sputum-überstand reagiert. Alle Werte waren nach Absetzen der Therapie auf die Ausgangswerte zurückgegangen. (Die Sputumzellendifferenzierung konnte bei dieser Visite nicht ausgewertet werden.)

Parameter	Einheit	Visite 1	Visite 2	Visite 3
Symptome				
Husten *	Score	0 (0 - 1)	1 (1 - 1)	1 (1 - 1)
Auswurf	Score	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 1)
Dyspnoe *	Score	0 (0 - 0)	0,5 (0 - 1)	1 (1 - 1)
Funktionsparameter				
FEV ₁ [#]	L	3,07 (2,40 - 3,89)	2,23 (1,90 - 2,62)	2,36 (2,07 - 3,31)
FVC	L	3,52 (2,72 - 4,62)	3,05 (2,20 - 3,74)	3,24 (2,50 - 4,59)
PC ₂₀ FEV ₁ Mch [#]	mg/mL	16,0 (13,3 - 16,0)	8,0 (2,0 - 16,0)	2,7 (0,8 - 10,7)
NO bei 50 mL/s [#]	ppb	27,0 (20,8 - 30,7)	78,7 (31,1 - 109,7)	59,8 (54,5 - 122,3)
Sputum				
Eosinophile [#]	%	2,1 (2,0 - 3,4)	18,1 (11,4 - 23,4)	37,0 (20,9 - 42,9)
Neutrophile *	%	44,2 (34,0 - 64,4)	50,1 (27,4 - 57,6)	24,6 (17,4 - 32,9)
Lymphozyten	%	6,9 (5,2 - 11,7)	7,0 (5,4 - 9,2)	7,1 (5,9 - 10,6)
Histamin *	ng/mL	4,5 (0,7 - 13,7)	11,4 (6,0 - 43,3)	12,0 (5,8 - 23,4)
Blut				
Eosinophile [#]	%	3,8 (2,4 - 4,7)	10,1 (7,0 - 11,1)	14,9 (11,4 - 24,9)
Lymphozyten	%	26,7 (21,4 - 29,6)	26,8 (16,5 - 35,4)	20,5 (12,7 - 31,9)
Serum-IgE	kU/L	57,8 (23,0 - 168,0)	61,7 (32,6 - 184,0)	52,6 (21,9 - 119,0)

Tabelle 14: Zeitlicher Verlauf der Variablen während der IL-2-Inhalationstherapie. Angegeben sind Mediane und Interquartilbereich (in Klammern). Signifikante Veränderungen zwischen den Visiten nach Friedman's ANOVA: * $p < 0,05$, [#] $p < 0,01$.

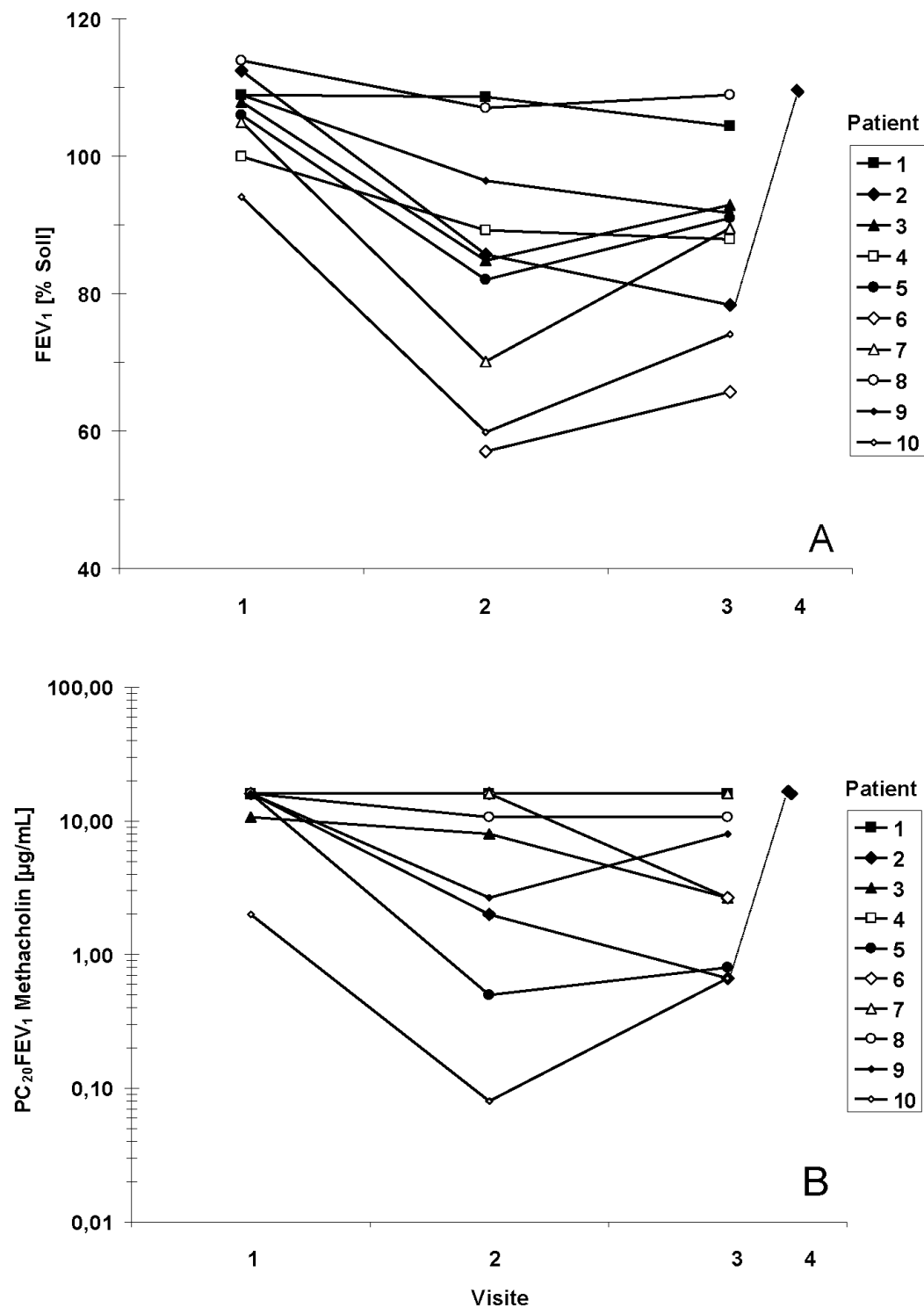


Abbildung 26a+b: Individueller Verlauf A) des forcierten expiratorischen Volumens in der ersten Sekunde (FEV₁) als Prozent vom Sollwert und B) der Atemwegempfindlichkeit als PC₂₀FEV₁ Methacholin [µg/mL] für alle 10 Patienten zu den Zeitpunkten der Ausgangsvisite (Visite 1), 8,5 Tage (Visite 2) und 29,5 Tage nach Beginn der Therapie (Visite 3). Visite 4 betrifft nur den Patienten Nr. 2, der 2 Monate nach Beendigung der Therapie nochmals gemessen werden konnte. Patienten, die bei Therapiebeginn sofort mit der subkutanen Applikation von 1/11 der Tagesdosis IL-2 begonnen haben, sind mit geschlossenen Symbolen dargestellt, diejenigen, die mit der subkutanen Gabe erst nach Visite 2 begonnen haben, sind mit offenen Symbolen ausgewiesen.

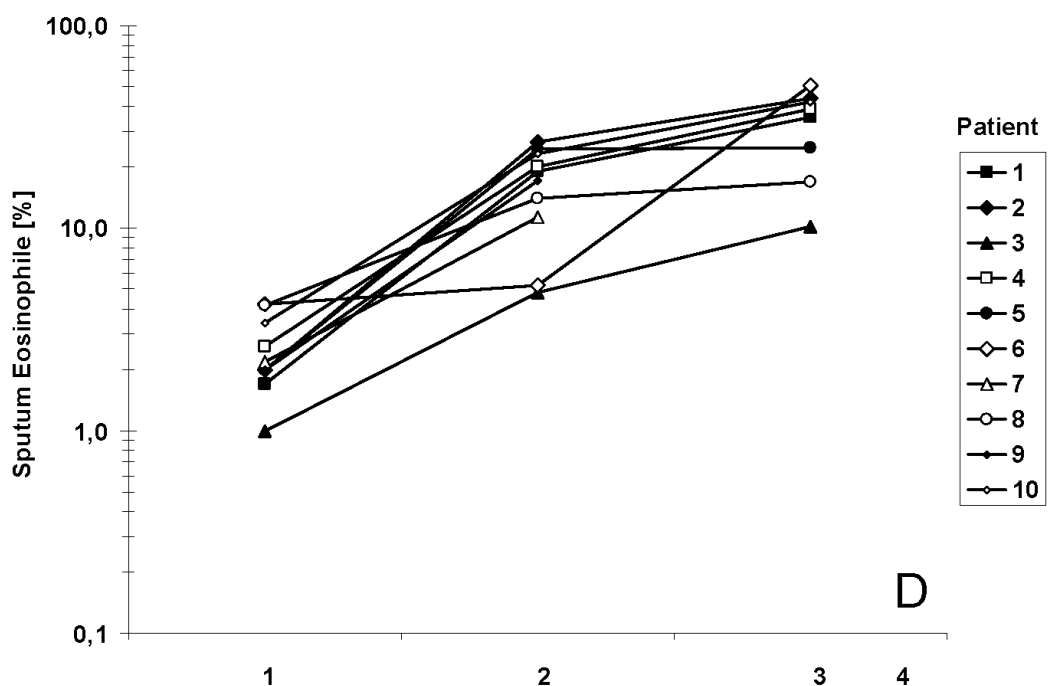
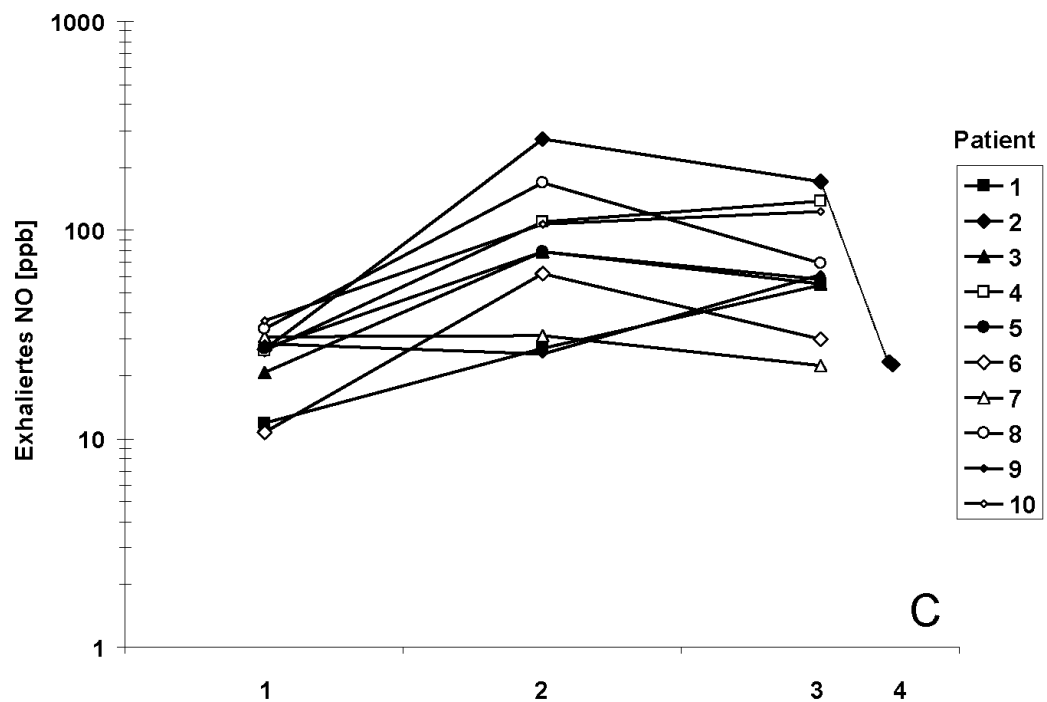


Abbildung 26c+d: Individueller Verlauf C) des exhalieren Stickstoffmonoxids (NO) in ppb und D) des prozentualen Anteils eosinophiler Granulozyten im induzierten Sputum für alle 10 Patienten zu den Zeitpunkten der Ausgangsvisite (Visite 1), 8,5 Tage (Visite 2) und 29,5 Tage nach Beginn der Therapie (Visite 3). Visite 4 betrifft nur den Patienten Nr. 2, der 2 Monate nach Beendigung der Therapie nochmals gemessen werden konnte. Patienten, die bei Therapiebeginn sofort mit der subkutanen Applikation von 1/11 der Tagesdosis IL-2 begonnen haben, sind mit geschlossenen Symbolen dargestellt, diejenigen, die mit der subkutanen Gabe erst nach Visite 2 begonnen haben, sind mit offenen Symbolen ausgewiesen.

		Visite 1	Visite 2	Visite 3	
Blut					
IL-2	T _H	0 → 52	0 → 47	0 → 48	
	T _{C/S}	0 → 33	0 → 27	0 → 25	
IFN- γ	T _H	0 → 12	0 → 9	0 → 8	*
	T _{C/S}	0 → 39	0 → 35	0 → 28	
IL-4	T _H	0 → 9	0 → 8	0 → 5	*
	T _{C/S}	0 → 19	0 → 19	0 → 13	
IL-5	T _H	2 → 20	3 → 26	2 → 21	
	T _{C/S}	2 → 14	3 → 28	2 → 13	*
Sputum					
IL-2	T _H	1 → 14	1 → 7	2 → 8	
	T _{C/S}	1 → 8	2 → 8	0 → 10	
IFN- γ	T _H	2 → 21	0 → 20	1 → 14	
	T _{C/S}	1 → 21	1 → 45	1 → 37	*
IL-4	T _H	6 → 13	2 → 16	2 → 8	
	T _{C/S}	2 → 16	1 → 26	2 → 13	
IL-5	T _H	12 → 23	11 → 13	11 → 11	
	T _{C/S}	10 → 17	5 → 12	6 → 10	

Tabelle 15: Zytokinproduktion von T_H- und T_{C/S}-Lymphozyten aus dem peripheren Blut und induzierten Sputum während IL-2-Therapie. Prozentuale Anteile Zytokin-positiver T-Zellen (Mediane) vor (→) oder nach Stimulation. T_H-Zellen sind als CD8-negative, T_{C/S}-Zellen als CD8-positive T-Zellen definiert. * Signifikante ($p < 0.05$) Änderungen zwischen den Visiten wurden nur nach Stimulation beobachtet.

