

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, Klinikum Großhadern, der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor Prof. Dr. med. G. Steinbeck

**Untersuchungen zur Oxidantien-
Antioxidantien-Balance
bei parenchymatösen Lungenerkrankungen
– Bedeutung der Alveolarmakrophagen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Barbara Degenkolb

aus
München

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Jürgen Behr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. U. Welsch
Priv. Doz. Dr. G. Kuhnle

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: ./.

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen
Prüfung: 13.6.2002

1 INHALTSVERZEICHNIS

1	INHALTSVERZEICHNIS	3
1	EINLEITUNG	7
1.1	Was sind interstitielle Lungenerkrankungen?	7
1.1.1	Klinische Manifestationen	7
1.1.2	Röntgenmorphologie.....	7
1.1.3	Lungenfunktionsdiagnostik	8
1.1.4	Serologische Diagnostik	8
1.1.5	Therapie	9
1.1.6	Prognose	10
1.2	Postulierte Pathogenese.....	11
1.2.1	Zellverteilung und Krankheitsbilder.....	12
1.2.2	Alveolitis und Fibroseentstehung	13
1.2.3	Molekularer Mechanismus des Respiratory Burst.....	18
1.2.4	Antioxidativer Schutz	24
1.2.5	Extrazelluläre Glutathionverteilung	26
1.2.6	Extrazelluläre Glutathionverteilung in der Lunge	27
1.2.7	Intrazellulärer Glutathionstoffwechsel.....	28
1.2.8	Intrazelluläre oxidative Mechanismen	29
1.3	Zusammenfassung und Fragestellung.....	30
2	METHODIK.....	32
2.1	Untersuchungskollektiv	32
2.1.1	Kontrollpersonen.....	32
2.1.2	Patienten mit interstitieller Lungenerkrankung.....	34
2.1.3	Patienten mit subklinischer Alveolitis bei Bindegewebserkrankungen	37
2.1.4	Sarkoidose	37
2.1.5	Exogen allergische Alveolitis vor und nach Exposition....	38

2.1.6	Patienten nach Lungen- oder Herzlungentransplantation...	39
2.2	Lungenfunktionsanalyse	40
2.3	Zellgewinnung und bronchoalveoläre Lavage	41
2.3.1	Differentialzellbild	43
2.3.2	Messung der Gesamtglutathionkonzentration in der bronchoalveolären Lavage	44
2.3.3	Messung von oxidiertem Methionin in den Proteinen der BALF	46
2.4	Oxidation von Glutathion mittels H₂O₂	47
2.4.1	Verschiedene Konzentrationen des eingesetzten reduzierten Glutathions im Testansatz	50
2.4.2	Einfluß von Katalase	52
2.4.3	Zugabe von Katalase zu Beginn des Tests	53
2.4.4	Bestimmung der Konzentration des Gesamtglutathions im Testansatz	54
2.4.5	Bestimmung der Konzentration des oxidierten Glutathions aus dem Testansatz	55
2.5	Makrophagenassay	57
2.5.1	Standardansatz	57
2.5.2	Verschiedene Zellzahlen	62
2.5.3	Zugabe von Katalase	62
2.5.4	Messung des oxidierten Glutathions im Überstand	62
2.5.5	Gesamtglutathion im Überstand	63
2.5.6	Enzymblockaden im γ -Glutamylzyklus	63
2.5.7	Messung der Myeloperoxidaseaktivität im Überstand, in den lysierten Zellen und in der BALF	67
2.6	Statistik	68
3	ERGEBNISSE	70
3.1	Zellverteilung in der BALF	70
3.1.1	Differentialzellbild	70
3.2	Untersuchung der Anzahl adhärenter Zellen auf den Platten	73

3.3	Varianzanalyse zwischen den Leerwerten, dem Abfall des reduzierten Glutathions und den oxidativen Aktivitäten unstimulierter und stimulierter Zellen.....	76
3.4	Oxidative Aktivität bei verschiedenen Zellzahlen	80
3.5	Enzymblockaden	80
3.5.1	Katalasezugabe	80
3.5.2	Buthioninsulfoximin	81
3.5.3	Carmustin	83
3.5.4	Acivicin	84
3.5.5	Gesamtglutathion, reduziertes Glutathion und GSSG im Zellversuch	85
3.6	Gesamtglutathion in der BALF.....	88
3.7	Bestimmung von Myeloperoxidase im Überstand und in den getesteten Zellen sowie in der BALF	90
3.8	Standardansatz.....	96
3.8.1	Kontrollen vs. gesunde Raucher.....	96
3.8.2	Kontrollen vs. interstitielle Lungenerkrankung	97
3.8.3	Kontrollen vs. subklinische Alveolitis	98
3.8.4	Kontrollen vs. Sarkoidose.....	99
3.8.5	Kontrollen vs. exogen allergische Alveolitis	99
3.8.6	Kontrollen vs. Patienten nach Lungen- oder Herzlungentransplantation	100
3.9	Zusammenhang zwischen der Gesamtzellzahl in der BALF und der oxidativen Aktivität.....	101
3.10	Messung von oxidiertem Methionin in den Proteinen der BALF.....	102
4	DISKUSSION	104
4.1	Zur Methodik des Makrophagenassay.....	104
4.1.1	Sensitivität und Meßbereich	104
4.1.2	Spezifität des Makrophagenassays	105
4.1.3	Rolle der MPO	107

4.1.4	Vergleich mit anderen Meßverfahren	108
4.1.5	Limitationen der Methode	111
4.2	Beurteilung der oxidativen Aktivität bei unterschiedlichen Krankheitsbildern.....	112
4.2.1	Bedeutung des bronchoalveolären Differentialzellbildes	112
4.2.2	Bedeutung der oxidativen Aktivität von ex vivo kultivierten Alveolarmakrophagen.....	114
4.2.3	Bedeutung der extrazellulären Glutathionkonzentration und der oxidierten Methioninreste in den bronchoalveolären Proteinen	115
4.2.4	Synopsis der Befunde verschiedener Patientengruppen...	118
4.2.5	Hypothese zur pathophysiologischen Bedeutung oxidativer Mechanismen	119
5	ZUSAMMENFASSUNG	122
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	125
7	DANKSAGUNG	136
8	LEBENS LAUF	137

2 Einleitung

2.1 Was sind interstitielle Lungenerkrankungen?

Interstitielle Lungenerkrankungen sind charakterisiert durch eine Entzündung peripherer bronchoalveolärer Strukturen, die zu einer mehr oder minder ausgeprägten Fibrosierung führt. Abzugrenzen sind maligne Erkrankungen und flüchtige Infiltrationen und Zirkulationsstörungen. Im engeren Sinne handelt es sich dabei um die idiopathische Lungenfibrose (ILF) sowie andere potentiell in eine Fibrose mündende Erkrankungen wie die exogen allergische Alveolitis, die Sarkoidose oder die Lungenbeteiligung bei der systemisch progressiven Sklerodermie. Auch Pneumokoniosen können ebenso wie toxische Schäden durch Arzneimittelnebenwirkungen nach Gabe von Bleomycin, Amiodaron oder Carmustin zur Fibrosierung der Lunge führen. Coultas et al. beschreiben eine Prävalenz interstitieller Lungenerkrankungen von 67,2 (w) bzw. 80,9 (m) pro 100.000 (Coultas et al., 1994; Jessar et al., 1953; Myrhe, 1959; Alarcon-Segovia et al., 1961; Haupt et al., 1981; Miller et al., 1985; König et al., 1984; Weaver et al., 1968; Young et al., 1978; King, 1993; Vogelmeier und Behr, 1999).

2.1.1 Klinische Manifestationen

Unabhängig von der Ätiologie der Lungenfibrose klagen die Patienten über trockenen Husten und Atemnot bei Belastung. Infektartiger Krankheitsbeginn oder Allgemeinsymptome wie Gewichtsverlust, Fieber, Müdigkeit, Muskel- und Gelenkschmerzen wurden beschrieben. Im fortgeschrittenen Stadium finden sich Ruhedyspnoe und respiratorische Insuffizienz, Trommelschlegelfinger, Zyanose und Rechtsherzbelastung bis hin zum Rechtsherzversagen.

2.1.2 Röntgenmorphologie

Die Thoraxübersichtsaufnahme weist in der Regel retikuläre und retikulonoduläre interstitielle Zeichnungsvermehrungen vor allem in

den Unterfeldern auf. Im fortgeschrittenen Stadium findet sich das Bild einer Honigwabene. 10-15 % der Patienten mit manifester ILF zeigen in der Übersichtsaufnahme allerdings keine Veränderungen und auch die Korrelation zwischen Schweregrad der Erkrankung, bzw. dem Krankheitsverlauf und den Verschattungen im Röntgenbild ist unbefriedigend. Die Computertomographie, und hier insbesondere die hochauflösende Computertomographie mit einer Auflösung von 0,5-2 mm, korreliert deutlich besser mit dem Fibrosestadium und kann prognostische Hinweise geben (*Padley et al., 1994; Collins et al., 1994*).

2.1.3 Lungenfunktionsdiagnostik

Die fibrosierenden Alveolitiden führen zu einer Einschränkung der Atmungsfunktion, die anhand typischer Lungenfunktionseinschränkungen objektiviert werden kann. Initial finden sich eine Einschränkung der Diffusionskapazität und eine Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes bei Belastung. Im weiteren Verlauf der Erkrankung nehmen die Vitalkapazität und die Totalkapazität als Zeichen restriktiver Ventilationsstörungen gleichsinnig ab, und es kommt auch unter Ruhebedingungen zu einer Verminderung des Sauerstoffpartialdruckes. Die Blutgasanalyse unter Belastungsbedingungen hat sich als sensitiver Parameter zur klinischen Verlaufsbeurteilung erwiesen. Eine Kohlendioxidretention ist selten und in erster Linie auf finale Stadien beschränkt. Obwohl vereinzelt eine „small airways disease“ beschrieben wurde, ist eine obstruktive Ventilationsstörung eher selten (*Renzi et al., 1982; Kornbluth et al., 1980; Marciniuk et al., 1994*).

2.1.4 Serologische Diagnostik

Die serologischen Zeichen der idiopathischen Lungenfibrose sind unspezifisch. Neben einer möglichen Erhöhung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, selten auch einer Erythrozytämie bei arterieller Hypoxie finden sich in einem Teil der Fälle zirkulierende Kryoglobuline. Nur für zirkulierende Immunkomplexe konnte bisher eine Korrelation zwischen Krankheitsstadium und Prognose gefunden werden (*Dreisin et al., 1978*). Die Veränderungen der Laborparameter bei einer Alveolitis auf dem Boden einer Binde-

gewebskrankung entsprechen den Befunden im Rahmen der Grunderkrankung (*James, 1993; Newman, 1990; Britton et al., 1999*).

2.1.5 Therapie

Eine kausale Therapie der fibrosierenden Alveolitis gibt es bisher nur bei den exogen induzierten Formen wie der EAA, Pneumokoniosen und Medikamentennebenwirkungen durch Karenz. Eine Behandlungsindikation ergibt sich bei der ILF und bei den Bindegewebskrankungen, wenn eine signifikante Einschränkung der Atmungsfunktionen vorliegt, bzw. bei Progredienz der pulmonalen Manifestation. Mangels spezifischer Verlaufsparemeter müssen klinische, speziell lungenfunktionsanalytische und radiologische Parameter für die Beurteilung herangezogen werden. Eine Zunahme der Dyspnoe und eventuell der interstitiellen Zeichnungsvermehrung im Röntgenbild, eine Abnahme der Diffusionskapazität und des Sauerstoffpartialdruckes in Ruhe und/oder bei Belastung im Vergleich zu den Voruntersuchungen deuten nach Ausschluß einer Infektion auf einen aktiven Krankheitsschub hin. Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) kann über die Bestimmung der Gesamtzellzahl und die Differenzierung der alveolären Entzündungszellen weitere Hinweise auf das Entzündungsgeschehen geben. Mangels adäquater Therapieansätze und aufgrund der immunologischen Auffälligkeiten (z. B. Immunglobulinerhöhung in der BAL und Immunkomplexbildung) wird heute eine immunsuppressive, entzündungshemmende Therapie mit Steroiden, beginnend mit einer Dosis von 0,5-1,0 mg Prednisonäquivalent über mehrere Wochen empfohlen (*Britton, 1999*). Eine lebensverlängernde Wirkung wurde für die Steroide allerdings bisher nicht in kontrollierten Studien belegt. Versuche mit Azathioprin (Imurek®) und Cyclophosphamid (Endoxan®) in Kombination mit Steroiden ergaben in kontrollierten Studien nur einen geringen Vorteil im Vergleich zu Steroiden (*Johnson et al., 1989; Raghu et al., 1991*). In den aktuellen internationalen Empfehlungen wird bei ILF-Patienten dennoch eine kombinierte Therapie mit Prednisolon 0,5 mg/d und Azathioprin 2 mg/kg KG/d vorgeschlagen (*ATS/ERS Consensus Statement, 2000*). Ziesche et al. behandelten 9 Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose über 12 Monate mit γ -Interferon 1b plus low-dose

Prednisolon und fanden im Vergleich zur ausschließlich mit Prednisolon behandelten Kontrollgruppe signifikante Verbesserungen mehrerer Lungenfunktionsparameter. Inwieweit dies ein vielversprechender Therapieansatz ist, müssen weitere Studien erst zeigen (*Ziesche et al., 1999*). Die Sarkoidose nimmt angesichts der hohen Spontanheilungsrate eine Sonderstellung ein, engmaschige Kontrollen beim diffusen Lungenbefall sind allerdings wichtig um eine eventuelle Fibrosierung rechtzeitig durch Steroide medikamentös abzufangen.

Bestehen bei einer chronischen Lungenerkrankung im finalen Stadium keine weiteren effektiven medizinischen und chirurgischen Behandlungsalternativen, kann unter Abwägung des Allgemeinzustandes, zusätzlicher Infektionen, Rechtsherzinsuffizienz etc. die Indikation zur Einzel- oder Doppellungentransplantation (LTx) gestellt werden. Danach erfolgen eine postoperative Immunsuppression und engmaschige Kontrolluntersuchungen. Die wichtigsten Komplikationen sind akute und chronische Abstoßungsreaktionen, Infektionen, sowie die Anastomoseninsuffizienz und Atemwegsstenosen. Postoperativ kann es durch die Manipulation auch zu akuten Schäden am Spenderorgan z. B. durch die Reperfusion kommen. Zur Diagnostik infektiöser Komplikationen werden die BAL und histologische Untersuchungen kombiniert. Die Diagnose einer Abstoßungsreaktion erfolgte neben der Klinik und den nicht invasiven Untersuchungsmethoden wie der Lungenfunktion bisher hauptsächlich über eine transbronchiale Biopsie oder über eine Probeexzision, da die BAL bisher keine eindeutige Differenzierung zwischen infektiöser oder immunogener Ursache erbrachte. Die BAL dient nach LTx/HLTx hauptsächlich der mikrobiologischen Untersuchung. Sie ist in späteren Stadien der chronischen Abstoßung oder bei Infektionen durch eine Zunahme der Gesamtzellzahl und einen Granulozyteneinstrom gekennzeichnet.

2.1.6 Prognose

Die Prognose der Patienten ist vom Ansprechen auf eine immunsuppressive Therapie, den damit verbundenen Komplikationen, die

erfolgreiche Behandlung rezidivierender bronchopulmonaler Infektionen und der Ausbildung eines Cor pulmonale bis hin zur Rechterzdekompensation abhängig. In einigen Fällen muß letztendlich eine Lungentransplantation mit der ihr eigenen Problematik ins Auge gefaßt werden. Trotzdem beträgt die mediane Überlebensrate nach Diagnosestellung einer ILF nur ca. 2,5 Jahre.

2.2 Postulierte Pathogenese

Es herrscht zunehmend die Auffassung, daß die Entstehung der Lungenfibrose unabhängig von der Grunderkrankung über ein und dieselbe pathogenetische Endstrecke verläuft (*Keogh et al., 1982*).

Man geht davon aus, daß eine chronische, unkontrolliert ablaufende interstitielle und intraalveoläre Entzündung zur zunehmenden Fibrosierung des Lungengewebes beiträgt, wobei die Frage des auslösenden Agens nur in einem Teil der Fälle geklärt ist. Bei den interstitiellen Lungenerkrankungen ungeklärter Genese werden virale Pneumonitiden als Auslöser diskutiert, die bei einer prädisponierten Person einen Autoimmunprozeß triggern könnten. 1982 beschrieben Keogh und Crystal bereits im Initialstadium einer interstitiellen Lungenerkrankung eine Erhöhung der Zellzahl in der BALF und prägten daher den Begriff der fibrosierenden Alveolitis (*Keogh et al., 1982*).

Katzenstein und Mitarbeiter betonen zudem die Wichtigkeit einer histologisch exakten Diagnosestellung und beschreiben vier Unterformen der interstitiellen Pneumonie, deren genaue histologische Unterscheidung auch für Prognose und Therapieprotokoll relevant sind. Die klassische idiopathische interstitielle Pneumonie (usual interstitial pneumonitis = UIP) ist gekennzeichnet durch den Nachweis sogenannter Fibroblastenfoci, bestehend aus zellarmen Kollagenbündeln, kleinen Ansammlungen aktiv-proliferierender Myofibroblasten und Fibroblasten, die spindelförmig entlang der Alveolarsepten ausgerichtet sind. Intraalveoläre Makrophagenansammlungen finden sich eher fokal, die interstitielle Entzündungsreaktion ist ge-

ring. Fibrosierung und Entzündungsreaktion ergeben ein fleckförmiges Muster (Katzenstein et al., 1998).

2.2.1 Zellverteilung und Krankheitsbilder

1990 veröffentlichte das BAL Cooperative Group Steering Committee die Ergebnisse einer Multicenterstudie zur Erstellung von einheitlichen Richtlinien zur Durchführung der BAL und Beurteilung der Inhaltsstoffe und Zellen in der BALF von gesunden Kontrollpersonen, gesunden Rauchern, Patienten mit pulmonaler Beteiligung bei Kollagenosen und Patienten mit pulmonaler Fibrose (Cherniack et al., 1990). Die untersuchten Patientendaten in Tabelle 1 stammen aus der Nichtrauchergruppe; dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

	Gesunde Nichtraucher	Gesunde Raucher	ILF	Kollagenosen
Zellen/ ml BAL \cdot 10⁴	12,9 \pm 2,0	41,8 \pm 4,5	20,1 \pm 3,8	64,3 \pm 44,5
Alveolarmakrophagen [%]	85,2 \pm 1,6	92,5 \pm 1,0	76,4 \pm 6,6	69,6 \pm 13,3
Neutrophile Granulozyten [%]	1,6 \pm 0,7	1,6 \pm 0,2	6,7 \pm 2,5	16 \pm 11,6
Eosinophile Granulozyten [%]	0,19 \pm 0,06	0,6 \pm 0,1	2,8 \pm 1,1	1,3 \pm 0,6
Lymphozyten [%]	11,8 \pm 1,1	5,2 \pm 0,9	14,2 \pm 7,0	12,9 \pm 7,7

Tabelle 1: Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups, Mittelwerte \pm SEM (The BAL Cooperative Group Steering Committee, American Review of Respiratory Disease, May 1990)

Nikotinabusus führte demnach zu einer Erhöhung der Gesamtzellzahl, zu einer prozentualen Erhöhung des Alveolarmakrophageanteils sowie zu einer Erhöhung der Absolutzahl der neutrophilen Granulozyten bei gleichem prozentualem Anteil im Vergleich zum Nichtraucher. Der prozentuale Anteil der Lymphozyten fiel bei den Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern. Mit dem Alter nahmen der prozentuale Anteil an T-Zellen sowie der prozentuale Anteil an T-Helferzellen zu. Die Daten der untersuchten ILF-Patienten wiesen,

wie aus Tabelle 1 ersichtlich, darauf hin, daß die fibrosierende Alveolitis tatsächlich durch eine Vermehrung der Gesamtzellzahl in der BAL gekennzeichnet ist und ein Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der Differenzierung der BALF-Zellen im Vergleich zum Normalkollektiv erfolgt. Teils waren auch die eosinophilen Granulozyten vermehrt. Eine ausgeprägte Granulozytose spricht eher für eine hohe Krankheitsaktivität und ein schlechtes Ansprechen auf Steroide, wohingegen eine Lymphozytose eher ein gutes Ansprechen auf Steroide signalisiert (*Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, 1993*). Entsprechendes gilt für die fibrosierende Alveolitis bei Kollagenosen. Die Sarkoidose und die exogen-allergische Alveolitis im chronischen Stadium sind in der Regel mit einer Lymphozytose verbunden, aber auch bei der ILF wurden leichte Lymphozytenvermehrungen beschrieben. Eine Neutrophilie bei der Sarkoidose weist auf eine zunehmende Fibrosierung hin. Auch Mischformen einer Granulozytose und Lymphozytose können bei der Kollagenose, und hier besonders bei der PSS, oder bei der fibrosierenden Sarkoidose gefunden werden. Ein deutlich erhöhter CD4/CD8-Quotient ist typisch für die Sarkoidose.

2.2.2 Alveolitis und Fibroseentstehung

Abbildung 1 soll einen Überblick über die vermuteten zellvermittelten Zusammenhänge bei der Fibroseentstehung geben.

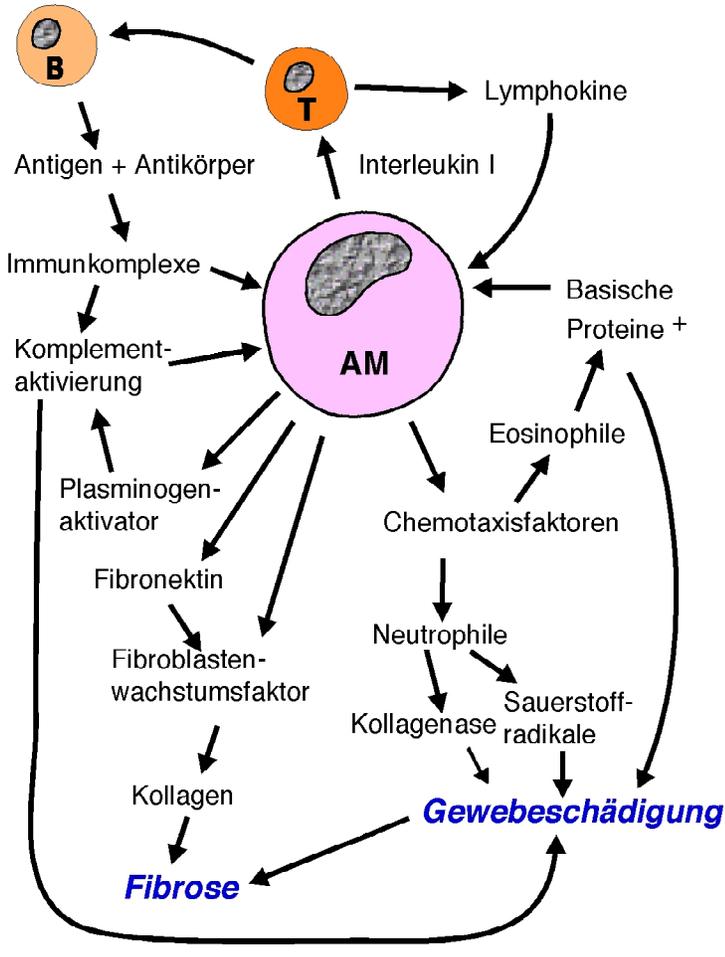


Abbildung 1: Modell der zellvermittelten Entstehung der interstitiellen Lungenfibrose
(nach Fishman, 1988)

AM = Alveolarmakrophage, T = T-Lymphozyt, B = B-Lymphozyt

Durch ein unbekanntes Agens aktivierte Alveolarmakrophagen stimulieren durch Abgabe von Interleukin-1 T- und B-Zellen, wodurch es zur Bildung von Immunkomplexen kommt, die wiederum eine Komplementaktivierung und Aktivierung von Alveolarmakrophagen

(AM) nach sich ziehen. Das entsprechende Antigen ist bisher noch nicht isoliert. Möglicherweise handelt es sich hier auch um körpereigene Substanzen, die z. B. infolge einer Virusinfektion vom Immunsystem als Antigen mißgedeutet werden. So stimulierte AM geben auch chemotaktisch wirksame Substanzen ab, insbesondere Interleukin-8 und Leukotrien B₄, die zu einem verstärkten Einstrom von polymorphonukleären Granulozyten führen, und auch der Einstrom unreiferer monozytenähnlicher AM aus der Blutbahn erhöht sich (*Carre et al., 1991*).

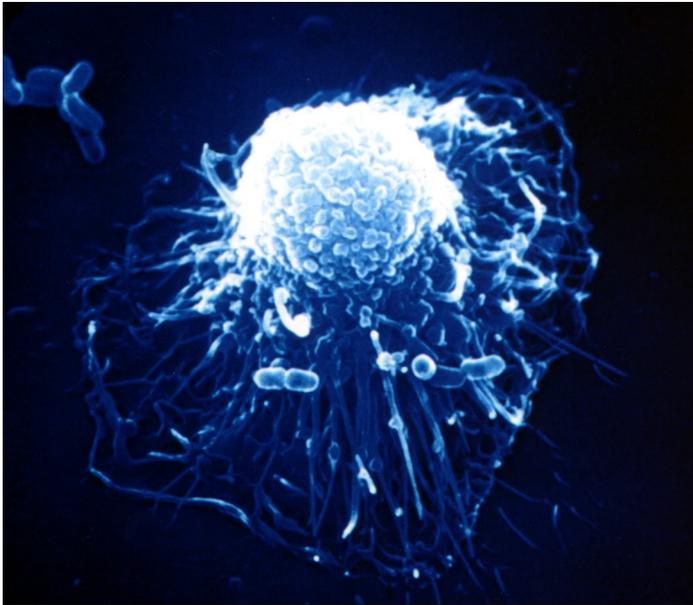


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines aktivierten Makrophagen von Dr. h. c. Lennart Nilsson in ~7000facher Vergrößerung (Mit freundlicher Genehmigung der Boehringer Ingelheim GmbH[®], 1981)

Im Rahmen “physiologischer” Abwehrreaktionen lagern sich Granulozyten nun an Fremdkörper an, und es bilden sich Pseudopodien zur Phagozytose des Partikels in die Vakuolen. Es folgt die Degranulation und Abgabe lysosomaler Enzyme wie Kollagenasen, Proteasen und insbesondere Elastase in die Vakuolen. Die extrazelluläre

Abgabe von lysosomalen Enzymen konnte unter experimentellen Bedingungen durch Zugabe von Interleukin-8 oder Immunkomplexen provoziert werden, ohne daß die Viability der Zellen darunter abnahm. Bei vermehrtem Einstrom von Granulozyten und entsprechend gesteigertem Zelluntergang gelangen lysosomale Enzyme zusätzlich in den Extrazellulärraum und Proteasen verschieben das Proteasen/Antiproteasengleichgewicht der Lunge zu Ungunsten der Antiproteasen. Lysosomale Enzyme können infolge des Zellunterganges körpereigenes Gewebe demnach auf direktem Wege schädigen (*Vogelmeier und Buhl, 1994; Crystal et al., 1991*).

Gleichzeitig produzieren speziell Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten Oxidantien in Form von reaktiven Sauerstoffradikalen, die im Rahmen einer körpereigenen Abwehrreaktion auf Erreger sinnvoll eingesetzt werden, bei der fibrosierenden Alveolitis im Rahmen interstitieller Fibrosen aber

wohl zu einer Schädigung des körpereigenen Gewebes führen können. Oxidantien inaktivieren ihrerseits wiederum Antiproteasen. Beim Gesunden steht der Oxidantienproduktion auf der einen Seite ein Schutzschild aus Antioxidantien auf der anderen Seite entgegen.

Es kommt zur Desintegration, zu Verdickungen und zu einem flächigen Verlust der Basalmembran. Mesenchymzellen und Matrixbestandteile können in den Alveolarraum eindringen. Einer intraalveolären mesenchymalen Proliferation folgt eine Reepithelialisierung, die letztendlich in einer Verdickung der Alveolarwand resultiert. Typ I-Epithelzellen, die sich als hochspezialisierte Zellen nicht mehr replizieren können, werden durch proliferierende Typ II-Zellen ersetzt.

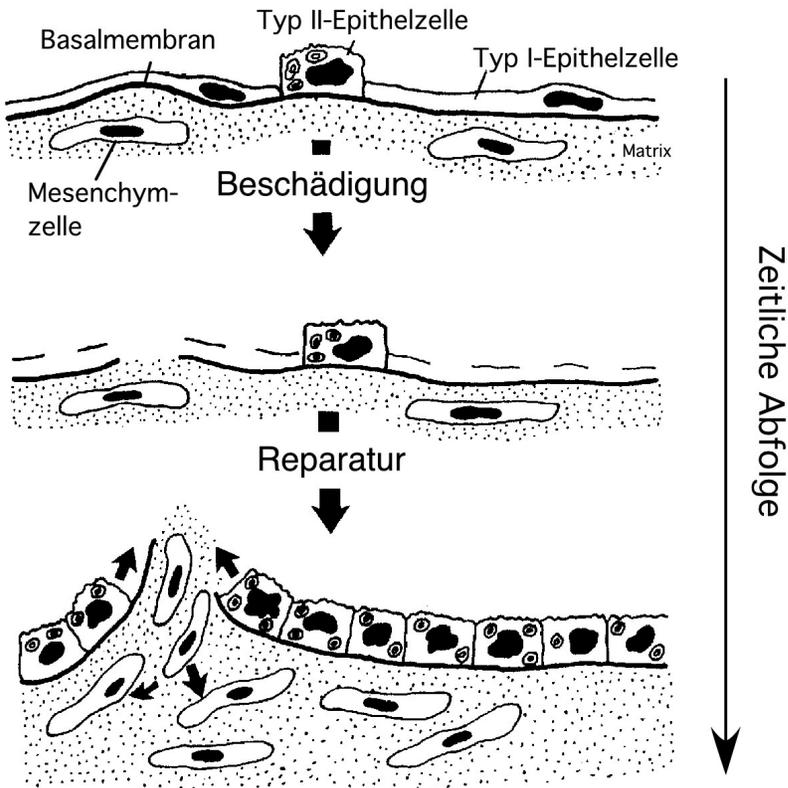


Abbildung 3: Gewebeveränderungen bei der Fibrosierung (nach Crystal et al., 1991)

Zusätzlich geben aktivierte AM Wachstumsfaktoren wie platelet derived growthfactor und IGF-1 ab, die wiederum die Proliferation mesenchymaler Zellen wie vor allem der Fibroblasten, der Perizyten und Myofibroblasten steigern, sowie Fibronectin, das neben seiner Funktion als Matrixsubstanz ebenfalls als Wachstumsfaktor wirken kann. Die exakte Rolle von TGF- β bei der Fibrosierung ist noch nicht geklärt. Prostaglandin E, das normalerweise eine Gegenregulation zur Stimulation mesenchymaler Zellen bildet, ist in der ILF-Lunge signifikant vermindert. Die Kollagenproduktion überwiegt schließlich und es kommt zu einer verstärkten Deposition der Substanz im Lungenparenchym. Auch die Qualität des Kollagens ist verändert:

man findet dünne ungeordnete Bündel mit einer Dominanz des Typ I-Kollagens in der späten Krankheitsphase. Gleichzeitig kann das Endothel der Lungenkapillaren verletzt werden, was zu einem erhöhten Leakage führt. Die Reparaturmechanismen und Fibrosierungen betreffen neben dem Interstitium auch den Alveolarraum bei gleichzeitiger Reduktion der funktionalen Alveolaroberfläche (*Crystal et al., 1991*). Im weiteren Verlauf findet man einen zunehmenden Parenchymbau bis hin zur irreversiblen Fibrose. Die Honigwabenlunge mit einer Schädigung und Vernarbung von Bronchiolen und Hohlräumen, die durch eine Rarefizierung der Alveolen bedingt sind, wird im Endstadium gesehen.

Die Beobachtungen bzgl. der Proteasen und der Oxidantien weisen darauf hin, daß möglicherweise nicht der Auslösemechanismus für die Entstehung einer Fibrose entscheidend ist, sondern ein Ungleichgewicht zwischen den Entzündungs- und Reparaturmechanismen einerseits und den Schutzmechanismen andererseits, die zu einer überschießenden, sich selbst perpetuierenden Entzündungsreaktion und Fibrosierung führen und schließlich in die Fibrose münden. Inwieweit es sich hierbei um eine genetische Prädisposition oder eine Fehlregulation von Entzündungsreaktionen bei der fibrosierenden Alveolitis an sich handelt, ist noch unklar.

Auf die Entstehung und Wirkung der Sauerstoffradikale, die Rolle des Glutathions zur Aufrechterhaltung eines Oxidantien/Antioxidantiengleichgewichtes und seiner Störungen bei der fibrosierenden Alveolitis soll in den nächsten Abschnitten näher eingegangen werden.

2.2.3 Molekularer Mechanismus des Respiratory Burst

Alveolarmakrophagen und Granulozyten produzieren nach Stimulation Superoxidanionradikale ($O\cdot_2^-$) sowie zahlreiche davon abgeleitete reaktive Sauerstoffmetaboliten (ROM).

Molekularer Sauerstoff besitzt 2 unpaarige Elektronen in den äußeren Orbitalen. Da diese Elektronen einen parallelen Spin aufweisen, ist es nach dem Pauli-Prinzip so nicht möglich, ein Elektronenpaar eines

anderen Moleküls aufzunehmen, was molekularen Sauerstoff weniger reaktiv macht. Möglich ist allerdings die Einzelelektronreduktion, wie sie z. B. bei der Atmungskette erfolgt. Die bei der Atmungskette entstehenden reaktiven Sauerstoffintermediate werden allerdings durch die eng gekoppelte Reaktionskette praktisch nicht frei. Wir betrachten daher die Einzelelektronreduktion in Anwesenheit verschiedener Katalysatoren näher (Abbildung 4).

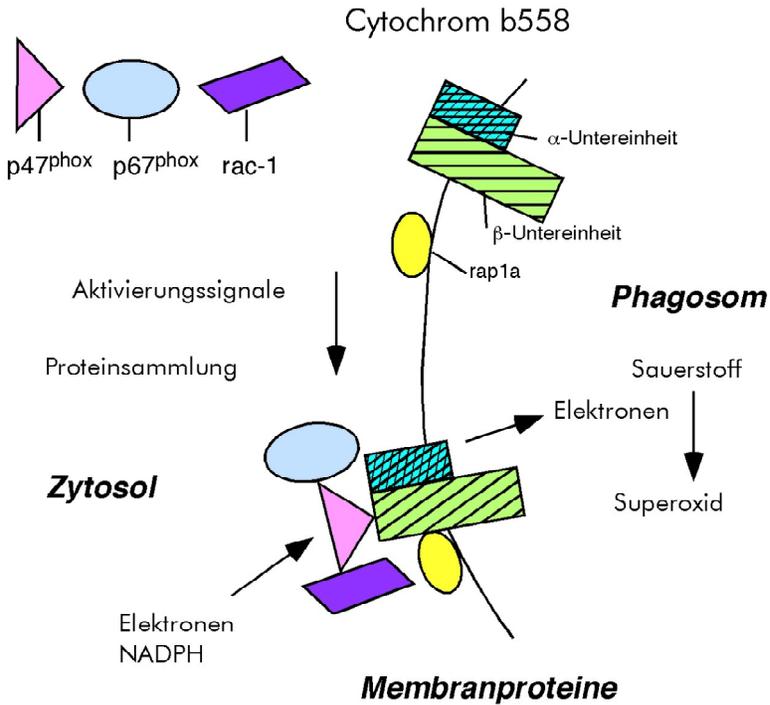


Abbildung 4: NADPH-Oxidase (nach Rotrosen, 1992)

Durch Aufnahme eines Elektrons entsteht das Superoxid anionradikal, das sowohl als Reduktions- wie auch als Oxidationsmittel fungieren kann und vor allem in seiner protonierten Form hoch reaktiv ist. Dies erfolgt über eine membranständige, NADPH-abhängige Oxidase der Phagozyten. Bei der Phagozytose gelangt die Oxidase in die

Wand der Phagosomen, und es entstehen dort weiterhin Superoxidationradikale.

