

Aus der Medizinischen Klinik III
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. P. Zabel

**Aktivierung peripherer neutrophiler Granulozyten
unter Stimulation mit Entzündungsmediatoren:
eine experimentelle Studie**



Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
von Isabel Munkel
geboren in Hamburg

Lübeck 2012

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: PD Dr. med. Daniel Drömann

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Stefan Ehlers

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 15.10.2013

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1.1. Definition	6
1.1.2. Epidemiologie	6
1.1.3 Symptome/Stadieneinteilung	7
1.1.4 Ätiologie	8
1.1.5 Abwehrmechanismen der Lunge und Pathogenese	9
1.1.6. Funktion pulmonaler neutrophiler Granulozyten während der Inflammation	11
1.2. Rezeptoren	13
1.2.1. CD11b	13
1.2.2. CD16	13
1.2.3. CD66b	14
1.2.4. CD62L	14
1.2.5. CXCR1/CXCR2	15
1.3. IL-8	16
1.4. MMP9	17
1.5. Zelltod	18
1.5.1. Apoptose	18
1.5.2. Nekrose	20
1.6. Oxidativer Burst	20
1.7. Fragestellung und Zielsetzung	25
2. Material	26
2.1. Geräte	26
2.2. Durchflußzytometer Antikörper	26
2.3. Reagenzien	27
2.4. ELISA	28
2.5. Minilavage	28
2.6. Sonstiges	28

3. Methoden	29
3.1 Studiendesign und Untersuchungskollektiv	29
3.1.1. Studiendesign	29
3.2. Untersuchungskollektiv	30
3.2.1. Kollektiv I: Patienten mit Infektexazerbation oder ambulant erworbener Pneumonie bei bestehender COPD	30
3.2.2. Kollektiv II: Probanden ohne pneumologische Grunderkrankung	31
3.2.3. Ethik und Finanzierung	32
3.3. Neutrophilenisolation	33
3.4. Bronchoskopie und Minilavage	34
3.5. Zellkultur	35
3.5.1. Wahl der Messzeitpunkte	38
3.6. Durchflußzytometrie	39
3.6.1. Vorbereitung der Zellen für die Durchflußzytometrie - Apoptose&Nekrose	42
3.6.2. Vorbereitung der Zellen für die Durchflußzytometrie - Anfärbung der Oberflächenantigene	44
3.6.3. Vorbereitung der Zellen für die Durchflußzytometrie - Oxydativer Burst	45
3.7. ELISA	46
3.8. Statistische Auswertung	46
4. Ergebnisse	47
4.1. Oberflächenexpression der CXC-Rezeptoren: CXCR1 und CXCR2	47
4.2. Oberflächenexpression der Adhäsionsantigene: CD11b und CD62L	49
4.3. Aktivitätsmarker CD16 & Neutophilenmarker CD66b	52
4.7. Oxidativer Burst	53
4.7.1. Oxidativer Burst unter FMLP Stimulation	53

4.7.2. Oxidativer Burst unter PMA Stimulation	54
4.8. IL-8	56
4.9. MMP9	57
4.10. Apoptose und Nekrose	58
5. Diskussion	59
6. Zusammenfassung	70
7. Literatur	72
8. Abürzungen	94
9. Anhang	97
9.1. Lebenslauf	97
9.2. Publikationsverzeichnis	98
9.3. Danksagung	99

1. Einleitung

1.1. COPD

1.1.1. Definition

Die WHO definiert die Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung als Erkrankung, die durch eine Obstruktion der Lunge mit vermindertem Luftfluss charakterisiert ist und mit einer irreversiblen Behinderung der normalen Atmung einhergeht.

Eine engere Umschreibung, welche jedoch die der COPD verwandten Krankheiten Lungenemphysem und chronische Bronchitis nicht mit einschließt, lieferte die Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2001 in ihren Leitlinien: „Die COPD ist eine progressiv verlaufende chronische Erkrankung, die durch eine nicht vollständig reversible Atemwegsobstruktion gekennzeichnet ist. Ihr zugrunde liegt eine entzündliche Reaktion der Atemwege, hervorgerufen durch inhalative Schadstoffe“ (Pauwels et al., 2001)

1.1.2. Epidemiologie

Bereits 1990 war die COPD weltweit die sechsthäufigste Todesursache. Doch auch heute stellt die Erkrankung noch ein erhebliches gesundheitliches Problem dar. So liegt die Prävalenz der COPD in Deutschland bei 10-15% (Weißbuch Lunge, 2005).

Auch in Zukunft wird die Erkrankung weiter im Fokus der Medizin stehen. Dies liegt unter anderem an der vermehrten Exposition der Lunge mit schädlichen Substanzen. So ist das Einstiegsalter für Rauchen heute zwischen das 11. und 15. Lebensjahr vorgerückt, sodass die COPD in Zukunft nicht nur Menschen in höherem Lebensalter betreffen wird, sondern auch zunehmend Patienten unter dem 45. Lebensjahr. Prognosen besagen, dass die Erkrankung im Jahr 2020 die dritthäufigste Mortalitätsursache und Morbiditätsursache sein wird (Murray et al., 1997). So ist sie unter den führenden Todesursachen die einzige Erkrankung, die in ihrer Verbreitung zunimmt (National Heart, Lung and Blood Institute, 1998). 2020 soll die COPD an Stelle 5 der durch Behinderung/Arbeitsunfähigkeit belasteten Lebensjahre (DALY: disability adjusted life years) stehen (Pauwels et al., 2001). Durch die steigenden Therapiekosten der COPD stellt die Erkrankung außerdem eine zunehmende finanzielle Belastung für die Kostenträger, wie Krankenkassen dar (Blanchette et al., 2012).

1.1.3. Symptome/Stadieneinteilung

Nach der Deutschen Atemwegsliga (Worth et al., 2002) und GOLD erfolgen die Diagnose und die Stadieneinteilung der COPD durch die typische Anamnese und den Lungenfunktionsbefund.

Erste Hinweise für das Bestehen einer COPD kann ein morgendlicher Husten mit oder ohne Auswurf sein, der im weiteren Verlauf immer ausgeprägter in Stärke und Dauer wird. Später kommt Luftnot, bei oder ohne Belastung, hinzu.

Bei Verdacht auf das Vorliegen der Erkrankung ist die körperliche Untersuchung bei leichter COPD zunächst unauffällig. In fortgeschrittenem Stadium fällt der COPD Patient durch ein verlängertes Expirium, Pfeifen/Giemen, Lungenüberblähung mit Zwerchfelltieftand und hypersonoren Klopfeschall auf.

Gesichert wird die Diagnose schließlich mittels Lungenfunktionstest. In der Spirometrie ist die COPD durch ein erniedrigtes FEV1 bei normaler Vitalkapazität charakterisiert. Der Tiffeneau-Index ist folglich erniedrigt. Die Stadieneinteilung der COPD erfolgt mittels FEV1 Werten (% vom Soll), gemessen nach Gabe eines Bronchodilatators.

Tab.1.: Schweregrad der COPD (GOLD 2005)

Schweregrad	Charakteristik
0 (Risikogruppe)	<ul style="list-style-type: none"> · normale Spirometrie · chronische Symptome (Husten, Auswurf)
I (leichtgradig)	<ul style="list-style-type: none"> · FEV1 > 80 % Soll · FEV1/VK < 70 % · mit oder ohne chronische Symptome (Husten, Auswurf, Dyspnoe - evtl. bei starker körperlicher Belastung)
II (mittelgradig)	<ul style="list-style-type: none"> · 50 % < FEV1 < 80 % Soll · FEV1/VK < 70 % · mit oder ohne chronische Symptome (Husten, Auswurf, Dyspnoe)
III (schwer)	<ul style="list-style-type: none"> · 30 % < FEV1 < 50 % Soll · FEV1/VK < 70 % · mit oder ohne chronische Symptome (Husten, Auswurf, Dyspnoe)
IV (sehr schwer)	<ul style="list-style-type: none"> · 30 % < FEV1 < 50 % Soll mit chronisch respiratorischer Insuffizienz · FEV1/VK < 70 %

1.1.4. Ätiologie

Die COPD ist eine entzündliche Atemwegserkrankung, die durch bestimmte Noxen getriggert werden kann. Ab einem bestimmten Punkt verläuft die chronische Entzündung selbstperpetuierend, auch wenn verursachende Noxen vermieden wurden. Dabei ist die COPD keine lokal begrenzte Entzündung, sondern geht mit Aktivierung zirkulierender Entzündungszellen einher. Die Mechanismen, welche die chronische Entzündung aufrechterhalten und die Beziehung zwischen pulmonalem und systemischem Kompartiment sind jedoch weitestgehend unverstanden.

Dennoch stehen inzwischen einige Faktoren im Verdacht für die Entstehung einer COPD verantwortlich zu sein. Dabei wird zwischen angeborenen und erworbenen Faktoren unterschieden. Es wird vermutet, dass bestimmte genetische Anlagen, wie z.B. der α -1-Antitrypsinmangel, das Risiko zu erkranken steigern. Ebenso scheinen Asthma und Atemwegshyperreagibilität Einfluss auf die Krankheitsentstehung zu haben (Sluiter et al., 1961). Auch langjähriges Einatmen von Chemikalien, Stäuben oder auch die zunehmende Umweltverschmutzung können das Erkrankungsrisiko steigern. Schwere Lungenerkrankungen in der Kindheit werden ebenfalls mit der COPD in Verbindung gebracht (Tager et al., 1988). Der bedeutendste exogene Faktor für die Entstehung der COPD scheint aber der inhalative Zigarettenrauch zu sein. Sowohl Aktiv- als auch Passivrauchen führen zu einer Veränderung des Lungengewebes sowie der pulmonalen Immunantwort. Unklar bleibt jedoch, weshalb nur ein geringer Teil der mit schädlichen Noxen in Kontakt gekommenen Individuen eine COPD entwickelt. So wurde früher postuliert, dass nur etwa 15% aller Raucher an einer COPD erkranken. Auch wenn neuere Studien davon berichten, dass die COPD häufig nicht diagnostiziert wird und der Anteil der Raucher, die an COPD erkranken, fast bei 50% liegt (Lundbäck et al., 2003), bleibt immer noch die Frage bestehen, warum die Erkrankung bei nur einem Teil der Raucher auftritt. Ebenfalls erwähnenswert ist, dass auch Nicht-Raucher durchaus erkranken können (Zhou et al., 2009). Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand scheint eine Störung der angeborenen Immunität zu sein, die zur Aktivierung neutrophiler Granulozyten innerhalb der pulmonalen Mikrozirkulation führt und über eine überschüssige Immunantwort Lungengewebe schädigt.

1.1.5. Abwehrmechanismen der Lunge und Pathogenese

Die Oberfläche der Lungenepithelien beträgt ca. 100m² und stellt damit die größte innere Fläche des Körpers dar, welche in direktem Kontakt mit der Umwelt steht. Um die Lunge zu schützen besitzt der Körper intrapulmonal nicht-spezifische und spezifische Abwehrmechanismen.

Die oberen Luftwege besitzen zu ihrem Schutz einen besonderen Aufbau: neben den in der Tiefe immer enger werdenden Verzweigungen von Bronchien und Bronchiolen sorgen der Hustenreflex und die Aktivität des Flimmerepithels für eine kontinuierliche Ausschwemmung von Fremdstoffen. Weiterhin trägt das Tracheobronchialsekret mit den dort enthaltenen Enzymen und zellulären Komponenten, zur Abwehr bei. Es enthält Enzyme wie Proteasen und Antiproteasen, Lysozyme, sowie, Komplement und Defensine und zahlreiche Antioxidantien (z.B. Transferrin, Laktoferrin, Glutathion, Albumin). Außerdem bilden die, in dem Sekret enthaltenen Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen eine erste Barriere gegen Fremdkörper (Physiological Medicine: A Clinical Approach to Basic Medical Physiology, 2000).

Die spezifische Abwehr der Lunge erfolgt antikörpervermittelt über sekretorische Immunglobuline (IgA) und Immunglobuline aus dem Blutplasma (IgG), sowie über zelluläre Mechanismen. Dabei wird die Rekrutierung der Abwehrzellen über antigenpräsentierende Zellen oder über Ausschüttung von Zytokinen vermittelt (Physiological Medicine: A Clinical Approach to Basic Medical Physiology, 2000).

Während die oben genannten Mechanismen gezielt Fremdkörper, Bakterien und Viren bekämpfen ohne Lungengewebe zu gefährden, wird die COPD durch eine chronische Entzündung der Atemwege und der Lunge verursacht. Verantwortlich dafür ist ein Ungleichgewicht zwischen inflammatorischen und antiinflammatorischen Mechanismen. So finden sich bei der COPD eine erhöhte Zahl von CD8⁺-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in der Lunge (Saetta et al.,1999), (Saetta et al., 2001). Während beim Lungengesunden eine Inflammation, beispielsweise nach Infektion, nach gewisser Zeit abklingt, produzieren die aktivierten Zellen des COPD-Patienten verschiedenste Mediatoren und Enzyme, welche die Inflammation permanent aufrecht erhalten (Hill et al., 2000). Weiterhin ist bei Lungengesunden das Verhältnis proteolytischer Enzyme und Antiproteasen ausgeglichen. Dagegen konnte bei COPD-Patienten eine erhöhte Aktivität der proteolytischen Enzyme (z.B. MMP9) oder eine verminderte Aktivität der Antiproteasen (z.B. TIMP 1) nachgewiesen werden (Vignola et al., 1998).