5 Diskussion

Die Methode der Sputuminduktion ist eine sichere, nicht-invasive Technik, um vitales biologisches Material aus den zentralen Atemwegen zu gewinnen, welches für zytologische Untersuchungen eingesetzt werden kann. Die guten Chancen der Methode, zukünftig eine wichtige Rolle in der klinischen Praxis zu spielen, beruhen auf der Tatsache, daß damit wiederholte Messungen für die Diagnose und Therapiekontrolle von Atemwegs- und Lungenerkrankungen ermöglicht werden [Fahy 1993a] [Hargreave 1993, 1997, 1998][Kips 1998a, b][O'Byrne 1996][Pavord 1997][Vignola 1998]. Desweiteren wurde gezeigt, daß die Zelldifferenzierung anhand von Zytospinpräparaten und die Konzentration löslicher Komponenten im Überstand gut reproduzierbar sind [Spanevello 1997][in't Veen 1996][Pizzichini 1996] und daß durch Inhalation ultraschallvernebelter Kochsalzlösung induziertes Sputum der spontanen Expektoratation hinsichtlich der Quantität und Qualität des gewonnenen Materials überlegen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden ausgearbeitet, um Proben des induzierten Sputums am Durchflußzytometer analysieren zu können. Die tägliche Kalibrierung und Qualitätskontrolle stellten eine einwandfreie Funktion der Durchflußzytometer sicher und gewährleisteten die notwendige Vergleichbarkeit ermittelter Fluoreszenzintensitäten, um Veränderungen der Antigendichte auf der Zelloberfläche erschließen zu können. Stets wurde der Vergleich zu herkömmlichen Bestimmungsmethoden gesucht, um die Richtigkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Plausibilitätskontrollen wurden durchgeführt, wenn keine Vergleichsmöglichkeiten vorhanden waren, und erlaubten eine kritische Betrachtung der Ergebnisse. Mit den entwickelten Verfahren konnten die Leukozytenpopulationen inklusive der eosinophilen Granulozyten und Lymphozytensubpopulationen sowie die intrazellulär nach Stimulation mit PMA und Ionomycin gebildeten Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-5 aus Proben des induzierten Sputums mit hinreichender Genauigkeit bestimmt werden. Teilweise wurden die Methoden in klinischen Studien eingesetzt. So wurde die intrazelluläre Zytokinbestimmung bei einer kleinen Gruppe von Patienten mit klinisch abgesicherter Diagnose Asthma bronchiale oder COPD eingesetzt und ergab statistisch signifikante Unterschiede im Vermögen, Zytokine nach Stimulation in

Lymphozytenpopulationen zu produzieren. Desweiteren wurden Patienten untersucht, die aufgrund eines pulmonal metastasierten Nierenzellkarzinoms inhalativ mit IL-2 behandelt wurden. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte immunzytochemische Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in Zellen des induzierten Sputums wurde in einer Studie eingesetzt, die den Effekt einer kurzzeitigen Behandlung mit inhalativen Corticosteroiden von Patienten mit chronischer Bronchitis untersuchte.

Für die Aufarbeitung der Sputumproben war der Einsatz von Dithiothreitol unabdingbar. Auswirkungen der DTT-Inkubation auf die immunologische Detektionsreaktion wurden an Vollblut eingehend untersucht. Die Ergebnisse unterschieden sich deutlich zwischen den untersuchten Markern. Allerdings betrafen die Auswirkungen für einen eingesetzten Antikörper in der Regel alle Blutproben in gleichem Maße, so daß der Einsatz von Dithiothreitol bei der Aufarbeitung der Proben des induzierten Sputums die Vergleichbarkeit nicht zu tangieren scheint.

5.1 Durchflußzytometrische Analyse der Leukozytensubpopulationen im induzierten Sputum

Durchflußzytometrische Messungen geben elektronische Ereignisse anstelle morphologischer Details an. Daher ist es erforderlich, die Ergebnisse anhand herkömmlicher Methoden zu validieren. Durch gut durchdachte Gating-Strategien und die ständige Überprüfung der Konsistenz der Messungen kann eine hohe Qualität der Analyse gewährleistet werden. Bei Untersuchungen von lysiertem Vollblut wird die Identifikation der Lymphozytenpopulation anhand der Streulichteigenschaften häufig als ausreichend angesehen. Das Vorwärtsstreulicht reflektiert dabei in erster Näherung die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht die Granularität der Zelle. Dieser Ansatz versagt bereits bei der Analyse der meisten Proben der BALF und ist bei Sputumproben, die normalerweise einen niedrigen Lymphozytenanteil aufweisen, nicht durchführbar, zumal die Zellqualität schlechter ist als im Blut. Nicholson et al. [1996] zeigten, daß der Ansatz, die Lymphozyten anhand der CD45-Expression als immunologischem und des Seitwärtsstreulichts als morphologischem Kriterium zu erfassen, zu einer höheren Reinheit des Lymphozyten-Gates und einer geringeren Variabilität bei wiederholten Messungen von T-Zellen führt. Dieser Ansatz ist die

Voraussetzung für die valide Bestimmung von Leukozytenpopulationen in BALF- oder Sputumproben und wurde bereits eingesetzt [Chow 1998][Loppow 1998 b].

Die Leukozytendifferenzierung in dieser Arbeit erfolgte anhand der Kombination von CD45-Expression und Seitwärtsstreulicht. Die prozentualen Anteile der beiden Hauptkomponenten Makrophagen und Granulozyten standen sehr gut zu den mikroskopisch ermittelten Werten in linearer Beziehung; für den prozentual kleineren Anteil von Lymphozyten war die Korrelation nur unwesentlich schlechter.

5.1.1 Durchflußzytometrische Analyse eosinophiler Granulozyten im induzierten Sputum

Um das Vorliegen eines Asthma bronchiale abzuklären, wird in der klinischen Routinediagnostik häufig die Frage gestellt, ob eine Eosinophilie in den Atemwegen vorliegt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit mit drei verschiedenen durchflußzytometrischen Ansätzen versucht, die eosinophilen Granulozyten im induzierten Sputum zu identifizieren. Sowohl die Detektion der Eosinophilen anhand der erhöhten Autofluoreszenz (Abb. 19) als auch diejenige anhand des erhöhten depolarisierten Seitwärtsstreulichts (Abb. 10 e) korrelierte für eosinophile und neutrophile Granulozyten gut mit den herkömmlichen Zelldifferenzierungsdaten der Zytospinpräparate (Abb. 18). Für die Detektion anhand der immunologischen Parameter als CD49d-positive und CD16-negative Zellen (Abb. 20) war die Korrelation schlechter (Abb. 18).

Mit der durchflußzytometrischen Detektion anhand des erhöhten depolarisierten Seitwärtsstreulichts war es möglich, im Mittel den gleichen prozentualen Anteil von eosinophilen Granulozyten zu bestimmen wie bei der Zelldifferenzierung mit dem Mikroskop (Tabelle 6). Bei den anderen durchflußzytometrischen Methoden wurden im Mittel 7,4 bzw. 5,0 % weniger Eosinophile detektiert als bei der herkömmlichen Analyse von Zytospinpräparaten. Die bei allen durchflußzytometrischen Methoden geringere Wiederfindung von neutrophilen Granulozyten war durch den um ca. 4 Stunden späteren Meßzeitpunkt gegenüber der Herstellung der Zytospinpräparate zu erklären, da die neutrophilen Granulozyten unter den Leukozyten als erstes zugrundegehen.

Die Detektion von eosinophilen Granulozyten im Sputum anhand der Autofluoreszenz wird zusätzlich dadurch erschwert, daß Zellen, die viel phagozytiert haben, ebenfalls eine erhöhte Autofluoreszenz zeigen können, und der immunologische Nachweis anhand von CD49d und CD16 ist unsicher, da auch T- und B-Lymphozyten CD49d exprimieren können. Außerdem wurde gezeigt, daß nur ein Teil der Eosinophilen aus der BALF CD49d exprimiert [Mengellers 1994] bzw. die Expression bei Eosinophilen aus dem Sputum im Vergleich zum Blut reduziert ist [Tan 1997] und somit ein quantitativer Nachweis mit dieser Methode nicht möglich ist.

Die durchflußzytometrische Detektion anhand des depolarisierten Seitwärtsstreu-lichts scheint der sinnvollste Ansatz einer automatisierbaren Bestimmung eosinophiler Granulozyten im induzierten Sputum zu sein. Er setzt aber ein Durchflußzytometer voraus, bei dem ein Polarisationsfilter in den Strahlengang gebracht werden kann. Dieses war beim BD FacsCalibur im Gegensatz zum Coulter Epics XL leider nicht möglich, so daß auf weitere Untersuchungen zur Bestimmung der Nachweisgrenze verzichtet werden mußte.

5.2 Durchflußzytometrische Analyse der Lymphozytensubpopulationen im induzierten Sputum

Die durchflußzytometrische Messung der Lymphozytensubpopulationen im induzierten Sputum kann mit derselben Genauigkeit durchgeführt werden wie in der BALF [Dauber 1992] oder im peripheren Blut [Majori 1997] und führt zu ebenso plausiblen Ergebnissen. Die Methode ist unabhängig vom eingesetzten Durchflußzytometer und von den eingesetzten Antikörpern, auch wenn geringe Unterschiede bei den Checksummen auftraten.

Die Lymphozyten wurden zunächst anhand der Kombination von CD45-Expression und Seitwärtsstreu-licht identifiziert, bevor prozentuale Anteile reifer T-, T_H-, T_{C/S}-, B- und NK-Zellen anhand CD-spezifischer Antikörper bestimmt wurden. Anschließend wurden Checksummen berechnet, um die Konsistenz der Messungen zu prüfen. Checksummen werden in der Routinediagnostik als interne Qualitätskontrolle der Lymphozytendifferenzierung von Blut- und Lavageproben zur Beurteilung der Aussagekraft der Messung herangezogen. Die mittleren Abweichungen

der in dieser Arbeit berechneten Checksummen wichen um 1,5 % für die Summe T_H + $T_{C/S}$ bis zu 10,1 % für die Summe T + B + NK von den erwarteten Werten ab. Mit dem BD-Durchflußzytometer und BD-Antikörpern konnten Abweichungen von nur 1,5 bzw. 3,6 % erreicht werden. Diese Werte sind erstaunlich niedrig, insbesondere wenn man berücksichtigt, daß Sputum häufig Zellen in suboptimaler morphologischer und immunologischer Qualität enthält sowie zahlreiche Zelltrümmer.

5.2.1 Durchflußzytometrische Bestimmung der intrazellulären Zytokine in T-Lymphozyten des induzierten Sputums

Zusätzlich zur Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen anhand von Zelloberflächenmarkern wurde die intrazelluläre Zytokinproduktion von Sputumlymphozyten gemessen. Zuvor wurden die Zellen mit PMA und Ionomycin über 4 h stimuliert, so daß eine ausreichende Menge der Zytokine IFN- γ , IL-2 und IL-4 in der Zelle akkumulieren konnte, die durch Monensin an der Proteinsekretion gehindert wurde [Rostaing 1999]. Im Gegensatz zum Blut waren die Zytokine in den T-Lymphozyten aus dem induzierten Sputum sowohl im unstimulierten als auch im stimulierten Ansatz nachweisbar. Diese Beobachtung legt nahe, daß sich die Lymphozyten im Sputum in einem anderen Aktivierungszustand befinden als diejenigen aus dem peripheren Blut. Der Anteil Zytokin-positiver Sputum-T-Zellen im stimulierten Ansatz war statistisch signifikant größer als im unstimulierten und lag in derselben Größenordnung wie bei Zellen aus der BALF [Krug 1996b] [Krouwels 1997], so daß die Messungen valide erscheinen. Ansätze mit Isotypkontrollen belegten die Plausibilität der Zytokinmessungen. Der Anteil Isotyp-positiver T-Zellen war im Mittel stets < 2 %. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher auf diese Kontrollen verzichtet [Keeney 1998].

5.2.2 Durchflußzytometrische Bestimmung der intrazellulären Zytokine in T_H - und $T_{C/S}$ -Lymphozytensubpopulationen des induzierten Sputums

Die Messung von Zytokinen in den T-Zellsubpopulationen von T_H - und $T_{C/S}$ -Zellen eröffnet neue Möglichkeiten der Beschreibung des immunologischen Status bei verschiedenen Erkrankungen [Maino 1998]. Bislang haben nur wenige Arbeits-

gruppen Zytokine in T-Zellsubpopulationen von Zellen aus den Atemwegen nachgewiesen. Dabei handelte es sich ausschließlich um BALF-Zellen [Prasse 1999][Inui 2001]. In dieser Arbeit konnten IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-5 in T-Zellen aus dem induzierten Sputum gemessen werden, die positiv oder negativ für CD8 waren (T_{C/S}- und T_H-Zellen). Die Zytokinproduktion in den unstimulierten Ansätzen lag statistisch signifikant niedriger als in den stimulierten. Die prozentualen Anteile Zytokin-positiver Sputum-T-Zellen lagen in der selben Größenordnung wie bei Zellen aus der BALF [Krug 1996b][Krouwels 1997].

Die Tatsache, daß die Zytokinproduktion in Sputumzellen überhaupt nachweisbar war, unterstreicht das Potential der Methode für die Evaluierung zukünftiger therapeutischer Strategien, die auf die Modulationen des immunologischen bzw. zytologischen Status innerhalb der Atemwege zielen. Besonders hervorzuheben ist, daß T_{C/S}-Zellen stärker sowohl IFN- γ als auch IL-4 produzierten als T_H-Zellen.

5.2.3 Durchflußzytometrische Bestimmung der Zytokinproduktion in Sputumlymphozyten von Patienten mit Asthma bronchiale oder COPD

Die Zytokinproduktion der Sputumlymphozyten von Patienten mit abgesicherter Diagnose Asthma bronchiale oder COPD wurde analysiert, um klinisch relevante Unterschiede aufzudecken. Im Vergleich der unstimulierten Ansätze waren die prozentualen Anteile Zytokin-positiver T-Zellen von Patienten mit Asthma bronchiale größer als die von Patienten mit COPD, während bei den stimulierten Ansätzen keine statistisch signifikanten Unterschiede auftraten. Nach Stimulation war der prozentuale Anteil IFN- γ -positiver T_{C/S}-Zellen bei Patienten mit Asthma bronchiale größer als bei Patienten mit COPD, während der Anteil IL-4-positiver T_H-Zellen bei Patienten mit Asthma bronchiale kleiner war. Die Aussagekraft dieses Vergleiches wird allerdings dadurch eingeschränkt, daß nur zwei der 7 Patienten mit Asthma bronchiale nicht mit inhalativen Corticosteroiden behandelt wurden, die die Zytokinproduktion hemmen [Barnes 1996b, c][Baraniuk 1997].

Die Analyse der sieben Patienten mit Asthma bronchiale ergab bei der kleinen Fallzahl deutliche Unterschiede in der basalen Zytokinproduktion von IFN- γ , IL-2,

IL-4 und IL-5 in T-Zellen und T-Zellsubpopulationen, die ausnahmslos höhere Werte für die zwei Patienten ohne Steroidtherapie ergaben. Diese Patienten sind sehr schwierig zu finden, da sie nach den Therapierichtlinien eigentlich nicht vorkommen sollten, so daß die Messung einer größeren Fallzahl im Rahmen einer eigenen Studie noch aussteht.

5.3 Einfluß von Dithiothreitol auf die immunologische Detektionsreaktion

Die vorliegenden Daten zeigen, daß DTT die durchflußzytometrisch detektierte Fluoreszenzintensität einiger Leukozytenoberflächenmarker beeinflusst. Jedoch waren die meisten Veränderungen klein und lagen im Bereich der Variabilität der Messungen. Alle untersuchten Zellpopulationen blieben deutlich oberhalb der Nachweisgrenze.