Aus den Vakuolen können Superoxidationradikale dann beim Zellenuntergang auch in den Extrazellulärraum gelangen. Da die Michaeliskonstante für Sauerstoff in diesem Enzymsystem im physiologischen Sauerstoffbereich liegt, könnte ein erhöhtes Sauerstoffangebot auch zu einer Zunahme der Superoxidationbildung führen. Superoxidationen sind ein wichtiger Faktor bei der Bekämpfung bakterieller Entzündungen. Ein angeborener Defekt, durch den die Superoxidationbildung ausfällt, die septische Granulomatose, führt zu persistierenden Entzündungen. Das Superoxidation liegt bei einem pH von 7 hauptsächlich in der unprotonierten Form vor und reagiert hier in erster Linie als Reduktionsmittel. Es ist somit weniger reaktiv als seine protonierte Form und könnte so auch über längere Strecken diffundieren. Erst ein pH-Abfall würde dann seine Toxizität erhöhen und zu lokalen Schädigungen führen. Über Anionenkanäle könnte unprotoniertes Superoxidation auch Zellmembranen überqueren.

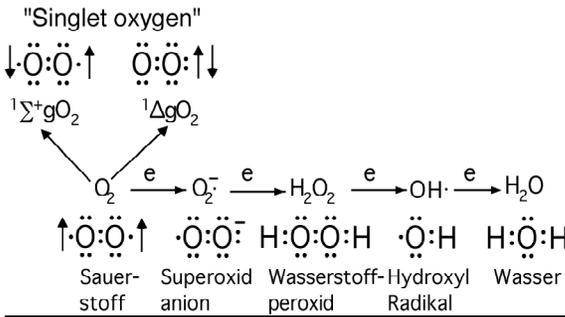
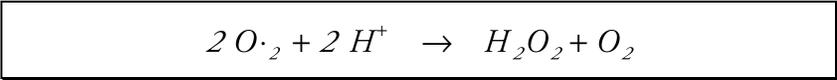


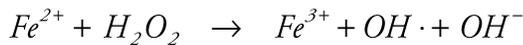
Abbildung 5: Reaktive Sauerstoffverbindungen (nach Klebanoff, 1992)

Wasserstoffperoxid entsteht hauptsächlich über die Dismutase-Reaktion:

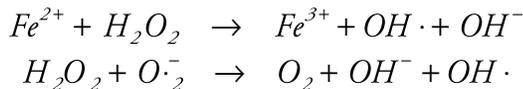


Die Reaktionsrate der spontanen Dismutasereaktion bei physiologischem pH in wässriger Lösung beträgt dabei $1 \cdot 10^5 \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$ und ist somit eher gering. Die Superoxiddismutase (SOD) kann diese Reaktion in einem pH-Bereich von 5-10 pH-unabhängig bis auf $1 \cdot 10^9 \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$ steigern (Dolman *et al.*, 1990). In den Phagosomen konnte allerdings bisher keine SOD direkt nachgewiesen werden, die Dismutasereaktion wird aber bei einem pH von 4,8 der SOD-vermittelten Reaktionsgeschwindigkeit angeglichen ($0,85 \cdot 10^8 \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$) (Behar *et al.*, 1970). Möglicherweise ist ein pH-Abfall in den Phagosomen also der Auslöser der Umwandlung von Superoxidation in Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Zusätzlich wird auch intrazelluläre SOD bei vermehrtem Zelluntergang während der Entzündungsreaktion in den Extrazellulärraum entlassen. Die Reaktivität von H_2O_2 ist niedriger als die des Superoxidradikales, wodurch es vermehrt unbeschadet durch biologische Flüssigkeiten diffundieren kann und sogar Membranen passiert (Frimer *et al.*, 1983). Dadurch kann Wasserstoffperoxid trotz seiner eher niedrigen Reaktivität verglichen mit anderen Oxidantien auch über weitere Strecken toxisch wirken.

Die weitere Reduktion von Wasserstoffperoxid erzeugt ein hochpotentes Oxidans, das Hydroxylradikal (Fenton-Reaktion):



Im Falle eines Eisenmangels als limitierendes Reagenz der Fenton-Reaktion kann Fe^{3+} mit Superoxidradikalen erneut zu Fe^{2+} reagieren, und es steht erneut Fe^{2+} für die Fenton-Reaktion zur Verfügung. Die Gesamtreaktion wird als Haber-Weiss-Reaktion bezeichnet. Die Formeln lauten somit:



Vor allem Granulozyten können über das lysosomale Enzym Myeloperoxidase (MPO) hypochlorige Säure produzieren, die physiologischerweise als Mikrobizid fungiert (Goldstein und Shak, 1994). Frisch eingewanderte Makrophagen haben sich zwar teils die Peroxidase erhalten, verlieren diese Eigenschaft aber mit zunehmender Ausreifung. Bei vermehrtem Zellumsatz und einer „Verjüngung“ der AM-Population mag dies jedoch auch quantitativ wieder ins Gewicht fallen. MPO katalysiert die Reaktion von Haliden mit H_2O_2 zu hypochloriger Säure. Hypochlorige Säure kann nun wieder mit Superoxidanionen und H_2O_2 reagieren. Über den MPO-Komplex können außerdem Hydroxylradikale entstehen. MPO ist in den Granula der neutrophilen Granulozyten enthalten und gelangt bei der Phagozytose nach der Degranulation in die Phagosomen und schließlich beim Zelluntergang auch in den Extrazellulärraum.

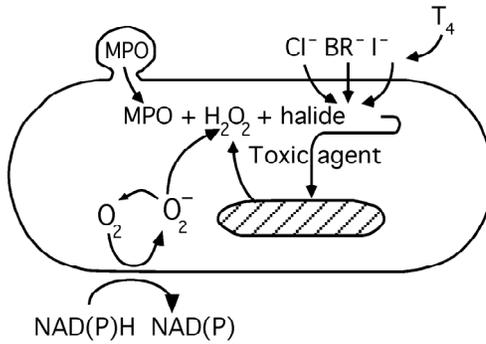


Abbildung 6: Das antimikrobielle MPO-System in den Phagosomen (nach Klebanoff, 1992)

Auch „singlet oxygen“, bei dem die Spinrestriktion durch Zuführung von Energie und Anheben eines Elektrons in einen anderen Spin umgangen wurde, kann entstehen (Halliwell und Gutteridge, 1990).

Mengenmäßig bewegt sich der ROI nach Maier et al. in einem Bereich von $1\text{-}10 \mu\text{M}$ Oxidans/ 10^5 Neutrophile/ml in vitro (Maier et al., 1993).

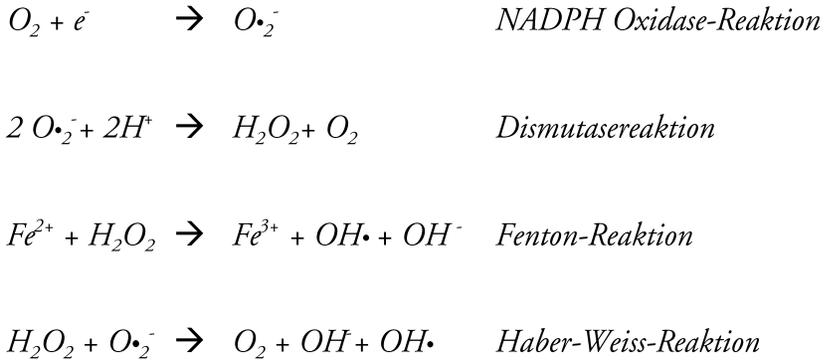


Abbildung 7: Übersicht über die für die Sauerstoffradikalentstehung verantwortlichen Reaktionen

Reaktive Sauerstoffradikale greifen vor allem die mehrfach ungesättigten Fettsäuren von Membranen an. Dadurch verändern sich Membranstruktur und Membraneigenschaften. Es kommt zu einer erhöhten Membranpermeabilität der Lungenzellen. Aus pulmonalen Entzündungszellen können lysosomale Enzyme austreten. Auch Polypeptide und Proteine werden oxidiert, hier insbesondere Sulfhydrylgruppen, was zu Disulfidbrücken und zu einem intra- und extrazellulären Funktionsverlust zahlreicher Enzyme und Proteine führt, zu gestörtem Zellstoffwechsel, sowie zur Ansammlung toxischer Metaboliten. Glykoproteine wie das Kollagen werden verändert und so dem proteolytischen Abbau vermehrt ausgesetzt. Die Oxidation der Nukleinsäuren schließlich führt zu DNA-Schäden und zur Mutagenese. Alle diese Mechanismen sind ursächlich an der suffizienten Immunabwehr durch Entzündungszellen beteiligt, eben diese Mechanismen tragen aber bei der fibrosierenden Alveolitis vermutlich zur Schädigung körpereigenen Gewebes bei.

Einige Autoren wiesen auf eine verstärkte Sauerstoffradikalbildung pulmonaler Entzündungszellen von asymptomatischen Rauchern und ILF-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen hin. Bereits 1981

veröffentlichten John R. Hoidal et al. Untersuchungen, denen zufolge Alveolarmakrophagen von asymptomatischen Rauchern ex vivo vermehrt Superoxidanionen abgeben. Sie wiesen auch auf eine erhöhte Stimulationsbereitschaft zur ROI-Produktion dieser Zellen durch PMA im Vergleich zum Normalkollektiv hin (*Hoidal et al., 1981*). Clement et al. zeigten anhand von Untersuchungen an BAL-Zellen von 8 Kindern mit interstitieller Lungenerkrankung eine signifikante Erhöhung des Radikalausstoßes der AM von Patienten vor und nach ex vivo Stimulation im Vergleich zu 11 gesunden Kontrollen auf (*Clement et al., 1987*). Untersuchungsergebnisse an erwachsenen Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose wiesen in die gleiche Richtung (*Strausz et al., 1990*).

2.2.4 Antioxidativer Schutz

Ein Schutzmechanismus ist die Superoxiddismutasereaktion selbst, die Superoxidanionen zunächst in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff abbaut. Die spontan ablaufende Dismutasereaktion wird dabei um das 10000-fache gesteigert. Eine Cu,Zn-SOD findet sich im Zytosol, eine Mn-enthaltende SOD in den Mitochondrien (*Fridovich, 1989*).

Katalase wandelt dann Wasserstoffperoxid in Sauerstoff und Wasser um:



Reduziertes Glutathion (GSH_{red}) ist durch seine Sulfhydrylgruppe ein guter Radikalfänger und wird dabei unter Bildung von Disulfidbrücken selbst zu Glutathiondisulfid oxidiert. Da die Bereitstellung eines hohen Anteils an reduziertem Glutathion durch ein ganzes enzymatisches System gewährleistet wird, kann das ganze Enzymsystem als antioxidativer Mechanismus angesehen werden. Die Glutathionperoxidase findet man als Selen-abhängiges Enzym im Intrazellulärraum. Aufgrund seiner Bedeutung für den antioxidativen Schutzmecha-

nismus wird in den nächsten Abschnitten auf das Glutathion und den Glutathionstoffwechsel gesondert eingegangen.

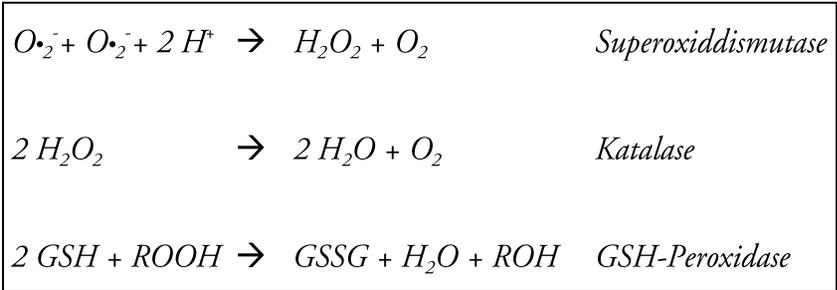


Abbildung 8: Antioxidative Schutzmechanismen

Neben den überwiegend intrazellulären enzymatischen Antioxidantien gibt es auch nicht enzymatische Antioxidantien. Hierzu zählen unter anderen die Ascorbinsäure, Vitamin E und Serumproteine wie Albumin. Ferritin und Lactoferrin binden Eisenionen und entziehen sie somit der Fentonreaktion.

Lungenzellen besitzen eine deutliche Transpeptidaseaktivität. Oxidativer Streß, z. B. durch Hyperoxie oder Ozon oder durch Reaktionen des Körpers auf Strahlung, führten zu einem vermehrten Anfall von Glutathiondisulfid (GSSG), dem oxidierten GSH, und zu einer Glutathionverarmung in verschiedenen Organen. Andererseits fanden sich auch Hinweise auf eine reaktive Hochregulation des Glutathiongehaltes der BALF und des intrazellulären Glutathiongehaltes pulmonaler Zellen 24-48 Stunden nach oxidativem Streß (*Deneke und Fanburg, 1989*).

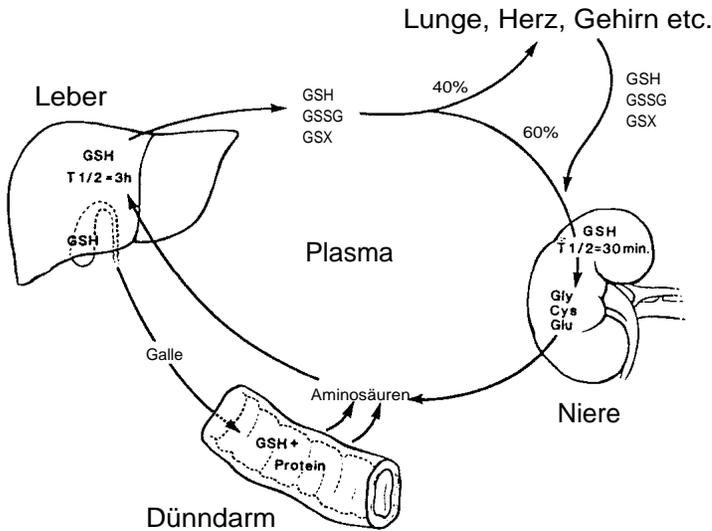


Abbildung 10: Glutathionkreislauf im Organismus (nach *Deneke und Fanburg, 1989*)

2.2.6 Extrazelluläre Glutathionverteilung in der Lunge

Untersuchungen der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und der Lavagezellen von Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen, gesunden Rauchern und nicht rauchenden Kontrollen weisen auf eine zentrale Rolle der Sauerstoffradikalbildung in der Pathogenese der Lungenfibrose und des Glutathions als Antioxidans hin. *Cantin et al.* fanden bei Normalpersonen eine 140-fach höhere Glutathionkonzentration in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen im Vergleich zu gesunden Rauchern und nicht rauchenden Kontrollen.

tration im epithelialen Flüssigkeitsfilm als im Plasma (*Cantin et al., 1987*). 96 % des Glutathions in der ELF lagen in der reduzierten Form vor. Die Mechanismen, die zu diesem Konzentrationsgefälle zwischen Plasma und Lunge führen, sind noch nicht bekannt.

2.2.7 Intrazellulärer Glutathionstoffwechsel

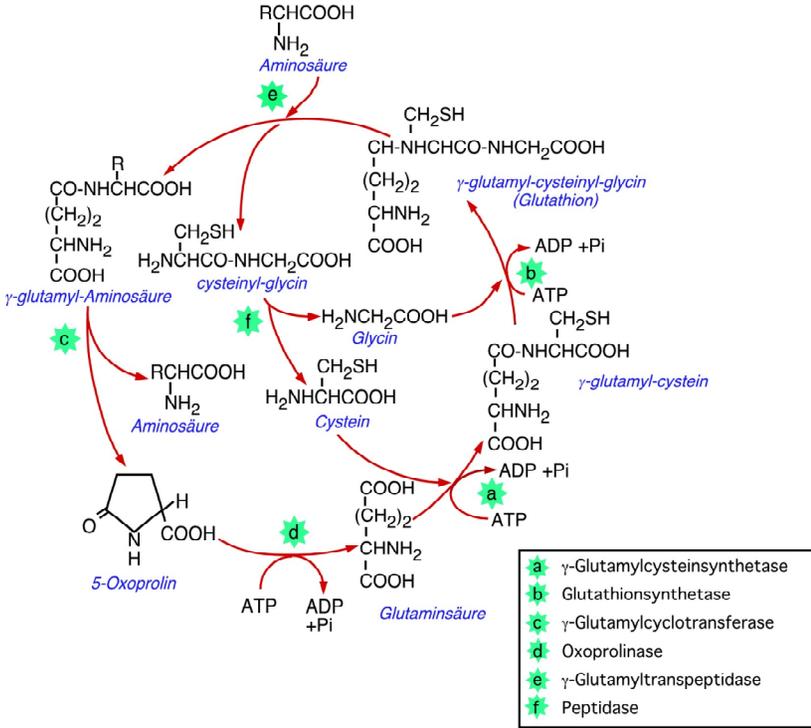


Abbildung 11: Glutathionsynthesezyklus (nach Deneke und Fanburg, 1989)

Abhängig vom Ausgangsgewebe liegt der normale Glutathiongehalt der Zelle bei etwa 0,5-10 mM (*Cantin und Begin, 1991*). Die Regulation erfolgt über den γ -Glutamylzyklus, der teils extrazellulär, teils intrazellulär abläuft. Die Aufnahme der Substrate der intrazellulären Glutathionsynthese kann durch direkte Aminosäureaufnahme oder über die γ -Glutamyltranspeptidase-Reaktion erfolgen. Dabei wird ein γ -Glutamylrest von extrazellulärem Glutathion auf eine Ami-

nosäure transferiert und dann in die Zelle transportiert. Ist die anbindende Aminosäure bei Aufnahme in die Zelle kein Cystein, muß diese über das Enzym γ -Glutamylcyclotransferase abgespalten werden. Aus 5-Oxoprolin entsteht dann unter ATP Verbrauch Glutaminsäure. Über die γ -Glutamylcysteinsynthetase wird dann aus Glutaminsäure und Cystein γ -Glutamylcystein synthetisiert. Über die Gluthationsynthetase und unter Bindung an Glycin entsteht γ -Glutamylcysteinylglycin (= Glutathion). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird durch die γ -Glutamyl-cysteinsynthetase katalysiert, die einer Feedbackregulation durch Glutathion unterliegt (Deneke und Fanburg, 1989).

2.2.8 Intrazelluläre oxidative Mechanismen

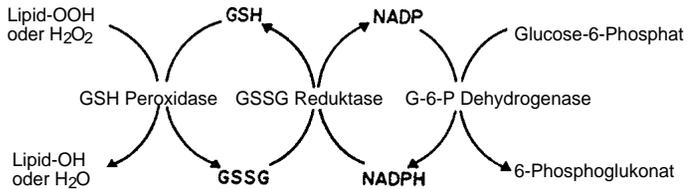


Abbildung 12: Regulation des intrazellulären Glutathiongleichgewichtes (nach Deneke und Fanburg 1989)

99 % des intrazellulären Glutathions liegen in der reduzierten Form vor. Abbildung 12 zeigt die Regulation dieses Gleichgewichtes. H₂O₂ oder Lipidperoxide werden mittels der Glutathion-Peroxidase-Reaktion reduziert. Dabei entstehendes Glutathiondisulfid wird nun in einer NADPH-abhängigen Reaktion wieder reduziert. Das Gleichgewicht liegt dabei wie bereits erwähnt zu 99 % auf der Seite des reduzierten Glutathions. NADPH wird aus dem Pentose-Phosphatweg regeneriert. Die Regulation des intrazellulären

Glutathiongehaltes und des Transportes von Glutathion in den Extrazellulärraum ist komplex und unterliegt zahlreichen, z. Zt. noch nicht vollständig erforschten Mechanismen.

Durch Bildung gemischter Disulfide entstehen Verbindungen, die sich der GSSG-Reduktase vermittelten Reaktion entziehen. Auch durch den Transport von intrazellulärem Glutathion aus der Zelle über die GSH-Transferase-Reaktion, z. B. bei der Inaktivierung von Steroiden, kommt es zu einem intrazellulären Glutathionverlust.

Unter oxidativem Streß wird vor allem GSSG in den Extrazellulärraum sezerniert. Sonst handelt es sich eher um reduziertes Glutathion, das von den Zellen, insbesondere Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und Epithelzellen abgegeben wird (*Cantin und Begin, 1991*).

2.3 Zusammenfassung und Fragestellung

Viele klinische Parameter und Befunde technischer Untersuchungen wie z. B. das Röntgenbild des Thorax korrelieren nur wenig mit Krankheitsprognose und -verlauf. Eine Gesamtzellzahlerhöhung alleine scheint kein ausreichendes diagnostisches Kriterium zu sein, wohingegen eine BALF-Granulozytose ein prognostisch ungünstiger, auf die Entstehung einer Fibrose hinweisender Faktor ist. Die weitere Aufklärung pathogenetischer Mechanismen ermöglicht die Entwicklung gezielter neuer Therapieansätze zur Verbesserung oder Ergänzung der bisherigen nebenwirkungsreichen immunsuppressiven Therapie.

Pathophysiologisch sind Lungengerüsterkrankungen durch eine Alveolitis gekennzeichnet, die zu einer Schädigung und Fibrosierung des Lungenparenchyms führt. Sowohl Alveolarmakrophagen als auch neutrophile Granulozyten besitzen die Fähigkeit, reaktive Sauerstoffmetaboliten zu bilden, wie dies unter physiologischen Bedingungen zur Keimabwehr sinnvoll ist. Gleichzeitig findet sich in der BALF von gesunden Probanden eine im Vergleich zum Blut circa 100-fach erhöhte Glutathionkonzentration, von der man annimmt, daß sie

als antioxidatives Schutzschild der Lunge fungiert. Eine Schlüsselrolle kommt dem Glutathionsystem zu, da die anderen antioxidativen Substanzen wie z. B. Ascorbinsäure quantitativ unterlegen sind und zum Teil durch das Glutathionsystem regeneriert werden.

In der von der Wilhelm Sander-Stiftung geförderten Studie „Pathogenetische Bedeutung von Störungen des Oxidantien/Antioxidantien-Gleichgewichtes bei Lungengerüsterkrankungen“ wurde die Frage untersucht, inwieweit reaktive Sauerstoffmetaboliten tatsächlich zur Fibroseentstehung beitragen, inwieweit eine Störung des Oxidantien/Antioxidantien-Gleichgewichtes bei der ILF besteht und welche tatsächliche pathogenetische Bedeutung dies gegebenenfalls besitzt. Der Bezug der Untersuchungsergebnisse zur Klinik und neue spezifischere Prognosekriterien sollten erarbeitet werden.

Die Aufgabenstellung für die vorliegende Arbeit lässt sich wie folgt zusammenfassen:

- Etablierung einer Methode, die die extrazelluläre biologische Wirksamkeit der Sauerstoffradikale in der Lunge ex vivo simuliert.
- Messung des Ausmaßes der Radikalbildung pulmonaler Entzündungszellen bei interstitiellen Lungenerkrankungen als möglicher funktioneller Beitrag zur Fibroseentstehung.
- Bestimmung der oxidativen Aktivität der Alveolarmakrophagen.
- Evaluierung des möglichen Beitrages oxidativer Pathomechanismen zur Entstehung interstitieller Lungenerkrankungen.

3 Methodik

3.1 Untersuchungskollektiv

Es wurden insgesamt 71 Personen untersucht. Von 21 Kontrollpersonen waren fünf Raucher und wurden deshalb getrennt beurteilt; die übrigen 16 Probanden waren gesunde Nichtraucher. Alle untersuchten Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung wenigstens ein Jahr lang Nichtraucher. Sowohl Patienten als auch Kontrollpersonen unterzogen sich einer internistischen körperlichen Untersuchung und einer Lungenfunktionsprüfung. Die Durchführung der Bronchoskopien und der BAL erfolgte nach den von der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie beschriebenen Richtlinien (*Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, 1993*).

	Kotrol- len NR	Kontrol- len R	ILD	subklin. ILD	Sar- koido- se	EAA v. Expo	EAA n. Expo	Ltx/ HLTx
Fall- zahl	16	5	24	4	7	1	6	8
w/m	6/10	4/1	17/7	4/0	4/3	0/1	0/6	6/2
Alter ± SD	31,2 ± 10,5	40,2 ± 13,3	57,2 ± 10,4	54,5 ± 9,2	49,3 ± 14,2	27	40,8 ± 15,4	36,4 ± 13,3

Tabelle 2: Übersicht über die untersuchten Kontrollpersonen und Patienten

3.1.1 Kontrollpersonen

Die Kontrollgruppe setzte sich einerseits aus Studenten und Beschäftigten der I. Medizinischen Klinik des Klinikum Großhadern, andererseits aus Patienten zusammen, bei denen zur Abklärung einer fraglichen pulmonalen Erkrankung, wie z. B. bei einem Tumorverdacht, eine diagnostische Lavage und Biopsien durchgeführt wurden, die jedoch keinen pathologischen Befund ergaben. Die untersuchten

Kontrollpersonen wurden hinsichtlich pulmonaler Erkrankungen in der Vorgeschichte, Allergien und Zeichen einer pulmonalen Insuffizienz befragt. Einschlusskriterien waren eine blande Vorgeschichte, eine unauffällige körperliche Untersuchung, unauffällige Standardhauttests und eine unauffällige Lungenfunktionsanalyse. Das mittlere Alter der Kontrollpersonen lag bei 31,2 Jahren; die jüngste Kontrollperson war zum Untersuchungszeitpunkt 23 Jahre, die älteste 61 Jahre alt. Lavagiert wurden nach Möglichkeit Mittellappen, Oberlappen und Lingula mit jeweils 100 ml physiologischer Kochsalzlösung, die Recovery wurde gepoolt und weiterverarbeitet. Das Kollektiv bestand aus zehn Frauen und elf Männern, wobei eine Frau im Abstand von zwei Monaten zweifach untersucht wurde. Hierbei wurde auch nur jeweils der Mittellappen lavagiert. Bei zwei Kontrollpersonen wurden lediglich Oberlappen und Lingula, bzw. Mittellappen und Lingula lavagiert (Tabelle 3). Zwei Frauen und drei Männer der untersuchten Kontrollpersonen waren Raucher und werden im Weiteren immer gesondert betrachtet.

Name	Datum	Nikotin	Alter	w/m	BAL-Ort	BAL-Vol.
R.U.	10.05.93	0	32	w	ML	100
R.U.	10.07.93	0	32	w	ML	100
M.	22.07.93	0	61	w	ML,OL,Li	300
V.L.	10.08.93	0	20	m	ML,OL,Li	300
S.A.	12.08.93	0	27	m	ML,OL,Li	300
B.S.	19.08.93	0	33	m	ML,OL,Li	300
T.M.	09.09.93	0	24	m	ML,OL,Li	300
M.-G.	03.11.93	0	24	m	ML,OL,Li	300
N.A.	23.11.93	0	23	w	ML,OL,Li	300
W.M.	30.11.93	0	28	w	ML,OL,Li	300
W.C.	07.12.93	0	24	w	ML,OL,Li	300
S.M.	16.12.93	0	48	w	ML,OL,Li	300
F.P.	17.02.94	0	39	m	ML,OL,Li	300
S.P.	07.03.94	0	27	w	ML,OL,Li	300
K.S.	28.03.94	0	29	w	ML,OL,Li	300
L.M.	06.04.94	0	28	m	ML,OL,Li	300
deR.P.	30.06.94	0	32	m	ML,OL,Li	300
F.B.	25.05.93	1	24	w	ML,OL,Li	300
L.C.	03.08.93	1	56	m	OL,LI	200
L.D.	03.08.93	1	45	m	ML,OL,Li	300
A.W.	26.08.93	1	29	w	ML,Li	200
M.M.	25.01.94	1	47	m	ML,OL,Li	300

Tabelle 3: Kontrollkollektiv (ML = Mittellappen, OL = Oberlappen, Li = Lingula)

3.1.2 Patienten mit interstitieller Lungenerkrankung

Die Diagnose einer idiopathischen Lungenfibrose wurde nach Ausschluß typischer Differentialdiagnosen anhand pathologischer Befunde in der Lungenfunktion, Veränderungen im Röntgenbild des Thorax und im hochauflösenden CT, sowie durch histologische Aufarbeitung transbronchialer oder offener Lungenbiopsien gestellt. Eine Erhöhung der Gesamtzellzahl in der BALF und ein pathologischer Befund in der BALF-Zellendifferenzierung wurden als Hinweis auf eine Alveolitis gewertet und insbesondere zur Beurteilung der entzündlichen Aktivität herangezogen.

Bei gesicherter Kollagenose wurde neben einer entsprechenden Klinik und eventuell auffälligen Befunden im Röntgenbild des Thorax/HR-CT eine pathologische Lungenfunktion und eine pathologische Zelldifferenzierung oder eine Erhöhung der Gesamtzellzahl in der BALF gefordert, um von einer manifesten pulmonalen Beteiligung ausgehen zu können.

Da man ungeachtet der Grunderkrankung und der klinischen Unterschiede annimmt, daß es sich bei der Fibroseentstehung um ein und dieselbe pathophysiologische Endstrecke handelt, wurden Patienten mit der Diagnose idiopathische Lungenfibrose (ILF) und mit pulmonaler Beteiligung bei Kollagenosen in einem Kollektiv der interstitiellen Lungenerkrankungen (ILD) zusammengefaßt und gemeinsam ausgewertet. Das mittlere Alter der Patienten in dieser Gruppe lag bei 57,3 Jahren; die jüngste Patientin war zum Untersuchungszeitpunkt 36 Jahre alt, die älteste 71 Jahre. Es handelte sich um 17 Frauen und sieben Männer. Eine Patientin wurde im Verlauf von einem Jahr dreimal lavagiert, eine Patientin wurde nach vier Monaten relavagiert und ein Mann wurde ebenfalls im Laufe von einem Monat erneut untersucht. Die Gruppe der Patienten mit interstitieller Lungenerkrankung setzt sich aus elf Patienten mit ILF, zehn Patienten mit PSS, einer Patientin mit RA, einer Patientin mit Polymyositis sowie einer Patientin mit LE zusammen. Acht Patienten erhielten zum Untersuchungszeitpunkt bereits eine immunsuppressive Therapie mit Prednisolon oder Methylprednisolon; drei Patienten nahmen ACC 600 mg/die ein. Eine Patientin mit PSS erhielt seit einem Jahr vor dem Untersuchungstermin eine gamma-Interferontherapie. Eine Patientin mit PSS nahm ein nichtsteroidales Antiphlogistikum (Indometacin) ein. In der Lungenfunktionsanalyse reichten die Veränderungen von geringen Einschränkungen der Diffusionskapazität, geringer Lungenrestriktion und Hypoxämie bis hin zu schweren pulmonalen Einschränkungen mit schwerer Hypoxämie in Ruhe und einer hochgradigen Restriktion, die zum Teil eine Diffusionmessung im single breath-Verfahren unmöglich machte. (Tabelle 4)

Name	Datum	Alter	w/ m	BAL-Ort	BAL-Vol.	Diagnose
B.M.	18.05.93	69	w	Li	100	ILF
P.G.	25.05.93	72	w	ML,OL,Li	300	PSS
G.A.	22.06.93	68	w	ML	100	RA
B.E.	29.06.93	54	w	ML,OL,Li	300	Polymyo- sitis
G.H.	08.07.93	54	w	ML,OL,Li	300	PSS
B.G.	03.08.93	59	m	ML,OL,Li	300	ILF
B.U.	17.08.93	60	w	ML,OL,Li	300	PSS
B.M.	02.09.93	69	w	Li	100	ILF
B.G.	23.09.93	59	m	ML,OL,Li	300	ILF
B.E.	05.10.93	55	w	ML,OL,Li	300	Polymyo- sitis
J.V.	26.10.93	68	w	ML,Li	200	PSS
C.A.	26.10.93	70	m	ML,OL,Li	300	ILF
M.M.	09.11.93	59	w	ML,Li	200	ILF
W.E.	13.01.94	71	w	ML,OL,Li	300	ILF
S.M.	20.01.94	70	w	ML,Li	200	ILF
H.J.	27.01.94	60	m	ML,Li	200	PSS
H.W.	17.02.94	60	w	ML,OL,Li	300	LE
H.E.	17.03.94	44	w	ML,OL,Li	300	PSS
A.N.	29.03.94	49	m	ML,OL,Li	300	PSS
H.A.	14.04.94	36	w	ML,OL,Li	300	PSS
T.J.	28.04.94	45	m	ML,OL,Li	300	ILF
K.A.	03.05.94	42	w	ML,OL,Li	300	ILF
B.C.	07.06.94	54	w	ML,OL,Li	300	ILF
B.E.	09.06.94	55	w	ML,OL,Li	300	Polymyo- sitis
S.I.	14.06.94	52	w	ML,OL,Li	300	PSS
E.N.	23.06.94	54	m	ML,Li	200	ILF
H.H.	28.06.94	48	m	ML,OL,Li	300	PSS
W.C.	26.07.94	54	w	ML,OL,Li	300	ILF

Tabelle 4: Patientenkollektiv mit der Diagnose ILD
(ML = Mittellappen, OL = Oberlappen, Li = Lingula)

3.1.3 Patienten mit subklinischer Alveolitis bei Bindegeweberkrankungen

Bei vier Patienten war die jeweilige Grunderkrankung gesichert, in der Lungenfunktionsanalyse und im Röntgenbild des Thorax ergab sich allerdings kein pathologischer Befund. Die Differenzierung der BALF-Zellen ergab jedoch ein entzündliches Zellbild ohne Anhalt für eine Infektion. Es wurde daher von einer subklinischen Alveolitis ausgegangen und die Patienten in eine engmaschige pneumologische Kontrolle eingebunden. Es handelte sich hier ausschließlich um Frauen im Alter zwischen 45 und 67 Jahren. Zweimal lag die Diagnose progressive systemische Sklerodermie, einmal systemischer Lupus erythematodes und einmal Sharp-Syndrom zugrunde. Die Patientin mit LE wurde aufgrund des übrigen Organbefundes mit Ciclosporin behandelt.