Alveolarmakrophagen produzieren proteolytische Enzyme sowie proinflammatorische Mediatoren wie Leukotrien B₄, TNF- α , Interleukin-8, welche neutrophile Granulozyten anlocken. Diese in die Lunge immigrierten neutrophilen Granulozyten können nun ihrerseits durch eine überschießende Inflammation pulmonale Strukturen angreifen (Saetta et al., 1999).

Neutrophile Granulozyten sezernieren außerdem Elastasen, welche Kollagen- und Elastinfasern der Lunge abbauen. Die Elastasen sind außerdem verantwortlich für die vermehrte Produktion von zähflüssigem Mukus, welcher die Zilienfunktion lähmt und so den Abtransport von schädlichen Substanzen behindert (Hunninghake et al., 1983), (Cosio et al., 1999).

Eine zentrale Rolle während der pulmonalen Abwehr spielt weiterhin die Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten (ROS). Um diese zu produzieren besitzen Neutrophile einen Multienzymkomplex, die sogenannte NADPH-Oxidase. Die überschießende Produktion von Sauerstoffradikalen bei COPD-Patienten kann auf Dauer zu Veränderung der Lungengewebsstrukturen führen (St. Geme et al., 1996). So bewirken diese, ähnlich der Elastase, eine vermehrte Mukussekretion und eine Schädigung der Zilienbewegung. Zusätzlich fördert oxidativer Stress die Freisetzung von chemotaktischen Substanzen, wie IL-8, aus Lungenepithelzellen, wodurch die chronische Entzündung in Gang gehalten wird (Palmer et al., 1987). Sauerstoffradikale können außerdem die Inaktivierung von Antiproteasen, wie z.B. α 1-Antitrypsin zur Folge haben, sodass der Einfluss von Proteasen auf das Lungenmilieu überwiegt.

Aus der ständigen Verletzung und dem Versuch, die entstandenen Mikroläsionen zu reparieren, resultiert die Bildung von Narbengewebe und somit eine veränderte Struktur der Bronchien und Bronchiolen sowie des Lungenparenchyms. Mikroskopisch sichtbar werden diese Veränderungen durch eine erhöhte Anzahl mukussezernierender Zellen und Becherzellen bei verminderter Zahl zilientragender Zellen (Saetta et al., 2000), (Abb. 1).

Der Verlust von Kollagen und Elastin des Narbengewebes der Bronchien führt zu einer Engstellung der Lumina, wodurch die chronische Obstruktion gefördert wird. Die Zerstörung und die damit einhergehende Aufweitung der Bronchiolen führt bei forcierter Expiration zu einem Kollaps der kleinen Atemwege. Beide Mechanismen bewirken, dass eingeatmete Luft in den Alveolen zurück bleibt. Letztendlich mündet die daraus resultierende Überblähung der Alveolen in funktionslosen Emphysemen (Hale et al., 1980), (Wright et al., 1992).

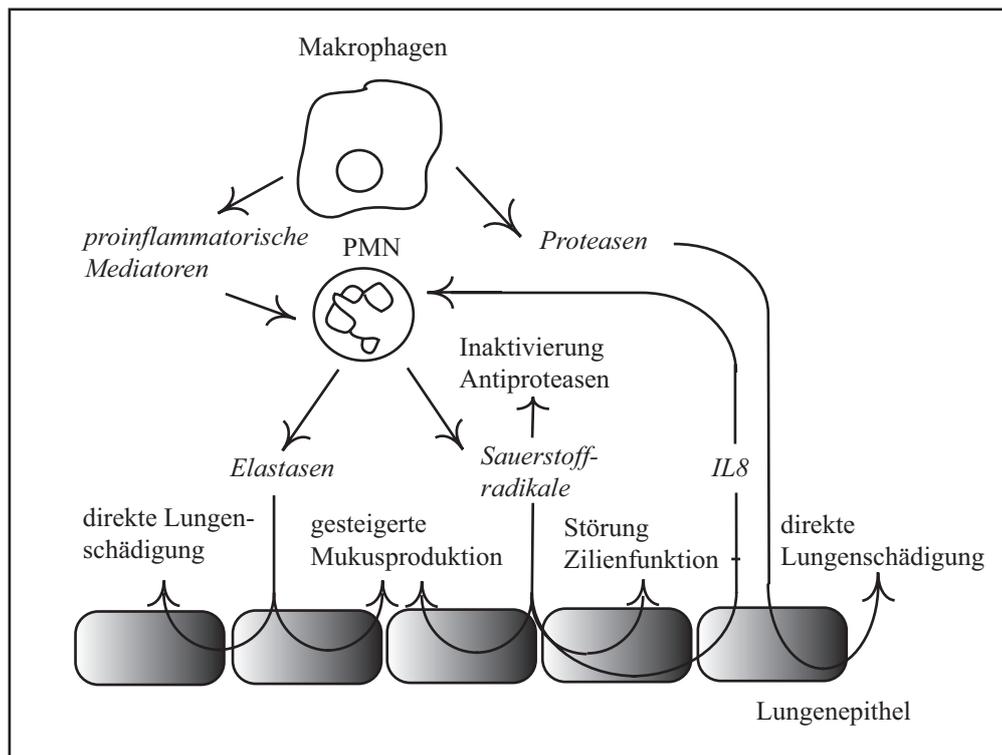


Abb. 1: schematische Darstellung der Interaktion zwischen inflammatorischen Zellen und Lungengewebe

1.1.6. Funktion pulmonaler neutrophiler Granulozyten während der Inflammation

Neutrophile Granulozyten nehmen in der pulmonalen Infektabwehr eine besondere Stellung ein. Sie sind die dominierende Zelllinie der Leukozyten in Alveolarraum und Ödemflüssigkeit (Steinberg et al., 1994), (Pitted et al., 1997). Zusätzlich hängt die Entwicklung der Inflammation durch andere Mechanismen entscheidend von den neutrophilen Granulozyten ab.

Durch Phagozytose und anschließende Phagosomenbildung binden neutrophile Granulozyten Gewebetrümmer und Bakterien. Außerdem produzieren sie reaktive Sauerstoffspezies, die in der Lage sind Fremdkörper, Gewebe und Bakterien zu zerstören. Weiterhin enthalten neutrophile Granula verschiedene Moleküle und Enzyme, welche wichtig für den Entzündungsprozess sind (Borregaard et al., 1997).

Während der Inflammation werden von Alveolarzellen und Makrophagen Zytokine wie IL-1, -4, -6, -8 und -10 und Tumor Nekrose Faktor α produziert, die neutrophile Granulozyten aktivieren und in das Kapillarbett der Lunge locken (Keatings et al., 1996). Dort werden sie am Endothel über Verknüpfung von L-Selektin auf den neutrophilen Granulozyten und dem E-Selektin der Endothelzellen mit den entsprechenden Liganden locker an das Endothel geheftet (Rolling). An-

schließlich wird eine feste Verbindung zwischen neutrophilen Granulozyten und Endothel gebildet, indem das auf den PMN's gebildete Beta2-Integrin (CD11/CD18) mit dem Ligand ICAM auf den Endothelzellen interagiert. Die adherierten PMN's durchdringen schließlich die Endothelwand und transmigrieren zum Ort der Entzündung. Dort angekommen, sezernieren die PMN drei verschiedene Arten von Granula und Vesikeln, in welchen sich proinflammatorische Substanzen befinden.

Sekretorische Vesikel werden durch zahlreiche Mediatoren (FMLP, LTB₄) mobilisiert. Sie beinhalten Rezeptoren, welche die PMN's in einen aktivierten Zustand versetzen und außerdem die feste Bindung an vaskulären Epithelien ermöglichen (Murav'ev et al., 2003), (Sengelov et al., 1993).

Primäre oder azurophile Granula enthalten Defensine, die ein großes antimikrobielles Spektrum haben und chemotaktisch wirken. Weiterhin finden sich saure Hydrolasen (saure Phosphatase, α -Mannosidase, N-acetyl- β -Glucosaminidase) und neutrale Proteasen (Proteinase-3, Cathepsin G, Elastase), welche aktivierend auf Lymphozyten, Makrophagen und Thrombozyten wirken. Im Rahmen der chronischen Bronchitis scheint besonders die Elastase, auch Neutrophilen-Elastase genannt, erwähnenswert. Sie steht im Verdacht eine Schleimhauthyperplasie mit Schleimhypersekretion zu induzieren und außerdem die Zilien in ihrer Reinigungsfunktion zu beeinträchtigen (Barnes et al., 2000), (Stockley et al., 1995). Einen besonders wichtigen Bestandteil stellen auch die Myeloperoxidasen dar, welche die Potenz des von der NADPH-Oxidase gebildeten H₂O₂ steigern (Klebanoff et al., 1999) und somit den oxidativen Burst verstärken.

Sekundäre oder spezifische Granula enthalten Substanzen wie Lactoferrin, die durch Freisetzung antimikrobieller Substanzen wichtig für die Phagozytose sind (Sengelov H et al., 1995).

Tertiär Granula oder sekretorische Vesikel schließen hauptsächlich Gelatinase ein. Dieses Enzym verursacht an Kollagen in Bindegewebe oder Basalmembranen Schäden und ermöglicht so die Diapedese der neutrophilen Granulozyten. Zusätzlich wird während der Exozytose der Vesikel Cytochrom b558, welches ein Bestandteil der NADPH-Oxidase ist, in die Neutrophilenzellwand eingebaut (Murav'ev et al., 2003). Alle o.g. Mechanismen dienen direkt oder indirekt zur Reduktion der Infektiosität von Mikroorganismen, indem diese inaktiviert oder abgetötet werden. Das Vermögen der peripheren neutrophilen Granulozyten, Mikroorganismen unschädlich zu machen und damit eine potentielle Infektion zu verhindern, bezeichnet man als antimikrobielle Kapazität.

1.2. Rezeptoren

1.2.1. CD11b

CD11b gehört zu der Gruppe der Leukozytenintegrine. Die Leukozytenintegrine besitzen alle eine gleiche β_2 -Untereinheit, unterscheiden sich jedoch in ihrer α -Untereinheit. Gespeichert wird CD11b primär in peroxidasenegativen Vesikeln (Bainton et al., 1987). Inflammatorische Stimuli bewirken die Translokation des Rezeptors auf die Zelloberfläche.

Eine Hauptfunktion des CD11b Rezeptors ist die Bindung an ICAM-1, über das die Leukozytenadhäsion an Endothelzellen vermittelt und damit die Chemotaxis ermöglicht wird (Hynes et al., 1992). Weiterhin bindet CD11b iC3b auf opsonierten Bakterien und ermöglicht so deren Phagozytose. Im Hinblick auf die COPD ist bekannt, dass eine höhere Anzahl neutrophiler Granulozyten im Sputum mit einem höheren Schweregrad der Erkrankung korreliert (Stanescu et al., 1996). Verantwortlich für diese erhöhten Zellzahlen ist eine gesteigerte Chemotaxis von PMN aus der Blutzirkulation über epitheliales Gewebe in das Bronchuslumen. Für diesen Vorgang werden Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 auf submukösen Gefäßen und Bronchialepithelien hochreguliert, die dann CD11b binden und so die Migration ermöglichen (Keatings et al., 1996), (Saetta et al., 2001). Daher wurde CD11b als Marker für eine gesteigerte Migrationsbereitschaft in der Studie bestimmt.

1.2.2. CD16

CD16, auch genannt, ist Teil der Gruppe der Fc γ RIII Rezeptoren, welche für die Bindung von Immunglobulinisotypen verantwortlich sind. CD16 gehört dabei der Untergruppe der Fc γ RIII Rezeptoren an. Diese Rezeptoren sind auf die Bindung von IgG spezialisiert und befinden sich auf Phagozyten, NK-Zellen, B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, dem Fc-Teil von IgG und den Komplementfaktor C3b (Hibbs et al., 1994). CD16 unterscheidet sich durch seine Struktur von den beiden anderen Fc γ RIII Rezeptoren CD64 und CD32. Die Bindung von IgG an Fc γ RIII Rezeptoren kann verschiedene Reaktionen auslösen. Im Rahmen der spezifischen Abwehr werden IgG gebildet, welche sich an Fremdzellen anheften und diese opsonieren. Bindet nun ein neutrophiler Granulozyt mittels CD16 an die IgG Moleküle, werden zytotoxische Substanzen ausgeschüttet, wodurch die IgG gebundene Zelle angegriffen und letztendlich so ihre Phagozytose

eingeleitet wird (Huizinga et al., 1988), (Huizinga et al., 1990a). Eine Bindung des Fc γ RIIIb mit Immunkomplexen verstärkt jedoch nicht nur die Phagozytose, sondern triggert auch Neutrophilenfunktionen wie die Degranulation. Im Hinblick auf unsere Studie ist hierbei auch erwähnenswert, dass die Bildung von ROS bei Blockade des Fc γ RIIIb signifikant vermindert ist (Huizinga et al., 1990b), (Bux et al., 1993), (Flesch et al., 1998). Bei COPD konnte in einer früheren Studie eine verminderte Expression von CD16 auf Makrophagen von COPD-Patienten im Vergleich zu Nichtrauchern beschrieben werden (Löfdahl et al., 2006). Dieser Fakt weist daraufhin, dass COPD-Patienten eine verminderte Abwehrleistung gegenüber Bakterien zeigen, welche sich in diesem Fall in einer verminderten Fc γ RIII Rezeptorexpression auf Makrophagen äußert. Ob sich solch eine verminderte Phagozytosekapazität auch auf PMN zeigt, sollte anhand der Expression des CD16 Rezeptors bestimmt werden.