Diese Versuche zielten darauf, den potentiellen Effekt von DTT auf die Analyse von induziertem Sputum zu erfassen. Sputumzellen sind in einer Matrix aus Atemwegssekreten von mukosalen Epithelzellen und submukösen Drüsen eingebettet [Lopez-Vidriero 1978]. Der Hauptbestandteil sind Mucine oder Mukus-Glycoproteine, die 1-3 % der Sputummasse ausmachen [Liu 1998b][Lopez-Vidriero 1980]. Diese Komponenten sind hauptsächlich für die Viskosität, Elastizität und Adhäsionskapazität des Mukus verantwortlich [Lundgren 1990]. Um Sputumzellen zu analysieren, ist es notwendig, sie aus ihrer Matrix herauszulösen, beispielsweise durch Zerstörung der makromolekularen Struktur der Mucine. Da diese durch Disulfidbrücken aufrechterhalten wird, ist deren Spaltung ein gängiger Ansatz, um Sputum zu verflüssigen. Die Behandlung von Sputum mit entsprechenden Reagenzien wie z.B. DTT ist sehr effektiv und führt zu einer besseren Reproduzierbarkeit von Zytospin- im Vergleich zu Ausstrichpräparaten [Popov 1994].

Die Spaltung der Disulfidbrücken durch DTT erfolgt deshalb sehr effektiv, weil die stabilen zyklischen Disulfide energetisch begünstigt sind. Der gleiche Mechanismus, der bei den Mukus-Glycoproteinen erwünscht ist, kann jedoch auch die dreidimensionale Struktur von Membranproteinen verändern, so daß die immunologische Detektionsreaktion durch fluoreszenzmarkierte Antikörper, die gegen membranständige Antigene gerichtet sind, gestört werden kann und in einer

verminderten Antikörperbindung resultiert. Als Folge kann die durchflußzytometrisch detektierte Fluoreszenzintensität beeinflußt werden.

Um den Effekt von DTT zu prüfen, war es notwendig, Zellen zu untersuchen, die ohne vorherige DTT-Behandlung zur Verfügung standen. Andere Methoden der Mukusverflüssigung, der Einsatz einer Nadel [Hansel 1991], wiederholtes Waschen [Wu 1997] oder die Inkubation mit einem Enzym-Mix [Cai 1996] könnten ebenfalls die Integrität der Zellen beeinflussen und zu einem selektiven Zellverlust führen. Aus diesem Grund wurden Leukozyten aus peripherem Vollblut als Model für Sputumzellen eingesetzt, da sie mit der geringstmöglichen Beeinträchtigung erhalten werden konnten. Es wurde berichtet, daß die Expression von Oberflächenmarkern wie CD11b und CD18 auf Zellen des peripheren Blutes ca. dreifach höher liegt, als auf Sputumzellen von Patienten mit Bronchioektasen [Wu 1997]. Die Tatsache, daß in den vorliegenden Daten die mittlere Fluoreszenz immer > 8000 MESF und die Nachweisgrenze stets < 1000 MESF war, läßt es als sehr unwahrscheinlich erscheinen, daß Signale mit einer um 50 % verringerten Fluoreszenzintensität, wie sie für Sputum anzunehmen wäre, unter die Nachweisgrenze fallen würden.

Mukus könnte die immunologische Detektionsreaktion beeinflussen, zumindest theoretisch z.B. durch die Adsorption von Antikörpern. Die Validität der vorliegenden Daten wäre jedoch auch dann gegeben, wenn die DTT-Konzentration, der die Sputumzellen ausgesetzt sind, durch Interaktion mit Mucinen deutlich reduziert würde. Sicherlich ist bei der Extrapolation der vorliegenden Daten auf Sputum Vorsicht geboten. Die vorgebrachten Argumente zeigen jedoch, daß die immunologische Markierung von Sputumzellen für die Durchflußzytometrie auch dann erfolgreich durchgeführt werden kann, wenn die Zellen vorher vom Mukus befreit wurden.

Für die durchflußzytometrische Analyse von Lymphozytensubpopulationen im induzierten Sputum werden Antikörper gegen CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD45, CD56 und HLA-DR benötigt. Bislang gab es Daten über den Effekt von DTT nur in Kurzform. Kidney et al. [1994b] berichteten, daß DTT die Detektion von CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD25 und CD45 in Leukozyten aus dem

peripheren Blut nicht beeinflusste, HLA-DR jedoch um 18 % reduzierte. Leider wird nicht deutlich, ob dabei prozentuale Anteile AK-positiver Zellen oder Fluoreszenzintensitäten untersucht wurden. Eine nachfolgende Studie, die durchflußzytometrische Messungen nach Inkubation des Sputums mit DTT einsetzte, zeigte Unterschiede der Lymphozyten zwischen Rauchern und Patienten mit Asthma bronchiale; der Effekt von DTT wurde aber nicht untersucht [Kidney 1996b].

Andere Daten zu den Auswirkungen von DTT auf die immunologische Zelldetektion beziehen sich auf Oberflächenmarker, die für die Analyse von Lymphozyten von untergeordneter Bedeutung sind. Im Vergleich zu Proben, die durch wiederholtes Waschen verflüssigt wurden, verursachte die Behandlung mit 0,1 % DTT eine Verminderung der Fluoreszenzintensität von CD11b und CD18 im Sputum von Patienten mit Bronchioektasen und in neutrophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut gesunder Probanden [Wu 1997]. In gleicher Weise verursachte DTE eine signifikante Verminderung von CD11a, CD11b und CD18 auf eosinophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut, während CD9, CD11c, CDw32 und CD35 nicht beeinflusst wurden [Hansel 1991].

Als Ergebnis dieser Überlegungen wurde der Effekt von DTT auf die durchflußzytometrische Detektion eines für die Lymphozytensubtypisierung notwendigen Spektrums von Oberflächemarkern untersucht. Um möglichst präzise Aussagen treffen zu können, wurde der Effekt von DTT sowohl auf prozentuale Anteile der Zellpopulationen als auch auf die Fluoreszenzintensität unter standardisierten Bedingungen von Kalibration und Qualitätskontrolle erhoben.

Mit Ausnahme der CD14-positiven Monozyten und der CD19-positiven Lymphozyten unterschieden sich die prozentualen Anteile der AK-positiven Zellen signifikant zwischen PBS- und DTT-behandelten Proben, wie die niedrigen R_i besonders für CD2, CD45 und HLA-DR zeigen (Tabelle 11). Der R_i von CD14 war zwar auch niedrig, aber der Unterschied zwischen DTT- und PBS-behandelten Proben war nicht signifikant.

Es muß erwähnt werden, daß der R_i schon aufgrund seiner Definition nicht alle Informationen für den Vergleich zwischen DTT- und PBS-behandelten Proben enthalten kann. Da Blut von freiwilligen, gesunden Spendern mit normaler Zellverteilung untersucht wurde, war die Variation zwischen den Probanden klein im Vergleich zur Variation innerhalb der Probanden, und das könnte zu einem Bias des R_i beigetragen haben. Betrachtet man die prozentualen Anteile AK-positiver Zellen, dann weisen die doppelten Ansätze, die separat inkubiert wurden, hohe R_i auf, die für die meisten eingesetzten Marker auf eine hohe intra-Assay-Reproduzierbarkeit hindeuten. Die wenigen Ausreißer könnten möglicherweise durch zu geringe Antikörpervolumina oder unzureichende Durchmischung von Probe und Antikörper verursacht worden sein.

Alle doppelten Ansätze zeigten eine gute Reproduzierbarkeit in Bezug auf die Fluoreszenzintensität. Bei den CD2- und CD45-positiven Lymphozyten sowie den CD14-positiven Monozyten war die Fluoreszenzintensität bei den DTT-behandelten Proben signifikant verringert gegenüber den PBS-behandelten. Möglicherweise wurden Epitope durch DTT so verändert, daß die Anzahl der auf der Zelloberfläche gebundenen Antikörper niedriger war. Im Gegensatz dazu kann die erhöhte Fluoreszenzintensität im Fall von CD16 dadurch erklärt werden, daß Veränderungen in der Umgebung der Epitope zu einer vermehrten Zugänglichkeit geführt haben. Die vorliegenden Daten für HLA-DR stimmen nicht mit den von Kidney et al. [1994b] berichteten Veränderungen überein, nämlich einer Reduktion um 18 %. Es ist jedoch schwierig, die Ergebnisse zwischen den Studien zu vergleichen, da die Autoren keine Angaben über die Methode der Quantifizierung geben.

In den hier vorgestellten Untersuchungen ging die verminderte Fluoreszenzintensität der CD45- und CD2-positiven Lymphozyten mit verminderten Lymphozytenanteilen einher, und die erhöhte Fluoreszenzintensität der CD16-positiven Granulozyten war von einer Zunahme des Granulozytenanteils begleitet. Im Gegensatz dazu ist die Verminderung der Fluoreszenzintensität der CD14-positiven Monozyten nach DTT-Behandlung nur schwer mit der Zunahme des Monozytenanteils in Einklang zu bringen. In beiden Fällen war der Effekt von DTT auf die Fluoreszenzintensität klein, wie die hohen R_i -Werte mit Ausnahme des Wertes für CD2 belegen (Tabelle

12). In keinem Fall führte die verminderte Fluoreszenzintensität nach DTT im Vergleich zu PBS dazu, daß die prozentualen Anteile Antikörper-positiver Zellen sich veränderten, da positive und negative Zellen stets eindeutig zu unterscheiden waren.

Die Prozentanteile der morphologisch zu identifizierenden Leukozyten unterschieden sich gering, aber signifikant zwischen PBS- und DTT-behandelten Proben. Unklar bleibt der Mechanismus, durch den DTT diese Veränderungen verursacht hat. Möglicherweise sind diese Änderungen durch die Erythrozytenlyse verursacht worden, die für die Analyse von Sputumproben nicht erforderlich ist. Die R_i -Werte für doppelte Ansätze deuten auf eine höhere Reproduzierbarkeit nach DTT als nach PBS hin. Für die Einschätzung der beobachteten Effekte ist es wichtig, sich klar zu machen, daß alle Verschiebungen der Leukozytenanteile im Bereich der durchflußzytometrischen Schwankungsbreite lagen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung beruhten auf der Messung von gesunden Probanden, und die Extrapolation der Daten auf andere Gruppen, z.B. Patienten mit Asthma bronchiale, muß erst noch gezeigt werden. Weitere Untersuchungen, um die Beziehung zwischen Aktivierungsstatus und der Expression von Oberflächenantigenen in Leukozyten aus Blut und Sputum oder den Einfluß der Mucine zu klären, wären hilfreich. Trotz dieser Einschränkungen belegt das Ergebnis, daß die Effekte von DTT auf die prozentualen Anteile AK-positiver Zellen gering sind.

Somit läßt sich folgern, daß die Behandlung mit Dithiothreitol analog der Sputumaufarbeitung einige Oberflächenmarker auf Leukozyten des peripheren Blutes sowohl hinsichtlich der Fluoreszenzintensität (CD2, CD14, CD16, CD45) als auch der prozentualen Anteile AK-positiver Zellen beeinflusste. Die Vergleichbarkeit immunzytochemischer Analysen von Lymphozytenmarkern verschiedener Proben wird durch DTT jedoch offenbar nicht beeinträchtigt.

5.4.1 Durchflußzytometrischer Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in Alveolarmakrophagen des induzierten Sputums

Die Entwicklung der durchflußzytometrischen Methode zum Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in Alveolarmakrophagen und Granulozyten aus dem induzierten Sputum gestaltete sich schwieriger als erwartet. In den ersten Versuchen unterschied sich die Fluoreszenzintensität der intrazellulären iNOS-Markierung von Alveolarmakrophagen nicht wesentlich von derjenigen der Isotypkontrolle. Vermutlich störte die erhöhte Autofluoreszenz der Makrophagen, die bei den erwarteten niedrigen Signalstärken stärker ins Gewicht fällt. Versuche, die Expression der iNOS durch einen „Zytokin-Cocktail“ zuvor zu stimulieren, schlugen sowohl bei humanen Zellen als auch bei der Maus-Makrophagenzelllinie RAW 264.7 fehl (Daten nicht gezeigt), so daß von weiteren Experimenten zum durchflußzytometrischen Nachweis der induzierbaren NO-Synthase abgesehen wurde.

5.4.2 Immunzytochemischer Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in Alveolarmakrophagen und Granulozyten des induzierten Sputums

Bei den untersuchten Patienten mit chronischer Bronchitis wurde durch die kurzzeitige inhalative Corticosteroidbehandlung keine statistisch signifikante Verbesserung der Lungenfunktion oder der Atemwegsentzündung in Form einer Veränderung der Sputumzusammensetzung, der Konzentration des exhalieren Stickstoffmonoxids oder der Expression der induzierbaren NO-Synthase im induzierten Sputum erreicht.

Nach vierwöchiger Behandlung mit Fluticason war die absolute Zellzahl im induzierten Sputum herabgesetzt, unterschied sich aber nicht signifikant von der nach Placebo. Im Vergleich zu Patienten mit Asthma bronchiale waren alle Werte für das exhalierete NO niedrig [Sterk 1999][Jatakanon 1998] und lagen im gleichen Bereich wie bei Patienten mit schwerergradiger COPD [Corradi 1999]. Die niedrigen Ausgangswerte können der Grund dafür sein, daß keine meßbaren Unterschiede während der Behandlungsphase auftraten.

Die Transkription von iNOS wird über NF- κ B reguliert, welches stark von Corticosteroiden beeinflusst wird [Cato 1996]. Aus diesem Grund hätte die Messung der iNOS-Expression als Marker der Atemwegsentzündung ein empfindliches Verfahren zum Nachweis corticosteroidbedingter Änderungen sein können. Statistisch signifikante Unterschiede der prozentualen Anteile iNOS-positiver Makrophagen oder Neutrophilen waren nicht nachweisbar. Möglicherweise war der Anteil iNOS-positiver Makrophagen in den Proben zu gering. Im Vergleich zu Daten von Rutgers et al. [1999] war der Anteil iNOS-positiver Makrophagen nur halb so hoch. Der Vergleich der Daten ist jedoch schwierig, da aus ihnen nicht hervorgeht, ob diese Autoren den anhand von Isotypkontrollen ermittelten Hintergrund an unspezifischer Bindung von den iNOS-positiven Proben abgezogen haben oder die Daten auf einen selektiven Zellverlust während der Färbung überprüft bzw. dafür korrigiert haben. Bei den vorliegenden Daten führte der nicht weiter zu minimierende hohe Hintergrund zu den relativ niedrigen Werten der Expression von iNOS in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten des induzierten Sputums.

5.5 Untersuchung der Auswirkungen der IL-2-Inhalationstherapie bei Patienten mit pulmonal metastasiertem Nierenzellkarzinom

Die vorliegenden Daten zeigen, daß die hochdosierte IL-2-Inhalationstherapie temporär Veränderungen induzieren kann, die denen eines Asthma bronchiale bezüglich der Symptome, Atemwegsobstruktion, -überempfindlichkeit und Parameter der Atemwegsentzündung ähneln.