Name	Datum	Alter	w/m	BAL-Ort	BAL-Vol.	patholog. Lufu	Diagnose
K.T.	22.06.93	67	w	ML	100	0	Sharp-S.
W.R.	24.08.93	52	w	ML,OL,Li	300	0	PSS
K.H.	23.09.93	54	w	ML,OL,Li	300	0	PSS
D.R.	04.11.93	45	w	ML,OL,Li	300	0	LE

Tabelle 5: Patienten mit subklinischerILD
(ML = Mittellappen, OL = Oberlappen, Li = Lingula)

3.1.4 Sarkoidose

Die Diagnose „pulmonale Sarkoidose“ wurde aufgrund charakteristischer Veränderungen des Röntgenbildes, ggf. einer pathologischen Lungenfunktion und einer Lungenbiopsie, die mit einer Sarkoidose vereinbar ist, nach Ausschluß möglicher Differentialdiagnosen gestellt. Wegweisend war außerdem ein erhöhtes CD4/CD8 Verhältnis in der BALF. Das mittlere Alter lag bei 49,3 Jahren; die jüngste Patientin war zum Untersuchungszeitpunkt 20 Jahre, der älteste Patient

63 Jahre alt. Drei Patienten waren männlichen, drei weiblichen Geschlechtes. Nach radiologischen Kriterien waren alle sieben Patienten dem Stadium II der Sarkoidose zuzuordnen, d. h., es ließen sich im Röntgenbild des Thorax neben vergrößerten Hiluslymphknoten streifige und netzige Verschattungen als Hinweis auf eine interstitielle granulomatöse Entzündung nachweisen (Hahn, 1990; Wurm, 1958; DeRemee, 1983).

Name	Datum	Alter	w/m	BAL-Ort	BAL-Vol.	patholog. Lufu
N.K.	16.09.93	45	m	ML,Li	200	0
G.A.	28.10.93	57	w	ML,OL,Li	300	1
S.W.	23.11.93	55	m	ML,OL,Li	300	0
S.H.	25.01.94	63	w	OL,Li	200	1
O.E.	24.03.94	56	w	ML,OL,Li	300	1
H.S.	07.04.94	20	w	ML,OL,Li	300	1
K.P.	10.05.94	49	m	ML	100	0

Tabelle 6: Patienten mit Sarkoidose (ML = Mittellappen, OL = Oberlappen, Li = Lingula)

Pathologische Lungenfunktionswerte wiesen vier Patienten auf. Eine immunsuppressive Therapie mit Prednisolon erhielt zum Zeitpunkt der Untersuchung ein Patient.

3.1.5 Exogen allergische Alveolitis vor und nach Exposition

Es wurden die Bronchiallavagen von sechs Patienten mit exogen allergischer Alveolitis untersucht. Ein Patient (Vogelhalter) wurde vor der Expositionsuntersuchung, am selben Tag nach Exposition mit einem standardisierten Allergen und 19 Tage nach diesen Untersuchungen nach häuslicher Expositionstestung lavagiert. Ein weiterer Patient (V. a. Farmerlunge) wurde ebenfalls im Verlauf zuerst mit Allergen vom eigenen Hof und anschließend mit standardisiertem Taubenallergen getestet. Auf die Exposition mit standardisiertem Material erfolgte auch klinisch eine pulmonale und systemische Reaktion. Es handelte sich ausschließlich um männliche Patienten mit

einem mittleren Alter von 40,8 Jahren. Der Älteste war 67 und der Jüngste 27 Jahre alt. Grundsätzlich erfolgte die Exposition beim Verdacht auf EAA ohne immunsuppressive Therapie. Eine pathologische Lungenfunktion vor Exposition wies ein Patient auf. Bei allen Patienten wurde nach der Exposition in Zusammenschau der Klinik, der BALF-Zytologie, des Blutbildes und der Lungenfunktionstestung eine EAA diagnostiziert (*Vogelmeier et al., 1987; Vogelmeier et al., 1988*).

Name	Datum	Alter	w/m	BAL-Ort	BAL-Vol.	Diagnose	patholog. Lufu
F.M.	15.06.93	27	m	ML,OL,Li	300	EAA v E	1
F.M.	17.06.93	27	m	ML,OL,Li	300	EAA n E	1
O.R.	06.07.93	67	m	OL,Li	200	EAA, E	0
F.M.	06.07.93	27	m	ML,OL,Li	300	EAA, n E	1
H.A.	14.09.93	45	m	ML,OL,Li	300	EAA, E	0
W.W.	25.01.94	31	m	ML,OL,Li	300	EAA, E	0
G.F.	22.02.94	47	m	ML,OL,Li	300	EAA, E	0
A.W.	08.03.94	28	m	ML,OL,Li	300	EAA, E	0
G.F.	15.03.94	47	m	ML,OL,Li	220	EAA, E	0

Tabelle 7: Patienten mit EAA. Die Lungenfunktionsparameter wurden vor der Exposition erhoben. (ML = Mittellappen, OL = Oberlappen, Li = Lingula, vE = vor Exposition, nE = nach Exposition, E = Exposition, 1 = vorhanden, 0 = nicht vorhanden)

3.1.6 Patienten nach Lungen- oder Herzlungentransplantation

Untersucht wurden 8 Patienten. Es handelte sich um zwei Männer und sechs Frauen; das mittlere Alter lag bei 36,4 Jahren. Der jüngste Patient war 22 Jahre, der älteste Patient 62 Jahre alt. Bei sechs von ihnen handelte es sich um eine Herzlungentransplantation (HLTx), bei einem Patienten um eine Doppellungentransplantation (DLTx) und bei einer Patientin um die Transplantation eines Lungenflügels (SLTx). Zwei der Patienten wurden im Verlauf untersucht. Bei einem der Patienten kam es im Verlauf zu einer Abstoßungsreaktion bei gleichzeitiger CMV-Infektion. Die immunsuppressive Therapie bestand aus Ciclosporin, Steroiden und Azathioprin in unterschiedli-

chen Dosierungen. Der Patient mit CMV-Infektion wurde zu diesem Zeitpunkt wegen rezidivierender Abstoßungen mit FK506 behandelt.

Name	Datum	Alter	w/ m	BAL-Ort	BAL-Vol.	OP
M.B.	12.08.93	27	w	ML,Li	200	HLTx
S.A.	14.09.93	44	w	ML,Li	200	HLTx
S.M.	12.10.93	25	w	ML,Li	200	HLTx
M.B.	22.10.93	27	w	ML,OL,Li	300	HLTx
P.D.	04.11.93	62	w	OL,Li	160	SLTx
S.K.	07.07.93	22	w	ML,OL,Li	300	HLTx
E.R.	13.01.94	33	w	ML,OL,Li	300	HLTx
W.H.	27.01.94	33	m	Li	100	DLTx
W.H.	27.01.94	33	m	ML,OL	200	DLTx
W.H.	23.06.94	34	m	ML,LI	200	DLTx
M.B.	21.04.94	27	w	ML,OL,LI	300	HLTx
H.F.	16.06.94	45	m	Li	100	HLTx

Tabelle 8: Patienten nach Lungen- oder Herzlungentransplantation
(ML = Mittellappen, OL = Oberlappen, Li = Lingula)

3.2 Lungenfunktionsanalyse

Die Lungenfunktionsanalysen wurden im Lungenfunktionslabor der Pneumologischen Abteilung der Medizinischen Klinik I des Klinikum Großhadern durchgeführt.

Die spirometrischen Untersuchungen (Vitalkapazität und Einsekundenkapazität = FEV₁) erfolgten im offenen System an einem Pneumotachographen. Bestimmt wurde außerdem das Residualvolumen mit einer Fremdgasverdünnungsmethode unter Verwendung von 8 % Helium in Raumluft. Die Totalkapazität setzt sich aus Vitalkapazität und Residualvolumen zusammen und wurde ganzkörperplethysmographisch gemessen. Dabei wurde das Residualvolumen bei maximaler Expiration gemessen und ein inspiratorisches VK-Manöver durchgeführt, so daß die gesamte Lungenkapazität erfaßt wurde. In der Regel wurde die Diffusionskapazität mittels der single breath-Methode unter Einatmung eines Gasgemisches mit 0,2 %

Kohlenmonoxid und 8 % Helium in Raumluft bestimmt. Lag die Vitalkapazität allerdings unter 1,8 l, kommt es bei dieser Methode zu falsch hohen Werten. Hier mußte mit dem gleichen Gasgemisch im steady state-Verfahren gemessen werden. Welche Methode verwendet wurde, wird jeweils angegeben. Der Atemwegswiderstand, die spezifische Resistance und das intrathorakale Gasvolumen wurden ganzkörperplethysmographisch bestimmt. Geräte und Software stammten von der Fa. Jäger in Würzburg (MasterLab-Body).

Die Blutgase, d. h. Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck sowie pH-Wert wurden im arterialisierten Kapillarblut aus dem Ohrläppchen in Ruhe und bei Belastung mit dem Fahrradergometer gemessen. Die Belastungsstufe richtete sich nach der Altersgruppe und dem Geschlecht und sollte idealerweise 70 % der Sollbelastung betragen. Bei den Patienten wurde dies nach Belastbarkeit und im Vergleich zu eventuell bereits vorhandenen Voruntersuchungen variiert.

Die Lungenvolumina und die single breath-Diffusionsbestimmung wurden mit Referenzwerten der Europäischen Gesellschaft für Kohle und Stahl verglichen (*European Community of Coal and Steel, 1983*). Die Diffusionsbestimmung nach der steady state-Methode wurden mittels laboreigener Normwerte beurteilt, der Blutgasanalyse wurden die Tabellen von Ulmer zugrundegelegt (*Ulmer et al., 1983*). Als oberer Grenzwert für den Atemwegswiderstand gilt $0,3 \text{ kPa} \cdot \text{s} \cdot \text{l}^{-1}$.

Bei begleitender Bronchialobstruktion wurden die Diffusionskapazität und die forcierten Atemmanöver nach erfolgter Bronchodilatation zur Beurteilung herangezogen.

3.3 Zellgewinnung und bronchoalveoläre Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde nach den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie durchgeführt (*Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, 1993*). Es wurde eine Lokalanästhesie mit 1 % Oxybuprocain-Hydrochlorid-Lösung (Novesine 1 %, Wander, Nürnberg) inhalativ über einen Vernebler verabreicht. Neben der Sauerstoffgabe von 2-4 l/min wurden 0,5 mg Atropinsulfat i. v.

(Atropin, Braun Melsungen.), Midazolam 0,02-0,1 mg/kg/KG i. v. (Dormicum, Hoffmann La Roche, Grenzach-Wyhlen) und 7,5 mg Hydrocodon s. c. (Dicodid, Knoll, Ludwigshafen) gegeben. Die Untersuchungen wurden in der Abteilung für Pneumologie der I. Med. Klinik des Klinikum Großhadern mit flexiblen Bronchoskopen der Fa. Pentax und Fa. Olympus durchgeführt. Nach Inspektion des Bronchialsystems wurde in erster Linie ein Segment des Mittellappens fünfmal mit jeweils 20 ml steriler Kochsalzlösung gespült und rasch abgesaugt. Wenn möglich erfolgte auch die Spülung jeweils eines Segmentes der Lingula und des Oberlappens. Die abgesaugte Lava-geflüssigkeit (BALF) wurde in sterilen Polystyrolröhrchen (EIKay, Boston, USA) aufgefangen und unverzüglich weiterverarbeitet.

Nach Filtration der BALF durch doppelagige Verbandsgaze zur Entfernung von Schleimpartikeln, wurde das wiedergewonnene Volumen (Recovery) gemessen und dann über 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert und dekantiert. Der Überstand wurde nochmals mit 3000 U über 10 Minuten zentrifugiert, erneut dekantiert und vor dem Einfrieren bei minus 20, bzw. minus 80 Grad Celsius wurden mehrere Aliquots für die sofortige GSSG- und Gesamtglutathionbestimmung abgenommen.

Zur Präparation der bronchoalveolären Zellen wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen und anschließend nochmals 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Danach wurde mit einer definierten Menge einer PBS resuspendiert und die Gesamtzellzahl mit Hilfe eines Coulter-Counters (T540, Coulter Electronics GmbH, Krefeld) bestimmt. Erythrozyten wurden ggf. lysiert (Lyse ST, Coulter Electronics, Krefeld). Die Zellsuspension wurde sodann mit PBS auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt, um die Entnahme definierter Zellmengen zu erleichtern.

Zur Bestimmung der Viability wurden 100 μ l der Zellsuspension mit 150 μ l 1 % Trypanblaulösung vermischt, fünf bis zehn Minuten inkubiert und in einer Zählkammer ausgezählt. Intakte Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, wohingegen sich das zelluläre Protein defekter Zellen blau anfärbt. Es wurden je zwei Kammern auf zwei Zähl-

kammerplatten ausgezählt. Die Viability errechnet sich nach der Formel:

$$Viability = \frac{\text{Anzahl ungefärbter Zellen} \cdot 100}{\text{Gesamtzellzahl in Kammer}} \quad [\%]$$

Da ein Teil der Zellen für ex-vivo Kulturen verwendet wurde, erfolgten alle Arbeitsschritte an einer Laminar-Flow-Arbeitsbank (Typ Enviroco, CEAG, D-Dortmund).

3.3.1 Differentialzellbild

Von der BALF-Zellsuspension wurden Aliquots von 50 µl und 100 µl abgenommen und in den Zytozentrifugentrichter (Shandon GmbH, Frankfurt) pipettiert. Nach Zentrifugation bei 300 g über fünf Minuten erhielt man Zytozentrifugenpräparate, die nach 20 minütiger Trocknung bei Raumluft unter Verwendung einer May-Grünwald-Giemsä-Färbung (Merck, Darmstadt) in einem Färbeautomaten (Vari-stain 4, Shendon, Frankfurt) angefärbt wurden. Alternativ wurden die Präparate nach vierminütiger Färbung mit May-Grünwald-Lösung mit destilliertem Wasser gespült und die Präparate anschließend 15 Minuten in die Giemsalösung (Merck, Darmstadt), die 1 : 20 mit destilliertem Wasser verdünnt war, getaucht. Danach wurde mit Aqua dest. gespült, das Präparat trocknete an der Raumluft aus und wurde mit einem Tropfen Eukitt (Kindler GmbH & Co., Freiburg) und einem Deckglas versiegelt. Sodann wurden 600 Zellen lichtmikroskopisch ausgezählt (Axiophot, Zeiss, Oberkochen) und differenziert. Der Anteil von Alveolarmakrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, sowie von Mastzellen und Lymphozyten wurde in Prozent angegeben. Die Bestimmungen der Gesamtzellzahl, der Viability und des Differentialbildes wurden im Labor Prof. Dr. med. vet. Krombach von Frau Annemarie Allmeling im Institut für Chirurgische Forschung durchgeführt.

3.3.2 Messung der Gesamtglutathionkonzentration in der bronchoalveolären Lavage

Aus den nach Zentrifugation frisch abgenommenen BALF-Aliquots wurde das Gesamtglutathion basierend auf einer Methode von Sies und Akerboom gemessen (*Sies und Akerboom, 1984*).

Dieser kinetische Test beruht einerseits auf einer nicht enzymatischen Reaktion, bei der 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) in einer kontinuierlichen Reaktion durch GSH reduziert wird, was zu einer Farbänderung von klar nach gelb führt. Reduziertes Glutathion wird dabei oxidiert und entstehendes GSSG, welches durch die Glutathionreduktase unter Verbrauch von NADPH wieder zu GSH reduziert wird, führt zu einer weiteren Reduktion von DTNB. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist linear abhängig von der Glutathionkonzentration im Testansatz. Die Absorptionsänderung in Abhängigkeit von der Zeit kann spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm gemessen werden und erlaubt so die Berechnung der in der Lösung vorliegenden Gesamtglutathionkonzentration ($\text{GSH}_{\text{red}} + 2 \cdot \text{GSSG}$).

Folgende Reagenzien wurden angesetzt:

- Natriumphosphatpuffer: NaH_2PO_4 50 mM (Merck, Darmstadt), EDTA 1,0 mM (Sigma, Deisenhofen), Na_2HPO_4 75 mM (Merck, Darmstadt), pH 7,0
- Ellmanns Reagenz: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoesäure) 1,5 mg/ml (Serva, Heidelberg), frisch angesetzt in Natriumphosphatpuffer; das entspricht einer 3,8 mM Lösung.
- NADPH-Lösung: NADPH 0,2 mM (Boehringer, Mannheim GmbH) in 0,5 % NaHCO_3
- Glutathionreduktaselösung: 5 U/20 μl (Sigma, Deisenhofen) in Natriumphosphatpuffer

- Interner GSH-Standard: GSH 50 μM (Boehringer Mannheim GmbH) in Natriumphosphatpuffer

Der Natriumphosphatpuffer hatte Zimmertemperatur, die übrigen Lösungen wurden auf Eis gelagert. 20 μl der Glutathionreduktaselösung laut Pipettierschema entsprachen 5 U/Ansatz. Es wurden jeweils Dreifachwerte angesetzt und gemessen.

Küvetten	1	2	3	4	5	6
NaPi-Puffer [μl]	1000	1000	1000	980	980	980
NADPH-Lösung [μl]	50	50	50	50	50	50
Reduktase-Lösung [μl]	20	20	20	20	20	20
Probe [μl]	100	100	100	100	100	100
Standardlösung [μl]	-	-	-	20	20	20
DTNB-Lösung [μl]	20	20	20	20	20	20

Tabelle 9: Pipettierschema für die kinetische Messung der Gesamtglutathionkonzentration

Nach guter Durchmischung wurden die Röhrchen 15 Minuten bei 25 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert und die Reaktion dann unter Zugabe von 20 μl der DTNB-Lösung gestartet. Die Endkonzentration des Ellmanns Reagenz im Ansatz betrug 63,5 μM .

Nach kurzem Mischen wurde sofort die Zunahme der Absorption bei 412 nm in einminütigen Intervallen über fünf Minuten gemessen (Lambda 19 Spektrometer, Perkin Elmer, D-Überlingen). Die erste der Messungen wurde jeweils verworfen, von den restlichen Messungen die Mittelwerte errechnet und die Konzentration des Gesamtglutathion in der BALF anschließend nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Interner Standard} = \text{Mittelwert } \Delta A_{(4-6)} - \text{Mittelwert } \Delta A_{(1-3)}$$

$$\frac{MW \Delta A_{(1-3)} \cdot 0,84 \cdot 11,9}{\text{Interner Standard}} = \text{Gesamtglutathion} \quad [\mu M]$$

Als interner Standard wurde eine Glutathionkonzentration im Ansatz von 0,84 μM verwendet. Die Verdünnung der BALF-Probe durch den Testansatz der Messung selbst betrug 11,9. $\Delta A_{(1-3)}$ ist die Absorptionsänderung durch die BALF-Probe.

Das Gesamtglutathion im Ansatz setzt sich aus dem Glutathiondisulfid und dem reduzierten Glutathion zusammen, wobei GSSG mit dem Faktor 2 geht, weil es aus zwei GSH_{red} -Molekülen besteht.

$$GSH_{ges} = GSH_{red} + 2 GSSG$$

Die Konzentrationsangaben erfolgten entsprechend einer Empfehlung von Baughman und Rennard in nMol pro ml BALF, da die bisher bekannten Korrekturmethode für die Verdünnung der ELF durch die Lavageflüssigkeit z. B. durch Permeabilitätsunterschiede im Lungengewebe gestört sein können (Rennard et al., 1986; Gorin et al., 1979; Gehr et al., 1978; Untersee et al., 1971; Baughman et al., 1999).

3.3.3 Messung von oxidiertem Methionin in den Proteinen der BALF

Die Bestimmung des oxidierten Methionins (Met(O)) in den BALF-Proteinen wurde nach der von Maier et al. beschriebenen Methode durchgeführt. 2 ml der bei -20 °C eingefrorenen BALF-Proben wurden drei Stunden lang bei 4 °C gegen entionisiertes Wasser dialysiert, lyophilisiert und in 840 μl 75 % stickstoffgesättigter Ameisensäure gelöst. Nach Zugabe von Bromcyan (CNBr, Rockford, Ill. USA) bis zu einer Endkonzentration von 0,2 M wurden die Proben bei Raumtemperatur in einer 100 % Stickstoffatmosphäre 24 Stunden lang inkubiert. Unter Lichtabschluß erfolgt dabei zu 99 % die Umwandlung

von Methionin in Homoserin und Homoserin Lakton. Methioninsulfoxid reagiert dabei nicht. Die mit CNBr vorbehandelten Proteine werden sodann 2x lyophilisiert und anschließend über 48 Stunden mit 6 M HCl in Anwesenheit von 5 mM Dithioerythritol (Merck, Darmstadt) unter Vakuum bei 110 Grad °C hydrolysiert. Met(O) wurde dabei wieder quantitativ zu Methionin reduziert. Die Proben wurden nun mit ortho-Phthalsäurealdehyd (Pierce, Rockford, Ill. USA) vorbehandelt und einer reversed-phase HPLC (HPLC Analyzer, LKB, D-Freiburg) unter Verwendung einer 3 µm Spherisorb ODS-2 Säule (Grom, Herrenberg) unterzogen. Methionin erscheint als Homoserin und Met(O) als Methionin. Ein Hitachi Fluorescence Detektor F 1000 (Exzitation bei 330 nm, Emission bei 450 nm) (Merck, Darmstadt) detektierte die Peaks, und die Daten wurden mittels eines Shimadzu C-RGA chromatopac Integrators (Kyoto, Japan) ausgewertet. Der Proteingehalt der BALF-Proben wird ebenfalls mittels der HPLC-Analyse evaluiert. Angegeben wurde der Methioninsulfoxid-Gehalt in % des Gesamtmethionins (= Met(O) + Met) (Maier *et al.*, 1991).

3.4 Oxidation von Glutathion mittels H₂O₂

Unter der Annahme, daß Glutathion im Oxidantien/Antioxidantienhaushalt der Lunge eine zentrale Rolle spielt und um ein ex vivo Testverfahren zu etablieren, das ein pathophysiologisch relevantes Äquivalent der extrazellulären biologischen Wirkung der Radikalproduktion pulmonaler Entzündungszellen widerspiegelt, wurde reduziertes Glutathion als Substrat in der Testlösung verwendet. Um die Versuchsbedingungen unter den verschiedensten Gesichtspunkten zu analysieren und zu standardisieren, wurde ein in vitro Modellversuch vorgeschaltet, in dem der zelluläre „oxidative burst“ durch Zugabe von H₂O₂ simuliert wurde. Die Versuchsbedingungen wurden dabei variiert; neben verschiedenen GSH_{red}-Konzentrationen wurden auch verschiedene H₂O₂-Konzentrationen im Ansatz getestet.

Reagenzien:

- Glutathionlösung: GSH_{red} 400 μM (Boehringer, Mannheim) in Hanks Balanced Salt Solution modified (HBSS) (Sigma, Deisenhofen) als Stammlösung
- Wasserstoffperoxidlösung: H_2O_2 Perhydrol 30 % 1 : 10000 verdünnt, das entspricht einer 979,1 μM Lösung (E. Merck, Darmstadt)

Pipettiert wurden jeweils Doppelwerte nach folgendem Schema:

Lösung	Leerwert	Leerwert	H_2O_2 10 nmol/ ml	H_2O_2 10 nmol/ ml	H_2O_2 20 nmol/ ml	H_2O_2 20 nmol/ ml	H_2O_2 30 nmol/ ml	H_2O_2 30 nmol/ ml	H_2O_2 50 nmol/ ml	H_2O_2 50 nmol/ ml
GSH_{red} 62,5 μM [ml]	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
HBSS [μl]	500	500	475	475	450	450	423	423	373	373
H_2O_2 Lsg. [μl]	-	-	25	25	50	50	77	77	127	127
Katalase [μl]	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

Tabelle 10: Pipettierschema H_2O_2 -Versuch mit 50 μM GSH_{red} im Ansatz und verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen (H_2O_2 10, 20, 30, 50 nmol/ml Testansatz)

Das Gesamtvolumen des Tests betrug 2,5 ml.

Katalaselösung: Bovine Liver Catalase, Aktivität 10000-25000 U/mg Protein (Sigma, St. Louis, Mo, USA), 2 mg in 5 ml PBS portioniert und bei -20°C eingefroren; haltbar ohne Konservierung zwei Wochen.

Zu 2 ml der 62,5 μM Glutathionlösung wurden HBSS und verschiedene Volumina einer 1 : 10000 verdünnte 30 % H_2O_2 , entsprechend 10, 20, 30, 50 nMol/ml Testansatz, sowie Kontrollen ohne Wasserstoffperoxidzugabe jeweils als Doppelwerte pipettiert. Der Einsatz

einer 62,5 μM GSH_{red} -Lösung entspricht einer Endkonzentration von GSH_{red} 50 μM im Ansatz.

Der Testansatz wurde nach guter Durchmischung eine Stunde abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Glutathionoxidation nach Ablauf der Inkubationszeit zu stoppen und damit vergleichbare Versuchsbedingungen zu schaffen, wurde am Ende der Inkubation unverbrauchtes H_2O_2 durch Zugabe von 25 μl Katalaselösung = 80 U/ml im Testansatz zu H_2O neutralisiert.

920 μl jeder Probe wurden nun in einer Küvette mit 80 μl einer 3,8 mM Ellmanns Reagenzlösung (DTNB) versetzt, was einer 304 μM Lösung im Ansatz entspricht, gut geschüttelt und erneut über fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dann spektrometrisch (Lambda 19 Spektrometer, Perkin Elmer, Überlingen) die Absorption bei 412 nm als Endpunktmessung registriert. Zur Bestimmung der Konzentration wurde eine Eichkurve erstellt, die sich aus vier Standardwerten mit definierten eingesetzten Konzentrationen von 75 μM , 56,25 μM , 37,5 μM und 18,75 μM zusammensetzte. Mit Hilfe des PECSS Software Package (Perkin Elmer, Überlingen) wurden die Konzentration des in der Probe verbliebenen reduzierten Glutathions berechnet (*Sies und Akerboom, 1984; Adams et al., 1983*). Ein Korrekturfaktor von 1,09 mußte zur Korrektur der Verdünnung im Meßansatz durch die Katalaselösung zusätzlich eingeführt werden.

Der Abfall des reduzierten Glutathion in der Endpunktmessung war proportional zum eingesetzten H_2O_2 .

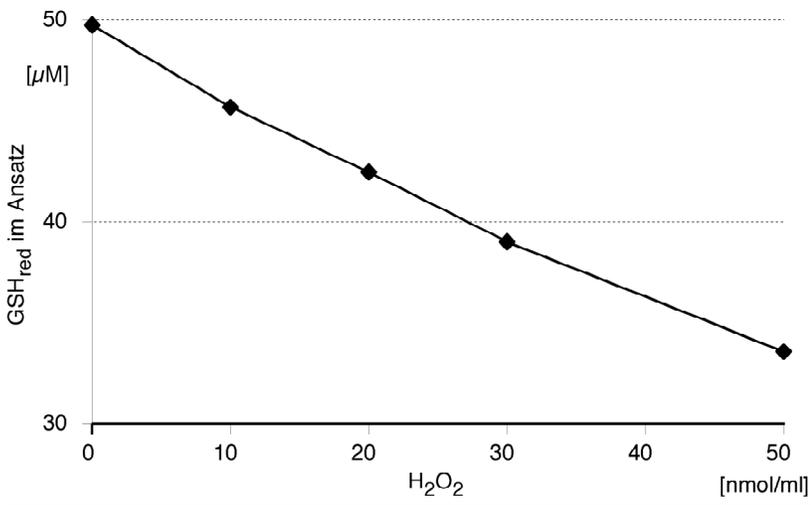


Abbildung 13: Gemessenes reduziertes Glutathion in Abhängigkeit von verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen

3.4.1 Verschiedene Konzentrationen des eingesetzten reduzierten Glutathions im Testansatz

Um die geeignete Konzentration des reduzierten Glutathions im Testansatz zu finden, wurden verschiedene Konzentrationen eingesetzt: 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM und 400 µM GSH_{red}. Dazu wurden 12,5 µM, 31,25 µM, 125 µM, 250 µM und 500 µM Lösungen aus der Stammlösung mit modifizierter Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma Nr. H-8264) verdünnt und davon nach obigem Schema jeweils 2 ml pro Küvette pipettiert. Anschließend wurde der Endpunkt der Reaktion wiederum gemessen. Betrachtet man den relativen Abfall des reduzierten Glutathions im Vergleich zur Ausgangskonzentration, zeigte sich im Bereich einer 50 µM GSH_{red}-Ausgangslösung prozentual der größte Effekt (Abbildung 14). Im weiteren wurde daher eine GSH_{red}-Konzentration von 50 µM im Testansatz verwendet. Ab einer Glutathionkonzentration von > 200 µM im Testansatz könnte die Methode aufgrund der Stöchiometrie

der Reaktionen nur unter Einsatz einer erhöhten DTNB-Konzentration verwendet werden.

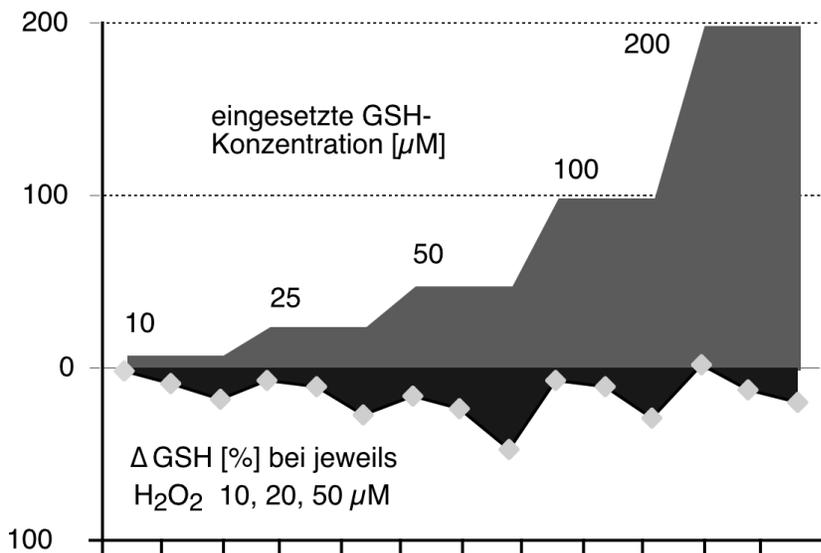


Abbildung 14: Zusammenhang zwischen eingesetzter GSH_{red} -Konzentration und $\Delta \text{GSH}_{\text{red}}$ in % bei jeweils 10, 20, 50 μM H_2O_2 -Konzentrationen im Testansatz

Um die Empfindlichkeit der Methode zu testen, wurden die in Tabelle 11 aufgeführten GSH_{red} -Konzentrationen eingesetzt. Es konnten Konzentrationsänderungen von 5 μM , jeweils als Doppelwerte, gemessen werden. Problematisch scheint jedoch der Bereich $\leq 25 \mu\text{M}$ zu sein, wo die gemessenen Werte von den tatsächlich eingesetzten Konzentrationen nach oben abweichen. Auch in wiederholten Messungen aus einer Probe und eine Stunde nach Katalasezugabe erwiesen sich diese Ergebnisse als reproduzierbar.

eingesetzte GSH-Konzentration [μM]	MW \pm SD	MW \pm SD nach 1 Stunde
100	100,17 \pm 0,24	99,98 \pm 0,24
95	95,42 \pm 1,86	95,83 \pm 0,24
90	90,42 \pm 0,49	91,10 \pm 0,15
85	86,43 \pm 1,37	86,19 \pm 0,58
80	81,23 \pm 0,18	81,25 \pm 0,22
75	76,71 \pm 0,69	76,63 \pm 0,72
50	48,75 \pm 0,68	48,43 \pm 0,8
25	31,17 \pm 0,6	30,35 \pm 0,38
10	16,91 \pm 1,16	16,38 \pm 0,72

Tabelle 11: Meßbereich der GSH_{red}-Endpunktmessung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nach einer Stunde

3.4.2 Einfluß von Katalase

Um zu überprüfen, ob die Zugabe von 80 U/ml Testansatz Katalase ausreichend ist, und wie lange die GSH_{red}-Konzentration danach stabil bleibt, wurde die Reaktion mit 80 U/ml Testansatz gestoppt und die GSH_{red}-Konzentration sofort und nach einer und nach zwei Stunden gemessen. Die Werte blieben auch nach 120 Minuten stabil, so daß man davon ausgehen konnte, daß Katalase mit 80 U/ml Testansatz in ausreichenden Mengen zugegeben wird und die anschließende GSH_{red}-Bestimmung in einem Zeitraum von bis zu 60 Minuten nahezu unverändert möglich ist.

	Nach Katalasezugabe	1 Stunde nach Katalasezugabe	2 Stunden nach Katalasezugabe
Versuch 1 (GSH _{red} 50 µM, H ₂ O ₂ 0 µM)	50,14	49,86	49,28
Versuch 2 (GSH _{red} 50 µM, H ₂ O ₂ 10 µM)	48,34	48,15	47,57
Versuch 3 (GSH _{red} 50 µM, H ₂ O ₂ 20 µM)	47,56	47,54	47,18
Versuch 4 (GSH _{red} 50 µM, H ₂ O ₂ 50 µM)	43,91	43,45	43,1

Tabelle 12: Messung des reduzierten Glutathions im H₂O₂-Versuch direkt nach Zugabe von 80 U/ml Katalase und Nachmessung jeweils nach einer und nach zwei Stunden

3.4.3 Zugabe von Katalase zu Beginn des Tests

Um nachzuweisen, daß die Abnahme des reduzierten Glutathions im Testansatz tatsächlich durch Wasserstoffperoxid verursacht ist, wurde zu Beginn der Inkubationsphase zusätzlich zum normalen Testansatz Katalase in einer Konzentration von 80 U/ml zugegeben.

Abbildung 15 zeigt, daß nach Zugabe von Katalase zum Test keine Änderung der Endkonzentration des reduzierten Glutathions erfolgt. Dies belegt auch die Annahme, daß die Oxidation des im Testansatz enthaltenen Glutathions über das eingesetzte natürliche Oxidans H₂O₂ erfolgt und nicht spontan abläuft oder durch Auto-Oxidation bedingt ist.