1.2.3. CD66b

CD66b gehört, wie CD66a, -c, und -d, zu der Familie der carcino-embryogenen-Antigene (CEA), die strukturell der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet werden (Skubitz et al., 1992). Da CD66b auf allen Granulozyten vorkommt, wird es als auch Marker für diese Zellen eingesetzt. CD66b ist durch einen Glykosylphosphatidylinositol- (GPI) Anker in der Zellmembran eingebunden und unterscheidet sich von den anderen CD66 Molekülen dadurch, dass es keine eigene Transmembrandomäne besitzt (Kuijpers et al., 1993). Die genaue Funktion des Moleküls ist noch unklar, jedoch wird vermutet, dass die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten unter anderem über die Bindung von spezifischen Antikörpern an CD66b läuft (Skubitz et al., 1996). CD66b wurde in allen Ansätzen der Studie als Neutrophilenmarker mitbestimmt.

1.2.4. CD62L

Bei CD62L, auch L-Selektin genannt, handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül, welches auf neutrophilen Granulozyten zu finden ist (Gallatin et al., 1983). L-Selektin besteht aus einem kurzen zytoplasmatischen Abschnitt, der über ein transmembranäres Stück mit einem dreiteiligen extrazellulärem Abschnitt verbunden ist (Vestweber et al., 1999). Der erste Kontakt zur Migration aus der Blutzirkulation zu einem Entzündungsherd wird über Selektinmoleküle vermittelt (Salmi et al., 1997) (Butcher et al., 1996): neutrophile Granulozyten binden mit CD62L über verschiedene

Sialylglykoproteine auf Endothelzellen, sodass sie über das Endothel „rollen“ können. Während dieses Vorgangs erfolgt eine Aktivierung der Leukozyten, sodass der extrazelluläre Anteil des L-Selektins durch membranständige Metalloproteinasen enzymatisch verdaut wird (Shedding) (Black et al., 1997). Im Gegensatz zu anderen Rezeptoren bedeutet dies für die Messung durch Flowcytometrie, dass eine erniedrigte rMFI für eine Aktivierung der Zellen spricht.

Ähnlich dem CD11b Rezeptor soll der ebenfalls für die Migration von Zellen wichtige CD62L Rezeptor einen Indikator für eine veränderte Inflammation im Rahmen der COPD darstellen. So berichten Noguera et al. 2004 von einer verminderten CD62L Expression von COPD-Patienten im Vergleich zu Nicht-Rauchern.

1.2.5. CXCR1/CXCR2

Die CXCR1 und der CXCR2-Rezeptoren gehören zur Familie der 7-Transmembran-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Das C-terminale Ende dieser Rezeptorart ragt ins Zytoplasma hinein, während der N-terminale Teil für die Bindung von bestimmten Chemokinen verantwortlich ist (LaRosa et al., 1992). CXCR1-Rezeptoren können IL-8, ENA-78, GCP-2 binden, wobei die Affinität von IL-8 zu CXCR1 am stärksten ist. An CXCR2-Rezeptoren binden, mit etwa gleicher Affinität, IL-8, NAP-2, ENA-78, GRO- α , GRO- β , GRO- γ (Wuyts et al., 1998). Dockt eines dieser Chemokine an den N-terminalen Teil des Rezeptors an, wird ein G-Protein aktiviert, welches über verschiedene Signalwege Effektorenzyme aktiviert. Über die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase- γ wird die Proteinkinase B und weitere kleine GTPasen aktiviert. Dieser Vorgang führt zu einer Migration entlang einer steigenden IL-8-Konzentration.

Ein weiteres wichtiges Effektorenzym ist die Proteinkinase C: über die Aktivierung der Enzyme Phospholipase C β 2 und C β 3 wird die Bildung von Diacylglycerat bewirkt, welches wiederum die Proteinkinase C aktiviert. Diese wird für einige Neutrophilenreaktionen wie z.B. den oxidativen Burst benötigt wird (Hirsch et al., 2000).

Hat eine Ligandenbindung stattgefunden werden CXCR1 und CXCR2-Rezeptoren innerhalb von kurzer Zeit internalisiert, recycelt und wieder an der Oberfläche gebunden (Oppenheim et al., 1991).

1.3. IL-8

IL-8 gehört zu der Familie der chemotaktischen Zytokine. Diese bestehen aus 70-130 Aminosäuren und enthalten vier hoch konservierte Cysteinreste, die über 2 Disulfidbrücken verbunden sind, sodass eine hohe Stabilität erreicht wird (Wuyts et al., 1998). Die Chemokine werden anhand der Cysteinreste in 4 Gruppen unterteilt, wobei die CC-Familie und die CXC-Familie die wichtigsten Vertreter sind. Diese beiden Gruppen unterscheiden sich durch die Position der ersten beiden Cysteine (Baggiolini et al., 1995). Im Gegensatz zu den Chemokinen der CC-Familie besitzen Chemokine der CXC-Familie, zu denen auch das IL-8 gehört, eine Aminosäure zwischen den ersten beiden Cysteinresten. Weiterhin unterscheidet man die Chemokine der CXC-Familie an ihrem N-terminalen Ende. Besitzen sie eine sogenannte ELR-Sequenz (Glu-Leu-Arg) so wirken sie chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten. Fehlt diese, bewirkt das Chemokin die Migration von Lymphozyten.

IL-8 besteht insgesamt aus 72 Aminosäuren und wiegt 8kDa. Sezerniert wird IL-8 durch zahlreiche Zellarten, u.a. von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Bronchialepithelien. Aktiviert wird die Sekretion von IL-8 durch mikrobielle Antigene und proinflammatorische Zytokine, u.a. LPS, TNF- α und durch bestimmten Interleukine (DeForge et al., 1992). Das freigesetzte IL-8 bindet an CXC1 oder CXC2-Rezeptoren und bewirkt so Chemotaxis, Adhäsion, Migration und Aktivierung von Entzündungszellen, insbesondere von neutrophilen Granulozyten (Smith et al., 1991), (Schröder et al., 1987). Weiterhin erhöht IL-8 in neutrophilen Granulozyten auch die intrazelluläre Calcium-Konzentration sowie einen schwachen sog. „Respiratory Burst“, d.h. die Aktivierung der NADPH-Oxidase (Schröder et al., 1987; Thelen et al., 1988). Uneinigkeit herrscht noch über die Frage über welchen Rezeptor die Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten hauptsächlich erfolgt. Eine Studie von Hammond (Hammond et al., 1995) besagt, dass die chemotaktische Wirkung hauptsächlich über den CXC1-Rezeptor vermittelt wird, während in einer anderen Studie (Chuntharapai et al., 1995) postuliert wird, dass IL-8 in entzündungsfernen Bereichen, mit mäßiger IL-8 Konzentration, eher mit dem CXC2-Rezeptor interagiert, während es direkt an der Entzündungsstelle eher an den CXC1-Rezeptor bindet. Abgebaut und inaktiviert wird IL-8 nur langsam durch Proteasen wie Elastase, Metalloproteasen, Proteinase-3 und Cathepsin G.

Zytokine spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der COPD, da sie eine wichtige Komponente des Inflammationsprozesses darstellen. Dieser Fakt konnte bereits in einigen Studien be-

wiesen werden. Exemplarisch zeigten Hackett und Kollegen (Hackett et al., 2008) in ihrer Studie eine erhöhte Produktion von TNF- α , IL-10, IL-8 und IL-6 in Lungenepithel von COPD-Patienten, im Vergleich zu Kontrollen mit normaler Lungenfunktion. Damiá Ade und Kollegen, (Damiá Ade et al., 2011) dokumentieren in Ihrer Studie, dass eine erhöhte IL-8 Konzentration mit erhöhter Obstruktion und Dyspnoe einhergeht. Eine andere Studie (Wilkinson et al., 2006) belegte, dass die IL-8 Konzentration im Sputum von COPD-Patienten während der Infektexazerbation signifikant im Vergleich zu Sputum das in einem infektfreien Intervall entnommen wurde, erhöht war.

1.4. MMP9

Bei den MMP's (Matrixmetalloproteinasen) handelt es sich um zinkabhängige Endopeptidasen. Diese sind in der Lage Oberflächenproteine sowie Bestandteile der Extrazellulärmatrix, inklusive Basalmembran abzubauen. MMP's sind durch 2 Zink- und 3 Kalziumionen im katalytischen Zentrum charakterisiert, sowie durch eine N-terminale Sequenz, welche nach der Synthese enzymatisch abgespalten wird. Dadurch werden sie von einem inaktiven in einen aktiven Zustand überführt (Kähäri et al., 1997; Shapiro et al., 1998; Woessner et al., 1998; Murphy et al., 1997). Weiterhin können sich die MMP's über Aktivierungskaskaden gegenseitig aktivieren.

Unterschieden werden sie anhand ihrer Struktur und Substratspezifität in 4 Untergruppen.

MMP9 gehört zu der Untergruppe der Gelatinasen. Diese besitzen im katalytischen Zentrum zusätzlich noch drei fibronectin-ähnliche Domänen, welche die Bindung an Gelatin möglich machen. Gelatinasen können die Kollagene IV, V, VII und X sowie Fibronectin und Elastin spalten (Murphy et al., 1991), (Senior et al., 1991), (Matrisian et al., 1992). MMP9 ist zusätzlich spezifisch für den Abbau der Kollagentypen I, II und V. Das Enzym wird in sekretorischen Vesikeln von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten gespeichert.

Die Gegenspieler der MMP's sind sogenannte TIMP's (tissue inhibitors of matrixmetalloproteinasen). Sie können die Aktivität der MMP's hemmen, indem sie mit der N-terminalen Domäne die Zinkionen im katalytischen Zentrum der MMP's reversibel binden (Sternlicht et al., 2001). Für die Inhibition von MMP9 ist TIMP4 verantwortlich. Physiologischerweise herrscht ein Gleichgewicht zwischen MMP's und TIMP's. Zahlreiche Studien beschreiben bereits, dass bei der COPD ein Ungleichgewicht zwischen den MMP's und den TIMP's herrscht, sodass die extrazelluläre Matrix der Lunge irreversibel geschädigt wird (Fujita et al., 1990), (Kang et al., 2003), (Higashimoto

et al., 2005). Ursächlich für ein Mißverhältniss zwischen den MMP's und TIMP's scheinen u.a. genetische Polymorphismen der Endopeptidasen zu sein. So wurde bereits diskutiert, ob ungünstige genetische Varianten der Endopeptidasen zur einem Manifestation der COPD prädisponieren (Mocchegiani et al., 2011). Beeh und Kollegen demonstrierten 2003, dass die TIMP-1 Konzentration im Sputum von Rauchern und COPD-Patienten erhöht ist.

MMP9 ist jedoch nicht nur verdächtig direkt die Lungenmatrix zu schädigen, sondern man vermutet auch, dass das Enzym für die Modulation der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen verantwortlich ist. So kann das Enzym beispielsweise IL-1 inaktivieren. Weiterhin wurde 2000 eine Studie veröffentlicht (Van den Steen et al., 2000), die zeigen konnte, dass MMP9 eine Variante von IL-8 erstellen kann, welche im Vergleich zum „Original“ 10mal aktiver ist. Zu den Zytokinen, die proteolytisch durch MMP9 aktiviert werden, gehören membrangebundenes TNF- α (Gearing et al., 1994) sowie TGF- β (Yu et al., 2000). Aufgrund dieser bereits zahlreichen Hinweise, dass MMP9 bei der Pathogenese der COPD eine Rolle spielt, sollte MMP9 als Marker für eine erhöhte Aktivität der MMP's bestimmt werden.

1.5. Zelltod

1.5.1. Apoptose

Unter Apoptose versteht man eine Form des Zelluntergangs, die durch endogene Prozesse im Zellinneren eingeleitet wird. Dabei bleiben die Zellintegrität sowie die Zellmembran intakt. Während der Apoptose durchläuft der neutrophile Granulozyt verschiedene Phasen. Zunächst wird während des sogenannten „Membran-Flipflop“ Phosphatidylserin auf der Oberfläche exprimiert (Homburg et al., 1995). Danach werden eine Reihe von Caspasen aktiviert, bei neutrophilen Granulozyten insbesondere die Caspasen 1,3,4 und 8, welche proteolytische Prozesse in der Zelle in Gang setzen, was letztendlich zum Abbau der Zelle führt (Santos-Beneit et al., 2000), (Yamashita et al., 1999). Bei einigen chronisch entzündlichen Erkrankungen wird vermutet, dass eine verlängerte Überlebensspanne der neutrophilen Granulozyten zu einer vermehrten Zerstörung von gesundem Gewebe führt. So berichtet eine Studie (Pletz et al., 2004), dass die Apoptose neutrophiler Granulozyten, welche aus dem Blut von hospitalisierten Patienten mit COPD stammten, zu bestimmten Zeitpunkten im Vergleich zu gesunden Freiwilligen erniedrigt war. Ob neutrophile Granulozyten in die Apoptose eintreten hängt von verschiedenen Faktoren ab. Eine Reihe pro- und antiapoptotischer

Faktoren finden sich in Tabelle 2.