Asthma bronchiale wird von der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) und interstitiellen Lungenerkrankungen hauptsächlich anhand der eosinophilen Entzündung [Jayaram 2000] und des erhöhten exhalieren NO [Silkoff 1999] [Khari-
tonov 2001] unterschieden. Beide Parameter werden stark von Corticosteroiden beeinflusst, die die effektivste Medikation beim Asthma bronchiale darstellen. Die Mechanismen, die zum Asthma bronchiale beim Menschen führen, sind bis heute nur teilweise verstanden, trotz der großen Zahl an Studien zur Rolle von Umwelteinflüssen, [Lau 2000] zur genetischen Disposition [Xu 2001] und Tiermodellen [Hamelmann 1999]. Nicht einmal die Beziehung zwischen Asthma bronchiale und Atopie ist zweifelsfrei geklärt, wie das intrinsische Asthma bronchiale demonstriert.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Parameter der Atemwegsentzündung zeigten konsistent parallele Veränderungen von Eosinophilen und NO, so wie es nach Allergenexposition bzw. umgekehrt nach antiinflammatorischer Behandlung der Fall ist. Diese Veränderungen treten also auch nach einem unspezifischen Stimulus wie IL-2 auf. Die Änderung der Eosinophilen war begleitet von derjenigen der Atemwegsempfindlichkeit. Diese Assoziation von Eosinophilie und Atemwegsempfindlichkeit setzt offenbar eine relativ kurze Dauer der asthmatischen Erkrankung voraus [Grönke 2002], und auch die Ergebnisse einer Anti-IL-5-Behandlung deuten darauf hin, daß es eine Dissoziation zwischen diesen Endpunkten bei Patienten mit langer Krankheitsgeschichte gibt [Leckie 2000].

Alle vorausgegangenen Versuche, ein Asthma bronchiale beim Menschen experimentell zu induzieren, waren nur bedingt erfolgreich. Weder konnte die Inhalation von platelet activating factor das Krankheitsbild Asthma bronchiale in befriedigender Weise abbilden [Chung 1989] noch haben andere experimentell handhabbare Stimuli wie Ozon [Holz 1999] zu Veränderungen geführt, die asthmatischen Symptomen - insbesondere der Eosinophilie - ähnelten. Möglicherweise stellen virale Atemwegsentzündungen das beste Asthmodell dar, denn sie rufen auch bei gesunden Probanden eine Eosinophilie in den Atemwegen hervor [Fraenkel 1995], führen zu erhöhtem exhalierendem NO [Kharitonov 1995] und erhöhen die Atemwegsüberempfindlichkeit [Laitinen 1991]. Daß die intravenöse IL-2-Gabe die Lungenfunktion in Form einer Reduktion von FEV₁ und FVC hervorrufen kann, wurde bereits als „nicht klinisch relevanter, interstitieller Lungendefekt“ beschrieben [Ardizzoni 1994]. Nach der IL-2-Inhalation trat eine Verminderung des FEV₁, und in geringerem Ausmaß des FVC, aber mit drastischer Veränderung der Atemwegsüberempfindlichkeit ein, beides Anzeichen, die eher für ein Asthma bronchiale als für eine interstitielle Lungenerkrankung sprechen.

Nur ein Patient berichtete, bereits vor Beginn dieser Studie an Asthmasymptomen gelitten zu haben, und kein Patient litt unter COPD. Es läßt sich nicht ausschließen, daß die täglichen Inhalationen *per se* zu den schnell auftretenden Veränderungen der Meßgrößen geführt haben, da sich keine Kontrollgruppe mit Placebo behandeln ließ. Die klinische Erfahrung mit Verneblern gleicher Art bei konventioneller Inhalations-

therapie läßt diese Annahme aber als sehr unwahrscheinlich erscheinen. Der extrapulmonale Status aller Patienten waren während der Studie stabil, so daß tumorbedingte immunologische Veränderungen ebenso unwahrscheinlich sind. Auch der Beginn der systemischen IL-2 Gabe, der 1/11 der täglichen Gesamtdosis umfaßte, und der IFN- α -Applikation schien nicht die Antworten beeinflußt zu haben (Abb. 26).

Bei einem Patienten, der nach Beendigung der Inhalationstherapie noch einmal gemessen werden konnte, waren nach intermediärer Induktion einer Eosinophilie und einer Atemwegsüberempfindlichkeit alle Werte auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt (Abb. 26). Von einem zusätzlichen Patienten, der das Studienprotokoll nicht beenden konnte, wurden peak expiratory flow-Daten (PEF) erhoben. Während seiner ersten Inhalationsphase zeigte der Patient mediane morgendliche und abendliche PEF-Werte von 307 und 370 L/min, die nach Absetzen der Therapie wieder auf 462 und 466 L/min anstiegen, um nach erneutem Therapiestart auf 417 und 432 L/min zu fallen und schließlich nach endgültigem Abbruch der IL-2-Behandlung auf 507 und 517 L/min zu steigen. Diese Messungen legen nahe, daß es einen Zusammenhang zwischen PEF-Abfall und Variation und IL-2-Therapie gibt. Die Beobachtung dieser reversiblen Veränderungen spricht nicht gegen die These, daß die hochdosierte IL-2-Inhalationstherapie alle wichtigen Symptome eines Asthma bronchiale hervorrufen kann, da Asthma bronchiale auch als temporär auftretender Zustand auftreten kann [Panhuysen 1997].

Bei der systemischen IL-2-Therapie kann es neben der Eosinophilie hauptsächlich zu Anämie, Thrombo- und Lymphozytopenie kommen. Auch infektiöse Komplikationen und fieberähnlichen Symptome können bei der systemischen IL-2-Applikation auftreten. Diese Symptome wurden hier nicht beobachtet, vermutlich aufgrund der inhalativen Gabe des größten Teils der täglichen Dosis.

Die meisten Daten zu den Effekten von IL-2 auf die Atemwege stammen aus Tierversuchen. Die subkutane Gabe von IL-2 bei Ratten führte zu einer Eosinophilie in der BALF, erhöhter Atemwegsempfindlichkeit in Verbindung mit Entzündung, jedoch nicht mit Ödemen oder vaskulären Infiltraten [Renzi 1991]. Ähnliche

Ergebnisse zeigten Versuche am Meerschweinchen [Milne 1995]. Desweiteren wurde gezeigt, daß IL-2 in Ovalbumin-sensibilisierten Tieren die allergische Früh- und Spätreaktion verstärken kann und zur Anreicherung von Eosinophilen, Lymphozyten und Mastzellen im atemwegsassoziierten Gewebe beiträgt, ohne zu erhöhten IgE-Werten zu führen [Renzi 1992]. Nur zwei der untersuchten Patienten waren Atopiker, und das mediane Serum-IgE war weder erhöht noch veränderte es sich unter der IL-2-Therapie. Allerdings deuten die erhöhten Histaminwerte im Sputumüberstand auf eine Mastzellaktivierung durch die IL-2-Therapie.

IL-2 spielt eine wichtige Rolle bei der Zellaktivierung und -proliferation im Immunsystem und entfaltet seine anti-Tumor-Wirkung über die Induktion von Zytokinen mit direkter tumortoxischer Aktivität wie IFN- γ oder die Vermehrung von LAK-Zellen. Außerdem wird IL-2 eine Rolle in der Reifung und Aktivierung von Eosinophilen zugesprochen [Tompkins 1990]. Lymphozyten, die während einer Asthmaexazerbation gewonnen wurden, verbesserten Proliferation und Überleben von Eosinophilen nach Stimulation durch IL-2. Diese Effekte hingen nicht direkt von der IL-2-Rezeptorexpression (IL-2r = CD25) auf den Lymphozyten ab [Yang 1993]. Außerdem können Eosinophile IL-2 synthetisieren, speichern und sezernieren [Bosse 1996][Levi-Schaffer 1996], und IL-2 mRNA ist in Zellen der BALF und der bronchialen Mukosa nachzuweisen [Ying 1995]. Die Konzentrationen von IL-2 und seinem löslichen Rezeptor sCD25 in der BALF sind bei Asthmatikern erhöht [Park 1994], obwohl sCD25 im Serum im Vergleich zum exhalieren NO kein spezifischer Marker für das Asthma bronchiale ist [Lanz 1997]. Aufgrund von bekannten methodologischen Problemen [Motojima 1993] wurde auf die Messung von sCD25 im Sputumüberstand verzichtet.

Erhöhte IL-5-Plasmakonzentrationen wurden nach Gabe von IL-2 beobachtet [van Haelst 1991][Schaafsma 1991][Engelhardt 1997] und IL-5 mRNA in T- [Enokihara 1989] und mononukleären Zellen gefunden [Schaafsma 1991], stets in Assoziation mit einer Eosinophilie. Auch LAK-Zellen zeigten eine erhöhte IL-5-Produktion nach Stimulation mit IL-2 [Ishimitsu 1993] ohne jedoch konsistente Veränderungen in der Plasmakonzentrationen von IL-4 und IFN- γ zu verursachen. Bevor die Zahl der Eosinophilen zunahm, stieg die Konzentration von major basic protein an, ein

Hinweis auf Degranulierung und Aktivierung der Eosinophilen [van Haelst 1991]. In dieser Studie schien die IL-2-induzierte Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten nicht von einer bereits bestehenden Eosinophilie abzuhängen, da bei der Ausgangsvisite lediglich ein Patient mehr als 6 % Eosinophile im Blut und nur 3 Patienten mehr als 3 % Eosinophile im Sputum aufwiesen.

Bislang ist noch nicht geklärt, inwieweit die Eosinophilie eine Rolle in der anti-Tumoraktivität von IL-2 spielt oder als Marker des Ansprechens auf die Therapie anzusehen ist, wie es z.B. für die lokale IL-2-Therapie in der Blase der Fall ist [Huland 1992]. Eosinophile Granulozyten können *ex vivo* nach Stimulation mit IL-5 direkt zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen entwickeln und *in vivo* indirekt nach IL-2-Stimulation [Rivoltini 1993]. Interessanterweise können Patienten mit Nierenzell-Adenokarzinom bereits vor Therapiebeginn im Serum erhöhte eosinophilenspezifische Proteine aufweisen [Trulson 1997].

Die Analyse der Zytokinproduktion in den Sputumzellen war durch die geringe Zellzahl und -qualität der Sputumzellen erschwert. Alle Daten der Tabelle 15 müssen aufgrund der multiplen Testungen mit einer gewissen Vorsicht betrachtet werden. Die Produktion von IL-5 nach Stimulation in T_H-Zellen des peripheren Blutes scheint in Übereinstimmung mit der Eosinophilie anzusteigen. Dies trifft in geringerem Maße auch auf IL-4 und IFN- γ nach Stimulation zu. Im Sputum war lediglich die IFN- γ -Produktion nach Stimulation in T_{C/S}-Lymphozyten zu beobachten. IL-2 (plus IFN- α) veränderte die Produktion von IL-2 und IFN- γ nicht merklich - trotz oder gerade aufgrund der T_H2-ähnlichen Antwort.

Die Interpretation der Zytokindaten hinsichtlich ihrer biologischen Bedeutung ist schwierig. Die Vergleichbarkeit der Werte, sowohl basal als auch nach Stimulation mit PMA und Ionomycin, war zwar gewährleistet, jedoch war die basale Zytokinproduktion sehr niedrig, und die Werte nach Maximalstimulation mit PMA, die dem maximalen Zytokinproduktionsvermögen entsprechen, sagen nichts über die Zytokinproduktion *in vivo* aus. Lediglich das Potential einer Zelle, ein bestimmtes Zytokin produzieren zu können, wird durch die durchflußzytometrische Messung der intrazellulären Zytokinproduktion bestimmt.

Nach 7 Tagen IL-2-Inhalationstherapie war das IL-2-Produktionsvermögen von T-Lymphozyten im Blut und Sputum als Antwort auf die externe IL-2-Gabe herunterreguliert. Während die basale IL-5-Produktion und das IL-5-Produktionsvermögen von T-Lymphozyten im Blut erhöht waren und die Eosinophilie hervorriefen, war das IL-5-Produktionsvermögen von T-Lymphozyten im Sputum vermindert. Diese Verminderung war möglicherweise bereits eine Reaktion des Immunsystems, um die Eosinophilie im Respirationstrakt zu reduzieren. Die Steigerung des IL-4-Produktionsvermögens von T-Lymphozyten im Sputum ging mit der Verminderung der basalen IL-4-Produktion im Sputum einher. Weitere Interpretationen, auch der Ergebnisse der Subgruppen von Patienten unter rein inhalativer und unter Kombination von inhalativer und subkutaner IL-2-Applikation, sind aufgrund der begrenzten Fallzahl nicht möglich. Es konnten leider keine weiteren Aktivierungsmarker gemessen werden, da die Sputumzellzahl begrenzt war.

Die Beziehung zwischen dem T_H1 -Typ-Zytokin IL-2 und Asthma ist unklar. Inzwischen wird diskutiert, ob die anhand des Mausmodells entwickelte Dichotomie zwischen der T_H1 - und T_H2 -Antwort direkt auf den Menschen übertragen werden kann, wie es oft geschieht [Durham 2000][Tournoy 2002]. Selbst unter der Annahme, daß es keine strikte Trennung zwischen den verschiedenen Domänen des Immunsystems gibt, ist die in voller Bandbreite auftretende asthmaartige Reaktion nach der IL-2-Inhalation bemerkenswert. Über den Wert dieser Ergebnisse für das Verständnis des Asthma bronchiale läßt sich nur spekulieren, aber erwähnenswert ist, daß die Komplementaktivierung einer der Faktoren ist, der mit der IL-2-induzierten Zytokinproduktion in Verbindung gebracht wird [Thijs 1990] und auf der anderen Seite Komplement 3a und 5 als Faktoren des angeborenen Immunsystems, zusätzlich zur adaptiven Immunantwort, beim Asthma bronchiale eine Rolle spielen [Humbles 2000][Karp 2000].

Um ungerechtfertigten Interpretationen vorzubeugen, sei betont, daß die Therapie gut toleriert wurde und die beobachteten Effekte den Patienten kein inakzeptables Maß an Nebenwirkungen aufbürdeten. Von der Gabe von Corticosteroiden wurde abgesehen, da bekannt ist, daß sie die anti-Tumor-Antwort beeinflussen [Vetto 1987]. Die Tatsache, daß die Veränderungen reversibel waren, unterstreicht, daß die Patienten

die zumindest zeitweise Kontrolle der Lungenmetastasen durch die IL-2-Inhalation nicht mit dem Preis einer irreversiblen chronischen Atemwegserkrankung bezahlen mußten.

Zusammenfassend zeigen die Daten, daß die hochdosierte IL-2-Inhalationstherapie asthmaähnliche Symptome, funktionelle Veränderungen und Atemwegsentzündung hervorrufen kann. Dieses verschiedene Domänen des Immunsystems überspannende Resultat läßt das Asthma bronchiale als eine lokal induzierbare Erkrankung erscheinen, die in einem weiteren Rahmen betrachtet werden muß als demjenigen einer T_H2 -Antwort.