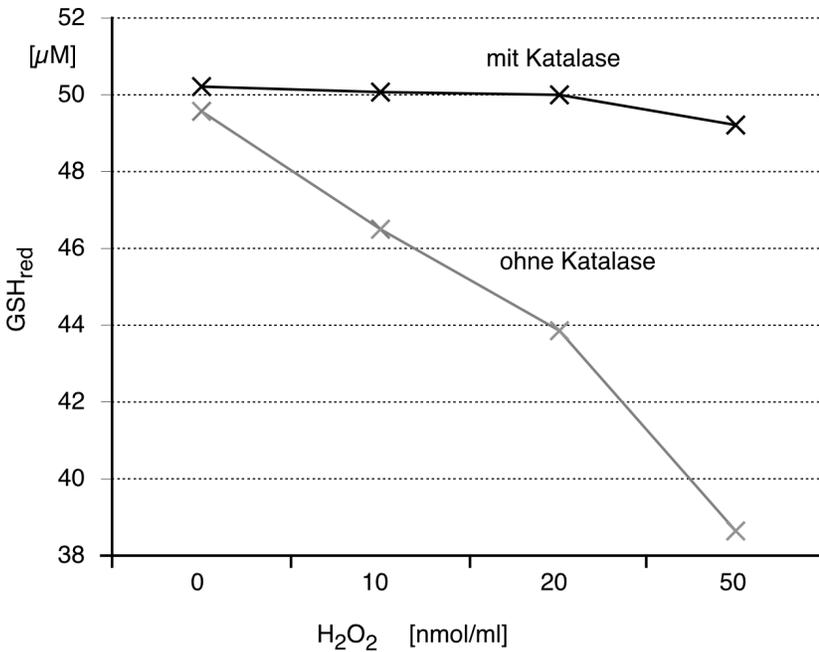


Abbildung 15: H₂O₂ -Vorversuch mit und ohne Katalasezugabe (80 U/l) zu Beginn des Tests

3.4.4 Bestimmung der Konzentration des Gesamtglutathions im Testansatz

Das Gesamtglutathion im Ansatz setzt sich aus dem Glutathiondisulfid und dem reduzierten Glutathion zusammen:

$$GSH_{ges} = GSH_{red} + 2 GSSG$$

Die Bestimmung des Gesamtglutathion in den Proben wurde wieder nach der von Sies und Akerboom beschriebenen Methode durchgeführt (Sies und Akerboom, 1984). Dazu wurden anstelle der BALF-Probe eine 1 : 5 verdünnte Probe aus dem Testansatz verwendet.

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors errechnete sich dann die Konzentration des Gesamtglutathions in der Probe nach folgender Formel:

$$\frac{MW \Delta A_{(1-3)} \cdot 0,84 \cdot 11,9 \cdot 5}{\text{Interner Standard}} = \text{Gesamtglutathion} \quad [\mu M]$$

Handelte es sich bei der ablaufenden Reaktion lediglich um eine Verminderung des reduzierten Glutathions durch Oxidation, müßte die Konzentration des Gesamtglutathions in allen Proben, unabhängig von der H₂O₂-Zugabe, konstant bleiben.

3.4.5 Bestimmung der Konzentration des oxidierten Glutathions aus dem Testansatz

Um nachzuweisen, daß tatsächlich reduziertes Glutathion oxidiert wurde, bestimmten wir die Glutathiondisulfid-Konzentration im Ansatz. Wir verwendeten eine modifizierte Methode von Akerboom und Sies (*Adams et al., 1983; Akerboom und Sies, 1981*).

Reagenzien:

- GSSG-Stammlösung: GSSG 800 µM (Boehringer Mannheim GmbH) in Aqua dest.
- Kaliumphosphatpuffer: KH₂PO₄ 0,1 M, EDTA 17,5 mM (Sigma, Deisenhofen), pH 6,5
- Puffer 1: N-Ethylmaleimidlösung (NEM) 10 mM in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, EDTA 17,5 mM, pH 6,5)
- Puffer 2: Kaliumphosphat 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 7,5
- Puffer 3: DTNB 800 µM (Serva, Heidelberg), Glutathionreduktase 2 U/ml, 1 mM NADPH (Boehringer Mannheim) in Puffer 2

Puffer 1 und 2 sind im Kühlschrank etwa eine Woche haltbar. Puffer 3 wurde unmittelbar vor Zugabe zum Test hergestellt und sofort verwendet. Zur Vorbereitung der Kartuschen (Waters, Millipore C 18 Cartridges) wurde mit 3 ml Methanol und danach mit 3 ml H₂O gespült und mit 2 ml Luft nachgetrocknet. 1 ml des Testansatzes wurde nach der Testinkubation und Katalasezugabe mit 1 ml der NEM-Lösung gemischt, und zehn Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Reduziertes Glutathion wurde hiermit gebunden und wurde über die Kartuschen zusammen mit überschüssigem NEM chromatographisch extrahiert. Dazu wurden 250 µl der Probe in die Kartusche pipettiert und das Effluat aufgefangen. Mit 1000 µl Puffer 2 wird GSSG von der Säule gewaschen und das Eluat ebenfalls mit dem Effluat zusammen aufgefangen. 750 µl des gemischten Effluates und Eluates wurden sodann in ein Eppendorfgesäß pipettiert, 250 µl Puffer 3 zugefügt und gut durchmischt. Wie bei der Bestimmung des Gesamtglutathions wurde nun in Anwesenheit von GSSG und Glutathionreduktase DTNB kontinuierlich reduziert und der Farbumschlag registriert. Dazu wurde die Änderung der Absorption fünf Minuten lang mit einem Intervall von 60 Sekunden bei 412 nm spektralphotospektrometrisch gemessen. 16 µM, 4 µM, 1 µM und 0,25 µM Verdünnungen der GSSG-Standardlösung mit NaCl wurden als Standards nach dem gleichen Muster einer Säulenchromatographie und einer spektrophotometrischen Messung unterzogen. Der Einminutenwert wurde verworfen, der Mittelwert aus den übrigen Werten errechnet und die GSSG-Konzentrationen mit Hilfe der Beckman Immunofit EIA/RIA Analyse, Version 3.0 (Beckmann Instruments, München) anhand der Standardkurve errechnet.

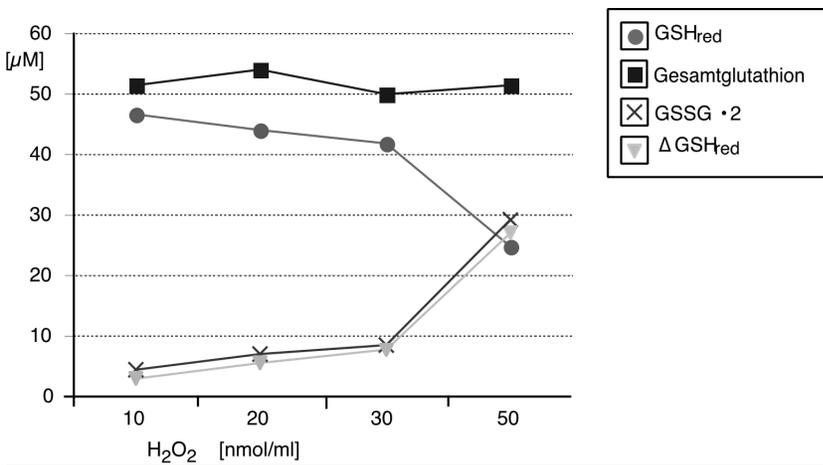


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Gesamtglutathionbestimmung, der GSSG-Bestimmung, des errechneten $\Delta\text{GSH}_{\text{red}}$ und der Bestimmung des verbliebenen reduzierten Glutathions im H_2O_2 -Vorversuch

In Abbildung 16 sind sowohl die Ergebnisse der Endpunktmessung, als auch der GSSG- und Gesamtglutathionbestimmung gegeneinander aufgetragen. Während das Gesamtglutathion auch nach Zugabe von Wasserstoffperoxid wie angenommen konstant blieb, sank die Konzentration des reduzierten Glutathions ab und das GSSG in der Probe steigt proportional zur Konzentration der H_2O_2 -Konzentration im Testansatz an. Eine Oxidation von Glutathion in Gegenwart von H_2O_2 konnte somit mit Hilfe dieses Ansatzes zuverlässig mit einer Genauigkeit von $< \pm 5\%$ gemessen werden.

3.5 Makrophagenassay

3.5.1 Standardansatz

Im Folgenden werden nun die Erkenntnisse aus den Vorversuchen zur ex vivo Messung der biologisch wirksamen Oxidantienfreiset-

zung durch ex vivo kultivierte pulmonale Entzündungszellen eingesetzt.

Folgende zusätzliche Reagenzien und Hilfsmittel wurden eingesetzt:

- RPMI-1640 Medium, modified, Nr. R-7509 (Sigma cellculture, Sigma chemical co)
- Reduziertes Glutathion, kristallisiert, M 307,3 (Boehringer Mannheim)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma chemical co)
- Falcon 3046 Multiwell Tissue Culture Plate (Becton Dickinson Labware, New Jersey 07035)

Um die Alveolarmakrophagen aus der Zellsuspension herauszutrennen, bedienen wir uns einer Methode von Senior et al. (*Senior et al., 1981*). Dabei macht man sich die Eigenschaft der Alveolarmakrophagen zunutze rasch an der Oberfläche von Polystyrolkulturgefäßen zu adhären. Nach Spülen mit salinen Lösungen erhält man dabei Monolayer Kulturen mit einer hohen Reinheit ($\geq 95\%$) (*Fedorko et al., 1970*).

Zunächst wurden aus obengenannter Zellsuspension Aliquots mit $0,5 \cdot 10^6$ oder $1 \cdot 10^6$ Zellen entnommen, in Eppendorfgefäße pipettiert und mit sterilem RPMI 1640 zu 2 ml aufgefüllt (*Adams, 1979*). Eine Zugabe von fetalem Kälberserum oder anderen Zusätzen zur Kultur erfolgte aufgrund der kurzen Kulturdauer nicht. So konnten gleichzeitig Störfaktoren, wie z. B. eine mögliche Endotoxinverunreinigung oder eine unspezifische Stimulationen in vitro vermieden werden. Die Suspensionen wurden nochmals gut gemischt und dann vier Löcher einer 6-Well-Kulturplatte mit jeweils $0,5$ oder $1 \cdot 10^6$ Zellen in Medium beschickt. Die übrigen zwei Löcher blieben zur späteren Leerwertbestimmung frei. Es folgte eine halbstündige Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 in Wasserdampf. Nach erfolgter Inkubation waren die Alveolarmakrophagen bereits adhären, während nicht adhären Zellen, z. B. nicht vitale Alveolarmakrophagen, Lymphozyten, Gra-

nulozyten durch fünfmaliges Spülen mit jeweils 2 ml warmem HBSS entfernt wurden. Um die absolute Zahl der in den Inkubationskammern verbliebenen Zellen zu ermitteln, wurden die nicht adhärenen Zellen aus dem ersten Spülgang in Zählkammern (Standardhäemocytometer, MD-Kova Raster 10, Madaus Diagnostik, D) gezählt. Dazu wurden 10 µl des gut geschüttelten zellhaltigen Überstandes in eine Standardzählkammer gegeben, drei Kammern unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und auf die Zellzahl pro ml hochgerechnet. Nach folgender Gleichung errechnete sich dann die absolute Zellzahl in den 2 ml abgenommenen Medium („x“ entspricht dem Volumen der ursprünglich zu 2 ml RPMI hinzu pipettierten Zellsuspension):

$$\text{Gezählte Zellzahl} \cdot 3 \cdot 1000 \cdot (2,0 \text{ ml} + x \text{ ml})$$

Die Differenz aus eingesetzter Zellzahl und gezählter Zellzahl im Mediumüberstand ergab die Anzahl der in den Kammern verbliebenen Zellen.

Um die oxidative Wirkung durch von Alveolarmakrophagen produzierte Sauerstoffradikale zu erfassen, wurden die Konzentrationen des reduzierten Glutathion in den zellfreien Kontrollöchern und in den unstimulierten und stimulierten Zellansätzen gemessen und verglichen. Ein Teil der Zellen wurde durch das Kokarzinogen Phorbolmyristataacetat (PMA), das die Cytochrom b_{245} -Untereinheit der membranständigen NADPH-Oxidase triggert, stimuliert. Verwendet wurde dies in einer Endkonzentration von 100 ng/ml, da bei höheren Konzentrationen die Steigerung der Radikalbildung nicht mehr weiter zunimmt, wohl jedoch der zelltoxische Effekt (*Pick und Keisari, 1981*). 1 mg PMA wurde in 1 ml DMSO gelöst, in 10 µl-Aliquots portioniert und bei -70 °C eingefroren. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurden zu einem aufgetauten Aliquot 10 ml PBS-Puffer zugegeben und gut vermischt.

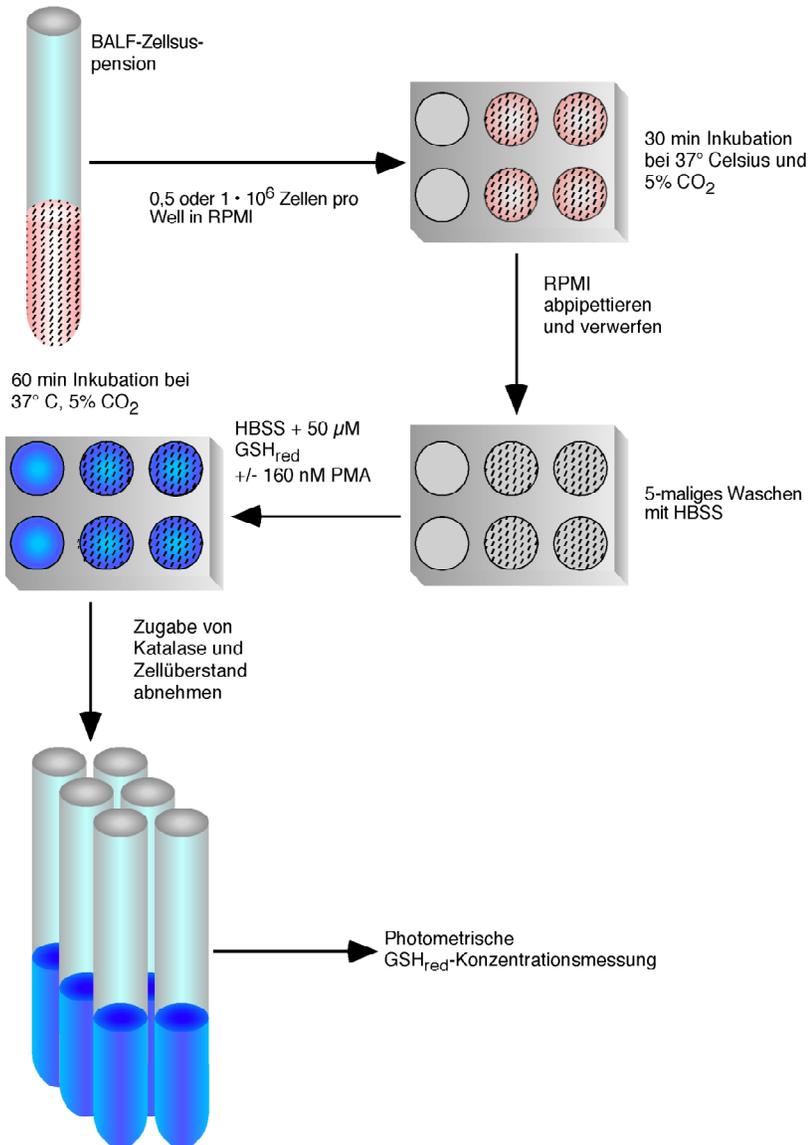


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Ablaufs des Zellversuchs

Pipettiert wurde nach folgendem Schema:

	Leerwert	Leerwert	Spontanwert	Spontanwert	Stimul. Wert	Stimul. Wert
GSH_{red} 75 µM [ml]	1	1	1	1	1	1
HBSS [µl]	500	500	500	500	35	350
PMA-Lösung [µl]	-	-	-	-	150	150
Zellzahl/ Well	-	-	$x \cdot 10^6$	$x \cdot 10^6$	$x \cdot 10^6$	$x \cdot 10^6$
Katalaselösung [µl]	15	15	15	15	15	15

Tabelle 13: Pipettierschema Makrophagenassay

Die Kulturplatten wurden dann durch vorsichtiges Rütteln durchmischt und über eine Stunde erneut bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nun wurden die Zellüberstände abgenommen, in Reagenzgläser pipettiert und dann weitere wasserstoffperoxidvermittelte Oxidationsvorgänge durch Zugabe von 80 U/ml Testansatz Katalase gestoppt (*Suzuki et al., 1990*).

Danach erfolgte die Messung der Konzentrationen des im Testansatz verbliebenen reduzierten Glutathions wie im Wasserstoffperoxidversuch. Es wurden 3 mg Ellmans Reagenz mit 2000 µl NaPi-Puffer vermischt und gut geschüttelt. Dann wurde mit Hilfe von vier Standards bekannter Konzentration eine Standardkurve erstellt. Den Meßbereich deckten die Konzentrationen 9,375, 18,75, 37,5 und 56,25 µM (Angabe rechnerisch, durch Verdünnung einer Ausgangslösung gewonnen) gut ab. 920 µl der jeweiligen Standardlösung wurden mit 80 µl der frisch angesetzten Ellmanns Lösung gut vermischt und über fünf Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 412 nm wie im Vorversuch gemessen, und die erhaltenen Werte anhand der eingegebenen Standardkonzentrationen einer Standardkurve zugeordnet. Die Proben wurden nun mit dem gleichen Testansatz gemessen und die Konzentration in der Probe anhand der Standardkurve ermittelt. Gemessen wurden jeweils Doppelwerte. Die Konzentrationen errechneten sich mit Hilfe der UVCSS Software. Auch hier mußte ein Korrekturfaktor von 1,09 zur Korrektur

tur der Verdünnung durch die abschließend zugefügte Katalaselösung im Meßansatz zusätzlich eingeführt werden.

Um nachzuweisen, daß die geschilderten Oxidationsvorgänge nach Katalasezugabe bleibend verhindert wurden, erfolgten Kontrollmessungen nach einer und nach zwei Stunden. Die Konzentrationen an reduziertem Glutathion blieben in den Ansätzen wie erwartet über 120 Minuten stabil.

3.5.2 Verschiedene Zellzahlen

Um den Einfluß der eingesetzten Zellzahl auf das Ausmaß der Oxidation des reduzierten Glutathions im Testansatz zu eruieren, wurden bei einem Teil der Proben zusätzlich Tests mit $0,5 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^6$ und $2 \cdot 10^6$ Zellen angesetzt und die Endpunktmessung, wie bereits beschrieben, durchgeführt.

3.5.3 Zugabe von Katalase

Um nachzuweisen, daß die Konzentrationsänderungen des reduzierten Glutathions im Test auch auf der Produktion reaktiver Radikale bzw. Wasserstoffperoxid beruht, führten wir parallel zum Standardversuch einige Testreihen unter Zugabe von 160 U/ml Katalase durch. Katalase katalysiert folgende Reaktion:



Nach Zugabe von Katalase zu Beginn des Tests müßte also, sollte der Annahme entsprechend Wasserstoffperoxid entstehen, der gemessene Konzentrationsunterschied an reduziertem Glutathion geringer ausfallen bzw. gegen null gehen.

3.5.4 Messung des oxidierten Glutathions im Überstand

Zum Nachweis, daß tatsächlich reduziertes Glutathion aus der Testlösung oxidiert wurde, bestimmten wir wie bereits in den Wasser-

stoffperoxidvorversuchen die GSSG-Konzentration im Ansatz nach der bereits genannten Methode. Dazu wurden 1 ml der Probe mit 1 ml der NEM-Lösung gemischt, und zehn Minuten bei 3000 g zentrifugiert. 250 µl der Lösung wurden dann wie bei der Messung von GSSG in der BALF anstelle der BALF-Probe eingesetzt und ebenso weiterverarbeitet.

3.5.5 Gesamtglutathion im Überstand

Handelt es sich auch im Zellversuch um eine Oxidation des Glutathions in der Testlösung, so müßte auch hier die Bestimmung des Gesamtglutathions in der Probe unverändert der eingesetzten Glutathionkonzentration entsprechen. Die Bestimmung des Gesamtglutathions in den Proben wurde wieder nach der bereits beschriebenen Methode von Sies und Akerboom durchgeführt (*Sies und Akerboom, 1984*). Dazu wurden anstelle der BALF-Probe eine 1 : 4 mit HBSS verdünnte Probe aus dem Testansatz verwendet. Unter Einfügen des Faktor 5 errechnete sich dann die Konzentration des Gesamtglutathions im Überstand.

$$\frac{MW \Delta A_{(1-3)} \cdot 0,84 \cdot 11,9 \cdot 5}{\text{Interner Standard}} = \text{Gesamtglutathion} \quad [\mu M]$$

3.5.6 Enzymblockaden im γ -Glutamylzyklus

Wie aus der Abbildung 18 ersichtlich, ist der Glutathionstoffwechsel der Zellen komplex und greift möglicherweise durch verschiedene Membranvorgänge in das extrazelluläre Geschehen ein. Um sicherzustellen, daß die extrazelluläre GSH-Konzentration nicht durch den transmembranösen GSH-Stoffwechsel beeinflußt wurde und um Änderungen der extrazellulären Glutathionkonzentrationen im Test, d. h. des Gesamtglutathions, des reduzierten Glutathions und des GSSG auf die Folge der Einwirkung von Sauerstoffradikalen eingren-

zen zu können, wurde die Regulation des intrazellulären Glutathionhaushalts durch die Blockade einzelner Enzyme näher untersucht.

Es wurden die Enzyme γ -Glutamylcysteinsynthetase, Glutathionreduktase und γ -Glutamyltranspeptidase selektiv gehemmt. Die Blockadeassays wurden jeweils als Parallelversuche zum Standardversuch durchgeführt.

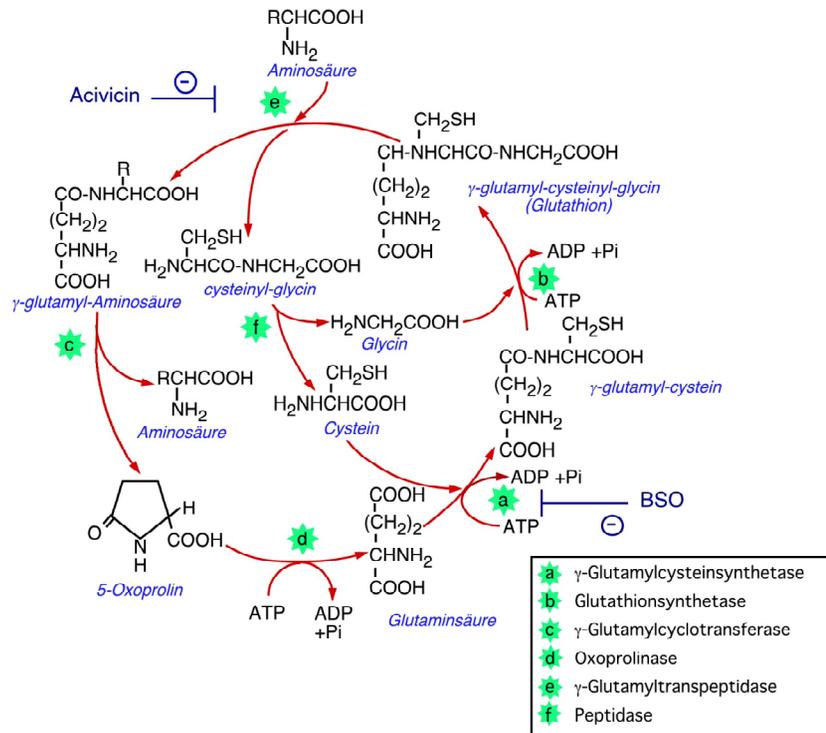


Abbildung 18: Glutathionsynthesekreislauf (nach Deneke und Fanburg, 1989)

Die γ -Glutamylcysteinsynthetase katalysiert die intrazelluläre Glutathionsynthese, die γ -Glutamyl-Transpeptidase transferiert einen γ -Glutamylrest von extrazellulärem Glutathion auf eine Aminosäure, dies ist in erster Linie Cystein, und transportiert diese dann in die

Zelle. Glutathionreduktase ist Bestandteil des Glutathionredoxzyklus in der Zelle.

3.5.6.1 Buthioninsulfoximin

DL-Buthionin-SR-sulfoximin (BSO) ist ein irreversibler, selektiver Inhibitor der γ -Glutamylcysteinsynthetase (*Griffith und Meister, 1979*) und hemmt die Glutathion-Biosynthese bei gleichzeitiger Glutathionverarmung der Zelle in vivo und in vitro (*Griffith und Meister, 1979; Griffith, 1982*). Griffith zeigte 1979 eine komplette Hemmung des Enzymes nach einer Minute ($t_{1/2} \sim 11$ s bei Überschuss des Inhibitors) im zellfreien Versuch. Die Reaktion folgt einer Reaktion einer Pseudoerstenordnung unter Ausbildung eines initialen Enzym-BSO-Komplexes. Anhand von Zellen der isolierten Rattenniere fand sich eine komplette Hemmung bereits nach zehn Minuten Inkubation mit BSO (*Griffith, 1982*).

Wir verwendeten Buthioninsulfoximin der Firma Sigma (B 2640). Es wurden 50 mg in 10 ml destilliertem Wasser gelöst, portioniert und bei 20 °C eingefroren. Wir verfahren nach folgendem Pipettierschema, wobei die Endkonzentration des BSO im Testansatz in Übereinstimmung mit der Literatur 1 mM betrug (*Griffith und Meister, 1979*).

	Leerwert	Leerwert	Basalwert	Basalwert	Stimul. Wert	Stimul. Wert
GSH 75 μ M	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
HBSS	433 μ l	433 μ l	433 μ l	433 μ l	283 μ l	283 μ l
BSO	67 μ l	67 μ l	67 μ l	67 μ l	67 μ l	67 μ l
PMA	-	-	-	-	150 μ l	150 μ l
Zellzahl/Well	-	-	$x \cdot 10^6$	$x \cdot 10^6$	$x \cdot 10^6$	$x \cdot 10^6$
Katalase	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l

Tabelle 14: Pipettierschema für die Zugabe von Buthioninsulfoximin zum Makrophagenassay

Die Messung der Konzentrationen erfolgte wieder wie im Standardversuch.

3.5.6.2 Carmustin

Die Hemmung der Glutathionreduktase führt zu einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes von GSH_{red} zu GSSG in der Zelle. Normalerweise liegt Glutathion zu mehr als 98 % als GSH_{red} vor. GSSG wird über die Glutathionreduktase in GSH_{red} übergeführt. Carmustin (1,3-Bis(2chloroethyl)-1-nitrosoharnstoff) (BCNU) ist ein Nitrosoharnstoff, der in zwei Intermediaten vorkommt und entweder als alkylierende Substanz wirkt, oder als Inhibitor der Glutathionreduktase fungiert. Miller und Blakely zeigten 1991 einen maximalen Abfall der Glutathionreduktaseaktivität und des zellulären Glutathiongehaltes von Chinese Hamster Zellreihen (Monolayer) V79A03 bei Carmustin-Konzentrationen von 50-100 μM . Bereits nach einer Inkubationszeit von einer Stunde fand sich eine Reduktion des Glutathiongehaltes (Miller und Blakely, 1992). Nach Reed inhibierte eine 75 μM Carmustin-Lösung die Glutathionreduktaseaktivität der Hepatozyten um 90 %. Die Viability war durch diese Konzentration nicht wesentlich herabgesetzt. Nach einer Stunde fand sich eine Reduktion des intrazellulären GSH um 60 % (Reed, 1986). Auch mit der Inkubation des Makrophagenassays mit Carmustin sollte ein Export von Glutathion in das Testmedium ausgeschlossen werden. Parallel zum Standardversuch wurde ein Testansatz mit pulmonalen Entzündungszellen mit Carmustin vorinkubiert. Dazu wurden die Zellen wie im Standardversuch über 30 Minuten im Medium bis zur Adhärenz inkubiert. Aus RPMI-Medium und Carmustin wurde eine 0,1 mM Lösung hergestellt und die Zellen nach Abnehmen des Mediums aus der Adhärenzinkubation mit 1,5 ml der 0,1 mM Carmustin-Lösung bedeckt. Es erfolgte eine weitere 15 minütige Inkubation im Inkubator (Wasserdampf, 37 °C, 5 % CO_2). Der Überstand wurde dann erneut (aufgrund der Toxizität von Carmustin mit einer Wasserstrahlpumpe) abgenommen und zweimal mit 2 ml RPMI-Medium gespült. Anschließend erfolgte nochmals eine 15-minütige Inkubation mit 2 ml RPMI. Nun wurde wie im Standardversuch weiterverfahren.

3.5.6.3 Acivicin

Die γ -Glutamyltranspeptidase spielt eine besondere Rolle im zellulären Stoffwechsel. Über dieses Enzym werden Substrate für die intrazelluläre Glutathionsynthese in die Zelle aufgenommen. Um eine

Verminderung der GSH_{red}-Konzentration in der Testlösung über dieses Enzym durch den Transport von Glutathion in den Intrazellulärraum auszuschließen, wurde die γ -Glutamyltranspeptidase mittels Acivicin (alpha-Amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxaloleacetic acid) gehemmt (Meister und Anderson, 1983).

Acivicin (Fa. Sigma, Prod. Nr. A2295) wurde in Aqua bidest. gelöst, portioniert und bei -20 °C eingefroren. Die Endkonzentration im Testansatz betrug 0,25 mM.

Es wurde nach folgendem Schema pipettiert und dann wie im Standardversuch weiter verfahren:

Lösung	Leerwert	Leerwert	Spontanwert	Spontanwert	Stimul. Wert	Stimul. Wert
GSH _{red} 75 μ M	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
HBSS	490 μ l	490 μ l	490 μ l	490 μ l	340 μ l	340 μ l
PMA-Lsg.	-	-	-	-	150 μ l	150 μ l
Acivicin-Lsg.	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Zellzahl/ Well	-	-	$x \cdot 10^6$	$x \cdot 10^6$	$x \cdot 10^6$	$x \cdot 10^6$
Katalaselsg.	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l

Tabelle 15: Pipettierschema für die Hemmung der γ -glutamyl-Transpeptidase durch Acivicin

3.5.7 Messung der Myeloperoxidaseaktivität im Überstand, in den lysierten Zellen und in der BALF

Die Aktivität der Myeloperoxidase wurde nach dem von Suzuki beschriebenen Verfahren bestimmt (Suzuki et al., 1983).

Reagenzien:

- Natriumhydrogenphosphatpuffer 150 mM: 10,35 g NaH₂PO₄ auf 500 ml Aqua dest.
- Tetramethylbenzidinelösung: 24 mg TMB (Sigma Chemicals, St. Louis) auf 5 ml N,N-dimethylformamidlösung (DMFA)

- Wasserstoffperoxidlösung 3 mM: 20 μ l 30 % Perhydrol + 980 μ l Natriumphosphatpuffer, davon 30 μ l + 1970 μ l Natriumphosphatpuffer ergeben eine 3 mM H_2O_2 -Lösung

420 μ l Natriumhydrogenphosphatpuffer und 80 μ l Tetramethylbenzidinelösung wurden gut gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend wurden 100 μ l der 3 mM Wasserstoffperoxidlösung sowie 400 μ l der jeweiligen Probe (BALF, Testüberstand aus dem Makrophagenassay bzw. Zellysate aus den BALF-Zellen oder den Testzellen des Makrophagenassays) dazu pipettiert, gemischt und rasch in vorbereitete Kunststoffküvetten umgefüllt. Anschließend wurde sofort die Absorption im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 655 nm gemessen und die Aktivität der MPO durch die Absorptionsänderung im linearen Bereich bestimmt (Beckmann Photometer, Time Drive, 655 nm, alle 20 sec über zwei Minuten). Der pH-Wert im Testmedium betrug 5,4.

3.6 Statistik

Verwendet wurde eine lizenzierte Studentenversion von SYSTAT für Macintosh, Course Technology Incorporation, Cambridge MA 02142, 1994.

Der Test auf Normalverteilung erfolgte nach David, Pearson und Stephens, der Test auf gleiche Varianzen mittels des F-Testes.

Mit Tests für verbundene Stichproben wurden die Unterschiede der Unterschiede zwischen Leerwerten, spontanen und stimulierten Werten bei der Analyse der Methodik, sowie die Enzymblockaden enthaltenen Tests analysiert.

Für abhängige nicht normalverteilte Stichproben wurde der Wilcoxon-Test verwendet.

Mit Tests für unverbundene Stichproben wurden die Vergleiche zwischen einzelnen Variablen der Kontroll- und Patientengruppen untersucht.

Normalverteilte Daten wurden bei gleicher Varianz mittels des t-Testes für unabhängige Stichproben untersucht, nicht normalverteilte Daten wurden bei gleicher Varianz mittels u-Test (Wilcoxon, Mann and Whitney) verglichen, und waren weder Normalverteilung noch gleiche Varianz vorhanden, wurde schließlich verteilungsunabhängig mittels des Kolmogorow-Smirnow-Testes untersucht.

Zugrundegelegt wurde jeweils eine Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$.

Auch bei der Prüfung der Korrelation zwischen zwei Parametern wurde neben dem Korrelationskoeffizienten „r“ die Irrtumswahrscheinlichkeit „p“ angegeben und auf einem Signifikanzniveau von 0,05 getestet (*Ramm und Hofmann, 1987; Kenneth, 1994; Sachs, 1992*).

4 Ergebnisse

4.1 Zellverteilung in der BALF

Die Viability lag bei allen Diagnosegruppen im Durchschnitt bei 73,9 % \pm 1,5, wobei die Viability in der Gruppe der transplantierten Patienten mit 68,9 % \pm 7,2 am niedrigsten war und in der rauchenden Kontrollgruppe mit 79,8 % \pm 6,0 am höchsten lag (Angaben in Mittelwert % \pm SEM).

Die Gesamtzellzahl lag durchschnittlich bei $84,0 \pm 36,8 \cdot 10^4$ Zellen pro ml BALF, wobei sich hier große Unterschiede zwischen den einzelnen Diagnosegruppen ergaben. Alle Werte wurden als Mittelwerte \pm SEM in 10^4 Zellen/ml BALF angegeben. Die mit Abstand höchsten Gesamtzellzahlen wiesen Patienten nach Lungentransplantation auf ($404,6 \pm 248,8 \cdot 10^4$ /ml BALF), gefolgt von Patienten mit exogen allergischer Alveolitis ($74,7 \pm 21,8 \cdot 10^4$ /ml BALF) und gesunden rauchenden Kontrollpersonen ($41,4 \pm 10,4 \cdot 10^4$ /ml BALF). Im nichtrauchenden Kontrollkollektiv lag die Gesamtzellzahl bei $15,1 \pm 1,6 \cdot 10^4$ /ml BALF, bei der subklinischen Alveolitis bei $12,2 \pm 1,8 \cdot 10^4$ /ml BALF, bei der ILD bei $27,3 \pm 7,4 \cdot 10^4$ /ml BALF und bei der Sarkoidose bei $19,6 \pm 5,4 \cdot 10^4$ /ml BALF.

4.1.1 Differentialzellbild

Der Prozentsatz der Alveolarmakrophagen betrug in der Gruppe der nichtrauchenden Kontrollpersonen und der gesunden Raucher mehr als 90 % (93,2 % \pm 0,9 und 91,0 % \pm 4,2). Der prozentuale Anteil der Alveolarmakrophagen lag bei den Patienten mit ILD bei 74,2 % \pm 4,7, bei der subklinischen Alveolitis ebenso bei 75 % \pm 15,6 und bei der Sarkoidose bei 68,9 % \pm 8,9. Die niedrigsten Anteile ergaben sich bei Patienten nach Lungentransplantation mit 34,9 % \pm 8,7 sowie bei der EAA mit 37,3 % \pm 5,7. Hier muß man jedoch mit in Betracht ziehen, daß durch die deutlich erhöhten Gesamtzellzahlen auch die absolute

Zahl der Alveolarmakrophagen im Vergleich zu den zellärmeren Diagnosegruppen erhöht war (alle Angaben in Mittelwert % \pm SEM).