Auch ROS scheinen die Apoptose zu beeinflussen. Bekannt ist, dass Apoptose mit einem Funktionsverlust der Phagozytose, Degranulation und Chemotaxis einhergeht. Weiterhin werden oxidative Prozesse ausgelöst und die spezifische Rezeptorexpression der neutrophilen Granulozyten ändert sich. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch die neutrophilen Granulozyten selbst führt wiederum ebenfalls zur Apoptose der Zellen. Man vermutet, dass die Generierung von NADPH den Gehalt an Cytochrom C in der Zelle vermindert, sodass die Aktivität der respiratorischen Kette reduziert ist. Dies führt wiederum zu einer Akkumulation von Elektronen, und einem daraus resultierenden Zusammenbruch des Mitochondrienmembranpotentials (Maianski et al., 2004).

Tab.2.: Apoptose modulierende Faktoren neutrophiler Granulozyten (Marshall et al., 1997))

Mediatoren/Prozesse	Verzögerung der Apoptose	Beschleunigung der Apoptose
Lösliche Mediatoren	IL-1b	IL-6 *
	IL-2	IL-10
	IL-6 *	TNF *
	CXCL-8	Fas Ligand
	GRO-a	O2-
	G-CSF	
	GM-CSF	
	INF-g	
	TNF *	
	C5a	
	Endotoxin (LPS)	
	Glukokortikoide	
	Zelluläre Prozesse	b2-Integrin-Adhäsion
erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration		Reduziertes intrazelluläres Glutathion

* über diese Mediatoren bestehen widersprüchliche Daten

1.5.2. Nekrose

Im Gegensatz zur Apoptose bezeichnet die Nekrose den Zelltod durch äußere Einflüsse verschiedener Art, z.B. durch mechanische oder toxische Faktoren. Beispielsweise können Sauerstoffradikale als toxische Faktoren die Nekrose von Zellen auslösen. Durch die Freisetzung von Pneumolysin und Wasserstoffperoxid bewirken beispielsweise Pneumokokken eine verstärkte Nekrose bei neutrophilen Granulozyten (Bejo et al., 2000).

Während der Nekrose schwillt die Zelle zunächst an bis schließlich die Membran platzt. Dadurch werden Zellorganellen und Zytosol in die Umgebung abgegeben, was wiederum zu einer verstärkten Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe führt.

Bei der COPD könnte eine verstärkte Nekrose, durch die permanente Anwesenheit von pronekrotischen Substanzen, die Entzündungsreaktion zusätzlich aufrechterhalten.

1.6. Oxidativer Burst

Neutrophile Granulozyten bilden im Rahmen der Inflammation reaktive Sauerstoffspezies. Dieser Vorgang erfolgt über einen Multienzymkomplex, genannt NADPH-Oxidase. Die NADPH-Oxidase besteht aus zwei membrangebundenen und drei zytosolischen Komponenten, sowie einem niedermolekularen G-Protein. Zunächst liegt das Enzym in einem inaktiven Zustand vor. Erfolgt ein adäquater Stimulus von außen, werden die zytosolischen Komponenten über kontraktile Elemente des Zytoskeletts, sowie Proteinkinase C-abhängiger Phosphorylierung an die Plasmamembran angenähert und mit den membrangebunden Komponenten verschaltet, sodass die Oxidase in einem aktiven Zustand, wie in Abb. 2 sichtbar, vorliegt (Vignais et al., 2002), (Cell Mol Life Sci, 2002).

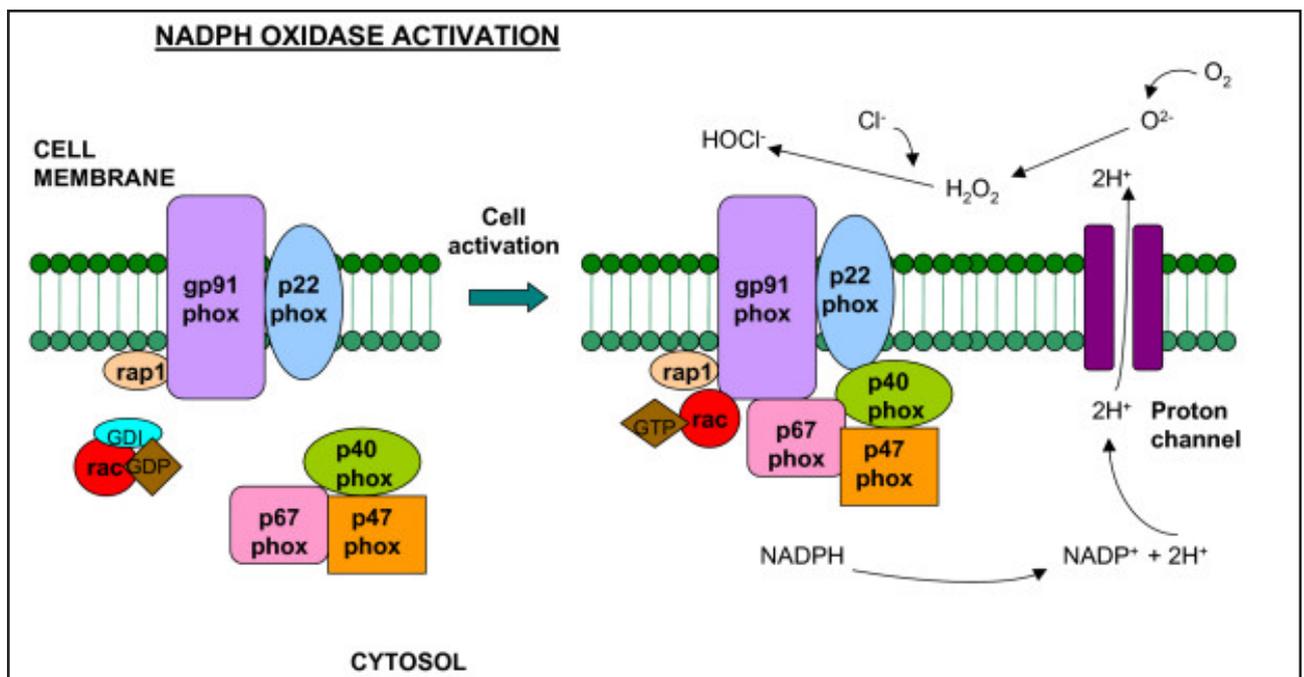


Abb. 2: Schematische Darstellung der NADPH-Oxidase. Der membrangebundene Teil besteht aus 2 Untereinheiten: p22phox und gp91phox. Der zytosolische Teil besteht aus 3 Untereinheiten: p67phox und p47phox und dem accessorisches p40phox Protein. Das Rac-GTP binding protein wird durch bestimmte Stimuli an die Zellmembran transloziert, sodass der NADPH Oxidase Komplex in aktivierter Form vorliegt. Modifiziert nach Assari Medical Immunology, 2006

Die aktivierte NADPH-Oxidase kann aus NADPH und Sauerstoff große Mengen an Superoxid anionen produzieren. Diese dienen als Vorstufe für weitere reaktive Sauerstoffspezies. Zunächst kann Superoxid entweder spontan oder katalysiert durch die Superoxiddismutase zu Hydrogenperoxid reduziert werden, welches wegen seiner fehlenden Polarität in Zellen eindringen kann.

Aus Hydrogenperoxid können zwei weitere sehr potente Sauerstoffspezies entstehen. Zum einen kann es durch Oxidation von Metallsalzen in das aggressive Hydroxylradikal OH^\cdot überführt werden. Andererseits reagiert Hydrogenperoxid mit Chloridionen, katalysiert durch die Myeloperoxidase, zu Hypochlorsäure. Die zugehörigen Reaktionen sind in Abb. 3 aufgeführt. Neben diesen wichtigen Sauerstoffspezies existieren noch eine Reihe anderer Radikale (Tabelle 3).

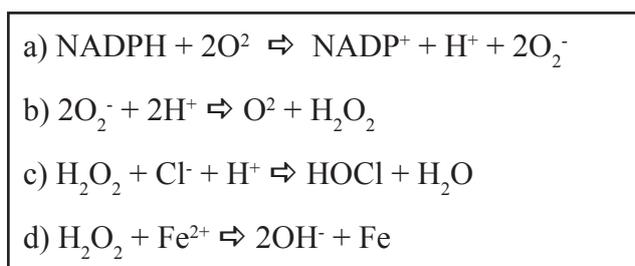


Abb. 3: Redoxreaktionen des oxidativen Bursts

Tab. 3: endogen gebildete Sauerstoffradikale

freie Radikale	Nichtradikale
O ₂ -Superoxide	H ₂ O ₂ Hydrogenperoxid
OH Hydroxyl	HOCl Hypochlorsäure
RO ₂ Peroxyl	O ₃ Ozon
RO Alkoxyl	ROOH Hydroperoxid
HO ₂ Hydroperoxyl	

Die gebildeten Sauerstoffspezies können direkt die extrazelluläre Matrix sowie Proteine und Nukleinsäuren schädigen oder aber auch indirekt, über eine Inaktivierung von Proteaseinhibitoren, diese Strukturen zerstören.

Eine Hypothese in der Pathogenese der COPD besagt, das die chronische Inflammation unter anderem durch ein Missverhältnis zwischen Oxidantien und Antioxidantien aufrechterhalten wird. So konnte bereits gezeigt werden, dass eine gute Ernährung mit antioxidativen Stoffen, wie Vitaminen, sich positiv auf die Lungenfunktion auswirkt. In der NHANES III Studie konnte dargestellt werden, dass die Blutkonzentration von Vitamin C, Vitamin E, Selen und β -Carotin positiv mit dem FEV1 korreliert (Hu et al., 2000). Auch die MORGEN Studie (Grievink L., 1998) konnte denselben Zusammenhang zwischen Vitamin C und β -Carotin mit dem FEV1 herausarbeiten.

Aber auch körpereigene Enzyme dienen dem Schutz vor Sauerstoffradikalen. Glutathion gehört mit seinen Redoxenzymen zu einem wichtigen protektiven antioxidativen System. Es konnte gezeigt werden, dass die Glutathionkonzentration in Lungen von Ratten und in vitro nach Zigarettenrauchexposition reduziert war. Nach der Exposition war die Glutathionkonzentration aufgrund eines Reboundeffekts einige Zeit erhöht (Rahman et al., 1995), (Li et al., 1994). In einer aktuellen Studie (Drost et al., 2005) wurde nun herausgearbeitet, dass Glutathion, als Schutz vor oxidativem Stress, während einer starken Exazerbation bei COPD-Patienten, sowie bei einer schwachen Exazerbation, als auch sogar bei COPD-Patienten in stabilem Zustand signifikant erniedrigt ist. Schon früh konnte eine reduzierte Glutathionmenge im Sekret von Rauchern gefunden werden (Cantin et al., 1987). Neben Glutathion existieren noch weitere antioxidativ wirkende Enzyme. Eine zentrale Rolle spielt die Magnesium Superoxid Dismutase (MSOD), welche hauptsächlich von AT2 Zellen produziert wird (Dobashi et al., 1993) und als Einzige wirksam gegen Sauerstoffradikale

ist, welche von Leukozyten produziert werden. Die MSOD Expression lässt sich durch Zigarettenrauchexposition steigern (Stringer et al., 2004). Weiterhin wurde von Harju et al. demonstriert, dass die Expression des Enzyms in 30-50% von Raucherlungen und dort besonders in AT2 Zellen erhöht ist.

Neben diesen Hinweisen, dass antioxidative Mechanismen bei COPD gestört sind, beleuchten andere Studien den Fakt, dass COPD-Patienten im Vergleich zu lungengesunden Rauchern einen höheren oxidativen Burst aufweisen. Besonders im Fokus der Untersuchung stand die Dysregulation von Redoxenzymen und die damit einhergehende übersteigerte Sauerstoffradikalbildung. Dass diese Veränderungen in starkem Zusammenhang mit Tabakexposition auftreten, ist auch weithin untersucht und anerkannt. So konnte gezeigt werden, dass Passivrauchen zu einer gesteigerten neutrophilen Inflammation und einer vermehrten Freisetzung von Sauerstoffradikalen führt (Anderson et al., 1991).

