

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_{CS}-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_{CS}-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.

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 cytospin 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.