Im Gegenzug zu den Alveolarmakrophagen war der Anteil der neutrophilen Granulozyten (GN) in der BALF der nichtrauchenden Kontrollgruppe mit 2,8 % \pm 0,4 sehr niedrig. Ebenfalls niedrig lag der prozentuale Anteil der GN bei den Patienten mit Sarkoidose (4,3 % \pm 0,9), gefolgt von den rauchenden Kontrollpersonen (7,4 % \pm 4,0) und den Patienten mit ILD (11,5 % \pm 4,1), den Befunden bei subklinischer Alveolitis (17,5 % \pm 16,2), den Befunden bei EAA mit 38,4 % \pm 8,9 und schließlich nach Lungentransplantation mit 58,3 % \pm 9,5.

Die eosinophilen Granulozyten stellten den niedrigsten Anteil der bronchoalveolären Zellen in der Gruppe der gesunden Kontrollen (0,4 % \pm 0,2), bei Patienten mit subklinischer Alveolitis (0 %) und bei exogen allergischer Alveolitis (0,2 % \pm 0,1). Höhere Anteile an eosinophilen Granulozyten fanden sich bei den untersuchten Patienten mit ILD (5,2 % \pm 2,1), mit Sarkoidose (1,0 % \pm 0,4), und nach Lungentransplantation (1,3 % \pm 0,9). Auch in der gesunden Rauchergruppe wurden Eosinophile mit einem Anteil von 1,2 % \pm 0,4 vergleichsweise hoch nachgewiesen. Der Lymphozytenanteil bei subklinischer Alveolitis (7,3 % \pm 3) lag unter dem Anteil der Lymphozyten in der BALF von Patienten mit manifester ILD (11,8 % \pm 3,6).

Neben Alveolarmakrophagen und Granulozyten sind die Lymphozyten die dritte größere Zellgruppe in der Lunge. Im Schnitt lag der Anteil der Lymphozyten bei 10,7 % \pm 1,6 in der BALF. Den erwartungsgemäß höchsten Anteil bot dabei die BALF von Patienten mit Sarkoidose (25,4 % \pm 8,1), gefolgt von Patienten mit EAA (23,6 % \pm 6,5) und den Befunden bei ILD (11,8 % \pm 3,6), der subklinischen Alveolitis (7,3 % \pm 3), den nichtrauchenden Kontrollpersonen (3,6 % \pm 0,6) und schließlich den rauchenden Kontrollpersonen (0,4 % \pm 0,2).

Mastzellen machen nur einen äußerst geringen Anteil der Immunzellen in der Lunge aus. In diesem Untersuchungskollektiv lagen die Mastzellen prozentual im Durchschnitt bei 0,3 % \pm 0,1, wobei der

höchste Anteil mit 0,6 % \pm 0,1 bei den gesunden Kontrollen lag, der niedrigste fand sich nach Lungentransplantation (0,1 % \pm 0,1).

Krankheitsbild	Gesamtzellzahl [$\cdot 10^4$ /ml BALF]	Viability [%]	Alveolarmakrophagen [%]	Neutrophile Granulozyten [%]	eosinoph. Granulozyten [%]	Lymphozyten [%]	Mastzellen [%]
Kontrollen n = 16	15,1 \pm 1,6	71,3 \pm 3,0	93,2 \pm 0,9	2,8 \pm 0,4	0,4 \pm 0,2	3,6 \pm 0,6	0,6 \pm 0,1
Kontr./R. n = 5	41,4 \pm 10,4	79,8 \pm 6,0	91,0 \pm 4,2	7,4 \pm 4,0	1,2 \pm 0,4	0,4 \pm 0,2	0 \pm 0
ILD n = 24	27,3 \pm 7,4	75,8 \pm 2,7	74,2 \pm 4,7	11,5 \pm 4,1	5,2 \pm 2,1	11,8 \pm 3,6	0,4 \pm 0,1
subklin. Alveolitis n = 4	12,2 \pm 1,8	71,3 \pm 5,2	75 \pm 15,6	17,5 \pm 16,2	0	7,3 \pm 3	0,3 \pm 0,3
Sarkoidose n = 7	19,6 \pm 5,4	77,4 \pm 2,7	68,9 \pm 8,9	4,3 \pm 0,9	1,0 \pm 0,4	25,4 \pm 8,1	0,3 \pm 0,2
EAA n = 7	74,7 \pm 21,8	77,2 \pm 5,1	37,3 \pm 5,7	38,4 \pm 8,9	0,2 \pm 0,1	23,6 \pm 6,5	0,4 \pm 0,2
LTx/HL Tx n = 8	404,6 \pm 248,8	68,9 \pm 7,2	34,9 \pm 8,7	58,3 \pm 9,5	1,3 \pm 0,9	5,5 \pm 2	0,1 \pm 0,1

Tabelle 16: Übersicht über die Zellbefunde in der BALF im Untersuchungskollektiv (Mittelwerte \pm SEM)

Zusammenfassend unterschieden sich bezüglich der Zelldifferenzierung im vorliegenden Kollektiv gesunde Raucher von der Kontrollgruppe (Nichtraucher) durch eine erhöhte Gesamtzellzahl unter Erhöhung der absoluten Anzahl der Alveolarmakrophagen bei leicht erhöhtem prozentualen Anteil an neutrophilen Granulozyten. Patienten mit ILD wiesen eine deutliche Erhöhung der Gesamtzellzahl bei Verminderung des prozentualen Anteiles

an Alveolarmakrophagen auf. Sowohl neutrophile als auch eosinophile Granulozyten und Lymphozyten waren erhöht. Bei der subklinischen Alveolitis war die Gesamtzellzahl nicht erhöht, der Anteil der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten lag jedoch auf Kosten des Alveolarmakrophagenanteiles in der BALF höher. Neben einer Erhöhung der Gesamtzellzahl kam es bei der Sarkoidose zu einer ausgeprägten BALF-Lymphozytose mit Abfall des Anteiles an Alveolarmakrophagen. Neben einer deutlichen Gesamtzellzahlerhöhung wies die BALF bei exogen allergischer Alveolitis eine Zunahme der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten auf. Die mit Abstand höchsten Gesamtzellzahlen wiesen Patienten nach Lungentransplantation auf, die mit einer Reduktion des Alveolarmakrophagen-Anteiles, einer massiven neutrophilen Granulozytose und einer leichten BALF-Lymphozytose verbunden waren.

4.2 Untersuchung der Anzahl adhärenter Zellen auf den Platten

Durch die verwendete Inkubationstechnik nach Senior et al. zur Adhärenz von Alveolarmakrophagen erhält man der Literatur zufolge Monolayer-Kulturen, die zu > 95 % aus Alveolarmakrophagen bestehen (Senior et al., 1981).

Bei einem Teil der untersuchten Kontrollen und Patienten wurden die Zellzahlen im abgesaugten Kulturmedium gezählt um daraus unter Berücksichtigung der eingesetzten Zellzahlen rechnerisch die noch auf den Platten befindlichen Zellen zu bestimmen.

Faßte man alle diesbezüglich untersuchten Fälle zusammen, ergab sich bei einer Fallzahl von 28 Untersuchungen eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,59$ ($p = 0,001$) zwischen den Zellen auf den Platten in % der eingesetzten Zellzahlen und dem prozentualen Anteil der Alveolarmakrophagen in der BALF. Betrachtete man alleine die nichtrauchende Kontrollgruppe ($n = 7$), betrug der Korrelationskoeffizient $r = 0,69$ wobei $p = 0,09$ ist. In der Gruppe der Patienten mit ILD ($n = 8$) betrug $r = 0,84$ ($p = 0,01$). Faßte man alle Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen zusammen ($n = 19$) war $r = 0,64$ ($p = 0,003$).

Es war also in Übereinstimmung mit der Literatur (*Senior et al., 1981; Clement et al., 1987; Schaberg et al., 1992; Schaberg et al., 1993; Buhl et al., 1989*) ein relativ enger linearer Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil der AM in der BALF und der Anzahl der adhären-ten Zellen in % der eingesetzten Zellen zu beobachten.

Auch bei Kontrollen der Platten nach der Adhärenzphase und nach Spülung mit HBSS unter dem Mikroskop bestanden die Zellrasen aus Alveolarmakrophagen. Eine Verunreinigung durch andere Zellarten, wie z. B. Granulozyten, zeigte sich in den untersuchten Platten nicht.

Die Viability der Zellen auf der Platte war durch ihre Fähigkeit zur Adhärenz belegt. Eine lichtmikroskopische Aufnahme einer Monolayerkultur nach der Adhärenzphase zeigt die folgende Abbildung.



Abbildung 19: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Zellplatte nach der Adhärenzinkubation in 400facher Vergrößerung

Tatsächlich handelte es sich bei den unseren Untersuchungen zugrunde gelegten Kulturen um Monolayer-Kulturen, die zu > 95 % aus Alveolarmakrophagen bestanden.

4.3 Varianzanalyse zwischen den Leerwerten, dem Abfall des reduzierten Glutathions und den oxidativen Aktivitäten unstimulierter und stimulierter Zellen

Aus den im Testansatz gemessenen Konzentrationen errechneten sich unter Berücksichtigung des prozentualen Anteiles der Alveolar-makrophagen in der Zellsuspension folgende Parameter:

Die Differenz aus der GSH_{red} -Konzentration im Leerwert, entsprechend dem eingesetzten reduzierten Glutathion, und der GSH_{red} -Konzentration im Ansatz mit unstimulierten, bzw. stimulierten Zellen wurde DBOX, bzw. DSOX benannt:

$$DBOX = [GSH_{red}]_{Leerwert} - [GSH_{red}]_{spontan} \quad [nMol/ml]$$

$$DSOX = [GSH_{red}]_{Leerwert} - [GSH_{red}]_{stimuliert} \quad [nMol/ml]$$

Da es sich nicht immer um gleiche Testvolumina handelte und es bei niedriger Gesamtzellzahl in der BALF nicht immer möglich war $1 \cdot 10^6$ Zellen einzusetzen, wurde die spontane oxidative Aktivität und die stimulierte oxidative Aktivität berechnet als Glutathionumsatz in nMol pro $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Stunde. Da der Prozentsatz der Alveolar-makrophagen in der BALF gut mit der Anzahl der adhärenen Zellen in % der eingesetzten Zellen korrelierte, wurde die Zahl der eingesetzten Zellen mittels des prozentualen Anteiles der Makrophagen in der BALF auf die tatsächlich adhärenen Zellzahl korrigiert. Die Formel für die spontane und stimulierte oxidative Aktivität (AMDBOXA, AMDSOXA) in nmol/h pro 10^6 AM lautet demnach:

$$\begin{aligned}
 \text{Spontane oxidative Aktivität} &= \frac{\text{DBOX} \cdot \text{Testvolumen}}{\text{eingesetzte Zellzahl} \cdot \text{AM-Anteil in BALF}} \left[\frac{\text{nmol}}{h \cdot 10^6} \right] \\
 \text{Stimulierte oxidative Aktivität} &= \frac{\text{DSOX} \cdot \text{Testvolumen}}{\text{eingesetzte Zellzahl} \cdot \text{AM-Anteil in BALF}} \left[\frac{\text{nmol}}{h \cdot 10^6} \right]
 \end{aligned}$$

In den einzelnen Diagnose- und Kontrollgruppen wurde nun getrennt untersucht, inwieweit sich die gemessenen Glutathionkonzentrationen in Leerwert, spontanem und stimuliertem Testansatz, die Differenzen aus den Glutathionkonzentrationen in Leerwert und jeweiligem Ansatz und die oxidativen Aktivitäten signifikant unterscheiden. Einen Überblick Über die Ergebnisse gibt die Tabelle 17.

Diagnose	n	GSH _{red} -Konz.	p	ΔGSH _{red}	p	AMDBXA/AMDSOXA	p
Kontrollen	16	–		–		–	
Kontrollen R	5	–		–		–	
ILD	26	BSTA/BBAS BSTA/BPMA BBAS/BPMA	< 0,01 < 0,01 < 0,01	DBOX/DS OX	0,0006	AMDBXA/ AMDSOXA	< 0,01
subklin. ILD	3	–		–		–	
Sarkoidose	7	–		–		–	
EAA	9	BSTA/BBAS BSTA/BPMA BBAS/BPMA	0,0077 0,0077 0,0152	DBOX/DS OX	0,0195	AMDBXA/ AMDSOXA	0,0152
LTx/ HLTx	12	BSTA/BBAS BSTA/BPMA BBAS/BPMA	0,00139 0,0006 0,001	DBOX/DS OX	0,0024	AMDBXA/ AMDSOXA	0,0376

Tabelle 17: Überblick Varianzanalyse

In der **nichtrauchenden Kontrollgruppe** (n = 16) ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Leerwert (BSTA), dem spontanen Glutathionwert (BBAS) und der Glutathionkonzentration mit stimulierten Zellen (BPMA). Auch bei den **rauchenden Kontroll-**

personen (n = 5) fand sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen den genannten Variablen.

Ein Vergleich der Konzentrationsdifferenzen zwischen Leerwert und unstimuliertem Ansatz, bzw. stimuliertem Testansatz (DBOX und DSOX) der Kontrollgruppe, aber auch in der Gruppe der rauchenden Kontrollpersonen zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Errechnete man die oxidative Aktivität, bestand kein signifikanter Unterschied zwischen spontanem und stimuliertem Zellansatz in der nicht rauchenden und in der rauchenden Kontrollgruppe.

Bei den Patienten mit **ILD** (n = 26) fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den Glutathionkonzentrationen in den Leerwerten und den Glutathionkonzentration im Assay mit unstimulierten Zellen ($p < 0,01$) und mit stimulierten Zellen ($p < 0,01$) und zwischen den Glutathionkonzentrationen im Ansatz mit unstimulierten, bzw. stimulierten Zellen ($p < 0,01$).

Bei diesen Patienten bestanden zudem signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationsdifferenzen von Leerwert und unstimuliertem Ansatz (DBOX), bzw. stimuliertem Testansatz (DSOX) ($p = 0,0006$).

Die oxidativen Aktivitäten bei nicht stimulierten und stimulierten Zellen unterschieden sich signifikant ($p < 0,01$).

Bei der **subklinischen Alveolitis** (n = 3) fand sich kein signifikanter Unterschied.

Auch die Konzentrationsdifferenzen aus Leerwert und spontanem, bzw. stimuliertem Testansatz sowie die oxidativen Aktivitäten zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen unterschieden sich nicht signifikant.

Patienten mit **M. Boeck** (n = 7) zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Leerwertes, der spontanen Glutathionkonzentration und der Glutathionkonzentration im stimulierten An-

satz, und auch die Differenzen aus eingesetzter GSH_{red} -Konzentration im Leerwert und den spontanen bzw. stimulierten Versuchsansätzen unterschieden sich nicht signifikant, ebenso wenig die oxidativen Aktivitäten.

Bei der **exogen allergischen Alveolitis** (= EAA) ($n = 9$) unterschieden sich Leerwert und Glutathionkonzentration im spontanen Testansatz ($p = 0,0077$), Leerwert und Glutathion im stimulierten Ansatz ($p = 0,0077$) und die Glutathionkonzentrationen des spontanen und stimulierten Ansatzes ($p = 0,0152$). Vergleicht man die Differenz der Glutathionkonzentrationen aus Leerwert und spontanem, bzw. Leerwert und stimuliertem Ansatz (DBOX, DSOX) so fand sich wiederum ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0195$). Auch die spontanen und stimulierten oxidativen Aktivitäten unterschieden sich signifikant ($p = 0,0152$).

Signifikante Unterschiede fanden sich bei Patienten **nach Lungentransplantation oder Herzlungstransplantation** zwischen Leerwert und Basalwert ($p = 0,0013$), zwischen Leerwert und stimuliertem Wert ($p = 0,0005$) sowie zwischen Basalwert und stimuliertem Wert ($p = 0,0010$). Die Differenzen aus eingesetzter GSH_{red} -Konzentration im Leerwert und den spontanen, bzw. stimulierten Versuchsansätzen ($p = 0,0024$) und die spontanen und stimulierten oxidativen Aktivitäten ($p = 0,0376$) unterschieden sich ebenfalls signifikant.

In der Gruppe der Kontrollen, der gesunden Raucher, der subklinischen Alveolitis und der Sarkoidose unterschieden sich innerhalb der Diagnosegruppen weder die absoluten gemessenen Glutathionwerte, jeweils als Leerwert, spontaner und stimulierter Wert, noch deren Differenzen oder oxidativen Aktivitäten. Anders sah das bei den entzündungsaktiveren Krankheitsbildern wie der EAA, ILD und nach LTx/HLTx aus. Neben den absoluten Glutathionwerten aus der Endpunktmessung unterschieden sich hier sowohl die Differenzen der GSH_{red} -Messung als auch die oxidativen Aktivitäten signifikant.

4.4 Oxidative Aktivität bei verschiedenen Zellzahlen

Untersucht wurden fünf Ansätze mit $0,5 \cdot 10^6$, zehn Ansätze mit $1 \cdot 10^6$ und sechs Ansätze mit $2 \cdot 10^6$ Zellen. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß ein streng linearer Zusammenhang zwischen den eingesetzten Zellzahlen (zwischen $0,5 \cdot 10^6$ und $2 \cdot 10^6$) sowohl für unstimulierte als auch für PMA-stimulierte Zellansätze. Auf der Grundlage dieser Befunde erfolgte im weiteren Verlauf ein Vergleich der oxidativen Aktivität bezogen auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/Stunde.

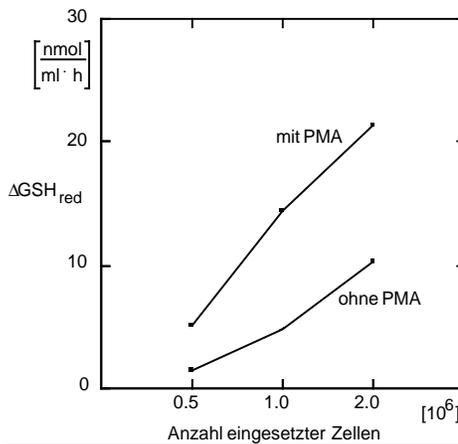


Abbildung 20: $\Delta\text{GSH}_{\text{red}}$ bei verschiedenen Zellzahlen ohne und mit PMA-Stimulation

4.5 Enzymblockaden

4.5.1 Katalasezugabe

Wie in Kapitel 2 beschrieben, wurde der Versuchsaufbau bei 12 Tests parallel zum Standardversuch durch Zugabe von Katalase zu Beginn der Inkubation verändert. Untersucht wurden neben den Standardversuchen vier Tests von Kontrollpersonen, sowie acht Tests von Patienten mit ILD. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 21 dargestellt.

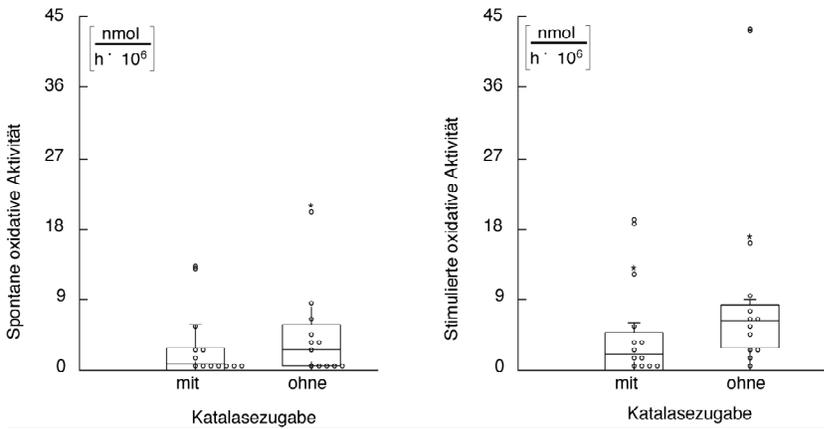


Abbildung 21: Oxidative Aktivitäten mit und ohne Zugabe von Katalase zum Zellassay

	MW spontane oxidative Aktivität ± SEM [nmol/h · 10 ⁶]	MW stimulierte oxidative Aktivität ± SEM [nmol/h · 10 ⁶]
Ohne Katalase	4,16 ± 1,65	8,87 ± 3,35
Mit Katalase	2,31 ± 1,0	4,0 ± 1,55
	P = 0,15	P = 0,07

Tabelle 18: Übersicht über die Änderungen der spontanen und stimulierten oxidativen Aktivitäten mit und ohne Katalase im Zellversuch

Wie aus Tabelle 18 ersichtlich, lagen die oxidativen Aktivitäten nach Zugabe von Katalase zu Beginn der Testinkubation sowohl im unstimulierten Zellansatz, als auch nach PMA-Stimulation unter den entsprechenden Werten ohne Katalasezugabe. Allerdings wurde keine vollständige Inhibition der oxidativen Aktivität erzielt, so daß wasserstoffperoxidunabhängige Reaktionen postuliert werden müssen.

4.5.2 Buthioninsulfoximin

Untersucht wurden 23 Personen parallel zu den durchgeführten Standardversuchen. Es handelte sich dabei um vier Kontrollperso-

nen, zwei gesunde Raucher, um acht Patienten mit ILD, zwei Personen mit subklinischer Alveolitis, einen Patienten mit Sarkoidose, zwei Patienten mit EAA und vier Personen nach Lungentransplantation. Die spontanen oxidativen Aktivitäten ohne Buthionin im Testansatz lagen zwischen 0,01 und 311,25 nmol/h · 10⁶ (Median 4,53 nmol/h · 10⁶), nach Zugabe von Buthionin zwischen 0,01 und 112,5 nmol/h · 10⁶ (Median 4,68 nmol/h · 10⁶). Die stimulierten oxidativen Aktivitäten lagen ohne Buthionin zwischen 0,01 und 538,5 nmol/h · 10⁶ (Median 6,56 nmol/h · 10⁶), nach Zugabe von Buthionin zum Test lagen die Werte zwischen 0,59 und 346,12 nmol/h · 10⁶ (Median 7,56 nmol/h · 10⁶).

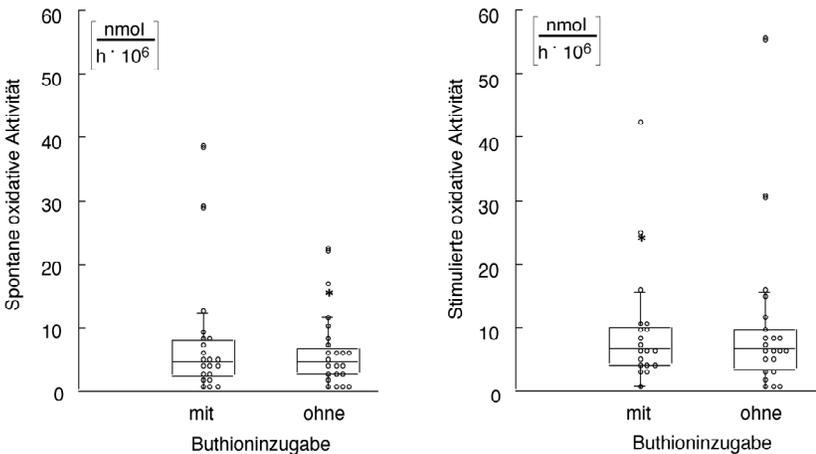


Abbildung 22: Vergleich der spontanen und stimulierten oxidativen Aktivitäten mit und ohne Zugabe von Buthionin zum Testansatz

Nach Hemmung der γ -Glutamylcysteinsynthetase durch Zugabe von Buthioninsulfoximin zum Testansatz fand sich innerhalb der jeweiligen Diagnosegruppen kein signifikanter Unterschied zwischen den spontanen und stimulierten oxidativen Aktivitäten mit und ohne BSO (p jeweils > 0,05).

4.5.3 Carmustin

Untersucht wurden insgesamt neun Personen, drei Kontrollpersonen, drei Patienten mit ILD, ein Patient mit subklinischer Alveolitis und ein Patient nach Lungentransplantation. Die Daten wurden nicht nach Diagnosen getrennt analysiert. Die spontanen oxidativen Aktivitäten lagen zwischen 0,01 und 7,42 nmol/h · 10⁶ (MW 2,19 nmol/h · 10⁶), nach Vorinkubation mit Carmustin zwischen 0,01 und 8,81 nmol/h · 10⁶ (MW 3,22 nmol/h · 10⁶). Die stimulierten oxidativen Aktivitäten lagen ohne Carmustin zwischen 0,01 und 23,76 nmol/h · 10⁶ (MW 6,04 nmol/h · 10⁶), nach Vorinkubation mit Carmustin zwischen 0,01 und 10,67 nmol/h · 10⁶ (MW 4,34 nmol/h · 10⁶).

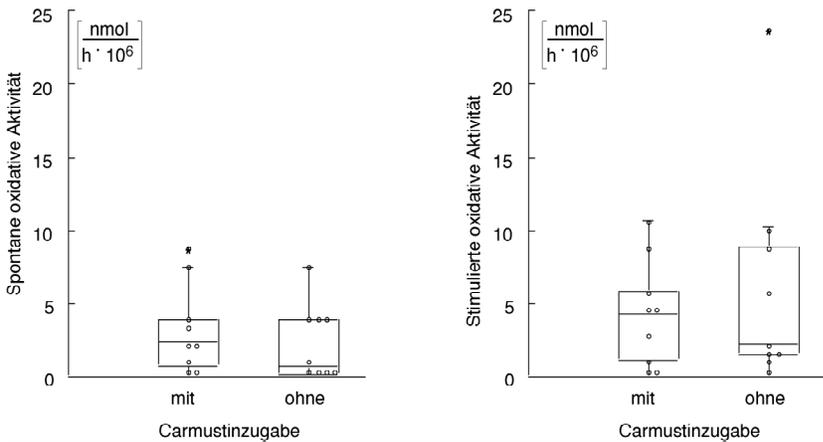


Abbildung 23: Spontane und stimulierte oxidative Aktivität ohne und mit Carmustin-Vorinkubation

Nach Blockade der Glutathionreduktase mit Carmustin kam es somit zu keiner signifikanten Veränderung der spontanen und stimulierten oxidativen Aktivitäten bei insgesamt neun untersuchten Individuen verschiedener Diagnosegruppen im Vergleich zu den oxidativen Aktivitäten im Standardversuch (p jeweils > 0,05).

4.5.4 Acivicin

Untersucht wurden insgesamt acht Patienten, davon ein gesunder Raucher, zwei Patienten mit ILD, ein Patient mit EAA und vier Patienten nach Lungentransplantation. Die spontanen oxidativen Aktivitäten ohne Acivicinzugabe lagen zwischen 1,8 und 427 nmol/h · 10⁶ (Median 31,51 nmol/h · 10⁶) und die stimulierten oxidativen Aktivitäten ohne Acivicinzugabe zwischen 5,07 und 727 nmol/h · 10⁶ (Median 103,47 nmol/h · 10⁶). Nach Zugabe von Acivicin lagen die spontanen oxidativen Aktivitäten bei Werten zwischen 0,01 und 325,5 nmol/h · 10⁶ (Median 35,43 nmol/h · 10⁶) und die stimulierten oxidativen Aktivitäten zwischen 0,01 und 597,25 nmol/h · 10⁶ (Median 91,69 nmol/h · 10⁶).

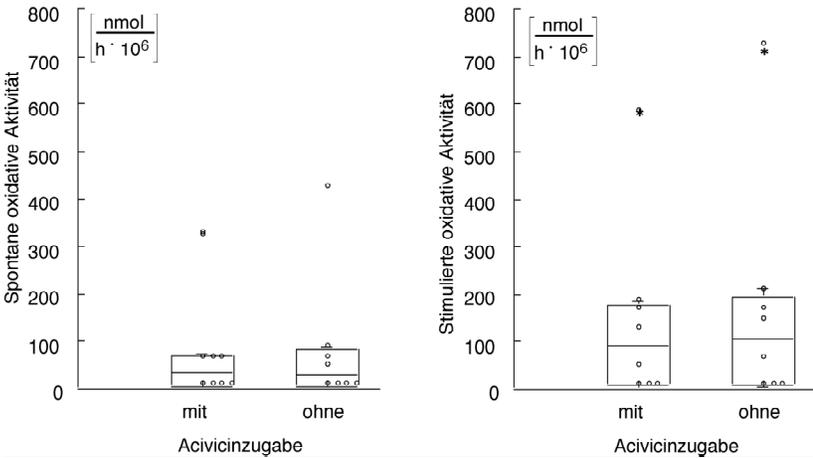


Abbildung 24: Unstimulierte und stimulierte oxidative Aktivität mit und ohne Zugabe von Acivicin

Nach Hemmung der γ -Glutamyltranspeptidase mittels Acivicin ergaben sich weder bei den spontanen, noch bei den PMA-stimulierten oxidativen Aktivitäten signifikante Unterschiede im Vergleich zu den unblockierten Standardversuchen (p jeweils $> 0,05$).

Zusammenfassend hatten spezifische Enzymblockaden mit Buthioninsulfoximin, Carmustin oder Acivicin keinen Einfluß auf die gemessenen oxidativen Aktivitäten. Eine Beeinflussung der Testergebnisse durch die Metabolisierung von reduziertem Glutathion oder Glutathiondisulfid durch zelluläre Enzymsysteme konnte somit ausgeschlossen werden.

Nach Zugabe von Katalase fanden sich verminderte spontane und stimulierte oxidative Aktivitäten im Vergleich zum Standardversuch. Es verblieb aber eine geringe, offenbar H_2O_2 -unabhängige oxidative Restaktivität.

4.5.5 Gesamtglutathion, reduziertes Glutathion und GSSG im Zellversuch

Unter der Annahme, daß die Konzentrationsänderungen des reduzierten Glutathions im Zellansatz nicht durch Transportvorgänge im Rahmen der intrazellulären Glutathionsynthese an den Zellmembranen bewirkt wurden, sondern tatsächlich Ausdruck einer Oxidation durch reaktive Sauerstoffmetabolite waren, wurde der Abfall des reduzierten Glutathions gegen die GSSG-Zunahme im Testüberstand aufgetragen. Man sieht eine kontinuierliche Zunahme der GSSG-Konzentration im Testansatz bei gleichzeitiger Vergrößerung von ΔGSH_{red} in den untersuchten Proben (Korrelationskoeffizient $r = 0,72$; $p < 0,001$; $n = 43$).

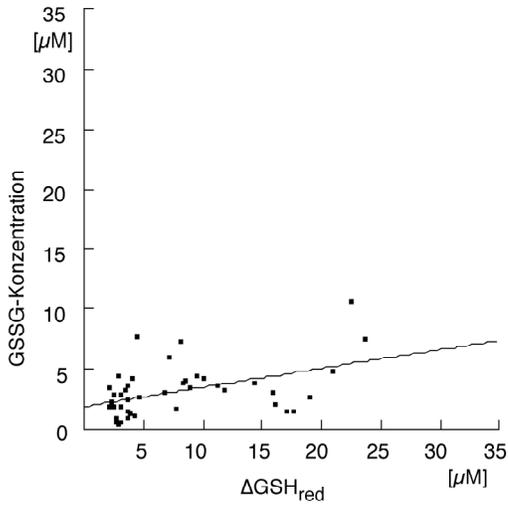
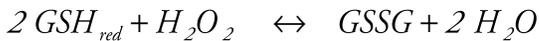


Abbildung 25: Zunahme der GSSG-Konzentrationen im Zellversuch bei gleichzeitigem Abfall des reduzierten Glutathions ($\Delta\text{GSH}_{\text{red}}$) im Testansatz

Die GSSG-Werte lagen zwischen 0,28 und 10,63 μM und $\Delta\text{GSH}_{\text{red}}$ zwischen 2,05 und 30,52 μM .

Unter Berücksichtigung der eingesetzten Methoden müßte sich entsprechend der Reaktionsgleichung



ein stöchiometrisch korrektes Verhältnis der Umsetzung von reduziertem Glutathion zu Glutathiondisulfid von 2 : 1 ergeben. Das gemessene Verhältnis lag bei 1,87 : 1. Dies entspricht einer Abweichung vom theoretisch erwarteten Wert von -6,5 %. Ursache ist vermutlich die Bildung gemischter Disulfide z. B. mit Proteinen, so daß die gemessene GSSG-Konzentration geringfügig zu niedrig ausfiel. Desweiteren ist die Meßgenauigkeit der Endpunktmessung bei einer verbleibenden Konzentration von reduziertem Glutathion im Bereich $\leq 25 \mu\text{M}$ im Testansatz eingeschränkt, so daß tendenziell eher etwas zu hohe Werte gemessen wurden (siehe 2.4.1).

Die Gesamtkonzentration an Glutathion im Testansatz blieb auch nach der Inkubationszeit wie in den H_2O_2 -Vorversuchen konstant, was in Übereinstimmung mit den Enzymblockadeversuchen gegen eine Aufnahme/Abgabe von Glutathion in/aus den Zellen spricht.

In Abbildung 26 wurden jeweils die Werte für ΔGSH_{red} ($n = 21$) aus der Endpunktmessung, die mittels der kinetischen Methode bestimmte Gesamtglutathionkonzentration im Testansatz ($n = 9$), sowie die GSSG-Konzentration im Testansatz ($n = 21$) aufgetragen.

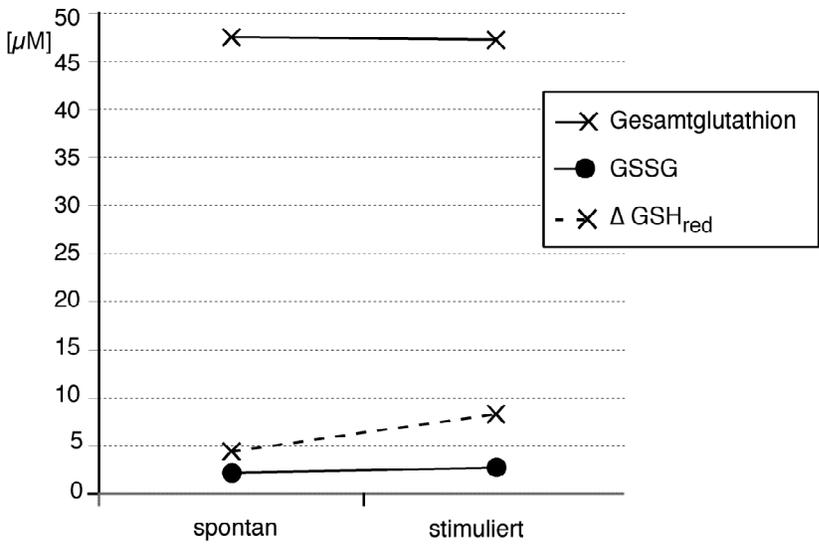


Abbildung 26: Gesamtglutathion, GSSG und ΔGSH_{red} im Standardversuch

Setzte man die spontanen und die stimulierten oxidativen Aktivitäten in Beziehung zur GSSG-Konzentration im Zellversuch, so errechnete sich für das untersuchte Kollektiv ($n = 22$) ein Korrelationskoeffizient r von 0,726 ($p < 0,001$) für die GSSG-Konzentration vs. die spontane oxidative Aktivität und ein r von 0,734 ($p < 0,001$) für die GSSG-Konzentration vs. die PMA-stimulierte oxidative Aktivität.