5.6 Ausblick

Das wenig invasive Verfahren des induzierten Sputums wird, trotz der zeitaufwendigen Aufarbeitung, für die Charakterisierung von Atemwegserkrankungen an klinischer Bedeutung gewinnen. Je mehr Parameter aus der geringen Zellzahl mit einer hohen statistischen Genauigkeit ermittelt werden können, desto wertvoller wird das Verfahren für die klinische Diagnostik; so hat die Anwendung der Durchflußzytometrie für Vollblut einen großen Stellenwert erlangt. Neben der reinen Zelldifferenzierung können nun auch Oberflächenantigene wie CD2 (pan-T-Zellen), CD3 (reife T-Zellen), CD4 (T-Helferzellen), CD8 (T-Suppressorzellen), CD14 (Monozyten), CD16 (neutrophile Granulozyten, Monozyten), CD19 (B-Zellen), CD45 (pan-Leukozyten), CD56 (NK-Zellen), HLA-DR (Leukozyten, Aktivierung) und Aktivierungsmarker wie iNOS oder die T_H1/T_H2 -Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-5 bestimmt werden. Es steht damit eine leistungsstarke Methode zur Verfügung, die sowohl der Früherkennung und Therapiekontrolle von Atemwegserkrankungen dienen kann als auch der Aufklärung wissenschaftlicher Fragestellungen.

Ein besonderes Problem im Hinblick auf die Verbreitung der Sputummethode auch in pneumologischen Arztpraxen stellt der Probentransport dar. Bislang konzentrierte sich die Anwendung der Methode auf klinische Zentren, da für die Aufarbeitung und Analyse von Sputumproben einige Erfahrung notwendig ist. Selbst wenn die Analyse des Materials in spezialisierten Laboratorien durchgeführt wird, können Effekte in

der Präanalytik z.B. beim Transport die Aussagekraft des Befundes stark einschränken. Aus diesem Grund wurde in einer prospektiven Studie untersucht, inwieweit das Einfrieren der Sputumproben mit 15 % Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -20°C vor der Aufarbeitung einen Einfluß auf die lichtmikroskopische Leukozyten-differenzierung hat [Holz 2001b]. Die Morphologie der Sputumzellen wurde durch diese Prozedur nicht in dem Maße verändert, daß die Ergebnisse der Zelldifferenzierung beeinträchtigt wurden. Weitere Untersuchungen zur Durchführbarkeit durchflußzytometrischer Untersuchungen an kryokonservierten Sputumproben werden folgen.

6 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war die Ausarbeitung durchflußzytometrischer Analyseverfahren zur Differenzierung von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie Lymphozyten und deren Subpopulationen aus induziertem Sputum anhand ihrer Oberflächenantigene. Den Schwerpunkt bildete die Entwicklung des intrazellulären Nachweises der Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-5 in T-, T_H- und T_{C/S}-Lymphozyten des Sputums. Blut- und Lavageproben dienten der Optimierung der angewandten Verfahren zur Zelldifferenzierung und -typisierung am Durchflußzytometer. Sputum wurde nach Inhalation ultraschallvernebelter Kochsalzlösung bei Probanden im Krankenhaus Großhansdorf gewonnen. Die Sputumflocken wurden vom Speichel getrennt, und nach Inkubation mit Dithiothreitol wurde ein Zytospinpräparat angefertigt, bevor die durchflußzytometrischen Messungen unter standardisierten Bedingungen erfolgten.

Die Leukozytendifferenzierung anhand des Seitwärtsstreulichts und der CD45-Expression war bereits erfolgreich von Proben der bronchoalveolären Lavage auf Proben des induzierten Sputums übertragen worden. Die Resultate waren für Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten vergleichbar mit der lichtmikroskopischen Zelldifferenzierung anhand May-Grünwald-Giemsa-gefärbter Zytospinpräparate. Zur Bestimmung der eosinophilen Granulozyten wurden in dieser Arbeit mehrere Methoden erprobt. Für Sputumproben war die Detektion anhand des depolarisierten Seitwärtsstreulichts denjenigen anhand der Autofluoreszenz bzw. immunologischer Marker (CD49d, CD16) überlegen und zeigte die beste Übereinstimmung mit der Zelldifferenzierung am Mikroskop.

Die Messung der Lymphozytensubpopulationen von T-, T_H-, T_{C/S}-, B- und NK-Zellen anhand von Oberflächenmarkern gegen CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD45 und CD56 konnte bei 77 Sputumproben unabhängig vom eingesetzten Durchflußzytometer mit derselben Genauigkeit durchgeführt werden wie in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit oder im peripheren Blut. Die Abweichung der Checksummen von den erwarteten Werten war < 6 %. Zur Absicherung der Methode wurde der Effekt der Sputumaufarbeitung auf die immunologische Detektionsreaktion untersucht. Die Behandlung mit Dithiothreitol beeinflusste einige Oberflächenmarker auf Leukozyten des peripheren Blutes sowohl hinsichtlich der Fluoreszenzintensität (CD2, CD14, CD16, CD45) als auch der Anteile Antikörper-positiver Zellen. Die Vergleichbarkeit immunzytochemischer Analysen von Lymphozytenmarkern verschiedener Proben wurde durch DTT jedoch nicht beeinträchtigt.

Der intrazellulären Nachweis von Zytokinen in Sputumzellen erfolgte nach Stimulation mit PMA und Ionomycin. Auf diese Weise konnten die Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-5 in den Zellen akkumulieren und durchflußzytometrisch zunächst in T-Lymphozyten und später in den Subpopulationen der T_H- und T_{C/S}-Lymphozyten nachgewiesen werden. Die intrazelluläre Zytokinproduktion von T-Lymphozyten aus dem induzierten Sputum lag in derselben Größenordnung wie bei Proben der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit. Die basale Zytokinproduktion in Sputumlymphozyten von Patienten mit klinisch abgesicherter Diagnose Asthma bronchiale war im Vergleich zu Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung erhöht. Asthmatiker unter Corticosteroidtherapie zeigten eine geringere basale Zytokinproduktion als solche ohne Corticosteroidbehandlung.

Zusätzlich wurden im Rahmen einer Studie Patienten untersucht, die aufgrund eines pulmonal metastasierten Nierenzellkarzinoms eine IL-2-Inhalationstherapie begannen. Die Daten zeigen, daß die hochdosierte Inhalation von IL-2 temporär asthmaähnliche Symptome, funktionelle Veränderungen und Atemwegsentzündung hervorrufen kann. Dabei traten im Verlauf der Therapie Husten, Dyspnoe, eine Verschlechterung der Lungenfunktion sowie eine Eosinophilie im Blut und Sputum auf. Atemwegsempfindlichkeit, exhalierendes NO, Histamin im Sputumüberstand und die IFN- γ -Produktion in Sputum-T_{C/S}-Lymphozyten nahmen zu. Diese Ergebnisse sind geeignet, dem Verständnis des Asthma bronchiale beim Menschen neue Wege zu öffnen.

Der immunzytochemische Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in Makrophagen und Granulozyten wurde etabliert und in einer Studie eingesetzt. Die kurzzeitige inhalative Corticosteroidtherapie bei Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung hatte keine Auswirkung auf die Expression der induzierbaren NO-Synthase in Alveolar-makrophagen und Granulozyten des induzierten Sputums.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die durchflußzytometrische Untersuchung von Proben des induzierten Sputums ein leistungsfähiges und für absehbare Zeit vermutlich das beste Verfahren darstellt, Informationen über die zelluläre und biochemische Zusammensetzung von Atemwegssekreten nicht-invasiv zu gewinnen. Da die Methode des induzierten Sputums ein wenig belastendes Verfahren zur Gewinnung von Zellen aus dem Atemtrakt darstellt, ist die Ausarbeitung von durchflußzytometrischen Analyseverfahren von großem wissenschaftlichen und diagnostischen Interesse.

6.1 Abstract

The aim of this study was the development of flow cytometric strategies for the differentiation of induced sputum eosinophils and neutrophils as well as the analysis of lymphocytes and lymphocyte subpopulations according to their cell surface antigens. Special emphasis was laid to the intracellular detection of the cytokines IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-5 in sputum T, T_H, and T_{C/S} lymphocytes. Blood and bronchoalveolar lavage samples were used to optimize protocols of cell differentiation and cell typing. Sputum was obtained from volunteers in the Hospital Großhansdorf after inhalation of ultrasonically nebulized saline solution. Sputum plugs were separated from saliva, processed with dithiothreitol and a cytopsin slide was prepared before flow cytometric measurements were performed under standardized conditions.

Flow cytometric leukocyte cell differentiation according to sideward scatter and CD45 expression has already been applied from bronchoalveolar lavage fluid to induced sputum. Results for macrophages, granulocytes, and lymphocytes were comparable to standard cell differentiation by microscopy. Several methods for the detection of eosinophils were tested. The flow cytometric detection of eosinophils due to their increased depolarized sideward scatter was superior to approaches using eosinophil autofluorescence or immunological markers (CD49d and CD16), and was in accordance with standard cell differentiation.

Sputum lymphocytes were analyzed for T, T_H, T_{C/S}, B, and NK cells according to cell surface marker expression of CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD45, and CD56 in 77 samples. Measurements reached the same precision as in bronchoalveolar lavage fluid or blood irrespectively of the used flow cytometer and check sums differed less than 6 % from expected values. Additionally, the effect of sputum processing on the immunological detection was investigated. Although dithiothreitol treatment as used in sputum processing affected some peripheral blood leukocyte surface markers with regard to fluorescence intensity (CD2, CD14, CD16, CD45) and percentages of cells positive for the respective antibody the comparability between samples is preserved.

After stimulation with PMA and Ionomycin the cytokines IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-5 could accumulate in the cells and were detectable by flow cytometry in T lymphocytes as well as in the subpopulations of T_H and T_{C/S} lymphocytes. The intracellular cytokine production of induced sputum T lymphocytes was in the same range as reported for samples of bronchoalveolar lavage fluid. In comparison with sputum samples from patients with the clinically established diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease the intracellular cytokine production in lymphocytes from asthmatics was elevated but yet decreased in asthmatic patients receiving corticosteroid treatment.

Additionally, patients treated with IL-2 inhalation therapy due to pulmonal metastases of renal cell carcinoma were investigated in a clinical study. The data showed that high dose IL-2 inhalation therapy temporarily induces asthma-like symptoms, functional changes and airway inflammation. Cough, dyspnea, limitations in lung function as well as blood and sputum eosinophilia occurred in the course of therapy. Airway responsiveness, exhaled NO, the concentration of histamine in sputum supernatants and IFN- γ production in sputum T_{C/S} lymphocytes increased. These results can open new ways for the understanding of the asthmatic disease in humans.

The immunocytochemical detection of inducible nitric oxide synthase in induced sputum macrophages and granulocytes was established and applied to a clinical study. Short-time inhalation of corticosteroids had no effect on the iNOS expression in macrophages and granulocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease.

The results show that the flow cytometric analysis of sputum samples is a powerful and for the foreseeable future best method to obtain information of the cellular and biochemical composition of airways secretions. As the method of sputum induction is a non-invasive technique with minimal burden for the patient to obtain cells from the respiratory tract the development of flow cytometric strategies is of scientific and diagnostic interest.

7 Literatur

Abbas 1996

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; **383**: 787-793.

Alving 1993

Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 1993; **6**: 1268-1270.

Ardizzoni 1994

Ardizzoni A, Bonavia M, Viale M, et al. Biologic and clinical effects of continuous infusion interleukin-2 in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer* 1994; **73**: 1353-1360.

ATS 1995

American Thoracic Society. Standardization of spirometry, 1994 update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; **152**: 1107-1136.

ATS 2000

American Thoracic Society. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing - 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**: 309-329.

Atzpodien 1990

Atzpodien J, Körfer A, Franks CR, Poliwoda H, Kirchner H. Home therapy with recombinant interleukin-2 and interferon alpha 2 b in advanced human malignancies. *Lancet* 1990; **335**: 1509-1512.

Barnes 1996a

Barnes PJ, Kharitonov SA. Exhaled nitric oxide: A new lung function test. *Thorax* 1996; **51**: 233-237.

Barnes 1996b

Barnes PJ. Mechanisms of action of glucocorticoids in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; **154**: S21-S27.

Barnes 1996c

Barnes PJ. Molecular mechanisms of steroid action in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; **97**: 159-168.

Baumgarth 2000

Baumgarth N; Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* 2000; **243**(1-2): 77-97.

Bickermann 1958

Bickermann HA, Sproul EE, Barach AL. An aerosol method of producing bronchial secretions in human subjects: A clinical technique for the detection of lung cancer. *Dis Chest* 1958; **33**: 347-362.

Bodanszky 1993

Bodanszky M. Peptide Chemistry. Springer Verlag, Berlin 1993.

Böttcher 1996

Böttcher M, Friede T, Abel G, Gercken G, Jörres R. Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit mit Hilfe der Dreifarbandurchflußzytometrie. *Pneumologie* 1996; **50**: A63.

Böttcher 1997

Böttcher M, Abel G. Bestimmung absoluter Zellzahlen mit dem Durchflußzytometer Epics XL und Coulter Flow Count FluoroSpheres. Broschüre. Coulter Electronics, Krefeld; 1997.

Böttcher 2000

Böttcher M, Loppow D, Holz O, Abel G, Jörres RA, Magnussen H. Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen in der BAL mit 3-Farben-Durchflußzytometrie. *Pneumologie* 2000; **54**: S50.

Boon 1986

Boon ME, Drijver JS. Routine cytological techniques. Macmillan, London 1986.

Borth 1995

Borth N, Strutzenberger K. Quantification of physiological parameters of single cells by flow cytometry. <http://www.boku.ac.at/iam/poster/facs.htm>.

Bosse 1996

Bosse M, Audette M, Ferland C, et al. Gene expression of interleukin-2 in purified human peripheral blood eosinophils. *Immunology* 1996; **87**: 149-154.

Boushey 1996

Boushey HA, Wong HH, Mahlmeister MJ, Fahy JV. Safety of sputum induction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; **153**: A289.

Bubenik 2000

Bubenik J, Den Otter W, Huland E. Local cytokine therapy of cancer: interleukin-2, interferons and related cytokines. *Cancer Immunol Immunother* 2000; **49**: 116-122.

Burmester 1998

Burmester GR, Pezzutto A. Taschenatlas der Immunologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1998.

Cai 1996

Cai Y, Carty K, Gibson P, Henry R. Comparison of sputum processing techniques in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1996; **22**: 402-407.

Castagna 1982

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 1982; **257**(13): 7847-7851.

Cato 1996

Cato AC, Wade E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bio Essays* 1996; **18**: 371-378.

Cavelly 1993

Cavelly et al. Guideline for flow cytometric immunophenotyping. Report from the national institute of allergy and infectious diseases. Division of AIDS. *Cytometry* 1993; **14**: 702-715.

Chow 1998

Chow MY, Torres A, Utell MJ, Boscia J, Azadniv M, Frasier L, Frampton MW. Comparison of induced sputum leucocyte differential cell counts using flow cytometry and microscopy. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; **157**(3): A613.

Chung 1989

Chung KF, Barnes PJ. Effects of platelet activating factor on airway calibre, airway responsiveness, and circulating cells in asthmatic subjects. *Thorax* 1989; **44**: 108-115.

Corradi 1999

Corradi M, Majori M, Cacciani GC, Consigli GF, de'Munari E, Pesci A. Increased exhaled nitric oxide in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999; **54**: 572-575.

Corraliza 1995

Corraliza IM et al., *Biochem Biophys Res Comm* 1995; **206**(2): 667-73.

Costabel 1993

Costabel U. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie. Empfehlungen zur diagnostischen bronchoalveolären Lavage. *Pneumologie* 1993; **47**: 607-619.