Oxidativer Stress kann eine Reihe von Reaktionen in der Lunge auslösen, die zu einer Schädigung des Gewebes führen. Zunächst wird beschrieben, dass das Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen, welche bei der COPD vermutet wird, durch eine Inaktivierung von Antiproteasen durch Sauerstoffradikale hervorgerufen wird. So beschreibt Bieth (Bieth et al., 1992), dass die Oxidation eines Methioninrestes von α 1-Antitrypsin im Reaktionszentrum zu einer starken Reduktion der Inhibitionskapazität führt. Weiterhin wird postuliert, dass Oxidantien die Mukusproduktion steigern (Nadel et al., 2001). Außerdem können H_2O_2 und HOCL die Ziliarfunktion der Bronchialzellen negativ beeinflussen, was von einer Reduktion des Zilienschlages bis zum kompletten Verlust der Bewegung reicht (Rogers et al., 2001). Oxidativer Stress wirkt außerdem direkt auf die Lungenzellen. So wurde eine gesteigerte Durchlässigkeit der Alveolarzellen in vitro und in vivo nach Zigarettenrauchexposition beschrieben (Morrison et al., 1999), (Rusznak et al., 2000), (Li et al., 1994). Zusätzlich kann oxidativer Stress die Freisetzung von chemotaktischen Substanzen wie IL-8 aus Endothelzellen stimulieren, sodass die Inflammation gefördert wird. In einer Studie dazu wurde belegt, dass Epithelzellen von COPD-Patienten mehr IL-8 sezernieren als Epithelzellen von Rauchern oder gesunden Probanden (Drost et al., 1992). Weiterhin wurde in der Studie vermutet, dass Sauerstoffradikale die Verformbarkeit von neutrophilen Granulozyten reduzieren, indem Aktinfilamente durch die oxidativen Stoffe vermehrt polymerisiert werden. Die verminderte Verformbarkeit der neutrophilen Granulozyten führt letztendlich dazu, dass sie

vermehrt in das Kapillarbett der Lunge abgegeben werden und von dort aus in das Lungengewebe migrieren, um dort die Inflammation aufrechtzuerhalten.

Aus neueren Studien geht außerdem hervor, dass oxidativer Stress durch die Hochregulierung von redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B die Inflammation unterstützt (Rahman I et al., 2006). NF- κ B reguliert die Transkription zahlreicher inflammatorischer Mediatoren. Es liegt in seiner inaktiven Form, gekoppelt an das inhibitorische Protein I κ B, im Zytosol vor. Wirken Oxidantien auf diesen Komplex ein, wird I κ B durch die I κ B Kinase phosphoryliert und I κ B von NF- κ B getrennt und schließlich in Proteasomen abgebaut. Da Inflammation mit vermehrter Bildung von Oxidantien einhergeht, resultiert ein Kreislauf aus vermehrter Produktion von Sauerstoffradikalen, welcher wiederum in verstärkter Inflammation mündet. Eine Zusammenfassung der schädigenden Wirkung von Sauerstoffradikalen im Zusammenhang mit COPD gibt Abb. 4.



Abb. 4: Schädigungsmechanismen von Sauerstoffradikalen in der Lunge

1.7. Fragestellung und Zielsetzung

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens sollten PMN von COPD-Patienten und Kontrollen im Hinblick auf Zellaktivierung und antimikrobielle Kapazität genauer charakterisiert werden. Dabei suchten wir Hinweise auf Unterschiede in der angeborenen Immunantwort der PMN von COPD-Patienten.

Wir prüften, ob periphere neutrophile Granulozyten bei COPD-Patienten im Vergleich zu lungengesunden Patienten einen stärkeren oxidativen Burst zeigen. Dabei sollte der oxidative Burst auch in einem entzündlichen Milieu, repräsentiert durch bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit untersucht werden.

Es sollte herausgearbeitet werden, ob sich neutrophile Granulozyten von COPD-Patienten und Probanden im Hinblick auf die Expression von für Chemotaxis und Migration relevanten Oberflächenrezeptoren unterscheiden.

Da es Hinweise darauf gibt, dass Chemokine und Matrixmetalloproteinasen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Krankheit spielen, untersuchten wir außerdem, ob und in welcher Form eine veränderte Aktivität der PMN von COPD-Patienten im Vergleich zu lungengesunden Patienten bezüglich der Freisetzung von IL-8 und MMP9 vorliegt.

2. Material

2.1. Geräte

- Durchflußzytometer FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Macintosh Power PC 7300 (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Software Lysis 2, CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Microplate Reader, Model 680 (Bio-Rad, München)
- Microplate Manager, Version 5.2.1 (Bio-Rad, München)
- Zentrifuge Rotina 35 R (Hettich, Tuttlingen)
- Zentrifuge Cytospin-2 (Shandon, Frankfurt)
- Mikroskop Axioskop 20 (Zeiss, Oberkochen)
- Cell Counter AC-8 (Assistant, Frankfurt)
- MS2 Minishaker IKA (Werner Hassa, Lübeck)
- Magnetrührer Ikamag RCT (IKA-Labortechnik, Staufen)
- Schüttler (Heidolph, Schwabach)
- PH Meter (WTW, Weilheim)
- Laborwaage Delta Range AG 204 (Hassa, Lübeck)
- Sterile Werkbank (Nuaire, Frankreich)
- Brutschrank Cell House 200 (Allerod, Dänemark)
- Eismaschine Icematic F90 Compact (Hauschild, Lübeck)
- Gefriertruhe Nuaire -85°C (Zapf Instrumente, Sarstedt)

2.2. Durchflußzytometer Antikörper

- IgM FITC, Isotypenkontrolle (BD Pharmingen, Heidelberg)
- IgG1 PE, Isotypenkontrolle “
- IgG2b PE, Isotypenkontrolle “
- CD66b FITC “
- CD11b PE “
- CD62L PE “

· CXCR2 PE	“
· CXCR1 PE	“
· CD16 PE	“
· Annexin - V FITC	“
· Propidium Iodid PE	“
· FMLP	(Sigma, Hamburg)
· PMA	(Sigma, Hamburg)
· DHR	(Molecular Probes, Eugene, US)

2.3. Reagenzien

· GIBCO DPBS 10x	(GIBCO, Karlsruhe)
· D - PBS 1x	(PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
· BSA (Bovines Serumalbumin)	(Roth, Karlsruhe)
· Natrumazide	(Sigma, Steinheim)
· Paraformaldehyd	(Merck, Darmstadt)
· RPMI 1640	(Biochrom, Berlin)
· Lymphocyte separation medium	(PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
· Polyvinyl Alkohol (PVA)	(Merck, Darmstadt)
· Aqua Dest.	(DeltaSelect, Dreieich)
· May-Grünwald-Färbung	(Greiner, Nümbrecht)
· Giemsa-Färbung	(Merck, Darmstadt)
· LPS	(Sigma, Hamburg)
· FCS (Fetal calf serum)	(Biochrom, Berlin)
· Ficoll	(Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Uppsala, Sweden)

2.4. ELISA

- IL-8 ELISA Kit (R&D, Minneapolis, USA)
- GMCSF ELISA Kit (R&D, Minneapolis, USA)
- MMP9 ELISA Kit (R&D, Minneapolis, USA)
- ELISA Platte (Nalge-Nunc, Hereford, UK)

2.5. Minilavage

- Flexibles Fiberglasbronchoskop IF20 (Olympus, Hamburg)
- Sterile Absaugkatheter QTY50 (Sherwood Medical, Tullamore, Irland)

2.6. Sonstiges

- Monovetten, Serum 9ml (Sarstedt, Nümbrecht)
- Monovetten, EDTA 9ml (Sarstedt, Nümbrecht)
- Monovetten, Lithium-Heparin 9ml (Sarstedt, Nümbrecht)
- PP-Röhrchen 15ml (Greiner, Nürtingen)
- PP-Röhrchen 50ml (Greiner, Nürtingen)
- Falcon Röhrchen 2053 (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Eppendorf Pipette (Eppendorf, Hamburg)
- Combitip plus (Eppendorf, Hamburg)
- Superfrost microscope slides (Menzel-Gläser, Braunschweig)
- PP-Röhrchen 15ml (Greiner, Nürtingen)
- PP-Röhrchen 50ml (Greiner, Nürtingen)
- Falcon Röhrchen 2053 (Becton Dickinson, Heidelberg)

3. Methoden

3.1 Studiendesign und Untersuchungskollektiv

3.1.1. Studiendesign

In die Studie eingeschlossene Patienten waren mit Infektexazerbation oder ambulant erworbener Pneumonie als Einweisungsdiagnose bei bestehender COPD stationär aufgenommen worden. Nach einer Lungenfunktionsprüfung folgte bei klinisch gegebener Indikation eine Bronchoskopie. Das gewonnene Material wurde aufgearbeitet, aliquotiert und eingefroren. Im infektfreien Intervall wurden diese Patienten erneut einbestellt, um venöses Blut aus der Ellenbeuge für die durchflußzytometrische Messungen zu gewinnen. Zusätzlich wurde eine zweite Lungenfunktion durchgeführt. Fünf zuvor eingeschlossene und bronchoskopierte Patienten lehnten eine Blutentnahme im infektfreien Intervall ab. Diese wurden durch infektfreie COPD-Patienten gleichen Geschlechts und Alters ersetzt. Als Kriterium für Infektfreiheit galt eine entsprechend beschwerdefreie Anamnese und ein niedriger CRP Wert.

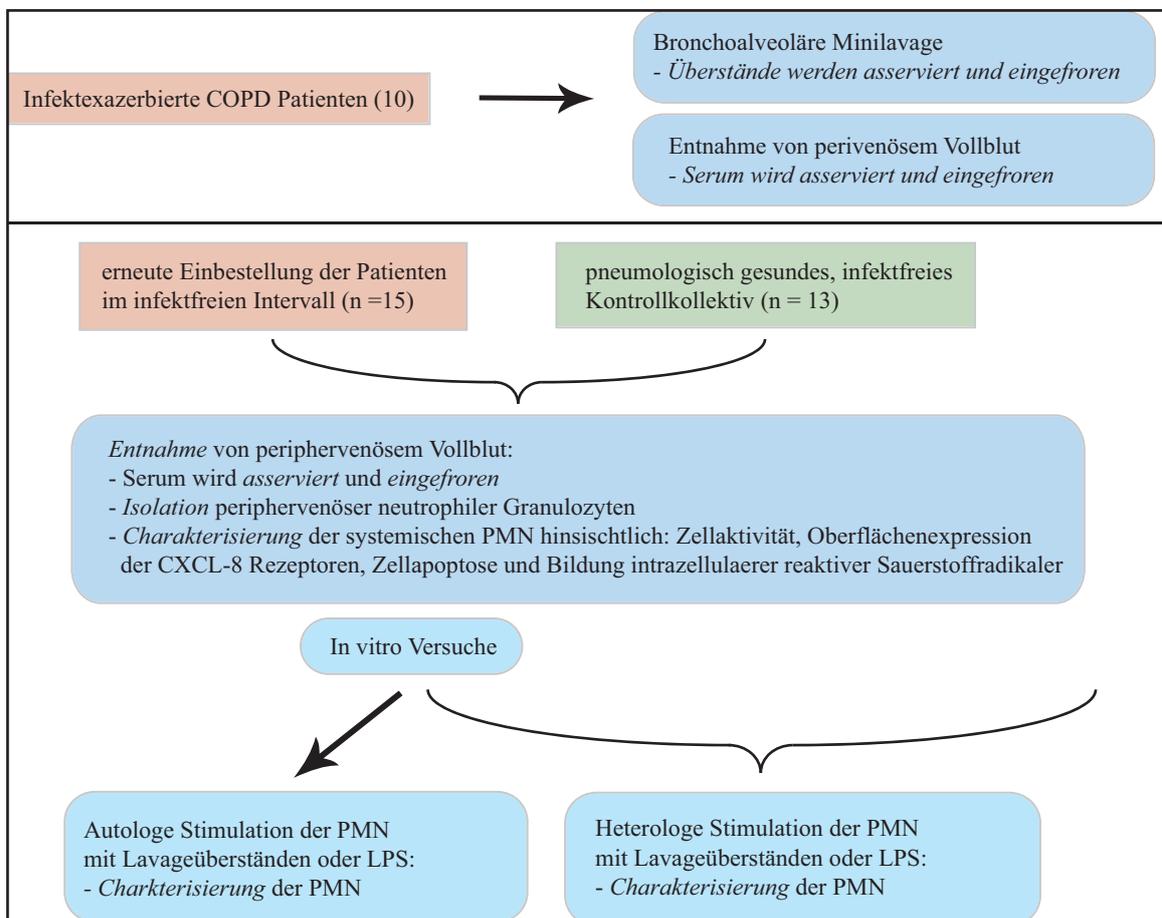


Abb. 5: Studiendesign im Flussdiagramm

In die Studie eingeschlossene Probanden waren stationäre Patienten, die aus nicht pneumologischen Gründen aufgenommen wurden. Ihnen wurde ebenfalls venöses Blut aus der Ellenbeuge entnommen und die Lungenfunktionsprüfung durchgeführt (siehe Abb.5).

3.2. Untersuchungskollektiv

3.2.1. Kollektiv I: Patienten mit Infektexazerbation oder ambulant erworbener Pneumonie bei bestehender COPD

Das erste Kollektiv bestand aus 15 Patienten (11 männlich, 4 weiblich; 6 Raucher, 9 Ex-Raucher; mittleres Alter 67,8 Jahre). Bei allen war eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung bekannt. Das forcierte expiratorische Volumen in der ersten Sekunde (FEV1) lag bei allen Patienten < 80% des Soll-Wertes. Acht der Patienten wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme mit systemischen Kortikosteroiden behandelt. Zehn Patienten des Gesamtkollektivs wurden nach klinischer Indikationsstellung bronchoskopiert. Mit dem gewonnenen Material erfolgte eine autologe Stimulation ihrer peripher venösen neutrophilen Granulozyten. Die neutrophilen Granulozyten der anderen fünf Patienten wurden heterolog stimuliert. Hierfür wurden bronchoalveoläre Lavagen genutzt, welche von Patienten stammten, die die Einschlußkriterien der Studie erfüllten, jedoch nicht zur Blutabnahme bereit waren. Tabelle 4 zeigt die jeweiligen Ein- und Ausschlusskriterien.