Zusammenfassend ging eine Verminderung der Konzentration an reduziertem Glutathion im Testansatz mit einer Erhöhung der GSSG-Konzentration einher. Die Gesamtglutathionkonzentration, die sich aus den Konzentrationen an reduziertem und oxidiertem Glutathion zusammensetzt, blieb dagegen unverändert. Die gemessenen oxidativen Aktivitäten korrelierten positiv und hochsignifikant mit den GSSG-Konzentrationen.

4.6 Gesamtglutathion in der BALF

Untersucht wurden 17 Kontrollpersonen, fünf gesunden Raucher, 26 Patienten mit ILD, vier Patienten mit subklinischer Alveolitis, sechs Patienten mit M. Boeck, acht Personen mit exogen allergischer Alveolitis sowie 12 Patienten nach Lungen-/Herzlungen transplantation.

Die Werte in der Kontrollgruppe lagen zwischen 2,55 μM und 8,19 μM , in der Gruppe der gesunden Raucher zwischen 8,92 μM und 18,22 μM , bei Patienten mit ILD zwischen 1,61 μM und 7,23 μM , bei der subklinischen Alveolitis zwischen 1,39 μM und 4,13 μM , bei der Sarkoidose zwischen 3,15 μM und 9,23 μM . In der Gruppe der Patienten mit exogen allergischer Alveolitis lagen die Werte zwischen 2,27 μM und 6,6 μM sowie nach LTx/HLT_x zwischen 1,67 μM und 7,88 μM .

Diagnosen	n	Gesamtglutathion in der BALF ± SEM [µM]	Kontrolle vs. p
Kontrollkollektiv	17	4,87 ± 0,4	
Gesunde Raucher	5	12,29 ± 1,57	0,0009
ILD	26	3,70 ± 0,27	0,0337
Subklinische Alveolitis	4	2,76 ± 0,57	0,0252
Sarkoidose	6	4,88 ± 0,77	0,6797
EAA	8	3,51 ± 0,52	0,0546
LTx/HLTx	12	3,59 ± 0,6	0,0374

Tabelle 19: Vergleich der Gesamtglutathionkonzentrationen in der BALF zwischen dem Kontrollkollektiv und den einzelnen Krankheitsbildern

Die Varianzanalyse ergab Hinweise auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Diagnosegruppen (p = 0,0004).

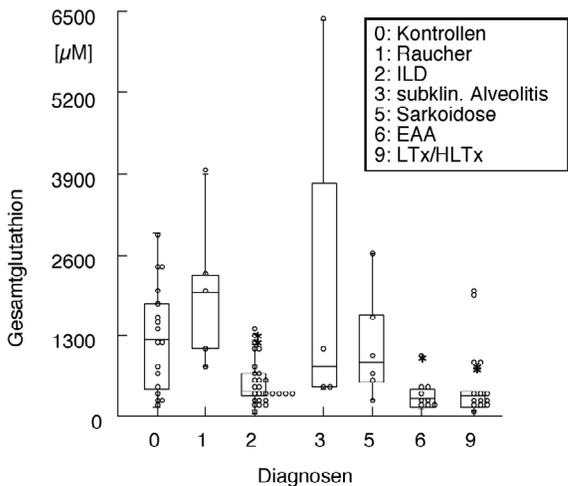


Abbildung 27: Gesamtglutathion in der BALF, aufgegliedert nach Kontroll- und Patientenkollektiven

In Abbildung 27 wurde dies graphisch dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied der BALF-Gesamtglutathionkonzentration

zwischen Kontrollkollektiv und Patienten mit Sarkoidose festgestellt werden. Eine grenzwertig signifikante Differenz fand sich hingegen zwischen Kontrollkollektiv und Patienten mit exogen allergischer Alveolitis. Signifikant waren die Konzentrationsunterschiede zwischen Kontrollpersonen und Patienten mit ILD, zwischen Kontrollpersonen und gesunden Rauchern, zwischen Kontrollpersonen und Patienten mit subklinischer Alveolitis sowie zwischen Kontrollpersonen und Patienten nach LTx/HLTx.

4.7 Bestimmung von Myeloperoxidase im Überstand und in den getesteten Zellen sowie in der BALF

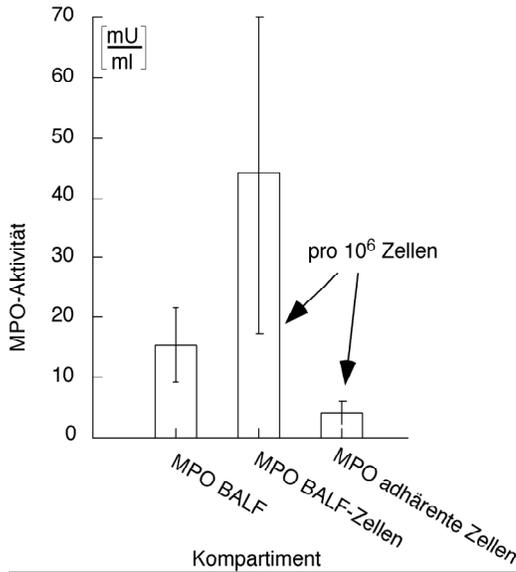


Abbildung 28: Überblick über die MPO-Aktivitäten in der BALF, in den BALF-Zellen und in den adhärenente Zellen

In Abbildung 28 ist in Form einer schematischen Übersicht dargestellt,

in welchem Ausmaß sich die gemessenen MPO-Aktivitäten in den einzelnen untersuchten Kompartimenten unterscheiden.

Im Gesamtkollektiv lagen die gemessenen Aktivitäten für MPO in der BALF zwischen 0,02 und 215,97 mU/ml, für die MPO-Aktivität im Zellüberstand zwischen 0,014 und 0,046 mU/ml, die MPO-Aktivität in den BALF-Zellen zwischen 1,77 mU/ml Zellysate aus 10⁶ Zellen und 255,36 mU/ml und in den adhärenen Zellen aus dem Zellversuch zwischen 0,11 und 36,03 mU/ml. Die Tabelle 20 gibt eine Übersicht über die in der BALF, im Zellüberstand des Zellversuches, in den BALF-Zellen und in den adhärenen Zellen gemessenen MPO-Aktivitäten, aufgeschlüsselt nach den Kontroll- und Patientenkollektiven.

Diagnose	MPO BALF [mU/ml] ± SEM	MPO Über- stand [mU/ml] ± SEM	MPO pro 10⁶ BALF-Zellen [mU/ml] ± SEM	MPO pro 10⁶ adhären- te Zel- len [mU/ml] ± SEM
Kontrollen	0,49 ± 0,14 n = 13	0,03 ± 0,01 n = 3	23,04 n = 1	0,93 ± 0,32 n = 5
Raucher	0,06 n = 1	-	-	1,01 n = 1
ILD	3,11 ± 1,60 n = 15	0,03 n = 1	23,58 ± 13,54 n = 4	2,70 ± 0,97 n = 6
Sarkoidose	2,63 ± 2,2 n = 3	0,03 ± 0,01 n = 2	2,0 n = 1	0,5 ± 0,36 n = 2
EAA	48,52 ± 44,29 n = 4	-	-	-
LTx/HLTx	51,14 ± 22,47 n = 11	0,05 n = 1	255,36 n = 1	5,35 ± 3,30 n = 5

Tabelle 20: Aufstellung der MPO-Aktivitäten in BALF, in den BALF-Zellen, im Testüberstand und in den adhärenen Zellen aus dem Zellversuch in den einzelnen Diagnosegruppen

Die MPO-Aktivität in der BALF lag in der Kontrollgruppe mit 0,49 mU/ml ± 0,14 am niedrigsten, gefolgt von den Aktivitäten in der

Gruppe der Patienten mit Sarkoidose mit $2,63 \text{ mU/ml} \pm 2,2$ und im ILD-Kollektiv mit $3,11 \text{ mU/ml} \pm 1,60$. Die bei weitem höchsten Werte wurden in der BALF des EAA-Kollektives mit einer Aktivität von $48,52 \text{ mU/ml} \pm 44,29$ und bei Patienten nach Lungen- bzw. Herzlungentransplantation mit einem Mittel von $51,14 \text{ mU/ml} \pm 22,47$ gemessen. Vergleicht man die Parameter mittels Varianzanalyse, ergaben sich Hinweise auf signifikante Unterschiede für die MPO-Aktivität in der BALF für die einzelnen Diagnosegruppen. Die MPO-Aktivität in der BALF der Kontrollgruppe unterschied sich signifikant von der MPO-Aktivität in der BALF der Patienten mit ILD ($p = 0,04$), der Patienten mit EAA ($p = 0,01$) und der Patienten nach Lungen- bzw. Herzlungentransplantation ($p = 0,0001$). Keine signifikanten Unterschiede fanden sich zwischen Kontrollgruppe und Patienten mit Sarkoidose ($p = 0,11$).

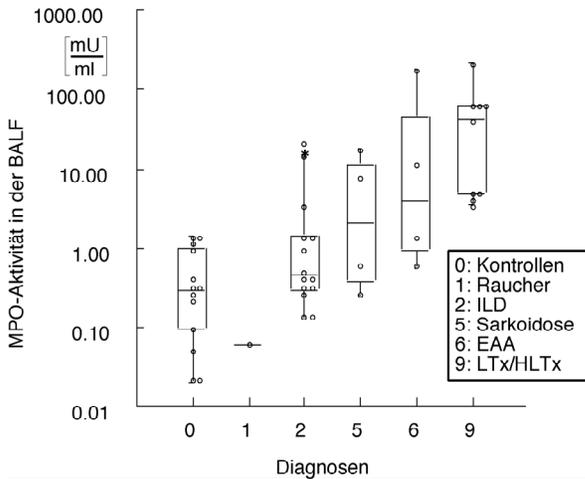


Abbildung 29: MPO-Aktivitäten in der BALF aufgeschlüsselt nach den einzelnen Kontroll- und Diagnosegruppen

Korrelierte man die MPO-Aktivität in der BALF mit dem prozentualen Anteil der polymorphonukleären Zellen in der BALF-Zelldifferenzierung, ergab sich ein Hinweis auf einen linearen Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,62$ ($p < 0,01$).

Die MPO-Aktivitäten in den Zellüberständen lagen bei $0,031 \text{ mU/ml} \pm 0,01$ in der Kontrollgruppe ($n = 3$), bei $0,03 \text{ mU/ml}$ in der Gruppe der Patienten mit ILD ($n = 1$), zwischen $0,02$ und $0,04 \text{ mU/ml}$ bei Patienten mit Sarkoidose ($n = 2$) und bei $0,05 \text{ mU/ml}$ nach Lungen- oder Herzlungentransplantation ($n = 1$).

Verglich man die MPO-Aktivitäten in der BALF mit der MPO-Aktivität in den Zellüberständen fanden sich für alle untersuchten Kontroll- und Patientenkollektive hochsignifikante Unterschiede ($p = 0,0001$), so daß Verunreinigungen mit BALF oder MPO ausgeschlossen sind.

Die MPO-Aktivitäten in den BALF-Zellen lagen in der Kontrollgruppe zwischen $5,12$ und $23,04 \text{ mU/ml}$ ($n = 3$). Niedrigere Aktivitäten fanden sich bei Patienten mit Sarkoidose, wo die MPO-Aktivität in den BALF-Zellen bei $2,0 \text{ mU/ml}$ lag ($n = 1$). Deutlich höhere Werte wurden bei ILD gemessen; die Werte lagen zwischen $1,77$ und $62,72 \text{ mU/ml}$ ($n = 4$). Nach Lungen- oder Herzlungentransplantation lagen die gemessenen Aktivitäten bei $255,36 \text{ mU/ml}$ ($n = 1$). Aufgrund der niedrigen Fallzahlen wurde nicht statistisch untersucht.

Die MPO-Aktivitäten in der Kontrollgruppe lagen in den adhären Zellen des Zellversuches bei $0,93 \text{ mU/ml} \pm 0,32$ ($n = 5$), im ILD-Kollektiv bei $2,70 \text{ mU/ml} \pm 0,97$ ($n = 6$), bei Patienten mit Sarkoidose bei $0,5 \pm 0,36$ ($n = 2$) und nach Lungen- oder Herzlungentransplantation bei $5,35 \text{ mU/ml} \pm 3,303$ ($n = 5$). Auch die MPO-Aktivitäten in den adhären Zellen aus dem Zellversuch unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,31$).

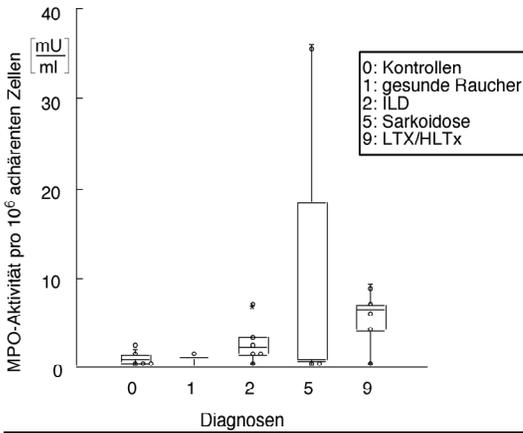


Abbildung 30: MPO-Aktivitäten in den adhärennten Zellen des Zellversuches in den einzelnen Kontroll- und Diagnosekollektiven

Verglich man die MPO-Aktivitäten in den Zellen des Zellversuches und den BALF-Zellen, fanden sich in der Varianzanalyse Hinweise auf signifikante Unterschiede ($p = 0,0026$).

Korrelierte man die gemessenen MPO-Aktivitäten in den einzelnen Kompartimenten mit den gemessenen spontanen und stimulierten oxidativen Aktivitäten, ergaben sich zum Teil Hinweise auf lineare Zusammenhänge. Einen Überblick zeigt die Tabelle 21.

Parameter vs. Parameter	n	Korrelationskoeffizient r	p
MPO-Aktivität BALF vs. spontane oxidative Aktivität	43	0,872	< 0,001
MPO-Aktivität BALF vs. stimul. oxidative Aktivität	47	0,887	< 0,001
MPO-Akt. BALF-Zellen vs. spontane oxidative Aktivität	9	0,975	< 0,001
MPO-Akt. BALF-Zellen vs. stimul. oxidative Aktivität	9	0,976	< 0,001
MPO-Akt. Testzellen vs. spontane oxidative Aktivität	20	0,16	0,487
MPO-Akt. Testzellen vs. stimul. oxidative Aktivität	20	0,165	0,486
MPO-Akt. Überstand vs. spontane oxidative Aktivität	7	0,464	0,296
MPO-Akt. Überstand vs. stimul. oxidative Aktivität	7	0,463	0,297

Tabelle 21: Übersicht über die Korrelationen der spontanen und stimulierten oxidativen Aktivitäten mit den MPO-Aktivitäten in der BALF, in den BALF- Zellen, in den Testüberständen und in den adhärenen Zellen

Während die spontanen und oxidativen Aktivitäten signifikant mit den MPO-Aktivitäten in der BALF und in den BALF-Zellen korrelierten, fand sich kein Hinweis auf einen linearen Zusammenhang zwischen den gemessenen oxidativen Aktivitäten und den MPO-Aktivitäten im Testüberstand und in den adhärenen Zellen des Zellversuches.

Zusammenfassend fanden sich niedrige MPO-Aktivitäten in den adhärenen Zellen, die sich auch zwischen den einzelnen Diagnose- und Kontrollkollektiven nicht unterschieden, trotz hoher MPO-Aktivität in den BALF-Zellen. In den BALF-Zellen fanden sich Hinweise auf signifikante Unterschiede der MPO-Aktivitäten zwischen Kontrollkollektiv und Patienten mit ILD und LTx/HLTx. Die MPO-Aktivitäten in der BALF differierten signifikant zwischen Kontrollgruppe und Patienten mit EAA, ILD und nach LTx/HLTx. In

den Zellüberständen konnte nur eine minimale MPO-Aktivität ohne signifikante Unterschiede zwischen den Kollektiven gefunden werden. Die MPO-Aktivitäten in der BALF und in den BALF-Zellen, nicht aber die MPO-Aktivitäten in den adhärennten Zellen und den Zellüberständen, korrelierten mit den gemessenen spontanen und stimulierten oxidativen Aktivitäten.

4.8 Standardansatz

Verglichen wurden jeweils die spontanen und stimulierten oxidativen Aktivitäten des Kontrollkollektivs mit den unterschiedlichen Diagnosegruppen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 22 aufgeführt.

Diagnose	n	spontane oxidat. Aktivität pro 10^6 Zellen \pm SEM [nmol/h \cdot 10^6] stimulierte oxidat. Akt. pro 10^6 Zellen \pm SEM [nmol/h \cdot 10^6]	P bei Kontrollen vs. Diagnosen
Kontrollen	16	2,75 \pm 0,66 3,02 \pm 0,67	-
Raucher	5	6,33 \pm 1,68 11,1 \pm 3,87	> 0,05 0,0123
ILD	26	20,7 \pm 11,93 38,0 \pm 22,01	0,02 0,0003
subklinische Alveolitis	3	0,93 \pm 0,64 2,39 \pm 1,28	> 0,05 > 0,05
Sarkoidose	7	2,8 \pm 1,13 5,0 \pm 1,58	> 0,05 > 0,05
EAA	9	57,9 \pm 26,3 106,6 \pm 54,6	0,0091 0,0209
LTx/HLTx	12	267,5 \pm 127,9 467,6 \pm 211,3	0,0011 0,0002

Tabelle 22: Vergleich der oxidativen Aktivitäten zwischen der Kontrollgruppe und den einzelnen Krankheitsbildern

4.8.1 Kontrollen vs. gesunde Raucher

In der Gruppe der nicht rauchenden Kontrollpersonen lagen die Werte für die spontane oxidative Aktivität zwischen 0,01 nmol/h \cdot

10^6 und $9,5 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$, die stimulierte oxidative Aktivität zwischen $0,01 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ und $9,0 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$.

Die minimale oxidative Aktivität unstimulierter Zellen in der rauchenden Kontrollgruppe lag bei $2,7 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$, die maximale bei $11,6 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$. Nach PMA-Stimulation der Zellen gesunder Raucher lag der minimale Wert der oxidativen Aktivität bei $3,3 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ und der maximale Wert bei $24,2 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$.

Die spontanen oxidativen Aktivitäten beider Gruppen unterschieden sich nicht signifikant, wohl aber die stimulierten oxidativen Aktivitäten ($p = 0,0123$).

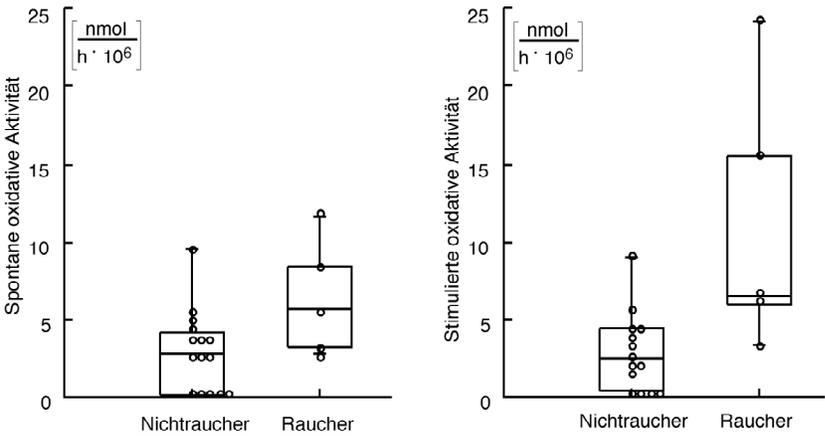


Abbildung 31: Spontane und stimulierte oxidative Aktivitäten von Kontrollpersonen und gesunden Rauchern

4.8.2 Kontrollen vs. interstitielle Lungenerkrankung

In der Patientengruppe mit ILD fanden sich spontane oxidative Aktivitäten zwischen $0,3 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ und $311,3 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ und stimulierte oxidative Aktivitäten zwischen $1,8 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ und $538,5 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$. Die spontanen und PMA-stimulierten oxidativen Aktivitäten von Kontrollkollektiv und Patienten mit ILD unterschied sich signifikant ($p = 0,02$ und $p = 0,0003$).

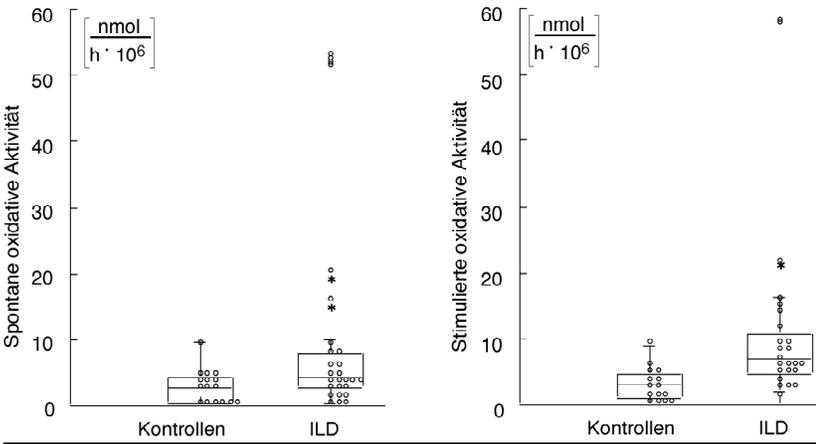


Abbildung 32: Vergleich der spontanen und der stimulierten oxidativen Aktivitäten des Kontrollkollektives und Patienten mit ILD

4.8.3 Kontrollen vs. subklinische Alveolitis

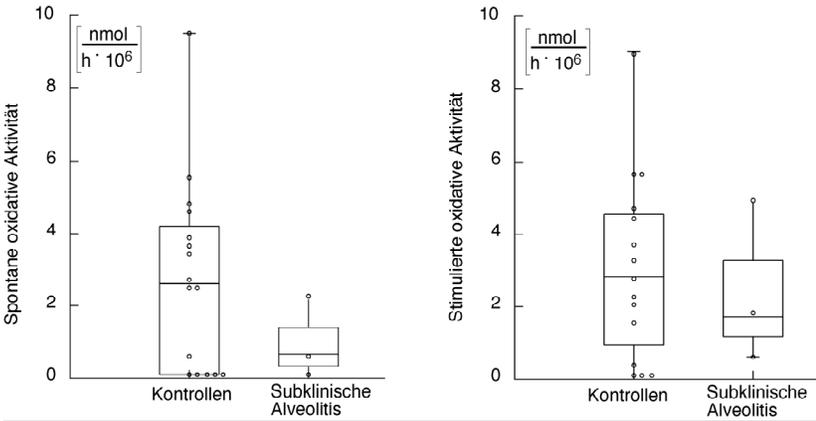


Abbildung 33: Vergleich der oxidativen Aktivitäten mit und ohne PMA-Stimulation zwischen Patienten mit subklinischer Alveolitis und dem Kontrollkollektiv

Die Werte für die spontane oxidative Aktivität lagen zwischen $0,01 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ und $2,16 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ und für die stimulierten Zellen zwischen $0,6 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ und $4,88 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ ($n = 3$).

Weder die spontanen noch die PMA-stimulierten oxidativen Aktivitäten unterschieden sich signifikant von den Werten der Kontrollgruppe.

4.8.4 Kontrollen vs. Sarkoidose

Die absoluten Werte lagen für die spontane oxidative Aktivität zwischen $0,01 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ und maximal $7,4 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ und für die stimulierte oxidative Aktivität zwischen $0,01 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ und $10,2 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ und somit im Bereich der nicht rauchenden Kontrollen.

Es fanden sich jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen den spontanen und stimulierten oxidativen Aktivitäten der Patienten mit Sarkoidose und der Kontrollgruppe.

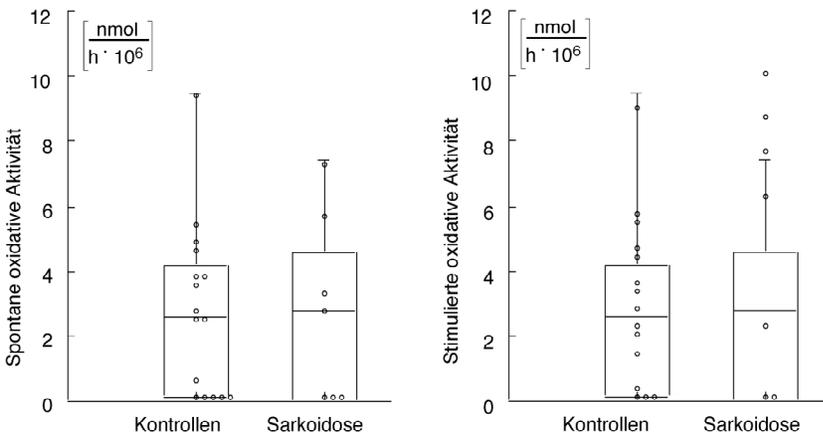


Abbildung 34: Vergleich der spontanen und stimulierten oxidativen Aktivitäten der Patienten mit Sarkoidose und des Kontrollkollektives

4.8.5 Kontrollen vs. exogen allergische Alveolitis

Die spontane oxidative Aktivität variierte bei der EAA über einen Bereich von $1,4 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ bis $254,4 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$, sowie nach PMA-Stimulation von $6,6 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ bis $529,7 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$.

Sowohl die spontanen oxidativen Aktivitäten der Patienten mit EAA, als auch die PMA-stimulierten oxidativen Aktivitäten unterschieden sich signifikant von der Kontrollgruppe ($p = 0,0091$ und $p = 0,0209$).

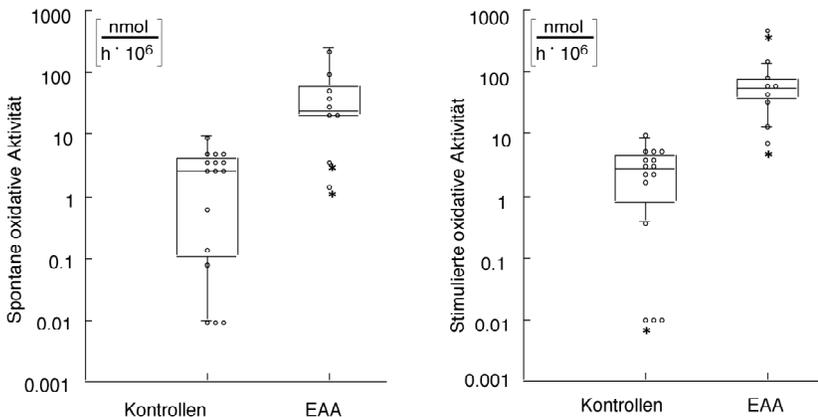


Abbildung 35: Vergleich der spontanen und der stimulierten oxidativen Aktivitäten von Kontrollpersonen und Patienten mit EAA

4.8.6 Kontrollen vs. Patienten nach Lungen- oder Herz-lungentransplantation

Die oxidativen Aktivitäten nach Lungentransplantation lagen zwischen $0,07 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ und maximal $1431,0 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$, sowie zwischen $0,579 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ und maximal $2289,0 \text{ nmol/h} \cdot 10^6$ bei den stimulierten oxidativen Aktivitäten.

Sowohl die spontanen als auch die stimulierten oxidativen Aktivitäten unterschieden sich signifikant von den Werten des Kontrollkollektives ($p = 0,0011$ und $p = 0,0002$).

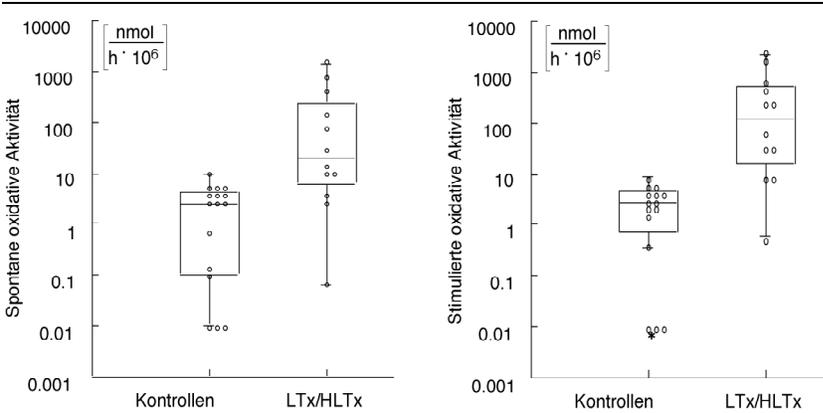


Abbildung 36: Spontane und stimulierte oxidative Aktivitäten nach LTx/HLTx im Vergleich zum Kontrollkollektiv

Zusammenfassend war zu beobachten, daß sich die oxidativen Aktivitäten der Patienten mit ILD, EAA und nach LTx/HLTx signifikant von den Werten des nicht rauchenden Kontrollkollektives unterschieden. Bei den rauchenden Kontrollpersonen bestanden nur für die PMA-stimulierten Zellen signifikante Unterschiede in den oxidativen Aktivitäten im Vergleich zum nicht rauchenden Kollektiv. Weder bei der Sarkoidose, einer Lungenparenchymerkrankung, die selten in eine Fibrose übergeht, noch bei der subklinischen Alveolitis fanden sich signifikante Differenzen zum Kontrollkollektiv.

4.9 Zusammenhang zwischen der Gesamtzellzahl in der BALF und der oxidativen Aktivität

Da die Gesamtzellzahl bisher eine ungeklärte Rolle für die Beurteilung der Alveolitis spielt, wurden die gemessenen spontanen und stimulierten oxidativen Aktivitäten mit der Gesamtzellzahl in der BALF korreliert. Betrachtet man alle Diagnosegruppen zusammen, fand sich nur ein sehr niedriger Korrelationskoeffizient für die spontane und stimulierte oxidative Aktivität ($r = 0,28, p = 0,016$; $r = 0,29, p < 0,01$).

Untersuchte man die einzelnen Diagnose- und Kontrollgruppen getrennt, ergaben sich nur in der Gruppe der Patienten mit ILD sowohl für die spontane oxidative Aktivität als auch für die stimulierte oxidative Aktivität vs. die Gesamtzellzahl in der BALF Korrelationskoeffizienten von $r = 0,68$ und $r = 0,66$ (p jeweils $< 0,01$).

4.10 Messung von oxidiertem Methionin in den Proteinen der BALF

Tabelle 23 zeigt die in der BALF gemessenen Methioninreste in den BALF-Proteinen der verschiedenen Untersuchungskollektive. Die Werte lagen für das Kontrollkollektiv zwischen 1,81 % und 8,7 %, für die gesunden Raucher zwischen 3,2 % und 5,0 %, für die subklinische Alveolitis zwischen 3,09% und 9,5%, für Patienten mit ILD zwischen 2,2 % und 12,15 %, für Patienten mit Sarkoidose zwischen 1,05 % und 6,8 %, für Patienten mit EAA zwischen 2 % und 10,2 % und für Patienten nach LTx/HLTx zwischen 5,3 % und 25,04 %.

Kontrollen vs.	n	Methionin [%] MW \pm SD	p
Kontrollkollektiv	17	4,26 \pm 2,01	
Gesunde Raucher	4	4,05 \pm 0,89	0,86
ILD	27	6,04 \pm 3,0	0,03
Subklinische Alveolitis	4	6,21 \pm 3,49	0,28
Sarkoidose	6	3,76 \pm 1,86	0,72
EAA	8	4,25 \pm 2,85	0,62
LTx/HLTx	11	12,92 \pm 6,26	0,0001

Tabelle 23: Methioninsulfoxidanteil in den Proteinen der BALF aufgeschlüsselt nach den unterschiedlichen Kontroll- und Patientenkollektiven

Mittels Varianzanalyse fanden sich signifikante Unterschiede. Untersuchte man die einzelnen Diagnosegruppen in Bezug auf das Kontrollkollektiv, fanden sich signifikante Differenzen zwischen Kontrollgruppe und Patienten mit ILD ($p = 0,033$) und nach Lungen- bzw. Herzlungentransplantation ($p = 0,0001$). Die Methioninsulfo-

Midwerte in der BALF von gesunden Rauchern, subklinischer Alveolitis, Sarkoidose und EAA unterschieden sich dagegen nicht signifikant vom Kontrollkollektiv.

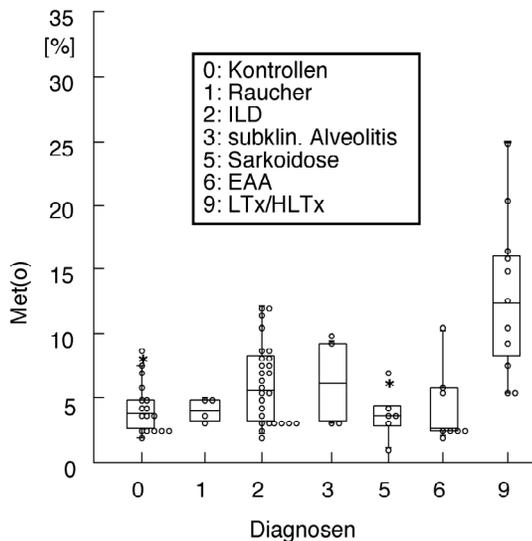


Abbildung 37: Gegenüberstellung des in der BALF gemessenen Methioninsulfoxid in den Proteinen der BALF [%] in den einzelnen Diagnosegruppen

5 Diskussion

Im Rahmen der von der Wilhelm Sander-Stiftung geförderten Studie „Pathogenetische Bedeutung von Störungen des Oxidantien/Antioxidantien-Gleichgewichtes bei Lungengerüsterkrankungen“ sollten die pathogenetisch relevanten oxidativen und antioxidativen Faktoren für die Entstehung fibrotischer Lungenveränderungen identifiziert und ihr Zusammenspiel näher untersucht werden. In diesem Rahmen entstand auch diese Arbeit, mit deren Hilfe eine Methode etabliert werden sollte, die die extrazelluläre biologische Wirksamkeit der Sauerstoffradikale in der Lunge an ex vivo kultivierten bronchoalveolären Zellen analysiert. Ausgehend von der Hypothese, daß ein Ungleichgewicht von Oxidantien und Antioxidantien an der Entstehung und Progression chronisch-entzündlicher, und hier insbesondere interstitieller Lungenerkrankungen mitverantwortlich ist, wurde der Oxidantienausstoß pulmonaler Entzündungszellen durch einige Vorauforen untersucht (*Behr et al., 1991; Buhl et al., 1994; Sherson et al., 1992; Dalhoff et al., 1992; Calhoun et al., 1988; Wallaert et al., 1990*). Das Ausmaß der Radikalbildung von Alveolarmakrophagen bei interstitiellen Lungenerkrankungen wurde daher außerdem als möglicher funktioneller Beitrag zur Fibroseentstehung sowie als eine neue, spezifischere Methode zur Aktivitätsbeurteilung von interstitiellen Lungenerkrankungen evaluiert.