Costabel 1994

Costabel U. Atlas der bronchoalveolären Lavage. Thieme, Stuttgart 1994.

Dauber 1992

Dauber JH, Wagner M, Brunsvold S, Paradis IL, Ernst LA, Waggoner A. Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in bronchoalveolar lavage fluid: comparison of a two-color technique with a standard immunoperoxidase assay. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; **7**: 531-541.

Daviskas1996

Daviskas E, Anderson SD, Gonda I, Eberl S, Meikle S, Seale JP, Bautovich G. Inhalation of hypertonic saline aerosol enhances mucociliary clearance in asthmatic and healthy subjects. *Eur Respir J* 1996; **9**: 725-732.

de Grooth 1987

Light-scattering polarization measurements as a new parameter in flow cytometry. de Grooth BG, Terstappen LW, Puppels GJ, Greve J. *Cytometry* 1987; **8**: 539-544.

Durham 2000

Durham SR, Till SJ, Corrigan CJ. T lymphocytes in asthma: bronchial versus peripheral responses. *J Allergy Clin Immunol* 2000; **106**: S221-226.

Efthimiadis 1995

Efthimiadis A, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Weston S, Dolovich J, Hargreave FE. The influence of cell viability and squamous epithelial cell contamination on the reliability of sputum differential cell counts. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; **151**: A384.

Efthimiadis 1997

Efthimiadis A, Pizzichini E, Pizzichini MM, Hargreave FE. Sputum examination for indices of airway inflammation: laboratory procedures. Canadian Thoracic Society; Astra Draco AB, Lund Sweden, 1997.

Engelhardt 1997

Engelhardt M, Wirth K, Mertelsmann R, Lindemann A, Brennscheidt U. Clinical and immunomodulatory effects of repetitive 2-day cycles of high-dose continuous infusion IL-2. *Eur J Cancer* 1997; **33**: 1050-1054.

Enokihara 1989

Enokihara H, Furusawa S, Nakakubo H, et al. T cells from eosinophilic patients produce interleukin-5 with interleukin-2 stimulation. *Blood* 1989; **73**: 1809-1813.

Fahy 1993a

Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; **147**: 1126-1131.

Fahy 1993b

Fahy JV, Steiger DJ, Liu J, Basbaum CB, Finkbeiner WE, Boushey HA. Markers of mucus secretion and DNA levels in induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am J Respir Dis* 1993; **147**: 1132-1137.

Fahy 1994

Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Analysis of cellular and biochemical constituents of induced sputum after allergen challenge: a method for studying allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1994; **93**: 1031-1039.

Fahy 1995

Fahy JV, Wong H, Liu J, Boushey HA. Comparison of samples collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; **152**: 53-58.

Fraenkel 1995

Fraenkel DJ, Bardin PG, Sanderson G, Lampe F, Johnston SL, Holgate ST. Lower airways inflammation during rhinovirus colds in normal and in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; **151**: 879-886.

Gessl 1994

Gessl A, Willheim M, Spittler A, Agis H, Krugluger W, Boltz-Nitulescu G. Influence of tumor necrosis factor- α on the expression of Fc IgG and IgA receptors, and other markers by cultured human blood monocytes and U937 cells. *Scand J Immunol* 1994; **39**: 151-156.

Gibson 1989

Gibson PG, Girgis-Garbado A, Morris MM, Mattoli S, Kay JM, Dolovich J, Denburg J, Hargreave FE. Cellular characteristics of sputum from patients with asthma and chronic bronchitis. *Thorax* 1989; **44**: 693-699.

Gollasch 1889

Gollasch. Zur Kenntnis des asthmatischen Sputums. *Fortschr Med* 1889; **7**: 361-365.

Grönke 2002

Grönke L, Kanniess F, Holz O, Jörres RA, Magnussen H. The relationship between airway hyperresponsiveness, markers of inflammation and lung function depends on the duration of the asthmatic disease. *Clin Exp Allergy* 2002; **165**: 57-63.

Hamelmann 1999

Hamelmann E, Takeda K, Schwarze J, Vella AT, Irvin CG, Gelfand EW. Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness requires interleukin-5 but not immunoglobulin E or B lymphocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; **21**: 480-489. Comment in: *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; **21**: 451-454.

Hansel 1991

Hansel TT, Braunstein JB, Walker C et al. Sputum eosinophils from asthmatics express ICAM-1 and HLA-DR. *Clin Exp Immunol* 1991; **86**: 271-277.

Hargreave 1993

Hargreave FE, Popov T, Kidney J, Dolovich J. Sputum measurements to assess airway inflammation in asthma. *Allergy* 1993; **48**: 81-83.

Hargreave 1997

Hargreave FE, Pizzichini MMM, Pizzichini E. Assessment of airway inflammation. In: Barnes PJ, Grunstein MM, Leff AR, Woolcock AJ, eds. *Asthma*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997: 1433-1449.

Hargreave 1998

Hargreave FE, Pizzichini E, Pizzichini M. Induced sputum examination. *J Allergy Clin Immunol* 1998; **101**: 569-570.

Holz 1996

Holz O, Jörres RA, Koschyk S, Speckin P, Welker L, Magnussen H. Changes in cellular and biochemical sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; **153**: A289.

Holz 1998a

Holz O, Weng B, Richter K, Jörres RA, Speckin P, Mücke M, Loppow D, Magnussen H. Nachweis der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in Zellen des induzierten Sputums bei Gesunden und Asthmatikern. *Pneumologie* 1998; **52**(1): S51.

Holz 1998b

Holz O, Jörres RA, Koschyk S, Speckin P, Welker L, Magnussen H. Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 1998; **28**: 284-292.

Holz 1998c

Holz O, Richter K, Jörres RA, Speckin P, Mücke M, Magnussen H. Changes in sputum composition between two inductions performed on consecutive days. *Thorax* 1998; **53**: 83-86.

Holz 1998d

Holz O, Weng B, Mücke M, Loppow D, Speckin P, Richter K, Jörres RA, Magnussen H. Detection of inducible NO-synthase (iNOS) in sputum cells of healthy and asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; **157**(3): A612.

Holz 1999

Holz O, Jörres RA, Timm P, et al. Ozone-induced airway inflammatory changes differ between individuals and are reproducible. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; **159**: 776-84.

Holz 2000

Holz O, Kips J, Magnussen H. Update on sputum methodology. *Eur Respir J* 2000; **16**: 355-359.

Holz 2001a

Holz O, Böttcher M, Timm P, Koschyk S, Abel G, Gercken G, Magnussen H, Jörres RA. Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations in bronchoalveolar lavage fluid after repeated ozone exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 2001; **74**: 242-248.

Holz 2001b

Holz O, Mücke M, Zarza P, Loppow D, Jörres RA, Magnussen H. Freezing of homogenized sputum samples for intermittent storage. *Clin Exp Allergy* 2001; **31**: 1328-1331.

Huland 1992

Huland E, Huland H. Tumor-associated eosinophilia in interleukin-2-treated patients: evidence of toxic eosinophil degranulation on bladder cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992; **118**: 463-467.

Huland 1997

Huland E, Heinzer H, Mir TS, Huland H. Inhaled interleukin-2 therapy in pulmonary metastatic renal cell carcinoma: six years of experience. *Cancer J Sci Am* 1997; **3**(suppl 1): 98-105.

Huland 2000a

Huland E, Heinzer H, Huland H, Yung R. Overview of interleukin-2 inhalation therapy. *Cancer J Sci Am* 2000; **6** (suppl 1): 104-112.

Huland 2000b

Huland E, Heinzer H, Huland H. A comparison of systemic versus inhaled recombinant IL-2 administration for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Folia Biologica* 2000; **46**: 237-246.

Humbles 2000

Humbles AA, Lu B, Nilsson CA, et al. A role for the C3a anaphylatoxin receptor in the effector phase of asthma. *Nature* 2000; **406**: 998-1001.

in't Veen 1996

in't Veen VJ, de Gouw HW, Smits HH et al. Repeatability of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma. *Eur Respir J* 1996; **9**: 2441-2447.

Inui 2001

Inui N, Chida K, Suda T, Nakamura H. T_H1/T_H2 and T_C1/T_C2 profiles in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid cells in pulmonary sarcoidosis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; **107**: 337-344.

Ishimitsu 1993

Ishimitsu T, Torisu M. An eosinophil chemotactic lymphokine in the supernatant of lymphokine-activated killer (LAK) cell culture: relationship to interleukin-5. *J Surg Res* 1993; **55**: 307-313.

Jatakanon 1998

Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998; **53**: 91-95.

Jayaram 2000

Jayaram, Parameswaran K, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice. *Eur Respir J* 2000; **16**: 150-158.

Jörres 1997

Jörres RA, Nowak D, Kirsten D, Grönke L, Magnussen H. A short protocol for methacholine provocation testing adapted to the Rosenthal-Chai dosimeter technique. *Chest* 1997; **111**: 866-869.

Jonjenjan 1990

Jonjenjan RC, De Jongste JC, Raatgeep RC, Bonta IL, Kerrebijn KF. Effects of changes in osmolarity on isolated human airways. *J Appl Physiol* 1990; **68**: 1568-1575.

Jung 1993

Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993; **159**: 197-207.

Jung 1995

Jung T, Lack G, Schauer U, et al. Decreased frequency of interferon-gamma- and interleukin-2-producing cells in patients with atopic diseases measured at the single cell level. *J Allergy Clin Immunol* 1995; **96**: 515-527.

Karp 2000

Karp CL, Grupe A, Schadt E, et al. Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. *Nat Immunol* 2000; **1**: 221-226. Comment in: *Nat Immunol* 2000; **1**: 190-192.

Keatings 1996

Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; **153**: 530-534.

Keatings, 1997

Keatings VM, Evans DJ, O'Connor BJ, Barnes PJ. Cellular profiles in asthmatic airways: a comparison of induced sputum, bronchial washings, and bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax* 1997; **52**: 372-374.

Keeney 1998

Isotype controls in the analysis of lymphocytes and CD34+ stem and progenitor cells by flow cytometry - time to let go! *Cytometry* 1998; **34**: 280-283.

Kharitonov 1994

Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; **343**: 133-135

Kharitonov 1995

Kharitonov SA, Yates D, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory tract infections. *Eur Respir J* 1995; **8**: 295-297.

Kharitonov 2001

Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **163**: 1693-1722.

Kidney 1994a

Kidney JC, Wong AG, Efthimiadis A et al. Sputum lymphocyte subclasses and activation measured by flow cytometry. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994; **149**: A572.

Kidney 1994b

Kidney JC, Efthimiadis A, Incretolli V, Kolendowicz R, Dolovich J, Hargreave FE. Evaluation of lymphocyte subclasses in sputum. *J Allergy Clin Immunol* 1994; **93**[2]: 168.

Kidney 1996a

Kidney JC, Efthimiadis A, Dolovich J, Hargreave FE. Three-color flow cytometry on sputum lymphocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; **153**: A291.

Kidney 1996b

Kidney JC, Wong AG, Efthimiadis A, Morris MM, Sears MR, Dolovich J, Hargreave FE. Elevated B cells in sputum of asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; **153**: 540-544.

Kips 1998a

Kips JC, Fahy JV, Hargreave FE, Ind PW, In't VJ. Methods for sputum induction and analysis of induced sputum: a method for assessing airway inflammation in asthma. *Eur Respir J Suppl* 1998; **26**: 9S-12S.

Kips 1998b

Kips JC, Pauwels RA. Noninvasive indicators of airway inflammation: induced sputum in allergic diseases. *Eur Respir Rev* 1998; **8**: 1095-1097.

Kleeh 1989

Kleeh H. and Pohl W. Ed. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar Lavage (BAL). *Eur Respir J* 1989; **2**(6): 561-585.

Kleeh 1990

Kleeh H. and Hutter C. Ed. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1990; **3**: 937-974.

Krouwels 1997

Krouwels FH, Nocker RE, Snoek M et al. Immunocytochemical and flow cytometric detection of intracellular IL-4, IL-5 and IFN- γ : applications using blood- and airway-derived cells. *J Immunol Methods* 1997; **203**: 89-101.

Krug 1996a

Krug N, Thureau AM, Lackie P, Baier J, Schultze-Werninghaus G, Rieger CH, Schauer U. A flow cytometric method for the detection of intracellular basic proteins in unseparated peripheral blood and bone marrow eosinophils. *J Immunol Methods* 1996; **190**: 245-254.

Krug 1996b

Krug N, Madden J, Redington AE et al. T-Cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; **14**: 319-326.

Krug 1997

Krug N, Schauer U, Wagner TO. Zellbiologie des Asthma bronchiale: Interessante neue Methoden. Intrazelluläre Bestimmung von Zytokinen in T-Zellen und von basischen Proteinen in Eosinophilen Granulozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie. *Pneumologie* 1997; **51**(4): 381-355.

Laitinen 1991

Laitinen LA, Elkin RB, Empey DW, Jacobs L, Mills J, Nadel JA. Bronchial hyperresponsiveness in normal subjects during attenuated influenza virus infection. *Am Rev Respir Dis* 1991; **143**: 358-361. Comment in: *Am Rev Respir Dis* 1991; **144**: 1422-1423.

Lanz 1997

Lanz MJ, Leung DY, McCormick DR, Harbeck R, Szeffler SJ, White CW. Comparison of exhaled nitric oxide, serum eosinophilic cationic protein, and soluble interleukin-2 receptor in exacerbations of pediatric asthma. *Pediatr Pulmonol* 1997; **24**: 305-311.

Lau 2000

Lau S, Illi S, Sommerfeld C, et al. Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. Multicentre Allergy Study Group. *Lancet* 2000; **356**: 1392-1397. Comments in: *Lancet* 2000; **356**: 1369-1370 and 2001; **357**: 1042-1043.

Leckie 2000

Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000; **356**: 2144-2148. Comment in: *Lancet* 2000; **356**: 2114-2116.

Levi-Schaffer 1996

Levi-Schaffer F, Barkans J, Newman TM, et al. Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils. *Immunology* 1996; **87**: 155-161.

Liu 1998a

Liu WS, Heckman CA. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal* 1998; **10**: 529-542.

Liu 1998b

Liu YC, Khawaja AM, Roger DF. Pathophysiology of airway mucus secretion in asthma. In: Barnes PJ, Rodger IW, Thompson NC (editors). *Asthma: basic mechanisms and clinical management*, 3rd ed. Academic Press, San Diego 1998; 205-227.

Lopez-Vidriero, 1978

Lopez-Vidriero MT, Reid L. Bronchial mucus in health and disease. *Brit Med Bul* 1978; **34**: 63-74.

Lopez-Vidriero, 1980

Lopez-Vidriero MT, Reid L. Respiratory tract fluid - chemical and physical properties of airway mucus. *Eur J Respir Dis* 1980; **110**: 21-26.

Loppow, 1997

Loppow D. Durchflußzytometrische Analyse der Zellpopulationen im induzierten Sputum. Diplomarbeit bei Prof. G. Gercken, Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie in Kooperation mit dem Krankenhaus Großhansdorf und der Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin Dr. Kramer und Kollegen in Geesthacht, Hamburg 1997.