Tab. 4: Ein- und Ausschlusskriterien für Kollektiv I

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
COPD	Alter < 18 Jahre, Schwangere
Infektexazerbation oder Pneumonie	manifeste Leber- oder Nierenfunktionsstörung
	Diabetes mellitus Typ I
	Karzinomerkkrankung
	Immunsupprimierende Erkrankungen oder Therapieformen
	Andere Atemwegserkrankungen, die zu einer chronisch obstruktiven Ventilationsstörung führen
	invasive oder nicht-invasive Beatmung

3.2.2. Kollektiv II: Probanden ohne pneumologische Grunderkrankung

Das zweite Kollektiv schloss 13 Probanden ein, die wegen nicht pneumologischer Erkrankungen stationär aufgenommen worden waren. Diese Patienten wurden entsprechend ihres Geschlechtes und Alters dem ersten Kollektiv angepasst und ausgewählt (9 männlich, 4 weiblich; mittleres Alter 66,6 Jahre). Zwei der Probanden waren Raucher, sechs Ex-Raucher, fünf hatten nie geraucht. Eine pneumologische Grunderkrankung wurde mittels Anamnese, Lungenfunktion und radiologischer Bildgebung der Lunge ausgeschlossen. Das FEV1 lag bei einem durchschnittlichen Tiffeneau Index von 99% zwischen 114% und 78%. Weiterhin hatten alle Probanden einen niedrigen CRP Wert. Tabelle 5 zeigt Ein- und Ausschlusskriterien für Kollektiv II. Die demographischen Daten der Patienten und Probanden sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tab. 5: Ein- und Ausschlusskriterien für Kollektiv II

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Lungengesund	Alter < 18 Jahre, Schwangere
	manifeste Leber- oder Nierenfunktionsstörung
	Diabetes mellitus Typ I
	Karzinomerkkrankung
	Immunsupprimierende Erkrankungen oder Therapieformen
	invasive oder nicht-invasive Beatmung
	manifeste entzündliche Prozesse

Tab. 6: Demographische Daten von Kollektiv I und II

Parameter	Kollektiv I	Kollektiv II	P
Alter (Jahre)	67,8 ± 8	66,6 ± 7,4	NS
Geschlecht (m:w)	11:4	9:4	NS
Raucherstatus (Raucher: Ex-Raucher:Nicht-Raucher)	6:9:0	2:6:5	NS
Packyears	47,8 ± 30,9	11,3 ± 15,0	< 0,001
FEV 1 bei Blutentnahme (%)	47,1 ± 18,5	84,8 ± 17,5	< 0,001
Tiffeneauindex bei Blutentnahme (%)	72,7 ± 17,4	99,1 ± 12,4	< 0,001
Schweregrad der COPD nach GOLD	2,7 ± 0,8	-	-
systemisches Kortison bei Blutentnahme (ja : nein)	8:7	-	-
inhalative Glukokortikoide (ja:nein)	11:4	-	-
Stimulation (autolog : heterolog)	5:10	0:13	-

3.2.3. Ethik und Finanzierung

Von allen Patienten wurde eine Einverständniserklärung unterschrieben. Die Studie wurde am 14.11.2006 von dem Ethikkomitee der Medizinischen Universität Lübeck unter dem Aktenzeichen 06-165 gebilligt und registriert.

Die Studie wurde mit den Mitteln der medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck (A25-2007) gefördert.

3.3. Neutrophilenisolation

Unter verschiedenen anerkannten Isolationsmethoden wurde die Trennung über einen Ficoll-Gradienten mit anschließender Lyse der Erythrozyten mit Aqua dest. angewandt. Der Grund für die Auswahl dieser Methode war der hohe Reinheitsgrad der Neutrophilenpopulation, der in jedem Fall über 95% betrug. Weiterhin konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass trotz Lyse der Erythrozyten die neutrophilen Granulozyten nicht in vitro stimuliert werden (siehe Tab. 7).

Tab. 7: Vergleich von Neutrophilenparametern hinsichtlich der Isolation mit bzw. ohne Erythrozytenlyse. Angabe von CD66b und CD62L in rMFL. Annexin und Propidiumjodid (PI) in %. (n =1)

	1h Medium			1h LPS	
	mit Erythrozytenlyse	ohne Erythrozytenlyse		mit Erythrozytenlyse	ohne Erythrozytenlyse
CD66b	16,81	14,92	CD66b	30,49	31,65
CD62L	27,27	28,16	CD62L	4,25	5,06
Annexin V	3,22	2,93	Annexin V	4,42	3,49
PI	0,65	0,89	PI	1,36	3,07

45ml venöses mit EDTA versetztes, bzw. 18ml venöses Li-Heparin Vollblut wurden 1:2 mit 1x PBS verdünnt. Danach wurden in drei 50ml PP-Röhrchen jeweils 30ml verdünntes EDTA-Vollblut auf 10ml Lymphozyten Separationsmedium geschichtet. In vier 15ml PP-Röhrchen wurde jeweils 9ml verdünntes Li-Heparin Vollblut auf 3ml Lymphozyten Separationsmedium geschichtet. Nach 20-minütiger Zentrifugation mit 419g, ohne Bremse wurden in den Röhrchen verschiedene Banden sichtbar, in welchen die Blutbestandteile je nach ihrer Dichte aufgetrennt waren (siehe Abb.6).

Der Überstand wurde bis zu dem Neutrophilenring abgesaugt. Das Sediment der EDTA bzw. Li-Heparin Probe wurde in jeweils einen 50ml Messzylinder gegeben, mit 50ml PVA aufgefüllt, gemischt und 20-30min unter der Sterilbank stehen gelassen. Nach Überpipettieren der Überstände in 50ml PP-Röhrchen, erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation mit 419g mit Bremse. Die entstandenen Überstände wurden verworfen, während die Pellets zur Lyse der Erythrozyten in 5ml Aqua dest. geschwenkt wurden. Nach 45sek wurde die Lyse durch Zugabe von 5ml 37°C warmen D-PBS gestoppt. Nach erneuter 8-minütiger Zentrifugation mit 419g ohne Bremse wurden die Überstände abgenommen und das EDTA-, bzw. Li-Heparin- Pellet in definierter Menge RPMI Medium aufgenommen. Zur Überprüfung der Reinheit der Neutrophilensuspension wurden May-Grünwald gefärbte Cytospin Präparate erstellt. Danach erfolgte die Zählung der Zellen mit einer Neubauerzählkammer. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Suspension auf 5×10^6

neutrophile Granulozyten /ml Zellkulturansatz eingestellt.

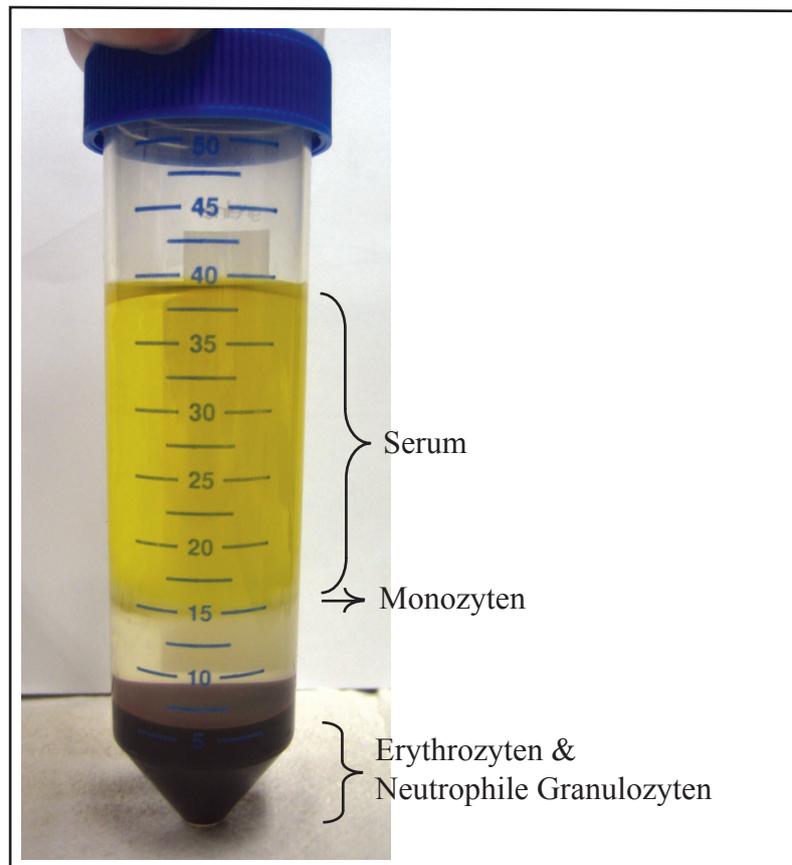


Abb.6: Schichtung nach Zelldichte

3.4. Bronchoskopie und Minilavage

Nach Lokalanästhesie mit 4%-iger Lidocainlösung (Dalhoff et al., 1990) wurde das röntgenologisch am stärksten betroffene Segment aufgesucht. Bei diffuser Verteilung wurde der Mittellappen gewählt. Am häufigsten Anwendung fand die Minilavage. Sie ist in ihrem diagnostischen Wert bei eitrigen Pneumonien der bronchoalveolären Lavage ebenbürtig (Palmer et al., 1995) (Papazian et al., 1995). Nach Anspülen mit 0,9%-iger NaCl-Lösung wurde die Lavage sofort aspiriert und auf ein Endvolumen von 50ml verdünnt. Nach Filterung durch 4-lagige Gaze und 10minütiger Zentrifugation bei 400g mit Bremse bei 4°C, wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet vorsichtig aufgerüttelt, mit PBS-Phosphatpuffer auf 50ml verdünnt und erneut zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand auf exakt 2ml eingestellt. In einer Neubauer-Zählkammer wurde mikroskopisch zunächst die Zellzahl ermittelt und anschließend, um das Zellbild zu differenzieren, ein Ausstrich mit May-Grünwald-Giemsa angefärbt.

3.5. Zellkultur

Die neutrophilen Granulozyten wurden über einen Zeitraum von 24h bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert. Um sicherzustellen dass die Zellen zu den Messzeitpunkten vital sind, wurde Apoptose und Nekrose nach 0h, 1h, 3h und 24h bestimmt. Hierbei zeigte sich eine deutlich Zunahme der Nekrose und Apoptose nach ca. 8h, sodass anzunehmen war, dass die Zellen ex vivo, sowie zu den Zeitpunkten 1h und 3h zum großen Teil vital sind (Abb. 7a und b). Bei allen Ansätzen wurde mit einer LPS Konzentration von 1µg/ml bzw. einer BAL Menge von 90µl gearbeitet. Das Gesamtvolumen jedes Röhrchens betrug 1ml.

Zur Stimulation der Neutrophilen wurde eine Reihe Zellkulturansätze mit Medium, sowie zwei Reihen weiterer Zellkulturansätze erstellt, in denen die Neutrophilen mit BAL bzw. LPS stimuliert wurden. So lagen zu jedem Zeitpunkt eine Mediumzellkulturreihe als Negativkontrolle, eine LPS Zellkulturreihe als Positivkontrolle, sowie die BAL stimulierte Zellkulturreihe vor. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung der Zellkulturreihen.

Für die Inkubation derjenigen Ansätze, in denen Apoptose und Nekrose sowie die Oberflächenantigene gemessen wurden, wurde als Medium RPMI + 5% FCS verwendet. Vorversuche haben gezeigt, dass bei dieser FCS Konzentration die Zellen über 24h länger vital sind, jedoch nicht wesentlich stimuliert werden. In den Ansätzen in welchen der oxidative Burst bestimmt wurde, benutzten wir dagegen RPMI mit 1% FCS.

Für die Stimulation der Neutrophilen in Zellkulturreihe drei wurde die Menge an LPS so gewählt, dass eine Konzentration von 1µg/ml vorlag. Diese Konzentration ermöglicht eine deutliche Stimulation der Zellen. Aufgrund der begrenzten Menge an BAL, die aus den Bronchoskopien gewonnen werden konnte, wurden zur Stimulation der Zellen in Zellkulturreihe zwei 90µl BAL verwendet. Dieses materialsparende Volumen erwies sich in Vorversuchen als ausreichend für die Stimulation der Zellen. Abb. 7c und 7d zeigen anhand einer repräsentativen Messung der Parameter CD66b und CXCR2 (Versuchsanzahl: n=3) die Stimulierbarkeit der neutrophilen Granulozyten durch eine BAL-Menge von 90 µl.

Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die Falcon Röhrchen bei 256g ohne Bremse 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden für die spätere Bestimmung von Zytokinen aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Pellets wurden je nach folgender Untersuchungsmethode mit 2ml FACS Puffer, 2ml eiskaltem PBS oder mit 2ml PBS + 1% FCS gewaschen. Die Zellpellets für die

Annexinkinetik innerhalb von 24h

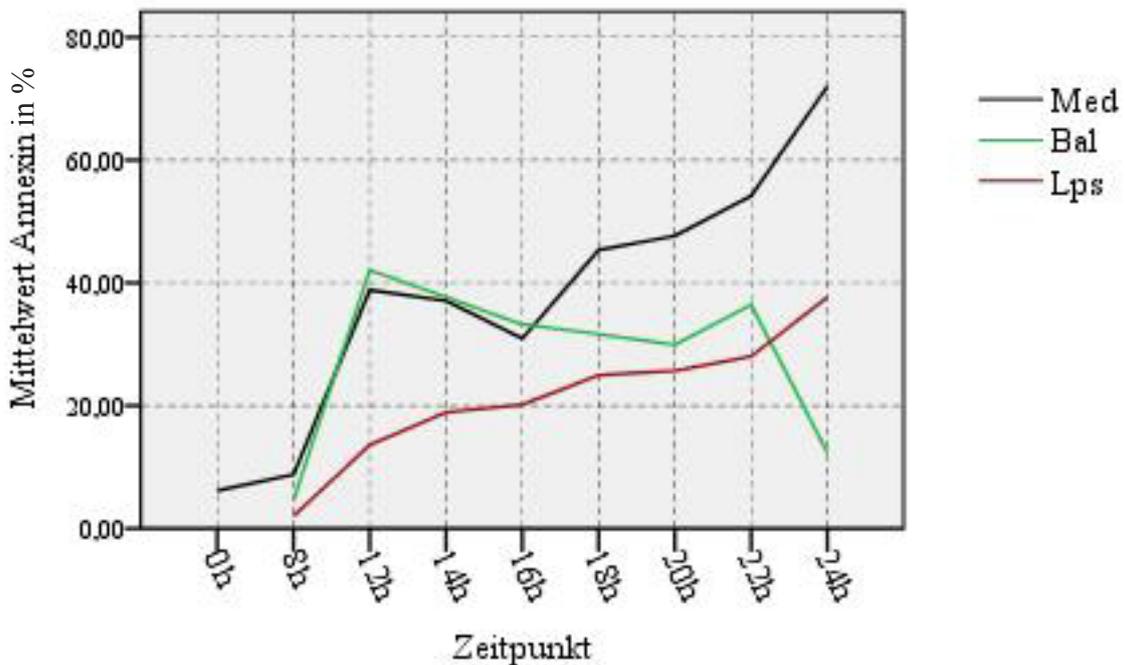


Abb.7a: Apoptose in %: die Apoptose beginnt nach ca. 8h. Während die mit Medium stimulierten Zellen nach 24h zu etwa 70% apoptotisch sind, setzt die Apoptose der LPS stimulierten Zellen verzögert ein. Zellen, die mit BAL stimuliert wurden, treten statt in Apoptose gehäuft in Nekrose ein, (n = 3)

Propidiumjodidkinetik innerhalb von 24h

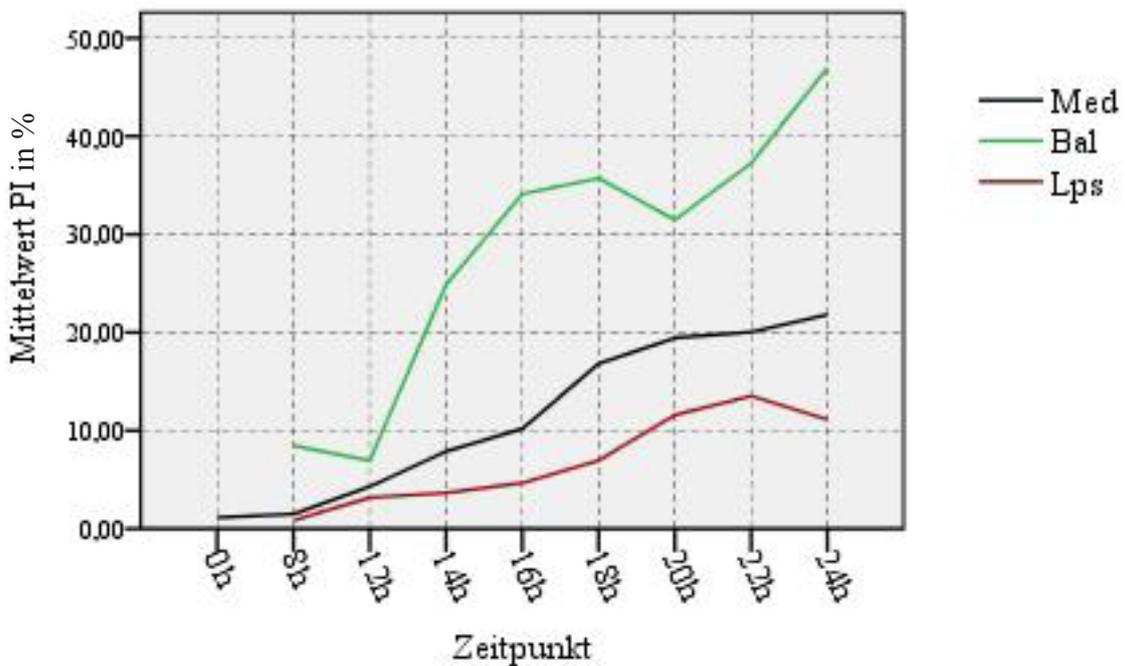


Abb. 7b: Nekrose in %: auch die Nekrose beginnt bei LPS stimulierten Neutrophilen im Vergleich zu Neutrophilen in Medium verzögert. Mit BAL stimulierte Zellen zeigen bereits nach 24h hohe Nekroseraten. Grund dafür sind möglicherweise zellschädigende Substanzen, z.B. Bakterien, in der BAL, (n = 3)

Bestimmung der Apoptose und Nekrose wurden daraufhin in 500µl Annexinpuffer aufgenommen und im Kühlschrank bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die Pellets für die Bestimmung der Oberflächenmarker wurden in 100µl FACS Puffer aufgenommen und ebenfalls bei -20°C gelagert. Zur Messung des oxidativen Bursts wurden die Pellets der jeweiligen Ansätze in 100µl PBS + 1% FCS gelöst und auf Eis gestellt.

Tab.8: Zusammensetzung der Zellkulturreihen

	ZKR 1	ZKR 2	ZKR 3
Medium	900 µl	810 µl	850 µl
BAL	-	90 µl	-
LPS	-	-	50 µl
Neutrophilen - suspension	100 µl	100 µl	100 µl

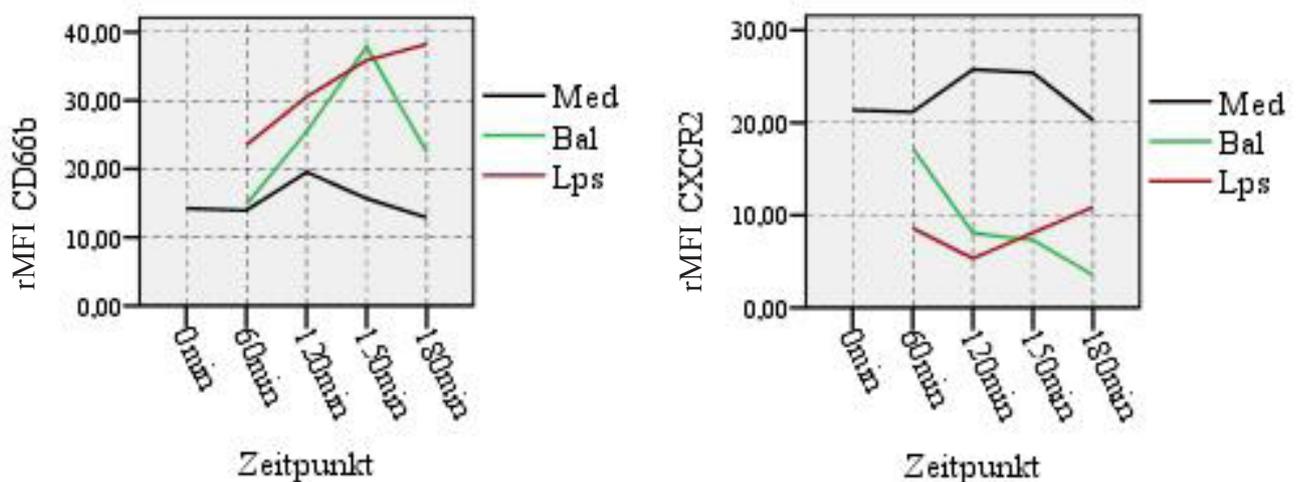


Abb. 7c und d: Mittelwert der rMFI von CD66b und CXCR2: bereits nach 60min wird eine Stimulation der Zellen durch die BAL sichtbar: die CXCR2-Rezeptorexpression in BAL liegt unter der CXCR2-Rezeptorexpression in Medium. Nach 150min sind die Neutrophilen durch die BAL genauso stark stimuliert wie durch LPS (siehe rel. Mean CD66b, CXCR2), (n=3)

3.5.1. Wahl der Messzeitpunkte

Die Messungen der Expression der Oberflächenantigene, der Freisetzung von Zytokinen und des oxidativen Bursts wurden zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt.

Für die Bestimmung der Oberflächenantigene erwies sich eine Messung nach 3h als optimal. Exemplarisch hierfür waren die Ergebnisse von CXCR2 bei den COPD-Patienten. Hier zeigte sich eine erhöhte Expression von CXCR2 nach 3h in Medium auf der Zelloberfläche. Währenddessen erzeugte die Inkubation der neutrophilen Granulozyten in BAL und LPS im Vergleich zu Medium zu diesem Zeitpunkt eine maximale Downregulation der Rezeptoren (Abb. 8). Ähnlich maximale Effekte auf die Stimulationen ließen sich bei CXCR1, CD11b, CD66b, CD62L und CD16 darstellen.

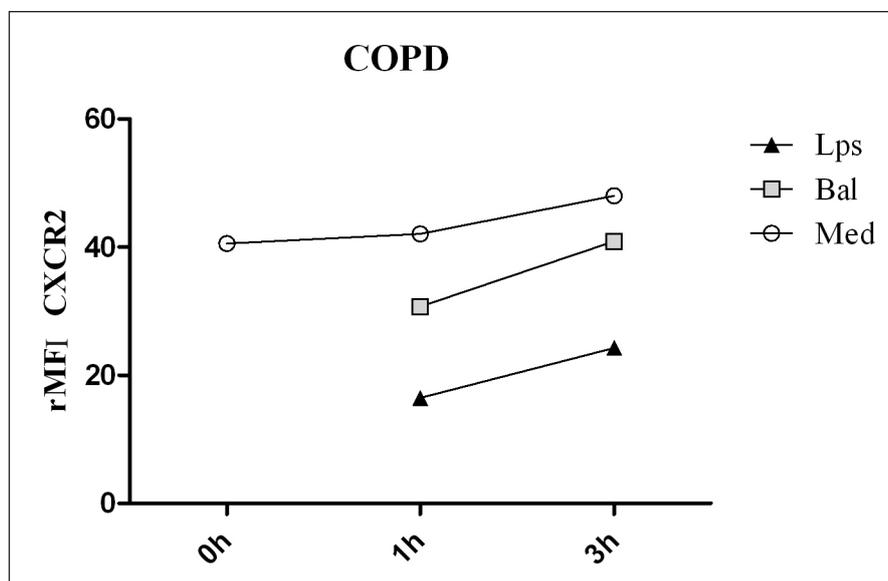


Abb. 8: Expression von CXCR2 peripherer neutrophiler Granulozyten von COPD-Patienten nach 0h, 1h und 3h unter Stimulation mit BAL/LPS im Vergleich zu Medium. Dargestellt als Median (n: 0h Med = 11, 1h und 3h Med/BAL = 14, 1h und 3h LPS = 13)

Der oxidative Burst der Zellen wurde nach 1h bestimmt. Es zeigte sich in Vorversuchen, dass bereits zu diesem Zeitpunkt eine maximale Freisetzung von Sauerstoffradikalen erzielt werden kann. Pathophysiologisch sinnvoll erscheint die Wahl dieses Zeitpunktes ebenfalls, da die Freisetzung von Sauerstoffradikalen während der Inflammation sehr früh abläuft, insbesondere die nicht rezeptorvermittelte Expression. Weiterhin wird vermutet, dass Sauerstoffradikale auch die Expression von Oberflächenantigenen beeinflussen.

IL-8 wurde nach 24h in den Zellkulturüberständen gemessen. Zu den frühen Zeitpunkten 1h und 3h war in Vorversuchen die IL-8 Konzentration zu klein um Unterschiede zwischen den Stimu-

lationen darzustellen. Im Gegensatz dazu, konnte MMP9 als schnell sezernierte Protease bereits nach 1h in großen Mengen in den Zellkulturüberständen nachgewiesen werden. Hier stellten sich bereits maximale Unterschiede durch die verschiedenen Stimulationen dar, sodass für MMP9 1h als Meßzeitpunkt gewählt wurde. Einen Überblick über die Meßzeitpunkte der einzelnen Parameter gibt Tabelle 9.