5.1 Zur Methodik des Makrophagenassay

5.1.1 Sensitivität und Meßbereich

Durch die systematische Austestung verschiedener $\text{GSH}_{\text{red}}^-$ Konzentrationen im Assay konnten die optimalen Versuchsbedingungen ermittelt werden. Dabei stellte sich hinsichtlich Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Assays eine $\text{GSH}_{\text{red}}^-$ Konzentration von $50 \mu\text{M}$ als optimal heraus. Bei dieser Konzentration konnte eine Änderung der $\text{GSH}_{\text{red}}^-$ Konzentration von $5 \mu\text{M}$ sicher und reproduzierbar gemessen werden.

5.1.2 Spezifität des Makrophagenassays

5.1.2.1 Einfluß unterschiedlicher Zellzahlen

Die Erhöhung der Zellzahlen auf den Platten ergab zunächst auch eine Erhöhung der Glutathiondifferenzen im Testansatz. Die oxidativen Aktivitäten pro Zelle unterschieden sich jedoch nicht signifikant. Das bedeutet, daß eine unterschiedlich hohe Anzahl eingesetzter Zellen auf den Platten trotz erhöhter $\Delta\text{GSH}_{\text{red}}$ keine Änderung der oxidativen Aktivitäten bewirkte und bestätigt die Annahme, daß die oxidative Aktivität eine Aussage über den Radikalausstoß der einzelnen Zelle ermöglicht, unabhängig von der eingesetzten Zellzahl. Man muß jedoch berücksichtigen, daß eine Erhöhung der Zellzahlen auf den Platten immer dichtere Zellrasen ergibt, so daß Zell-Zell-Interaktionen zu stimulatorischen oder auch inhibitorischen Effekten führen könnten. Eine Zellzahl von $2 \cdot 10^6$ Zellen in 35 mm Wells ergibt bereits einen konfluierenden Zellrasen. Es wurden daher immer Zellzahlen von $0,5 \cdot 10^6$ oder $1 \cdot 10^6$ pro Well eingesetzt (*Adams, 1979; Senior et al., 1981*).

5.1.2.2 Blockadeversuche

Die Zugabe von Katalase im Überschuß zum Zellversuch verursachte eine nicht vollständige Verminderung des Abfalles an reduziertem Glutathion sowohl im stimulierten als auch im unstimulierten Versuchsansatz, was darauf hinweist, daß die Oxidation des extrazellulären Glutathions überwiegend, aber nicht ausschließlich durch Wasserstoffperoxid verursacht ist. Insbesondere bei höheren oxidativen Aktivitäten sind somit auch andere reaktive Sauerstoffmetabolite, z. B. Hydroxylradikale an der extrazellulären Oxidation von Glutathion beteiligt.

Um mögliche Beeinflussungen der Testaussage durch den zellulären Glutathionmetabolismus auszuschließen, wurden die wichtigsten Enzyme des Glutathionmetabolismus durch spezifische Inhibition in Testreihen gehemmt und so deren Einfluß auf das Testsystem überprüft (*Crystal et al., 1991; Crystal, 1991; Cantin und Begin, 1991; Deneke und Fanburg, 1989; Meister, 1984*).

Acivicin als Inhibitor der γ -Glutamyltranspeptidase bewirkte im Zellversuch keine Veränderung der oxidativen Aktivitäten im Vergleich zum Standardansatz. Eine Aufnahme von Glutathion in die Zellen konnte demnach als Ursache für den Abfall des reduzierten Glutathions in der Testlösung ausgeschlossen werden.

Auch der geschwindigkeitsbestimmende und durch die intrazelluläre Glutathionkonzentration negative gegenregulierte Schritt der intrazellulären Glutathionbiosynthese, die Synthese von Gammaglutamylcystein aus Cystein und Glutaminsäure, wurde durch die Inhibition von γ -Glutamylcysteinsynthetase mit BSO untersucht und veränderte die oxidativen Aktivitäten im Assay nicht.

Mit Hilfe von Carmustin wurde das Enzym Glutathionreduktase inhibiert. Es ist für das intrazelluläre Verhältnis von reduziertem Glutathion zu Glutathiondisulfid verantwortlich, welches normalerweise zu 98 % auf Seiten des reduzierten Glutathions liegt. Auch durch diese Maßnahme wurde die im Zellassay gemessene oxidative Aktivität nicht signifikant verändert.

Gleichzeitig bestimmten wir in der Testlösung die Konzentration an GSH_{red} und GSSG sowie die Gesamtglutathionkonzentration. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, blieb die Gesamtglutathionkonzentration im Test weitestgehend konstant. In Übereinstimmung mit den Enzym-Blockadeversuchen spricht auch dieser Befund dafür, daß der zelluläre Glutathionmetabolismus die extrazelluläre Glutathionkonzentration nicht beeinflusst, so daß der Testassay spezifisch oxidative Effekte erfaßt. Zusätzlich entsprach der Abfall des reduzierten Glutathions dem Anstieg der GSSG-Konzentration in der Testlösung in stöchiometrischer Übereinstimmung mit der oxidativen Umsetzung von GSH_{red} zu GSSG.

Durch systematische Testreihen konnten wir mittels punktueller Hemmung entscheidender Schritte im Glutathionmetabolismus ausschließen, daß die gemessenen oxidativen Aktivitäten durch die Stoffwechselaktivitäten der Zellen beeinflusst werden. Der Testansatz erfaßt somit spezifisch die oxidative Aktivität der ex vivo kultivierten Alveolarmakrophagen.

5.1.3 Rolle der MPO

Myeloperoxidase ist ein Markerenzym für die lokale neutrophile Granulozytenaktivität in der Lunge (*Schmekel et al., 1990*).

Während in der BALF teilweise sehr hohe MPO-Aktivitäten gemessen wurden, fanden sich nur minimale MPO-Aktivitäten in den Testüberständen, unabhängig von der Diagnosegruppe. Die gemessenen oxidativen Aktivitäten sind demnach nicht das Ergebnis neutrophiler MPO-abhängiger Reaktionen. Auch in den Diagnosegruppen mit hoher Neutrophilenzahl in der BALF kam es nicht zu einer signifikanten Erhöhung der MPO-Aktivität im Testansatz, so daß eine relevante Kontamination mit neutrophilen Granulozyten ausgeschlossen werden kann.

Die hohen intrazellulären MPO-Werte in den BALF-Zellen bei sehr niedrigen Werten in den adhärennten Zellen zeigen, daß es sich auf den Platten tatsächlich, wie in der Literatur beschrieben, vorwiegend um AM handelte. Dies gilt um so mehr, da sich auch bei den granulozytenreichen Krankheitsbildern bezüglich der intrazellulären MPO der adhärennten Zellen keine Unterschiede zwischen den einzelnen Krankheitsbildern und dem Kontrollkollektiv finden ließen. Schmekel et al. konnten lediglich in 4% der von ihnen untersuchten Lavagemakrophagen mittels eines immunhistochemischen Verfahrens MPO nachweisen. Die tatsächlich gemessenen, sehr niedrigen MPO-Aktivitäten in den Testüberständen und adhärennten Zellen des Makrophagenassays sind möglicherweise durch Inkorporation von MPO im Rahmen der Phagozytose oder bei großem AM-Umsatz auch durch Peroxidasen unreiferer monozytenähnlicher Alveolarmakrophagenvorstufen bedingt (*Schmekel et al., 1990; Breton-Gorius et al., 1982*). Auch bei den Krankheitsbildern mit hohem Granulozytenanteil in der BALF-Zelldifferenzierung und damit positiv korrelierten hohen MPO-Aktivitäten kam es somit nicht zu einer signifikanten Verunreinigung der Platten mit neutrophilen Granulozyten.

Die MPO-Aktivitäten in der BALF und den BALF-Zellen, nicht aber die MPO-Aktivitäten im Testansatz und in den adhärennten Zellen

korrelieren mit den gemessenen oxidativen Aktivitäten. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß vermutlich sowohl die oxidativen Aktivitäten der AM wie die MPO-Aktivität in der BALF und in den BALF-Zellen zu einer erhöhten Oxidantienbelastung in der Lunge beitragen, wobei die oxidative Aktivität der AM jedoch ein von der MPO unabhängiger Parameter ist.

5.1.4 Vergleich mit anderen Meßverfahren

Die Messung von Wasserstoffperoxid und Sauerstoffmetaboliten bei den Voruntersuchern erfolgte über unterschiedliche Methoden.

Bereits 1987 beschrieben Clement et al. (Clement et al., 1987) einen signifikant erhöhten spontanen und stimulierten Radikalausstoß bei Kindern mit interstitieller Fibrose. Der Nachweis von Wasserstoffperoxid erfolgte durch eine von Pick und Keisari beschriebene Methode, mittels der die Wasserstoffperoxidkonzentration durch die Oxidation von Phenolrot, katalysiert durch Meerrettichperoxidase, bestimmt wurde (Pick und Keisari, 1980). Der Meßbereich liegt zwischen 1-60 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$. Vorteil der Phenolrotmethode ist die geringe Toxizität des Phenolrotes, insbesondere auch in Zellassays. Nachteil des Verfahrens ist die mögliche Interferenz der Peroxidaseaktivität z. B. mit Medikamenten (Anderson, 1992). Zudem beobachtete Anderson ebenso wie Berger et al. bei unstimulierten PMN auch eine Aufnahme von Wasserstoffperoxid aus dem Extrazellulärraum, d. h., daß die extrazellulär wirksamen Wasserstoffperoxidkonzentrationen von stimulationsabhängigen Membranvorgängen beeinflussbar sein könnten. Je nach Meßmethode wurden in der Literatur unterschiedlich hohe Größenordnungen an H_2O_2 angegeben (Berger et al., 1990). Superoxidanionen wurden von den genannten Autoren mittels der hochspezifischen Methode der Reduktion von Ferricytochrom C gemessen (Pick und Keisari, 1980; Massey, 1959). Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid wurden demnach mit zwei verschiedenen Assays bestimmt.

Im Rahmen des Vergleiches oxidativer Parameter verschiedener Spezies wurden die spontanen und stimulierten oxidativen Aktivitäten von vier Kontrollpersonen mit den Ergebnissen der Ferricytochrom-

Methode verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden in Tabelle 24 aufgeführt.

	Fallzahl	O ₂ ⁻ Produktion mittels Ferricytochrom-Methode [μM/0,5 • 10 ⁶ Zellen • h ⁻¹] MW ± SD	Oxidative Aktivität [μM/0,5 • 10 ⁶ Zellen • h ⁻¹] MW ± SD	O ₂ ⁻ / oxidative Aktivität
Spontan	4	8,08 ± 4,93	2,98 ± 2,29	2,71
PMA-stimuliert	4	15,56 ± 4,89	5,43 ± 2,89	2,86

Tabelle 24: Vergleich der Superoxidationbestimmung mittels Ferricytochrom-Methode mit den oxidativen Aktivitäten

Trotz der niedrigen Fallzahlen könnte dies bedeuten, daß die Ferricytochrom-Methode die biologische Wirksamkeit der gemessenen Superoxidationenproduktion der adhärenen Zellen im Vergleich zur oxidativen Aktivität etwa um den Faktor 2,8 überschätzt (*Neuber, 1999*).

Strausz und Mitarbeiter (*Strausz et al., 1990*) untersuchten anhand von erwachsenen Patienten mit interstitieller Lungenfibrose die Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten mit Hilfe der Chemilumineszenzmethode nach Trush et al. Die exakten Mechanismen dieser Methode, die letztendlich auf der Emission von Licht aus elektrisch angeregten Molekülen wie z. B. „singlet oxygen“ beruht, sind noch nicht bekannt. Postuliert wurde eine Reaktion von Wasserstoffperoxid mit dem im Überschuß vorhandenen Luminol, wodurch über mehrere Zwischenschritte zu einem 3-Aminophthalatdianion Licht frei wird und die CL-Aktivität direkt proportional zur Wasserstoffperoxidkonzentration bestimmt werden kann.

Trush und Mitarbeiter wiesen darauf hin, daß das CL-Phänomen eng mit der zellulären Aktivierung und dem intrazellulären Metabolismus von phagozytierenden Zellen korreliert. De Baetselier et al. maßen u. a. die zytolytische Wirkung z. B. auf Tumorzellen und die

Phagozytosefähigkeit von AM mit Hilfe der CL. Die Chemilumineszenzantwort phagozytischer Zellen wurde dort beschrieben als ein Vorgang, der von vielen humoralen und zellulären Stoffwechselforgängen und Aktivierungen beeinflusst ist. Thorpe et al. beschrieben 1986, daß durch die Zugabe eines Scavengers zum Test die CL reduziert wurde, d. h., daß unter in vitro Bedingungen nicht das biologisch und klinisch relevante Korrelat gemessen wurde, da in der BALF Glutathion als Radikalfänger vorhanden ist. Auch Grebner et al. zeigten einen engen Zusammenhang der CL zur Phagozytoseaktivität von phagozytischen Zellen, die wohl indirekt auch zur Gewebeschädigung beiträgt, jedoch nicht direkt das Ausmaß der Radikalschädigung im Lungenmilieu durch reaktive Sauerstoffmetaboliten oder Wasserstoffperoxid zeigt (Trush et al., 1978; Seitz, 1978; De Baetselier und Schram, 1986; Thorpe und Kricka, 1986; Grebner et al., 1977).

Vorteil dieser Methode ist die Detektion von Wasserstoffperoxid in Konzentrationen bis zu 10 mM mit hohem oberem Meßbereich. Die Materialien sind billig, verfügbar und stabil. Nachteil ist, daß letztendlich nicht geklärt ist, welchem Kompartiment die entstehende Chemilumineszenz (CL) zuzuordnen ist und welche Radikale im Zellassay aufgrund der multiplen Sauerstoffmetabolite im Gegensatz zu zellfreien Assays detektiert werden. Für Patienten mit Sarkoidose wurde beispielsweise von mehreren Arbeitsgruppen eine erhöhte Freisetzung von Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen mittels der Chemilumineszenz-, Phenolrot- oder Ferricytochrommethode gemessen. Kienast et al. untersuchten mit Hilfe der Chemilumineszenzmethode Alveolarmakrophagen von Kontrollpersonen nach SO₂-Exposition und verglichen diese mit der ROI-Freisetzung von Patienten mit Sarkoidose. Die Radikalfreisetzung nach SO₂-Exposition erreichte nicht die ROI-Produktion von Sarkoidosepatienten, die im Vergleich zur Kontrollgruppe um das 3,9-fache erhöht war. In unseren Untersuchungen unterschieden sich die spontanen und stimulierten oxidativen Aktivitäten von AM des Sarkoidosekollektives jedoch nicht signifikant von den Werten der Kontrollgruppe (Kienast et al., 1993). Tatsächlich ist die Sarkoidose auch durch eine lymphozytäre Alveolitis mit hoher Spontanremissionsrate und relativ guter

Prognose trotz ausgeprägter granulomatöser Veränderungen des Lungenparenchyms gekennzeichnet. Aus der Literatur ist bekannt, daß erst im Stadium III der Sarkoidose, das mit einem zunehmenden fibrotischen Umbau des Lungengewebes einhergeht, eine Zunahme der neutrophilen Granulozyten in der BALF auftritt. Diese könnte mit einer erhöhten Oxidantienbelastung einhergehen und so auch die Fibrogenese fördern (*Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, 1993; Crystal et al., 1981; Davis, 1994; Thompson, 1993*)

Desweiteren diffundiert Wasserstoffperoxid gut durch Zellmembranen, weshalb ein Test, der letztendlich nur die tatsächliche extrazelluläre Wirkung der Oxidantien bezüglich der Prüfung der biologisch relevanten Auswirkungen auf das Lungengewebe mißt, überlegen ist. In allen aufgeführten Voruntersuchungen wurden mehrere Tests benötigt, um zumindest Wasserstoffperoxid und Superoxidradikale zu bestimmen, ohne daß durch die teils sehr sensitiven Tests die biologische Wertigkeit der gemessenen Ergebnisse beurteilt werden konnte.

Es wurde eine Methode etabliert, die einerseits ein pathophysiologisch wichtiges Substrat verwendet und zusätzlich die tatsächliche extrazelluläre biologische Wirksamkeit der von AM freigesetzten Oxidantien in der Lunge ex vivo simuliert. Die Oxidation des reduzierten Glutathions wurde valide gemessen. Die vorliegenden Befunde belegen, daß die Freisetzung der ROS tatsächlich über ex vivo kultivierte Makrophagen erfolgte.

5.1.5 Limitationen der Methode

Bei Krankheitsbildern mit einem sehr hohen Anteil an Granulozyten spiegelte die alleinige Untersuchung der oxidativen Aktivitäten der AM in der Lunge zur Gesamtbeurteilung nur einen Teil der tatsächlichen zellbedingten Oxidantienbelastung wider, da den PMN ein zunehmend hoher Anteil an der Radikalbildung zukam. In diesem Falle wäre zur klinischen Beurteilung statt des Adhärenzverfahrens auch ein veränderter Versuchsaufbau zu diskutieren. Die mittels Lavage gewonnene bronchoalveoläre Zellpopulation wurde nach Einstellung auf $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Reagenzglas dann als Suspension in einer

Glutathionlösung hinsichtlich ihrer oxidativen Aktivität untersucht (eigene unveröffentlichte Untersuchungen).

Kato et al. und Williams et al. zeigten, daß Alveolarmakrophagen durch die Adhärenz an die Plastikschalen ähnlich einer Reaktion in Anwesenheit von phagozytierbaren Fremdkörpern in vivo oder in vitro zur Superoxidanionproduktion angeregt werden (*Kato et al., 1987; Williams und Cole, 1981*). Die im Standardansatz nach Adhärenz bestimmten spontanen oxidativen Aktivitäten enthielten wie unter in vivo Bedingungen in der Lunge also auch bereits eine Grundstimulation. Der Versuchsaufbau mit einer Zellsuspension würde die Aktivierung der AM durch die Adhärenzphase umgehen, eine spezifische Untersuchung der Alveolarmakrophagen, wie in dieser Arbeit angestrebt, wäre jedoch nach einer aufwendigen vorherigen Isolierung der AM möglich.

5.2 Beurteilung der oxidativen Aktivität bei unterschiedlichen Krankheitsbildern

5.2.1 Bedeutung des bronchoalveolären Differentialzellbildes

Die im Untersuchungskollektiv gefundenen Gesamtzellzahlen stimmten bei den gesunden Kontrollpersonen und den gesunden Rauchern gut mit den Ergebnissen der BAL Cooperative Group Steering Committee überein, d.h. daß sich im Vergleich zum nichtrauchenden Kollektiv bei Rauchern eine erhöhte Gesamtzellzahl nachweisen läßt. Der Makrophagenanteil lag im vorliegenden Kontroll- und Raucherkollektiv über den Werten der BAL Cooperative Group Steering Committee, und zwar über 90 %. Neutrophile und eosinophile Granulozyten, sowie die Lymphozyten in der Kontrollgruppe und bei den gesunden Rauchern entsprachen zwar dem Trend der Ergebnisse des BAL Cooperative Group Steering Committee, absolut gesehen lagen die Granulozytenanteile jedoch etwas höher und der Anteil der Lymphozyten in der BALF etwas niedriger als dort angegeben (*Cherniack, 1990*).

Da in dieser Arbeit Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose und Alveolitis bei Kollagenosen zusammengefaßt, dafür aber Patienten mit Verdacht auf eine Alveolitis bei Kollagenosen ohne klinische Zeichen (subklinische Alveolitis) extra beurteilt wurden, konnten unserer Ergebnisse hier nicht direkt mit den Zahlen des BAL Cooperative Group Steering Committee verglichen werden (*Cherniack, 1990*). Bei der subklinischen Alveolitis ist die Gesamtzellzahl vergleichbar mit unserem Kontrollkollektiv, der Anteil der Alveolarmakrophagen ist jedoch bei erhöhtem prozentualen neutrophilen Granulozytenanteil und leicht erhöhten Lymphozyten vermindert. Im Gegensatz dazu fanden wir im Kollektiv mit gesicherter interstitieller Lungenkrankung eine Erhöhung der Gesamtzellzahl sowie der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten auf Kosten des Alveolarmakrophagenanteiles.

Bei Patienten mit EAA, die entsprechend den Kriterien der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie nach Exposition signifikante systemische Reaktionen und Lungenfunktionseinschränkungen entwickelten, lag die Gesamtzellzahl etwa doppelt so hoch wie bei Patienten mit ILD. Zusätzlich bestand eine leichte Lymphozytose, vergleichbar den Befunden bei Sarkoidose (*Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, 1998*).

Am höchsten lagen die Gesamtzellzahlen, der Abfall des Makrophagenanteiles sowie der Anteil der neutrophilen Granulozyten bei Patienten nach LTX/HLTx. Auch klinisch entsprach dies aktiven entzündlichen Krankheitszeichen und beginnenden fibrotischen Umbauvorgängen mit teils massiven Einschränkungen der Lungenfunktionsparameter im Sinne eines Bronchiolitis-obliterans-Syndroms (BOS).

Wie von der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie beschrieben (*Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, 1993*) war bei der Sarkoidose der Lymphozytenanteil zu Lasten des Alveolarmakrophagenanteiles in der Zelldifferenzierung erhöht. Die Gesamtzellzahl lag nur wenig über den Werten des Kontrollkollektives. Tatsächlich ist für dieses Krankheitsbild eine hohe Spontanremissionsrate auch bei ausge-

prägten Lungenbeteiligungen beschrieben. Ein Übergang in eine manifeste Fibrose ist eher selten.

Aktive Krankheitsbilder wie die EAA, die ILD sowie die Befunde nach Lungentransplantation waren von einer Erhöhung der Gesamtzellzahl und des Anteiles der neutrophilen Granulozyten auf Kosten des relativen Alveolarmakrophagenanteiles in der Zelldifferenzierung der BALF-Zellen begleitet. Die Gesamtzellzahl korrelierte nicht mit den oxidativen Aktivitäten.

5.2.2 Bedeutung der oxidativen Aktivität von ex vivo kultivierten Alveolarmakrophagen

5.2.2.1 Kontrollgruppe und gesunde Raucher

Beim Vergleich der oxidativen Aktivitäten von Kontrollpersonen und gesunden Rauchern fiel auf, daß sich die spontanen oxidativen Aktivitäten nicht signifikant unterschieden, während die stimulierten oxidativen Aktivitäten bei gesunden Rauchern erhöht waren. Dieser Befund legt den Schluß nahe, daß die Zellen von ihrer Enzymausstattung oder infolge von Regulationsmechanismen leichter stimulierbar sind. Eine zusätzliche Noxe könnte somit als Stimulus früher als beim gesunden Nichtraucher eine Radikalbelastung der Lunge, und damit eine potentiell raschere Schädigung der Lunge hervorrufen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von John R. Hoidal (*Hoidal et al., 1981*), der ebenfalls eine erhöhte PMA-induzierte Stimulierbarkeit zur ROI-Produktion bei asymptomatischen Rauchern nachweisen konnte, überein. Interessanterweise findet sich auch bei Patienten mit einer idiopathischen Lungenfibrose eine erhöhte Rate an Bronchialcarcinomen (*Hubbard et al., 2000*)

5.2.2.2 Subklinische Alveolitis und Sarkoidose

Weder bei der Sarkoidose, einer Lungenparenchymerkrankung, die selten in eine Fibrose übergeht, noch bei der subklinischen Alveolitis finden sich signifikante Differenzen zum Kontrollkollektiv. Die Diagnose einer subklinischen Alveolitis wurde neben der Diagnose der entsprechenden Grunderkrankung bei normalen Lungenfunktions- und Röntgenbefunden lediglich aufgrund einer Erhöhung des prozentualen Anteiles der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BALF-Zelldifferenzierung gestellt. In allen vier untersuchten

Fällen ergab sich kein Hinweis auf signifikant erhöhte oxidative Aktivitäten im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Tatsächlich wurde ein Übergang in eine manifeste Lungenfibrose bei diesen Patienten bisher nicht beobachtet (Wallaert, 1990; Wallaert, 1990)

5.2.2.3 ILD, exogen allergische Alveolitis, LTx/HLTx

In Abbildung 38 sind sowohl die spontanen, als auch die stimulierten Aktivitäten der einzelnen Kollektive noch einmal in der Zusammenschau aufgeführt.

Sowohl die spontanen oxidativen als auch die stimulierten oxidativen Aktivitäten von Patienten mit ILD, EAA oder nach LTx/HLTx waren im Vergleich zum Kontrollkollektiv signifikant erhöht.

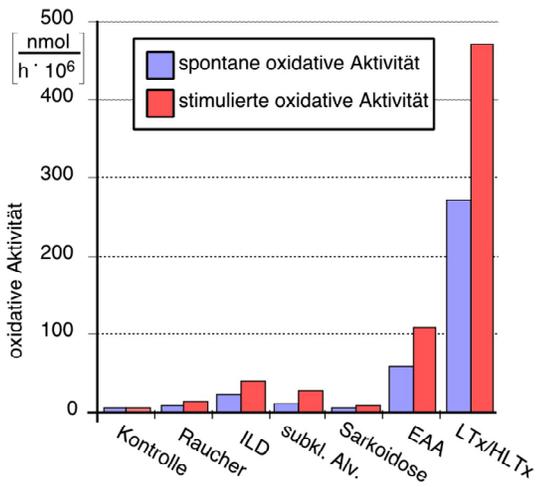


Abbildung 38: Spontane und stimulierte oxidative Aktivitäten in den einzelnen Kontroll- und Patientenkollektiven

5.2.3 **Bedeutung der extrazellulären Glutathionkonzentration und der oxidierten Methioninreste in den bronchoalveolären Proteinen**

Methionin ist eine ubiquitär in Enzymen vorkommende, durch die verschiedenen reaktiven Sauerstoffradikale leicht zu oxidierende

Aminosäure. Der Nachweis oxidierter Methioninreste, des Methioninsulfoxids, geht bei zahlreichen Enzymen und Inhibitoren wie z. B. Alpha-1-Proteinase-Inhibitor und Chymotrypsin sogar mit einer Aktivitätsminderung bzw. einem Aktivitätsverlust einher. Oxidierte Methioninreste können somit als Maß für die an Proteinen biologisch wirksame Radikalwirkung verwendet werden. Tatsächlich ergaben Untersuchung der BALF erwachsener Patienten mit diffuser fibrosierender Alveolitis einen Anstieg der oxidierten Methioninreste in Prozent des Gesamtmethionins als Hinweis auf die gesteigerten oxidativen Vorgänge in den Alveolen und auf eine Veränderung und Schädigung pulmonaler Proteine in der „epithelial lining fluid“ (ELF) (Maier et al., 1991; Behr et al., 1991).

Der erhöhte Anteil von Methioninsulfoxid in den Proteinen der BALF weist also darauf hin, daß das oxidative Schutzschild der Lunge bereits überlastet war und eine Oxidation von Proteinen und deren funktionellen Gruppen nicht mehr verhindert werden konnte.

Im hier beschriebenen Kollektiv wurden für die Patienten mit ILD und nach LTx/HLTx im Vergleich zum Kontrollkollektiv signifikante erhöhte prozentuale Anteile von Methioninsulfoxid in den BALF-Proteinen gefunden. Patienten mit Sarkoidose, mit subklinischer Alveolitis, mit EAA und gesunde Raucher unterschieden sich im hier untersuchten Kollektiv nicht von der Kontrollgruppe.

Mehrere Arbeitsgruppen wiesen auf Unterschiede in der Glutathionkonzentration in der ELF zwischen gesunden Kontrollpersonen, Rauchern, Patienten mit ARDS sowie manifest erkrankten Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen hin (Bunnel und Pacht, 1993; Cantin et al., 1989). Im Vergleich zum nicht rauchenden Normalkollektiv konnte in der ELF von Rauchern eine um 80 % erhöhte Gesamtglutathionkonzentration gefunden werden, wobei der Anteil des reduzierten Glutathions um 98 % lag. Patienten mit einer manifesten fibrosierenden Alveolitis oder asymptomatische HIV-positive Individuen wiesen dagegen eher niedrige Gesamtglutathionspiegel auf (Buhl et al., 1989).

Ob es sich beim chronischen Nikotinabusus mit erhöhter Radikalexposition der Lunge durch Zigarettenrauch um eine Hochregulation des antioxidativen Schutzes handelt, und ob es sich bei den erniedrigten Glutathionspiegeln in der ELF von Patienten mit fibrosierender Alveolitis um Ursache oder Wirkung einer vermehrten Oxidantienbelastung der Lunge bei der fibrosierenden Alveolitis handelt, blieb bisher ungeklärt. Die zentrale Rolle von Glutathion im Oxidantien/Antioxidantienhaushalt der Lunge und das Mißverhältnis zwischen antioxidativem Schutz und Oxidantienanfall bei interstitiellen Lungenerkrankungen stehen jedoch im Einklang mit der Hypothese, daß ein Oxidantienüberschuß zur Fibrogenese beiträgt.

In Übereinstimmung mit der Literatur lagen die Gesamtglutathionspiegel in der BALF gesunder Raucher in unseren Untersuchungen verglichen mit dem Kontrollkollektiv signifikant höher.

Signifikante Verminderungen der Gesamtglutathionkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe ließen sich für Patienten mit subklinischer Alveolitis und ILD sowie nach LTx/HLTx nachweisen. Die Gesamtglutathionkonzentrationen in der BALF von Patienten mit Sarkoidose und EAA unterschieden sich nicht vom Kontrollkollektiv, wobei der Befund für Patienten mit EAA grenzwertig war ($p = 0,0546$).

Für Patienten mit ILD, subklinischer Alveolitis und nach LTx/HLTx kann aufgrund der verminderten Gesamtglutathionkonzentration in der BALF auf eine verminderte Oxidantienabwehr der Lunge geschlossen werden. Bei gleichzeitig erhöhter oxidativer Aktivität der ex vivo kultivierten Makrophagen von Patienten mit interstitieller Lungenerkrankung oder nach LTx/HLTx liegt eine erhöhte oxidative Belastung zumindest im Kompartiment ELF vor. Bei den hier untersuchten Patienten mit ILD und nach LTx/HLTx war demnach der oxidative Schutzschild bereits angegriffen, und es kam dadurch zur Oxidation von BALF-Proteinen. Dies spiegelt sich in diesen Kollektiven auch in einem erhöhten Met(O)-Gehalt der alveolären Proteine wider.

5.2.4 Synopsis der Befunde verschiedener Patientengruppen

Kontrollen vs:	Raucher	ILD	Subklin. Alveolitis	Sarkoidose	EAA	LTx/HLTx
Spontane ox. Aktivität	↔	↑	↔	↔	↑	↑
Stimulierte ox. Aktivität	↑	↑	↔	↔	↑	↑
GZZ BALF	↑	↑	↔	↔	↑	↑
AM BALF %	↓	↓	↓	↓	↓	↓
AM BALF absolut	↑	↑	↓	↔	↑	↑
PMN BALF %	↑	↑	↑	↔	↑	↑
MPO BALF	— (n=1)	↑	—	↔	↑	↑
Gesamtglutathion BALF	↑	↓	↓	↔	↔	↓
Met(O) BALF	↔	↑	↔	↔	↔	↑

Tabelle 25: Zusammenschau der wichtigsten Parameter für das Oxidantien/Antioxidantiengleichgewicht in der Lunge

Aus Tabelle 25 ist ersichtlich, daß die Erhöhung der Gesamtzellzahl und des PMN-Anteiles in der BALF bei vermindertem AM-Anteil alleine kein aussagekräftiger Parameter ist, um die oxidative Belastung in der Lunge näher zu beschreiben, da diese Veränderungen bei den verschiedensten unterschiedlich aktiven Krankheitsbildern anzutreffen sind. Zu bedenken ist zudem, daß ein relativer Abfall des AM-Anteiles in der BALF-Zelldifferenzierung trotzdem bei einzelnen

Krankheitsbildern mit einer deutlichen Erhöhung der Gesamtzellzahl einer Erhöhung der absoluten Alveolarmakrophagenanzahl entspricht. Erst die Beurteilung der Zellbefunde in der BALF unter Berücksichtigung anderer Parameter des Oxidantien/Antioxidantiengleichgewichtes in der Lunge wie der oxidativen Aktivitäten der Alveolarmakrophagen weisen tatsächlich auf eine erhöhte zelluläre Oxidantienproduktion hin. Durch die gleichzeitige Bestimmung des Gesamtglutathions in der BALF und der oxidierten Methioninreste in den BALF-Proteinen wurde schließlich die biologisch relevante oxidative Radikalwirkung in der Lunge gemessen. Nur die Kombination einer erhöhten spontanen und stimulierten oxidativen Aktivität der Alveolarmakrophagen mit einem Absinken der Gesamtglutathionkonzentration in der BALF und einer Erhöhung der absoluten Anzahl von AM in der Lunge resultierten nach unseren Befunden in einer Erhöhung der Methioninreste, also in nachgewiesenen, oxidativen Schäden an den alveolären Proteinen.

5.2.5 Hypothese zur pathophysiologischen Bedeutung oxidativer Mechanismen

In zahlreichen Vorveröffentlichungen wurde auf einen möglichen Beitrag von Oxidantien bei der Entstehung chronisch-interstitieller Lungenerkrankungen hingewiesen. Es handelte sich bei diesen Beobachtungen jedoch zunächst erst um indirekte Hinweise (*Bunnell und Pacht, 1993; Cantin et al., 1989; Buhl et al., 1989*). Maier et al. wiesen anhand der Bestimmung oxidierten Methioninreste in den BALF-Proteinen von Patienten mit interstitieller Lungenfibrose schließlich eine direkte oxidative Schädigung nach (*Maier et al., 1991*).

Anhand des hier vorgestellten Makrophagenassays konnte der direkte Nachweis erbracht werden, daß Makrophagen *in vitro* in der Lage sind, extrazelluläres Glutathion zu oxidieren.

Katzenstein und Mitarbeiter veröffentlichten 1998 histopathologische Richtlinien zur Beurteilung interstitieller Lungenerkrankungen und wiesen auf das unterschiedliche Ausmaß der interstitiellen sowie der intraalveolären Entzündungsreaktionen bei den idiopathischen inter-

stitiellen Pneumonien sowie der nicht spezifischen interstitiellen Pneumonie (nonspecific interstitial pneumonia = NSIP) hin. Die klassische idiopathische interstitielle Pneumonie (usual interstitial pneumonitis = UIP) ist gekennzeichnet durch den Nachweis sogenannter Fibroblastenfoci, bestehend aus zellarmen Kollagenbündeln, kleinen Ansammlungen aktiv-prolierender Myofibroblasten und Fibroblasten, die spindelförmig entlang der Alveolarepten ausgerichtet sind. Intraalveoläre Makrophagenansammlungen finden sich eher fokal, die interstitielle Entzündungsreaktion ist gering. Fibrosierung und Entzündungsreaktion sind zu unterschiedlichen Zeiten entstanden und ergeben daher ein fleckförmiges Muster. Hingegen ist die NSIP durch ein zellreiches interstitielles und intraalveoläres Bild und einer besseren Prognose vergesellschaftet und spiegelt wohl die interstitielle Pneumonieförmigkeit u.a. bei Bindegeweberkrankungen wider.