Loppow 1998a

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Zelldifferenzierung von induziertem Sputum (iSP) am Durchflußzytometer anhand immunologischer und morphologischer Parameter. *Pneumologie* 1998; **52**(1): S78.

Loppow 1998b

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Differential cell counts of induced sputum by flow cytometry using immunological and morphological criteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; **157**(3): A601.

Loppow 1998c

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Flow cytometric detection of induced sputum eosinophils. *Eur Respir J* 1998; **12**(29): 65s.

Loppow 1999

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Flow cytometric analysis of induced sputum lymphocyte subpopulations. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; **159**(3): A514.

Loppow 2000a

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Durchflußzytometrische Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen im induzierten Sputum (iSP). *Pneumologie* 2000; **54**: S96.

Loppow 2000b

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Flow cytometric analysis of the effect of dithiothreitol on leucocyte surface markers. *Eur Respir J* 2000; **16**: 324-329.

Loppow 2000c

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Durchflußzytometrische Bestimmung eosinophiler Granulozyten im induzierten Sputum anhand des depolarisierten Seitwärtsstreulichts. *Pneumologie* 2000; **54**: S3.

Loppow 2000d

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Flow cytometric detection of induced sputum eosinophils due to their depolarized sidewardscatter properties. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**(3): A179.

Loppow 2000e

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Durchflußzytometrische Bestimmung intrazellulärer Zytokine in Lymphozyten aus induziertem Sputum (iSP). *Pneumologie* 2000; **54**: S96.

Loppow 2000f

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Flow cytometric analysis of intracellular cytokines in lymphocytes from induced sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**(3): A663.

Loppow 2001a

Loppow D, Böttcher M, Gercken G, Jörres RA, Magnussen H. Durchflußzytometrische Analyse von induziertem Sputum - eine Alternative zur bronchoalveolären Lavage? Poster, 14. Arbeitstagung: Anwendung der Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik, Regensburg, April 5-6, 2001.

Loppow 2001b

Loppow D, Böttcher M, Gercken G, Magnussen H, Jörres RA. Flow cytometric assessment of sputum lymphocyte cytokine profile in patients with asthma and COPD. *Eur Respir J* 2001; **18**(33): 316s.

Loppow 2001c

Loppow D, Schleiss MB, Kannieß F, Taube C, Jörres RA, Magnussen H. In patients with chronic obstructive bronchitis a four week trial with inhaled steroids does not attenuate airway inflammation. *Respir Med* 2001; **95**: 115-121.

Loppow 2001d

Loppow D, Abel G, Welker L, Magnussen H, Jörres RA. Durchflußzytometrische Analyse der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit - Welche Faktoren beeinträchtigen die diagnostische Aussagekraft? Poster, 14. Arbeitstagung: Anwendung der Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik, Regensburg, April 5-6, 2001

Loppow 2001e

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Durchflußzytometrische Analyse der Zytokinproduktion von T_H- und T_S-Lymphozyten im induzierten Sputum. *Pneumologie* 2001; **55**: 104.

Loppow 2001f

Loppow D, Böttcher M, Gercken G, Jörres RA, Magnussen H. Analyse der Zytokinproduktion von T_H- und T_S-Lymphozyten des induzierten Sputums mit Hilfe der Durchflußzytometrie. *Pneumologie* 2001; **55**: S8.

Loppow 2001g

Loppow D, Böttcher M, Gercken G, Magnussen H, Jörres RA. Sputum T_H and T_S lymphocyte cytokine production on single cell level. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **163**(5): A600.

Lorenz 1996

Lorenz J, Wilhelm M, Kessler M, et al. Phase I trial of inhaled natural interleukin-2 for treatment of pulmonary malignancy: toxicity, pharmacokinetics and biological effects. *Clin Cancer Res* 1996; **2**: 1115-1122.

Lucey 1996

Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 1996; **9**: 532-562.

Lundgren 1990

Lundgren JD, Shelhamer JH. Pathogenesis of airway mucus hypersecretion. *J Allergy Clin Immunol* 1990; **85**: 399-417.

Maino 1998

Maino VC, Picker LJ. Identification of functional subsets by flow cytometry: Intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry* 1998; **34**: 207-215.

Majori 1997

Majori M, Piccoli ML, Melej R, Pileggi V, Pesci A. Lymphocyte activation markers in peripheral blood before and after natural exposure to allergen in asthmatic patients. *Respiration* 1997; **64**: 45-49.

Mengelers 1994

Mengelers HJ, Maikoe T, Brinkmann L, Hooibrink B, Lammers JW, Koendermann L. Immunophenotyping of eosinophils recovered from blood and BAL of allergic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994; **149**: 345-351.

Milne 1995

Milne AA, Teixeira MM, Hellewell PG, Piper PJ. Induction of leucocyte recruitment and bronchial hyperresponsiveness in the guinea pig by aerosol administration of interleukin-2. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; **108**: 60-67.

Modolell 1995

Modolell M et al., *Eur J Immunol* 1995; **25**(4):1101-1104.

Motojima 1993

Motojima S, Ogata H, Tateishi K, et al. Soluble interleukin-2 receptor in sputum from patients with bronchial asthma. *Arerugi* 1993; **42**: 162-166.

Motzer 2000

Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Russo P, Berg WJ, Metz EM. Effect of cytokine therapy on survival for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 1928-1935.

Nakamoto 1997

Nakamoto T, Kasaoka Y, Mitani S, Usui T. Inhalation of interleukin-2 combined with subcutaneous administration of interferon for the treatment of pulmonary metastases from renal cell carcinoma. *Int J Urol* 1997; **4**: 343-348.

Nicholson 1996

Nicholson JK, Hubbard M, Jones BM. Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Cytometry* 1996; **26**: 16-21.

O'byrne 1996

O'byrne PM, Inman MD. Induced sputum to assess airway inflammation in asthma. *Eur Respir J* 1996; **9**: 2435-2436.

Ormerod 1994

Ormerod MG. Flow cytometry. A practical approach. Oxford University Press, 1994.

Panhuysen 1997

Panhuysen CI, Vonk JM, Koeter GH, et al. Adult patients may outgrow their asthma: a 25-year follow-up study. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **155**: 1267-1272. Erratum in: *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **156**: 674.

Park 1994

Park CS, Lee SM, Chung SW, Uh S, Kim HT, Kim YH. Interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchial asthma. *Chest* 1994; **106**: 400-406.

Pauwels 1998

Pauwels RA, Brusselle GG, Tournoy KG, Lambrecht BN, Kips JC. Cytokines and their receptors as therapeutic targets in asthma. *Clin Exp Allergy* 1998; **28**(3): 1-5.

Pavia 1979

Pavia D, Thomson ML, Clarke SW. Enhanced clearance of secretions from human lung after the administration of hypertonic saline aerosol. *Am Rev Respir Dis* 1978; **117**: 199-203.

Pavord 1997

Pavord ID, Pizzichini MM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax* 1997; **52**: 498-501.

Perna 1997

Perna F, Vatrella A, Parrella R et al. Flow cytometric evaluation of lymphocyte subsets on induced sputum samples. *Eur Respir J* 1997; **10**: 61s.

Picker 1995

Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood* 1995; **86**: 1408-1409.

Pin 1992

Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; **47**: 25-29.

Pizzichini 1996

Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; **154**: 308-317.

Pizzichini 1997

Pizzichini E, Marcia MM, Efthimiadis A, Dolovich J, Hargreave FE. Measuring airway inflammation in asthma: eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 1997; **99**: 539-544.

Popov 1994

Popov T, Gottschalk R, Kolendowicz R, Dolovich J, Powers P, Hargreave FE. The evaluation of a cell dispersion method of sputum examination. *Clin Exp Allergy* 1994; **24**: 778-783.

Popov 1995

Popov TA, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, Hargreave FE. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J* 1995; **8**: 559-565.

Prasse 1999

Prasse A, Georges CG, Biller H et al. Vergleich der intrazellulären Zytokinproduktion von BAL-Lymphozyten bei Sarkoidosepatienten und Normalpersonen. *Pneumologie* 1999; **53**: S73-S74.

Quanjer 1993

Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report working party standardization of lung function tests, European Community for Steel and Coal. Official statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993; **16** (suppl): 5-40.

Renzi 1991

Renzi PM, Sapienza S, Du T, Wang NS, Martin JG. Lymphokine-induced airway hyperresponsiveness in the rat. *Am Rev Respir Dis* 1991; **143**: 375-379.

Renzi 1992

Renzi PM, Sapienza S, Wasserman S, et al. Effect of interleukin-2 on the airway response to antigen in the rat. *Am Rev Respir Dis* 1992; **146**: 163-169.

Richter 1999

Richter K, Holz O, Jörres RA, Mücke M, Magnussen H. Sequentially induced sputum in patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 1999; **14**: 697-701.

Rick 1990

Rick W. Klinische Chemie und Mikroskopie. Springer Verlag, Berlin 1990.

Rivoltini 1993

Rivoltini L, Viggiano V, Spinazze S, et al. In vitro anti-tumor activity of eosinophils from cancer patients treated with subcutaneous administration of interleukin 2. Role of interleukin 5. *Int J Cancer* 1993; **54**: 8-15. Erratum in: *Int J Cancer* 1993; **54**: 887.

Robertson 1995

Robertson F, Trask OJ. Flow cytometry newsletter. <http://cytometry.med.ohio-state.edu/5/Newsfolder/News95.htm>.

Rosenberg 1987

Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. **N Engl J Med** 1987; **316**: 889-897.

Rosenberg 1994

Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, et al. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal-cell carcinoma using high-dose bolus interleukin-2. *JAMA* 1994; **271**: 907-913.

Rostaing 1999

Rostaing L, Tkaczuk J, Durand M et al. Kinetics of intracytoplasmatic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells. *Cytometry* 1999; **35**: 318-328.

Rutgers 1999

Rutgers SR, van der Mark TW, Coers W et al. Markers of nitric oxide metabolism in sputum and exhaled air are not increased in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999; **54**: 576-580.

Schaafsma 1992

Schaafsma MR, Falkenburg JH, Landegent JE, et al. In vivo production of interleukin-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophages colony-stimulating factor, and interleukin-6 during intravenous administration of high-dose interleukin-2 in cancer patients. *Blood* 1991; **78**: 1981-1988. Comment in: *Blood* 1992; **79**: 2500-2501.

Sedgwick 1990

Sedgwick JB, Frick WE, Sondel PM, Hank JA, Borden E, Busse WW. The appearance of hypodense eosinophils during interleukin-2 treatment. *J Allergy Clin Immunol* 1990; **85**: 557-566.

Shapiro 1995

Shapiro HM. Practical flow cytometry. Wiley-Liss, New York, 1995.

Silkoff 1999

Silkoff PE. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; **160**: 2104-2117.

Sondel 1988

Sondel PM, Kohler PC, Hank JA, et al. Clinical and immunological effects of recombinant interleukin 2 given by repetitive weekly cycles to patients with cancer. *Cancer Res* 1988; **48**: 2561-2567.

Spanevello 1997

Spanevello A, Migliori GB, Sharara A et al. Induced sputum to assess airway inflammation: a study of reproducibility. *Clin Exp Allergy* 1997; **27**: 1138-1144.

Sterk 1999

Sterk PJ, de Gouw HWFM, Ricciardolo FLM, Rabe KF. Exhaled nitric oxide in COPD: glancing through a smoke screen. *Thorax* 1999; **54**: 565-567.

Stirling 2000

Stirling RG, Chung KF. New immunological approaches and cytokine targets in asthma and allergy. *Eur Respir J* 2000; **16**: 1158-11747.

Takahashi 1987

Takahashi M. Respirationstrakt. In: Farbatlas der onkologischen Zytologie. Deutsche Übersetzung der 2. engl. Auflage 1987. S. 267-270. Fachbuch-Verlagsgesellschaft Erlangen 1987.

Tan 1997

The characterization of eosinophils from induced sputum and from blood in asthmatic patients by flow cytometry. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **155**: A626.

Thijs 1990

Thijs LG, Hack CE, Strack van Schijndel RJ, et al. Activation of the complement system during immunotherapy with recombinant IL-2. Relation to the development of side effects. *J Immunol* 1990; **144**: 2419-2424.

Thurau 1996

Thurau AM, Schulz U, Wolf V, Krug N, Schauer U. Identification of eosinophils by flow cytometry. *Cytometry* 1996; **23**: 150-158.

Tockman 1995

Tockman MS, Qiao Y, Li L, Zhao G, Sharma R, Cavanaugh LL, Erozan YS. Safe separation of sputum cells from mucoid glycoprotein. *Acta Cytologica* 1995; **39**: 1128-1136.

Tompkins 1990

Tompkins MB, Novotney C, Grindem CB, et al. Human recombinant interleukin-2 induces maturation and activation signals for feline eosinophils in vivo. *J Leukoc Biol* 1990; **48**: 531-540.

Tournoy 2002

Tournoy G, Kips JC, Pauwels RA. Is Th1 the solution for Th2 in asthma? *Clin Exp Allergy* 2002; **31**: 17-29.

Trulson 1998

Trulson A, Nilsson S, Venge P. The eosinophil granule proteins in serum, but not the oxidative metabolism of the blood eosinophils, are increased in cancer. *Br J Haematol* 1997; **98**: 312-314. Comment in: *Br J Haematol* 1998; **100**: 607-609.

van Haelst 1991

van Haelst Pisani C, Kovach JS, Kita H, et al. Administration of interleukin-2 (IL-2) results in increased plasma concentrations of IL-5 and eosinophilia in patients with cancer. *Blood* 1991; **78**: 1538-1544.

Vatrella 1998

Vatrella A, Perna F, Parrella R et al. Flow cytometric analysis of lymphocyte subsets in induced sputum of asthmatic subjects before and after eight weeks of treatment with inhaled budesonide. *Eur Respir J* 1998; **12**: 226s.

Vetto 1987

Vetto JT, Papa MZ, Lotze MT, Chang AE, Rosenberg SA. Reduction of toxicity of interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells in humans by the administration of corticosteroids. *J Clin Oncol* 1987; **5**: 496-503.

Vignola 1998

Vignola AM, Bousquet J, Chanez P et al. Assessment of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; **157**: 184-187.

Weng 1997a

Weng B, Holz O, Richter K, Mücke M, Speckin P, Loppow D, Jörres RA, Magnussen H. Detection of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in induced sputum of asthmatic patients with and without inhaled corticosteroids. *Eur Respir J* 1997; **10**(25): 318s.

Weng 1997b

Weng B, Holz O, Richter K, Mücke M, Speckin P, Loppow D, Jörres RA, Magnussen H. Nachweis der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) im induzierten Sputum von Patienten mit Asthma. 25. Wissenschaftliche Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Pneumologie, Rostock 1997.

Wong 1995

Wong DA, Hargreave FE, O'Byrne PM. Identification of eosinophils in induced sputum by depolarized light in flow cytometry. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; **152**: A219.

Wu 1997

Wu MS, Hwang KH, Lin HC, Kuo HP. The preservation of neutrophil activity in induced sputum by repeated washing and dithiothreitol method. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **155**[4]: A622.

Xu 2001

Xu X, Fang Z, Wang B, et al. A genomewide search for quantitative-trait loci underlying asthma. *Am J Hum Genet* 2001; **69**: 1271-1277.

Yang 1993

Yang JP, Renzi PM. Interleukin-2 and lymphocyte-induced eosinophil proliferation and survival in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1993; **91**: 792-801.

Yates 1995

Yates DH, Kharitonov SA, Robbins RA, Thomas PS, Barnes PJ. Effect of a nitric oxide synthase inhibitor and a glucocorticosteroid on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; **152**: 892-896.

Ying 1995

Ying S, Durham SR, Corrigan CJ, Hamid Q, Kay AB. Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; **12**: 477-487.

Zissel 1996

Zissel G, Aulitzky WE, Lorenz J, Huber C, Müller-Quernheim J. Induction of accessory cell function of human alveolar macrophages by inhalation of human natural interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* 1996; **42**: 122-126.

8 Anhang

8.1 Veröffentlichungen

Diplomarbeit

Loppow D. Durchflußzytometrische Analyse der Zellpopulationen im induzierten Sputum. Diplomarbeit bei Prof. G. Gercken, Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie in Kooperation mit dem Krankenhaus Großhansdorf und der Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin Dr. Kramer und Kollegen in Geesthacht, Hamburg 1997.

8.1.1 Artikel

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Flow cytometric analysis of the effect of dithiothreitol on leucocyte surface markers. *Eur Respir J* 2000; **16**: 324-329.

Loppow D, Schleiss MB, Kannieß F, Taube C, Jörres RA, Magnussen H. In patients with chronic obstructive bronchitis a four week trial with inhaled steroids does not attenuate airway inflammation. *Respir Med* 2001; **95**: 115-121.

Holz O, Mücke M, Zarza B, Loppow D, Jörres RA, Magnussen H. Freezing of homogenized sputum samples for intermittent storage. *Clin Exp Allergy* 2001; **31**: 1328-1331.

8.1.1.1 Zur Publikation eingereichte Artikel

Reinhard N, Chen CIU, Loppow D, Schink T, Kleinau I, Jörres RA, Wahn U, Magnussen H, Paul K. Cellular profiles of induced sputum in children with stable CF: Reproducibility and comparison with BAL*

Eingereicht zur Publikation beim *Eur Respir J* im Mai 2002.

Loppow D, Huland E, Heinzer H, Grönke L, Jörres RA, Magnussen H. Interleukin-2 inhalation therapy temporarily induces asthma-like functional changes and airway inflammation.

Eingereicht zur Publikation beim *New Engl J Med* am 11.06.2002.

8.1.2 Vorträge

Schleiss MB, Loppow D, Magnussen H. Effect of inhaled corticosteroids in patients with mild COPD. *Eur Respir J* 1999; **14**(30): 282s.

Vortrag, European Respiratory Society, Madrid 1999.

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Durchflußzytometrische Bestimmung eosinophiler Granulozyten im induzierten Sputum anhand des depolarisierten Seitwärtsstreulichts. *Pneumologie* 2000; **54**: S3.

Vortrag, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, Hamburg 2000.

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Durchflußzytometrische Analyse der Zytokinproduktion von TH- und TS-Lymphozyten im induzierten Sputum. *Pneumologie* 2001; **55**: 104.

Vortrag, Herbsttagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, Berlin 2000.

Loppow D, Böttcher M, Gercken G, Jörres RA, Magnussen H. Analyse der Zytokinproduktion von TH- und TS-Lymphozyten des induzierten Sputums mit Hilfe der Durchflußzytometrie. *Pneumologie* 2001; **55**: S8.

Vortrag, Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, Jena 2001.

Loppow D, Gercken G, Magnussen H, Jörres RA. Flow cytometric analysis of induced sputum - from cell differentials to intracellular cytokine profiles.

Vortrag, Dänische Gesellschaft für Durchflußzytometrie, Aarhus 2001.

Loppow D, Böttcher M, Gercken G, Magnussen H, Jörres RA. Flow cytometric assessment of sputum lymphocyte cytokine profile in patients with asthma and COPD. *Eur Respir J* 2001; **18**(33): 316s.

Vortrag, European Respiratory Society, Berlin 2001.

8.1.3 Posterdiskussionen und Poster

Weng B, Holz O, Richter K, Mücke M, Speckin P, Loppow D, Jörres RA, Magnussen H. Detection of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in induced sputum of asthmatic patients with and without inhaled corticosteroids. *Eur Respir J* 1997; **10**(25): 318s.

Poster, European Respiratory Society, Berlin 1997.

Weng B, Holz O, Richter K, Mücke M, Speckin P, Loppow D, Jörres RA, Magnussen H. Nachweis der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) im induzierten Sputum von Patienten mit Asthma.

Poster, Norddeutsche Gesellschaft für Pneumologie, Rostock 1997.

Holz O, Weng B, Richter K, Jörres RA, Speckin P, Mücke M, Loppow D, Magnussen H. Nachweis der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in Zellen des induzierten Sputums bei Gesunden und Asthmatikern. *Pneumologie* 1998; **52**(1): S51.

Poster, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, Leipzig 1998.

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Untersuchung des Einflusses von Dithiothreitol (DTT) auf Zellen des peripheren Blutes mit dem Durchflußzytometer (FCM) - Konsequenzen für die Analyse des induzierten Sputums. *Pneumologie* 1998; **52**(1): S78.

Poster, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, Leipzig 1998.

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Zelldifferenzierung von induziertem Sputum (iSP) am Durchflußzytometer anhand immunologischer und morphologischer Parameter. *Pneumologie* 1998; **52**(1): S78.

Poster, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, Leipzig 1998.

Holz O, Weng B, Mücke M, Loppow D, Speckin P, Richter K, Jörres RA, Magnussen H. Detection of inducible NO-synthase (iNOS) in sputum cells of healthy and asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; **157**(3): A612.

Poster, American Thoracic Society, Chicago 1998.

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Differential cell counts of induced sputum by flow cytometry using immunological and morphological criteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; **157**(3): A601.

Poster, American Thoracic Society, Chicago 1998.

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Flow cytometric analysis of the effect of dithiothreitol on leucocyte surface markers in peripheral blood - possible consequences for the analysis of induced sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; **157**(3): A813.

Poster, American Thoracic Society, Chicago 1998.

Welker L, Loppow D, von Baur E, Berndt D, Böttcher M, Magnussen H. Hyaluronic acid levels in pleural effusions: a diagnostic tool to separate malignant mesothelioma from other effusions. *Eur Respir J* 1998; **12**(28): 417s.

Poster, European Respiratory Society, Geneva 1998.

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Flow cytometric detection of induced sputum eosinophils. *Eur Respir J* 1998; **12**(29): 65s.

Posterdiskussion, World Asthma Meeting, Barcelona 1998.

Welker L, Loppow D, von Baur E, Berndt D, Böttcher M, Magnussen H. Maligne Mesotheliome: Stellenwert der Hyaluronsäuremessung in der Ergußdiagnostik. *Pneumologie* 1999; **53**(1): S49.

Poster, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, Bad Reichenhall 1999.

Welker L, Loppow D, von Baur E, Berndt D, Böttcher M, Magnussen H. Malignant mesothelioma (MM): clinical value of the measurement of hyaluronic acid in pleural effusions. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; **159**(3): A388.

Poster, American Thoracic Society, San Diego 1999.

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Flow cytometric analysis of induced sputum lymphocyte subpopulations. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; **159**(3): A514.

Posterdiskussion, American Thoracic Society, San Diego 1999.

Holz O, Saba B, Mücke M, Loppow D, Jörres RA, Magnussen H. Comparison of differential cell counts between frozen and native sputum samples. *Eur Respir J* 1999; **14**(30): 23s.

Posterdiskussion, European Respiratory Society, Madrid 1999.

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Durchflußzytometrische Bestimmung intrazellulärer Zytokine in Lymphozyten aus induziertem Sputum (iSP). *Pneumologie* 2000; **54**: S96.

Posterdiskussion, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, Hamburg 2000.

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Durchflußzytometrische Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen im induzierten Sputum (iSP). *Pneumologie* 2000; **54**: S96.

Posterdiskussion, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, Hamburg 2000.

Böttcher M, Loppow D, Holz O, Abel G, Jörres RA, Magnussen H. Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen in der BAL mit 3-Farben-Durchflußzytometrie. *Pneumologie* 2000; **54**: S50.

Posterdiskussion, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, Hamburg 2000.

Holz O, Saba B, Jörres R A, Mücke M, Loppow D, Magnussen H. Vergleich der Zelldifferenzierung zwischen standardmäßig aufgearbeiteten und kryokonservierten Sputumproben. *Pneumologie* 2000; **54**: S48.

Posterdiskussion, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, Hamburg 2000.

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Flow cytometric analysis of intracellular cytokines in lymphocytes from induced sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**(3): A663.

Poster, American Thoracic Society, Toronto 2000.

Loppow D, Böttcher M, Jörres RA, Gercken G, Magnussen H. Flow cytometric detection of induced sputum eosinophils due to their depolarized sidewardscatter properties. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**(3): A179.

Poster, American Thoracic Society, Toronto 2000.

Loppow D, Böttcher M, Gercken G, Jörres RA, Magnussen H. Durchflußzytometrische Analyse von induziertem Sputum - eine Alternative zur bronchoalveolären Lavage?

Poster, 14. Arbeitstagung: Anwendung der Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik, Regensburg 2001.

Loppow D, Abel G, Welker L, Magnussen H, Jörres RA. Durchflußzytometrische Analyse der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit - Welche Faktoren beeinträchtigen die diagnostische Aussagekraft?

Poster, 14. Arbeitstagung: Anwendung der Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik, Regensburg 2001.

Loppow D, Böttcher M, Gercken G, Magnussen H, Jörres RA. Sputum TH and TS lymphocyte cytokine production on single cell level. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **163**(5): A600.

Poster, American Thoracic Society, San Francisco 2001.

8.1.4 Bewerbung um Fördermittel

Loppow D, Böttcher M, Abel G, Gercken G, Magnussen H, Jörres RA. Flow cytometric lymphocyte subtyping in induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid.

Bewerbung um den Förderpreis der Deutschen Gesellschaft für Zytologie 2001.

Loppow D. Induktion von Atemwegssymptomen und -entzündung durch Inhalation von Interleukin-2 als Modell eines Asthma bronchiale beim Menschen.

Bewerbung um den Förderpreis der Deutschen Atemwegsliga 2002.

8.2 Unterstützung

Mittel und Arbeitsfreiraum für diese Arbeit ermöglichten folgende Institutionen:

- Verein zur Förderung der Pneumologie am Krankenhaus Großhansdorf e.V.
Wöhrendamm 80, 22927 Großhansdorf
- Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin Dr. Kramer und Kollegen
Lauenburger Straße 61-67, 21502 Geesthacht
- LVA Freie und Hansestadt Hamburg, Jungestraße 10, 20535 Hamburg
- Krankenhaus Großhansdorf GmbH
Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie
Wöhrendamm 80, 22927 Großhansdorf
- Christiane Herzog Stiftung, Geißstraße 4, 70173 Stuttgart
- Prof. Dr. med. H. Magnussen, Ihlandieksweg 34, 22927 Großhansdorf
- Pneumologisches Forschungsinstitut am Krankenhaus Großhansdorf
Wöhrendamm 80, 22927 Großhansdorf

Lebenslauf

Name: Detlef Loppow
geboren am: 29.11.1968 in Hamburg
Familienstand: ledig

Schulbildung

8/74 - 6/78 Grundschule, Bandwirkerstraße, Hamburg
8/78 - 7/88 Gymnasium, Charlotte-Paulsen-Gymnasium, Hamburg
15.07.1988 Abschluß: allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Ersatzdienst

10/88 - 4/90 Zivildienst im Pflegeheim Horn, Hamburg

Studium und Berufsausbildung

4/90 - 7/97 Studium der Chemie an der Universität Hamburg

Externe Diplomarbeit am Krankenhaus Großhansdorf unter der Betreuung von Prof. Dr. G. Gercken: „Durchflußzytometrische Analyse des induzierten Sputums“

seit 7/97 Beginn der externen Dissertation am Krankenhaus Großhansdorf unter der Betreuung von Prof. Dr. G. Gercken

Berufspraxis

3/91 - 4/97 Nebentätigkeit bei IBL, Immuno Biological Laboratories, Hamburg
9/97 - 9/98 Wissenschaftlicher Mitarbeiter von Prof. Magnussen (1/2 Stelle)
seit 9/98 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Verein zur Förderung der Pneumologie am Krankenhaus Großhansdorf (1/2 Stelle)

seit 2001 Leitung der Abteilung Durchflußzytometrie in der Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin Dr. Kramer und Kollegen, Geesthacht (2/5 Stelle)

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 30. September 2002

Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Gercken danke ich für die Überlassung der interessanten Themenstellung; die anregenden Besprechungen und die Durchsicht der Arbeit.

Herrn Dr. D. Kramer gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung aller Mittel, Geräte und Räumlichkeiten, die zur Durchführung der Versuche notwendig waren.

Herrn Prof. Dr. H. Magnussen danke ich für die Bereitstellung von Mitteln, Geräten, Räumlichkeiten und Probenmaterial.

Den Leitern der Abteilung Durchflußzytometrie Michael Böttcher, Rita Dittmer und Armin Pahl danke ich für die Betreuung bzw. Freiräume in Geesthacht.

Mein besonderen Dank gilt Rudolf Jörres. Egal ob im Labor, im Wald, beim Sternegucken oder beim Transport des „großen Grünen“, ich danke Dir für all die Zeit, die Du Dir für mich genommen hast. ☺

Allen Mitarbeitern der Forschungsabteilung des Krankenhauses Großhansdorf: Christian Taube, Dagmar Nielsen-Gode, Dunja Schmidt, Einar Lück, Frank Kannieß, Inga Robinson, Ingrid Schwertfeger, Jan Hansen, Kai Richter, Kai-Christian Müller, Karen von Froreich, Kathrin Grönke, Kirsten Paasch, Lars Grönke, Marion Mücke, Martin Einhaus, Michaela Behnke, Miguel Schleiß, Olaf Holz, Petra Timm, Stanislaw Janicki, Steffi Böhme, Susanne Schlicht danke ich herzlich für die gute Laune, Geduld und viele anregende Gespräche.

Gleiches gilt für alle Mitarbeiter der Abteilung Durchflußzytometrie im Labor in Geesthacht, ganz besonders aber Gerhard Abel (*Das gibt's in keinem Russenfilm!*).

Allen im klinischen Labor und in der Zytologie Beschäftigten sei für die Hilfsbereitschaft bei der Auswahl der Blut- und Lavageproben gedankt, besonders aber Dr. Lutz Welker - ich freue mich auf die weitere Zusammenarbeit!

Dank gebührt vor allen Dingen den Probanden, die zum großen Teil aus meinem Freundeskreis stammen. Viele begaben sich früh um sieben Uhr nach Großhansdorf, um Sputum zu spenden. Danke!

Mein ganz persönlicher Dank gilt Dir, Vicky. Hoffentlich haben wir die schwerste Zeit unseres Zusammenlebens jetzt hinter uns.

Besonderer Dank gilt meiner Mutter, die im Sinne meines verstorbenen Vaters fortfuhr, mir meine Berufsausbildung großzügig und frei von Pflichten zu ermöglichen. Danke! Ebenso danke ich meiner Schwester mit Familie für Ihre Unterstützung ☺!