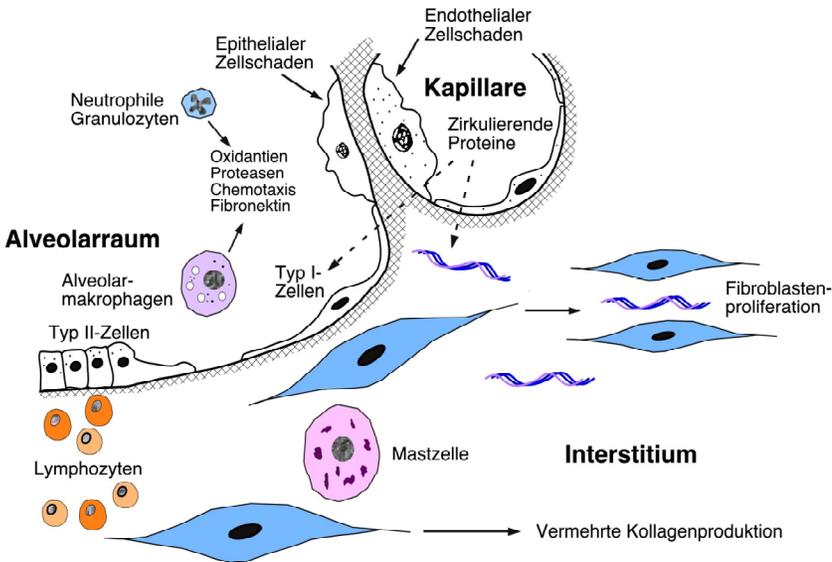


Abbildung 39: Übersicht über die an der interstitiellen Fibrosierung der Lunge beteiligten Zellen und Kompartimente (nach Sheppard et al., 1994)

Anhand unseres Assays konnte belegt werden, daß Alveolarmakrophagen Oxidantien freisetzen, die extrazelluläres Glutathion oxidie-

ren können. Es wird Aufgabe weiterführender Untersuchungen sein, die pathogenetische Wertigkeit der oxidativen Aktivitäten bei den einzelnen histopathologischen Subtypen zu untersuchen. Katzenstein und Mitarbeiter vermuteten als Auslöser der Fibrosierung bei der UIP eine Verletzung des Alveolarepithels durch ein bisher nicht bekanntes Agens. Die Balsammembranen der Lungenalveolen werden angegriffen oder sogar zerstört. Die Fibroblastenproliferation wurde dann als Reparaturmechanismus ähnlich der Wundheilung nach Hautverletzungen gedeutet. Auch nach Beginn der ersten Vernarbungsprozesse in der Lunge postulierten sie eine fortwährende Verletzung des Lungengewebes, die den Fibrosierungsprozeß fortschreiten läßt. Möglicherweise tragen AM durch ihre Oxidantienproduktion auch sekundär über eine Verminderung des antioxidativen Schutzschildes letztendlich zu Schäden an den pulmonalen Basalmembranen bei (*Katzenstein und Myers, 1998; Cottin et al., 1998; Nagai et al., 1998; MacNee und Rahman, 1995; Bouros et al., 2000; Katzenstein und Fiorelli, 1994; Bjoraker et al., 1998*).

6 Zusammenfassung

In der von der Wilhelm Sander-Stiftung geförderten Studie „Pathogenetische Bedeutung von Störungen des Oxidantien/Antioxidantien-Gleichgewichtes bei Lungengerüsterkrankungen“, sollten die pathogenetisch relevanten oxidativen Faktoren für die Entstehung fibrotischer Lungenveränderungen identifiziert und ihr Zusammenspiel näher untersucht werden. In diesem Rahmen entstand auch diese Arbeit, die zum Ziel hatte, eine Methode zu etablieren, die extrazelluläre biologische Wirksamkeit der Sauerstoffradikale von ex vivo kultivierten Alveolarmakrophagen zu erfassen. Zudem sollte das Ausmaß der Radikalbildung von Alveolarmakrophagen bei interstitiellen Lungenerkrankungen als möglicher funktioneller Beitrag zur Fibroseentstehung gemessen werden sowie eine neue, spezifischere Methode zur Aktivitätsbeurteilung bei interstitiellen Lungenerkrankungen evaluiert werden.

Es wurden insgesamt 16 Kontrollpersonen, fünf gesunde Raucher, 24 Patienten mit fibrosierender und vier Patienten mit subklinischer Alveolitis sowie sieben Patienten mit Sarkoidose, sieben Patienten mit EAA und acht Patienten nach LTx/HLTx untersucht. Lavagezellen wurden auf Plastikplatten ausgesät, AM konnten so adhären, die übrigen Zellen wurden abgespült und die Platten mit einer 50 μ M Glutathionlösung inkubiert. Der Abfall des reduzierten Glutathions in der Testlösung wurde durch Zugabe von Ellmanns Reagenz gemessen. Zusätzlich wurden andere Parameter des Oxidantien/Antioxidantienhaushaltes, die Zellzahl und Zelldifferenzierung in der BALF und der zelluläre Glutathionstoffwechsel, untersucht.

Anhand der gewonnenen Ergebnisse werden die aufgeworfenen Fragen wie folgt beantwortet:

- Es wurde eine Methode entwickelt, die den **biologisch tatsächlich wirksamen Effekt der Oxidantienproduktion von Alveolarmakrophagen anhand der Oxidation des biologisch relevanten An-**

tioxidans Glutathion mißt und somit *ex vivo* die extrazelluläre Wirksamkeit der Oxidantienproduktion erfaßt.

- Das Ausmaß der Oxidantienproduktion der Alveolarmakrophagen weist in der Zusammenschau mit den übrigen Parametern, dem Methioninsulfoxidgehalt der BALF-Proteine und der Konzentration an Glutathion in der BALF sowie der BALF-Zytologie, auf eine relevante Rolle der oxidativen Aktivität der Alveolarmakrophagen zumindest für oxidative Läsionen im Kompartiment der ELF hin.
- Die oxidative Aktivität von Alveolarmakrophagen bei derILD, der EAA und nach LTx/HLTx sind sowohl vor, als auch nach Stimulation im Vergleich zum Kontrollkollektiv signifikant erhöht. Bei gesunden Rauchern liegt eine erhöhte Stimulierbarkeit der oxidativen Aktivität der AM vor.
- Die Gesamtzellzahl in der BALF, die Verminderung des AM-Anteiles und die Erhöhung des PMN-Anteiles in der BALF-Zelldifferenzierung, die bisher zur Verlaufsbeurteilung fibrosierender Lungenerkrankungen herangezogen wurden, sind hinsichtlich oxidativer Phänomene vergleichsweise unspezifische Parameter. Mit Hilfe der Messung der oxidativen Aktivität pulmonaler Entzündungszellen kann ein Aspekt des tatsächlich wirksamen zellvermittelten Beitrags zum aktuellen Entzündungsgeschehen quantifiziert werden.
- Die Befundkombination einer erhöhten spontanen und stimulierten oxidativen Aktivität kultivierter AM mit einer verminderten GSH_{red} -Konzentration in der BALF war mit einer erhöhten Met(O)-Bildung als Ausdruck oxidativer Proteinläsionen assoziiert und fand sich bei Krankheitsbildern, die gewöhnlich mit einer progressiven Fibrose und Destruktion peripherer bronchopulmonaler Strukturen einhergehen. Dies könnte als wichtiger Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen oxidativer Belastung und Fibrose gedeutet werden.

Um die tatsächliche klinische Bedeutung oxidativer Lungenparenchymschäden zu analysieren, könnten antioxidative Therapiestrategien bei Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen eingesetzt werden. Eine entsprechende Pilotstudie mit N-acetylcystein als Glutathion-Precursor wurde bereits erfolgreich abgeschlossen (*Behr et al., 1997; Behr et al., zur Publikation angenommen Oktober 2001*). Seit März 2000 läuft eine entsprechende europäische Multicenterstudie (IFIGENIA).

7 Abkürzungsverzeichnis

AM	Alveolarmakrophagen
AMDBOXA	spontane oxidative Aktivität
AMDSOXA	stimulierte oxidative Aktivität
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BBAS	Glutathionkonzentration im unstimulierten Zellversuch
BOS	Bronchiolitis obliterans-Syndrom
BPMA	Glutathionkonzentration im stimulierten Zellversuch
BSO	DL-Buthionin-SR-sulfoximin
BSTA	Leerwert
CL	Chemilumineszenz
DBOX	Konzentrationsdifferenz zw. Leerwert und reduziertem GSH im unstimulierten Zellversuch
DLTx	Doppellungentransplantation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSOX	Konzentrationsdifferenz zw. Leerwert und reduziertem GSH im stimulierten Zellversuch
DTNB	Ellmanns Reagenz
EAA	Exogenallergische Alveolitis
ELF	Epithelialer Flüssigkeitsfilm
GN	Neutrophile Granulozyten
GSH _{red}	Reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion = Glutathiondisulfid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HLTx	Herzlungentransplantation
ILD	Interstitielle Lungenerkrankungen
ILF	Idiopathische Lungenfibrose
LE	Lupus erythematoses
Li	Lingula
LTx	Lungentransplantation
Met(O)	oxidiertes Methionin
ML	Mittellappen
MPO	Myeloperoxidase
NEM	N-Ethylmaleimid
NSIP	Nonspecific interstitial pneumonia
$\bullet\text{O}_2^-$	Superoxidanionradikal
OL	Oberlappen
PMA	Phorbolmyristatacetat
PMN	Polymorphonukleäre Granulozyten
PSS	Progressiv systemische Sklerodermie
RA	Rheumatoide Arthritis
ROM	Reaktive Sauerstoffmetabolite
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SLTx	Einzellungentransplantation
SOD	Superoxiddismutase
UIP	Usual interstitial pneumonitis

A

- Adams D, "Macrophages", *Methods in Enzymology*, Vol LVIII: 494-506, 1979..... 58
- Adams JD, Lauterburg BH, Mitchell J.R., "Plasma glutathione and glutathione disulfid in the rat: regulation and response to oxidative stress", *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 227 (3) : 749-754, 1983..... 55
- Akerboom TM, Sies H, "Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological sample", *Methods in Enzymology*, Vol. 77: 373-382, 1981..... 55
- Alarcon-Segovia D, Alarcon DG, "Pleuro-pulmonary manifestations of systemic lupus erythematosus", *Dis Chest*, Vol. 39: 7-17, 1961 7
- Anderson R, "A peroxidase-independent method for the quantification of extracellular hydrogen peroxide generated by activated phagocytes in vitro", *J Immunological Methods*, Vol. 155: 49-55, 1992 112
- ATS/ERS Consensus Statement, *Am J Respir Crit Care Med*, Vol. 161: 646-664, 2000..... 9

B

- Baughman RP, Rennard SI, "Bronchoalveolar lavage: general approaches to correct for variability of dilution and lung permeability", *Eur Respir Rev*, Vol. 9: 66, 28-31, 1999..... 46
- Behar D, Czapski G, Rabani J, Dorfman LM, Schwarz HA, "The acid dissociation constant and decay kinetics of the perhydroxyl radical", *J Phys Chem*, Vol. 74: 3209-3213, 1970 21
- Behr J, Degenkolb B, Krombach F, Vogelmeier C, "Intracellular glutathione levels and bronchoalveolar cell activation in fibrosing alveolitis - effect of oral high-dose N-acetylcysteine", *Eur Respir J*, zur Publikation angenommen Oktober 2001 129
- Behr J, Maier K, Degenkolb B, Krombach F, Vogelmeier C, "Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis", *Am J Respir Crit Care Med*, Vol. 156: 1897-1901, 1997..... 129
- Behr J, Maier K, Krombach F, Adelman-Grill BC, "Pathogenetic significance of reactive oxygen species in diffuse fibrosing alveolitis", *Am Rev Respir Dis*, Vol. 144: 146-150, 1991 108
- Berger EM, Beehler CJ, Harada RN, Repine JE, "Human phagocytic cells as oxygen metabolite scavengers", *Inflammation*, Vol. 14: 613, 1990..... 112
- Bjoraker JA, Ryu JH, Edwin MK, Myers JL, Tazelaar HD, Schroeder DR, Offord KP, "Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis", *Am J Crit Care Med*, Vol. 157: 199-203, 1998..... 126
- Bouros D, Nicholson AC, Polychronopoulos V, du Bois RM, "Acute interstitial pneumonia", *Eur Respir J*, Vol. 15: 412-418, 2000 126

- Breton-Gorius J, JL, Guichard J, Vainchenker W, Basset F, "Peroxidatic activity distinct from myeloperoxidase in human monocytes in vitro and in alveolar macrophages", *Adv Exp Med Biol*, Vol. 141: 491-499, 1982..... 111
- Buhl R, "Oxidantien und Antioxidantien in der Lunge im Fenster der bronchoalveolären Lavage", *Atemw.-Lungenkrh*, Vol. 20: 127-130, 1994..... 108
- Buhl R, Jaffe HA, Holroyd KJ, Wells FB, Mastrangeli A, Saltini C, Cantin AM, Crystal RG, "Systemic glutathione deficiency in symptome-free HIV-seropositive individuals", *Lancet*, Vol. 2: 1294-1298, 1989..... 75
- Bunnell E, Pacht ER, "Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of patients with adult respiratory distress syndrome\)", *Am Rev Respir Dis*, Vol. 148: 1174-1178, 1993 121

C

- Calhoun WJ, Salisbury SM, Chosy LW, Busse WW, "Increased alveolar macrophages chemiluminescence and airspace cell superoxide production in active pulmonary sarcoidosis", *J Lab Clin Med*, Vol. 112: 147-156, 1988 108
- Cantin AM, Begin R, "Glutathione and inflammatory disorders of the lung", *Lung*, Vol. 169: 123-138, 1991..... 110
- Cantin AM, Hubbard RC, Crystal RG, "Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis", *Am Rev Respir Dis*, Vol. 139: 370-372, 1989 121
- Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG, "Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione", *J Appl Physiol*, Vol. 63: 152-157, 1987 28
- Carre PC, Mortenson RL, King ET Jr., Noble PW, Sable CL and Riches DWH, "Increased Expression of the Interleukin-8 gene by alveolarmacrophages in idiopathic pulmonary fibrosis", *J Clin Invest*, Vol. 88: 1802-1810, 1991..... 15
- Cherniack RM (Ed.), "Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic lung fibrosis and selected comparison groups", *Am Rev Respir Dis*, Vol. 141: 166-202, 1990..... 12
- Clement A, Chadelat K, Masliah J, Housset B, sardet A, Grimfeld A, Tournier G, "A controlled study of oxygen metabolite release by alveolar macrophages from children with interstitial lung disease", *Am Rev Respir Dis*, Vol. 136: 1424-1428, 1987 75
- Collins CD, Wells AU, Hansell DM et al, "Observer variation in pattern type and extent of disease in fibrosing alveolitis on thin section computed tomography and chest radiography", *Clin Radiol*, Vol. 49: 236-240, 1994..... 8
- Cottin V, Donsbeck AV, Revel D, Loire R, Cordier JF, "Nonspecific interstitial pneumonia", *Am J Crit Care Med*, Vol. 158: 1286-1293, 1998 126
- Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE, "The epidemiology of interstitial lung diseases", *Am J Crit Care Med*, Vol. 150: 967-972, 1994..... 7
- Crystal RG, "Alveolar Macrophages", *The Lung*, New York, 527-538, 1991 110
- Crystal RG, Ferrans VJ, Basset F, "Biological basis of pulmonary fibrosis", *The Lung*, New York, 2031-2046, 1991 110

- Crystal RG, Gadek JE, Ferrans VJ, Fulmer JD, Line BR, Hunninghake GW,
 "Interstitial lung disease: current concepts of pathogenesis, staging and therapy",
 Am J Med, Vol. 70: 542-568, 1981 115

D

- Dalhoff K, Braun J, Lipp R, Schnabel A, Wießmann KJ, "Sauerstoffradikalbildung
 bei Sarkoidose", Dtsch med Wschr, Vol. 117: 887-893, 1992 108
- Davis GS, "Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease", Sem Respir Crit Care
 Med, Vol. 15: 37-60, 1994 115
- De Baetselier P, Schram E, "Luminescent bioassays based on macrophage cell lines",
 Methods in Enzymology, Vol. 133: 507-530, 1986..... 114
- Deneke SM, Fanburg BL, "Regulation of cellular glutathione", Am J Physiol, Vol.
 257: L163-L173, 1989 110
- DeRemee RA, "The roentgenographic staging of sarcoidosis, historic and
 contemporary perspectives", Chest, Vol. 83: 129-133, 1983 38
- Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, "Empfehlungen zur diagnostischen
 bronchoalveolären Lavage", Pneumologie, Vol. 47: 607-619, 1993..... 13
- Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, "Empfehlungen zur inhalativen
 Provokationstestung bei exogen-allergischer Alveolitis", Pneumologie Vol. 52:
 444-446, 1998 117
- Dolman CJA, Bast A, "Oxygen radicals in lung pathology", Free Radical Biology
 and Medicine, Vol. 9: 381-400, 1990 21
- Dreisin RB, Schwarz MI, Theofilopoulos AN, Stanford RE, "Circulating immune
 complexes in the idiopathic interstitial pneumonias", N Engl J Med, Vol. 298: 353-
 357, 1978..... 8

E

- European Community of Coal and Steel, "Standardized lung function testing. Report
 working party "standardization of lung function tests.", Bull Eur Physiopathol
 Respir, Vol. 19 (Suppl 5) : 11-92, 1983..... 41

F

- Fedorko ME, Hirsch JG, Semin hepatol, Vol. 7: 109, 1970..... 58
- Fishman AP, "Pulmonary diseases and disorders", New York, 2. Aufl., Vol. 1: 728-
 768, 1988..... 14
- Fridovich I, "Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas", J Biol
 Chem, Vol. 264: 7761-7764, 1989..... 24
- Frimmer AA, Forman A, Borg DC, "H₂O₂-diffusion through lysosomes", Israel J
 Chem, Vol. 23: 442-445, 1983..... 21

G

- Gehr P, Bachofen M, Weibel ER, "The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity", *Respir Physiol*, Vol. 32: 121-140, 197846
- Goldstein IM, Shak S, "Host defense in the lung: neutrophils, complement and other humoral mediators", *Textbook of respiratory medicine*, Murray and Nadel (Hrsg.), 402 ff, 199422
- Gorin AB, Steward PA, "Differential permeability of endothelial and epithelial barriers to albumin flux", *J Appl Physiol*, Vol. 47: 1315-1324, 1979.....46
- Grebner JV, Mills EL, Gray BH, Quie PG, *J Lab Clin Med*, Vol. 89: 153 ff, 1977 ..114
- Griffith OW, " Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 257: 13704-13712, 198265
- Griffith OW, Meister A, "Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine)", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 254 (16): 7558-7560, 197965

H

- Hahn D, "Lunge, Mediastinum und Zwerchfell", aus: *Radiologie II*, Lissner J, Fink G (Hrsg.), Stuttgart, 3. Aufl., 119-123, 1990.....38
- Halliwell B, Gutteridge MC, "Role of radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview", *Methods in Enzymology*, Vol. 186: 1-85, 199022
- Haupt HM, Moore GM, Hutchins GM, "The lung in systemic lupus erythematosus: analysis of the pathologic changes in 120 patients", *Am J Med*, Vol. 72: 791-797, 19817
- Hoidal JR, Fox RB, LeMarbre PA, Perri R, Repine J, "Altered oxidative metabolic responses in vitro of alveolar macrophages from asymptomatic cigarette smokers", *Am Rev Respir Dis*, Vol. 123: 85-89, 198124
- Hubbard R, Venn A, Lewis S, Britton J, "Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study", *Am J Respir Crit Care Med*, Vol. 161: 5-8, 2000 119

J

- James DG, "Clinical picture of sarcoidosis" in: *Interstitial lung disease*, Schwartz MI, King TE (Hrsg.), St. Louis, 2. Aufl., 127-178, 1993.....9
- Jessar RA, Lamont-Havers RW, Raga C, "Natural history of lupus erythematosus disseminatus", *Ann Intern Med*, Vol. 38: 717-731, 19537
- Johnson MA, Kwan S, Snell NJC, Nunn AJ, Darbyshire JH, Turner-Warwick M, "Randomised controlled trial comparing prednisolone alone with cyclophosphamide and low dose prednisolone in combination in cryptogenic alveolitis", *Thorax*, Vol. 44: 280, 1989.....9
- JR Britton, AJ Knox (Ed.), "The diagnosis, assessment and treatment of diffuse parenchymal lung disease in adults", *Thorax*, Vol. 54 (Suppl 1) : 1-30, 19999

K

- Kato T, Terui T, Tagami H, "Lucigenin- induced chemiluminescence in human neutrophiles in the process of adherence and chemotactic migration measured in a modified Boyden chamber system", *Tohoku J Exp Med*, Vol. 151: 409-415, 1987 116
- Katzenstein ALA, Fiorelli RF, "Nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis", *Am J Surg Pathol*, Vol.18 (2) : 136-147, 1994 126
- Katzenstein ALA, Myers JL, "Idiopathic lung fibrosis: clinical relevance of pathologic classification", *Am J Respir Crit Care Med*, Vol. 157: 1301-1315, 1998 12
- Kenneth NB, "Data Analysis", Cambridge, 1994 70
- Keogh BA, Crystal RG, "Alveolitis: the key to the interstitial lung disorders", *Thorax*, Vol. 37: 1-10, 1982 11
- Kienast K, Müller-Quernheim J, Knorst M, Schlegel J, Mang C, Ferlinz R, "Realitätsnahe In-vitro-Untersuchung zur Sauerstoffradikalfreisetzung von Alveolarmakrophagen und mononukleären Zellen des peripheren Blutes nach Kurzzeitexposition mit SO₂", *Pneumologie*, Vol. 47: L 60-65, 1993 115
- King TE Jr., "Connective tissue disease", *Interstitial Lung Disease*, Schwartz MI, King TE (Hrsg.), St. Louis, 2. Aufl., 286 ff, 1993 7
- Klebanow SJ, "Oxygen metabolites from phagocytes" aus: *Inflammation: basic principles and clinical correlates*, New York, 2. Aufl., 541 ff, 1992 20
- König G, Luderschmidt C, Hammer C, Adelman-Grill BC, Braun-Falco O, Fruhmann G, "Lung involvement in scleroderma", *Chest*, Vol. 85: 318-324, 1984 7
- Kornbluth RS, Turino GM, "Respiratory control in diffuse interstitial lung disease and diseases of the pulmonary vasculature", *Clin Chest Med*, Vol. 1: 91-102, 1980 8

M

- MacNee W, Rahman I, "Oxidants/antioxidants in idiopathic pulmonary fibrosis", *Thorax*, Vol. 50 (Suppl 1) : 53-58, 1995 126
- Maier K, Leuschel I, Constable U, "Increased levels of oxidized methionine residues in bronchoalveolar lavage fluid proteins from patients with idiopathic lung fibrosis", *Am Rev Respir Dis*, Vol. 143: 271-274, 1991 47
- Maier KL, "How the lung deals with oxidants", *Eur Respir J*, Vol. 6: 334-336, 1993 22
- Marciniuk DD, Gallagher CG, "Clinical exercise testing in interstitial lung disease", *Clin Chest Med*, Vol. 15: 287-303, 1994 8
- Massey Y, "The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome c", *Biochim Biophys Acta*, Vol. 34: 255-259, 1959 113
- Meister A, "New aspects of glutathione biochemistry and transport - selective alteration of glutathione metabolism", *Nutr Rev*, Vol. 42: 397-410, 1984 110
- Meister A, Anderson ME, "Glutathione", *Ann Rev Biochem*, Vol. 52: 711-760, 1983 67

- Miller AC, Blakely WF, "Inhibition of glutathione reductase activity by a carbamoylating nitrosourea effect of cellular radiosensitivity", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 12: 55-62, 1992.....66
- Miller LR, Greenberg SD, McLarty JW, "Lupus lung", *Chest*, Vol. 88: 265-169, 19857
- Myrhe JR, "Pleuropulmonary manifestations in lupus erythematosus disseminatus", *Acta Med Scan*, Vol. 165: 55-60, 1959.....7

N

- Nagai N, Kitaichi M, Nishimura K, Izumi T, Colby TV, "Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis comparison with idiopathic pulmonary fibrosis and BOOP", *Eur Respir J*, Vol. 12: 1010-1019, 1998126
- Neuber A, "Ein Vergleich oxidativer Parameter bei Alveolarmakrophagen der Spezies Mensch, Javaner Makake, Sprague-Dawley Ratte und syrischer Goldhamster", München, 1999113
- Newman Taylor AM, "Extrinsic allergic alveolitis" aus: *Respiratory medicine*, Brewis RAL, Gibson GJ, Geddes DM, Bailliere Tindall, 19909

P

- Padley SPG, Hansell DM, Flower CDR et al, "Comparative accuracy of high resolution computed tomography and chest radiography in the diagnosis of chronic diffuse infiltrative lung disease", *Clin Radiol*, Vol. 44: 222-226, 1994.....8
- Pick E, Keisari Y, "A simple colorimetric Method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture", *J Immunological Methods*, Vol. 38: 161-170, 1980112
- Pick E, Keisari Y, "Superoxidation and hydrogen peroxide production by chemically elicited peritoneal macrophages - induction by multiple nonphagocytotic stimuli", *Cellular Immunology*, Vol. 59: 301-318, 198159

R

- Raghu G, Depaso WJ, Cain K, Hammar SP, Wetzel CE, Dreis DF, Hutchinson J, Pardee NE, Winterbauer RH, "Azathioprine combined with prednisone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: A prospective double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial", *Am Rev Respir Dis*, Vol. 144: 291 ff, 19919
- Ramm B, Hofmann G, "Biomathematik", Stuttgart, 3. Aufl., 1987.....70
- Reed DJ, "Regulation of reductive processes by glutathione", *Biochemical Pharmacology*, Vol. 35 (1): 7-13, 198667
- Rennard SI, Basset G, Lecossier D, O'Donnell KM, Pinkston P, Martin PG, Crystal RG, "Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution", *J Appl Physiol*, Vol. 60 (2) : 532-538, 198646

- Renzi G, Milic-Emili J, Grassino AE, "The pattern of breathing in diffuse lung fibrosis", *Bull Eur Physiopath Respir*, Vol. 18: 461-472, 1982..... 8
- Rotrosen D, "The respiratory burst oxidase", in: *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*, New York, 2. Aufl., 589 ff, 1992..... 19

S

- Sachs L, "Angewandte Statistik", Berlin, 7. Auflage, 1992..... 70
- Schaberg T, Haller H, Rau M, Kaiser D, Fassbender M, Lode H, "Superoxide anion release induced by platelet-activating factor is increased in human alveolar macrophages from smokers", *Eur Respir J*, Vol. 5: 387-393, 1992 75
- Schaberg T, Rau M, Stephan H, Lode H, "Increased number of alveolar macrophages expressing surface molecules of the CD11/CD18 family in sarcoidosis and idiopathic lung fibrosis is related to the production of superoxide anions by these cells", *Am Rev Respir Dis*, Vol. 147: 1507-1513, 1993 75
- Schmekel B, Karlsson SE, Linden M, Sundström C, Tegner H, Venge P, "Myeloperoxidase in human lung lavage a marker of local neutrophil activity", *Inflammation*, Vol. 14 (4): 447-461, 1990 111
- Seitz WR, "Chemiluminescence detection of enzymatically generated peroxide", *Methods in Enzymology*, Vol. LVII: 445-462, 1978..... 114
- Senior RM, Campell EJ, Villiger B, "Obtaining and culturing human and animal alveolar macrophages", *Methods for studying mononuclear phagocytes*, Academic Press, New York, 69-84, 1981..... 58
- Sheppard MN, Harrison NK, "Lung injury, inflammatory mediators, and fibroblast activation in fibrosing alveolitis", *aus: New perspectives on basic mechanisms in lung disease 1*, Roger DF (Hrsg.), 1064-1074, 1994..... 125
- Sherson D, Nielsen H, Frederiksen J, Milman N, Struve-Christensen E, Nuchel-Petersen B, "Superoxide anion release from blood monocytes and alveolar macrophages in patients with diffuse lung fibrosis", *APMIS*, Vol 100: 408-414, 1992..... 108
- Sies H, Akerboom TM, "Glutathione disulfid efflux from cells and tissues", *Methods in Enzymology*, Vol. 105: 445-451, 1984..... 44
- Strausz J, Müller-Quernheim J, Stepling H, Ferlinz R, "Oxygen radical production by alveolar inflammatory cells in idiopathic pulmonary fibrosis", *Am Rev Respir Dis*, Vol. 141: 124-128, 1990..... 24
- Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T, "Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes", *Analytical Biochemistry*, Vol. 132: 345-352, 1983 68
- Suzuki Y, Lyall V, Biber T, Ford GD, "A modified technique for the measurement of sulfhydryl groups oxidized by reactive oxygen intermediates", *Free Radical Biol Med*, Vol. 9: 479-484, 1990 61

T

- Thompson AB, Spurzem JR, Rennard SI, "Bronchoalveolar lavage in interstitial disease", *Interstitial Lung Disease*, Schwartz MI, King T, 2. Aufl., 119-126, 1993 115
- Thorpe GG, Kricka LJ, "Enhanced Chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase", *Methods in Enzymology*, Vol 133: 331-353, 1986..... 114
- Trush MA, Wilson ME, van Dyke K, "Bioluminescence and chemiluminescence", *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, Vol. LVII: 402, 1978..... 114

U

- Ulmer WT, Reichel G, Nolte D, Islam MS, "Die Lungenfunktion - Physiologie, Pathophysiologie, Methodik", Stuttgart, 1983..... 41
- Untersee P, Gil J, Weibel ER, "Visualization of extracellular lining layer of lung alveoli by freeze etching", *Respir Physiol*, Vol. 13: 171-185, 1971 46

V

- Vogelmeier C, Baur X, König G, Fruhmann G, "Diagnostik der exogen-allergischen Alveolitis: Heustaub-Testungen bei nicht exponierten Kontrollpersonen", *Prax Klin Pneumol*, Vol. 41: 645-646, 1987..... 39
- Vogelmeier C, Baur X, Mauermayer R, Fruhmann G, "Der Heustaubexpositionstest in der Diagnostik der Farmerlunge: Staubmessungen und Testungen von Kontrollpersonen", *Prax Klin Pneumol*, Vol. 42: 749-752, 1988..... 39
- Vogelmeier C, Behr J, "Lungengerüsterkrankungen" aus: *Therapie innerer Krankheiten*, Paumgartner G (Hrsg.), Berlin, Heidelberg, New York, 9. Aufl., 342-358, 1999 7
- Vogelmeier C, Buhl R, "Therapie von Lungenkrankheiten mit Antiproteasen", *Pneumologie*, Vol. 48: 57-62, 1994 16

W

- Wallaert B, "Subclinical alveolitis in immunologic systemic disorders", *Lung*, Vol. 168 (Suppl): 974-983, 1990..... 119
- Wallaert B, Dugas M, Dansin E, Perez T, Marquette CH, Ramon P, Tonnel AB, Voisin C, "Subclinical alveolitis in immunological systemic disorders. Transition between health and disease?", *Eur Respir J*, Vol. 3 (10): 1206-1216, 1990 119
- Wallaert B, Lassalle P, Fortin F, Aerts C, Bart F, Fournier E, Voisin C, "Superoxide anion generation by alveolar inflammatory cells in simple pneumoconiosis and in progressive fibrosis of nonsmoking coal workers", *Am Rev Respir Dis*, Vol. 141: 129-133, 1990 108
- Weaver AL, Divertie MB, Titus JL, "Pulmonary scleroderma", *Dis Chest*, Vol. 54: 490-498, 1968 7

Williams AJ, Cole PJ, "In vitro stimulation of alveolar macrophage metabolic activity by polystyrene in the absence of phagocytosis", Br J Exp Pathol, Vol. 62: 1-7, 1981	116
Wurm K, Reindell H, Heilneyer L, "Der Lungenboeck im Röntgenbild", Stuttgart, 1958.....	38

Y

Young RH, Mark GJ, "Pulmonary vascular changes in sclerodema", Am J Med, Vol. 64: 998-1003, 1978.....	7
---	---

Z

Ziesche R, Hofbauer E, Wittmann K, Petkov V, Block LH, "A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolon in patients with idiopathic pulmonary fibrosis", N Engl J Med, Vol. 341: 1264-1269, 1999	10
---	----

8 Danksagung

Herrn PD Dr. med. Behr danke ich für das Thema dieser Arbeit und seine allzeit hilfreiche Betreuung, sowohl in praktischen Fragen, als auch bei den Korrekturen der Arbeit. Dies war häufig zeitaufwendig. Trotzdem war auf seine sachkundige Unterstützung, seine Gründlichkeit und Fairness immer Verlaß. Vielen Dank!

Herrn Dr. rer. nat. K. Maier danke ich für die in seinem Labor der GSF Neuherberg durchgeführten Untersuchungen und Herrn Prof. Dr. med. vet. Krombach für die Möglichkeit sein Labor mitzubnutzen.

Ohne Frau Anne-Marie Allmeling und insbesondere ohne Frau Barbara Braun und Frau Dr. med. vet. Ariane Neuber im Labor wären so umfangreiche Versuchsreihen und Datensammlungen, immer unter Zeitdruck, nicht möglich gewesen. Trotzdem gab es auch immer etwas zu lachen oder zu feiern.

Alf Henryk Wulf hat nach einigen Abstürzen meine Computerbetreuung übernommen und mich mit Rat und Tat beim Layout, den Abbildungen und in mathematischen Fragen unterstützt. Ihm verdanke ich das gesamte äußere Erscheinungsbild der Arbeit sowie viel Zeitaufwand und so manche Durchhalteparole.

Vielen Dank auch an Christl und Heyo Wulf für ihre Hilfe beim Korrekturlesen. Einige Fehler und grammatikalische Unverzeihlichkeiten wären andernfalls in den Druck gegangen.

Meinen Eltern danke ich für den Wert, den sie auf mein schulisches und berufliches Fortkommen gelegt haben, meinen Geschwistern Alexandra Degenkolb und Johannes Degenkolb für ihre moralische Unterstützung und die Relativierung des einen oder anderen überhöhten Anspruchs.

Allen zusammen nochmals ganz herzlichen Dank!

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Barbara Hannelies Degenkolb, geboren am 16.10.1965 in München
wohnhaft: Im Oberen Kienle 98, 70184 Stuttgart
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schul Ausbildung:

1972-1976 Grunds chule in Gilching
1976 Übertritt in den neusprachlichen Zweig des
Gymnasiums Gilching
1985 Abitur

Studium:

WS 1985/86 Beginn des Medizinstudiums an der Lud-
wig-Maximilians-Universität München
Frühjahr 1992 III. Teil der Ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit:

1.2.93-31.12.95 Ärztin im Praktikum, später Assistenzärz-
tin an der Medizinischen Klinik I des Klini-
kums Großhadern
16.12.94 Approbation als Ärztin
1.12.96-31.3.98 Assistenzärztin in der Abteilung für
Psychiatrie und Psychotherapie des St. Eli-
sabeth-Krankenhauses, Gerolstein
1.4.98-30.9.99 Assistenzärztin an der Klinik am Schönen
Moos, Fachklinik für Psychotherapie und
Psychosomatik, Bad Saulgau
Seit 1.10.99 Abteilungsleiterin an der Sonnenberg-
Klinik, Stuttgart