Tab. 9: Zu bestimmende Parameter zu den jeweiligen Zeitpunkten

	0h	1h	3h	24h
Apoptose und Nekrose	+	+	+	+
Oberflächenantigene	+	-	+	-
Oxidativer Burst	+	+	-	-
IL-8	-	-	-	+
MMP9	-	+	-	-

3.6. Durchflußzytometrie

Für die durchflußzytometrische Messung wurde ein FACScan der Firma Becton Dickinson benutzt. Das FACScan zeichnet sich durch einen Argon-Ionen-Laser, sowie durch zwei Streulichtkanäle und drei Fluoreszenzkanäle aus.

Über ein Ansaugsystem werden Zellen einzeln durch eine Quarzküvette geschossen und durch den Argon-Laser erfasst. Trifft der Laser auf eine Zelle, können durch die Streuung des Lichts Aussagen über Größe und Granularität der Zelle getroffen werden. Dafür verantwortlich sind die beiden Streulichtkanäle, Forward-Scatter (FSC) und Side-Scatter (SSC). Der Forward-Scatter erkennt die Streuung des Lichts zwischen 0°-10° und kann so Daten zur Charakterisierung der Zellgröße liefern. Der Side-Scatter erkennt die Ablenkung des Laserlichts im 90° Winkel und kann die Stärke der Granulierung und die Dichte von Zellen darstellen.

Für die Darstellung von Oberflächenantigenen ist der Argonlaser im Zusammenspiel mit den Flu-

oreszenzkanälen verantwortlich. Um die zu untersuchenden Oberflächenantigene auf den Zellen sichtbar zu machen, werden sie zunächst mit einem an einen monoklonalen Antikörper gebundenen Farbstoff, markiert. Die Elektronen dieser Farbstoffe werden durch den Argonlaser auf ein höheres Energieniveau gebracht. Fallen sie auf ihr ursprüngliches Niveau zurück, wird Energie in Form von Licht bestimmter Wellenlänge frei. Dieses Licht wird über verschiedene Fluoreszenzkanäle erfasst, wobei die Fluoreszenzintensitäten mit der Antigenmenge des untersuchten Proteins pro Zelle korrelieren. Das FACScan besitzt drei Kanäle:

- 1) Kanal 1 detektiert Licht im grünlichen Bereich - Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, Emissionsmaximum bei 525nm)
- 2) Kanal 2 detektiert Licht im orangenen Bereich - Phycoerythrin (PE, Emissionsmaximum bei 575nm)
- 3) Kanal 3 detektiert Licht im roten Bereich - Phycoerythrin-Cyanat (PE-Cy5, Emissionsmaximum 610nm)

Für alle zu untersuchenden Oberflächenantigene wurden also Antikörper gewählt, die mit einem der drei oben genannten Farbstoffe konjugiert waren.

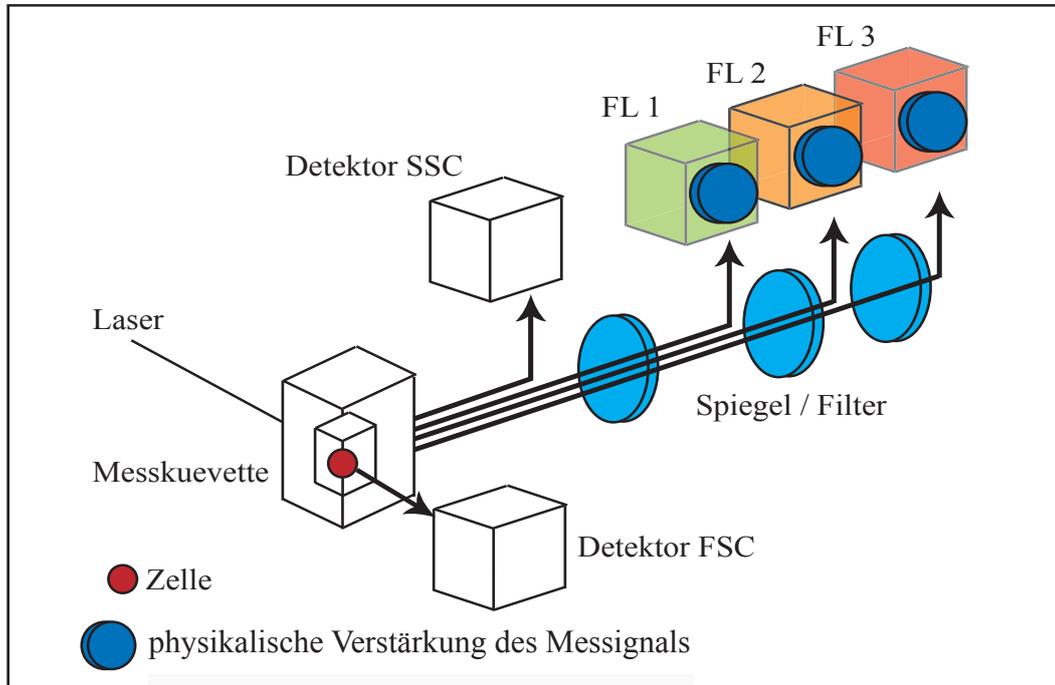


Abb. 9: Schematische Darstellung eines Durchflußzytometers

Für die Datenauswertung wurde das Programm CellQuest verwendet. Als Darstellungsform der Daten wurden Punktwolken (Dot Plot) und Häufigkeitsverteilungen (Histogramme) gewählt.

Für die Charakterisierung von Zellpopulationen wurde zu Beginn jedes Experiments zunächst ein Dot Plot erstellt. Auf der y-Achse wurden die Daten des Side-Scatters aufgetragen und auf der x-Achse die Daten des Forward Scatters. So konnten Zelltrümmer, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten voneinander abgegrenzt werden. Für die weiteren Analysen wurde dann ein „Gate“ um die Granulozytenpopulation gesetzt.

Diese Trennung ermöglichte die Untersuchung der neutrophilen Granulozyten unter Ausschluss störender Einflüsse von anderen Zellpopulationen (siehe Abb. 10).

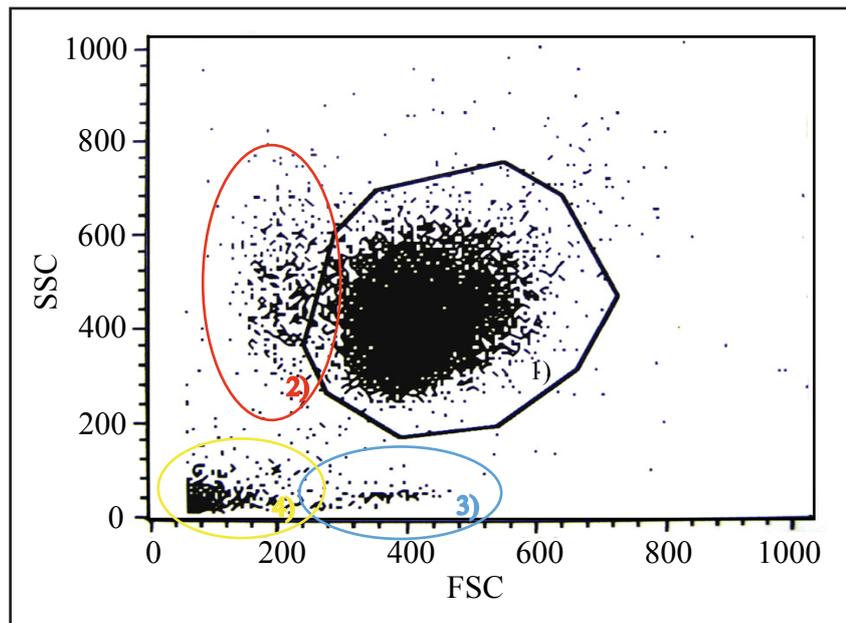


Abb. 10: Darstellung von Zellpopulationen im Dot Plot. 1 = neutrophile Granulozyten, 2 = eosinophile Granulozyten, 3 = Lymphozyten, 4 = Zelltrümmer. y-Achse = SSC. x-Achse = FSC

Für die Analyse der Oberflächenantigenexpression wurden Histogramme erstellt. Bei Histogrammen handelt es sich um Häufigkeitsverteilungen. Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz logarithmisch und in aufsteigender Reihenfolge aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Zellzahl der jeweiligen Intensität an. Für die statistische Weiterverarbeitung der Daten aus den Histogrammen, wurde der relative Mittelwert der Fluoreszenzintensität berechnet. Dieser entsteht aus dem Quotienten der mittleren Fluoreszenzintensität des monoklonalen Antikörpers und der mittleren Fluoreszenzintensität der Isotypenkontrolle.

Zur Analyse des oxidativen Bursts wurden ebenfalls Histogramme verwendet (siehe Abb. 11a und b). Mit Hilfe einer Negativkontrolle konnten neutrophile Granulozyten, welche Sauerstoffradikale produzierten, von denen welche kein Sauerstoff produzierten, im Histogramm unterschieden wer-

den. Durch das anschließende Setzen eines Gates um die sauerstoffradikalproduzierende Population wurde der prozentuale Anteil der sauerstoffradikalproduzierenden neutrophilen Granulozyten berechnet.

Um die Daten der Apoptose und Nekrose auszuwerten wurde eine zweidimensionale Darstellung im Dot Plot gewählt. Hierbei wurden die positiv markierten Populationen ebenfalls in Prozent ausgedrückt.

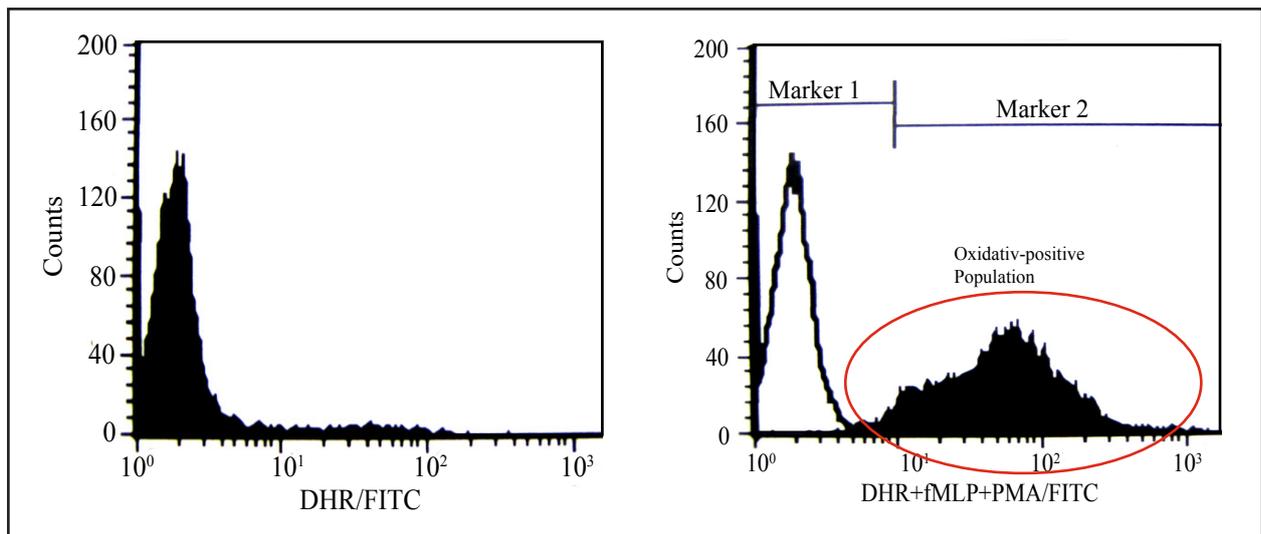


Abb. 11a: Negativkontrolle im Histogramm

Abb. 11b: Histogramm mit 99% ROS-positive Zellen

3.6.1. Vorbereitung der Zellen für die Durchflußzytometrie - Apoptose&Nekrose

Um die Apoptoserate der neutrophilen Granulozyten zu bestimmen, wurden die Zellen mit einem an Annexin V gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Annexin V ist ein Protein, welches Ca^{2+} -abhängig Phosphatidylserin bindet. Phosphatidylserin befindet sich normalerweise auf der Innenseite der doppelschichtigen Zytoplasmamembran und kann so nicht von dem Annexin V erreicht werden. Tritt die Zelle jedoch in die Apoptose ein, wird das Phosphatidylserin auf die zytoplasmatische Membranaußenseite verlagert, sodass das Annexin V daran binden kann. Von Vorteil ist Annexin V für die Bestimmung der Apoptoserate deshalb, weil es eine sehr hohe Affinität zum Phosphatidylserin hat. Es bindet also sehr schnell, sodass Zellen in frühen Apoptosephasen gut mit erfasst werden.

Da Annexin V auch nekrotische Zellen anfärbt, deren Zellmembran aufgrund des Nekroseprozesses durchlässig geworden ist, wurden die Zellen gleichzeitig mit Propidiumjodid angefärbt. Propidi-

umjodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der die Kernmembran von nekrotischen Zellen durchdringt und sich im Kern an die DNA anlagert.

Durch diese Doppelfärbung ließen sich im Dotplot vier Populationen (Abb. 12) voneinander unterscheiden:

- 1) Vitale Zellen, die weder durch Annexin V noch Propidiumjodid angefärbt wurden
- 2) Apoptotische Zellen, die nur durch Annexin V angefärbt wurden
- 3) Nekrotische Zellen, die nur durch Propidiumjodid angefärbt wurden
- 4) Spätapoptotische oder nekrotische Zellen, die sowohl Annexin V und Propidiumjodid positiv waren

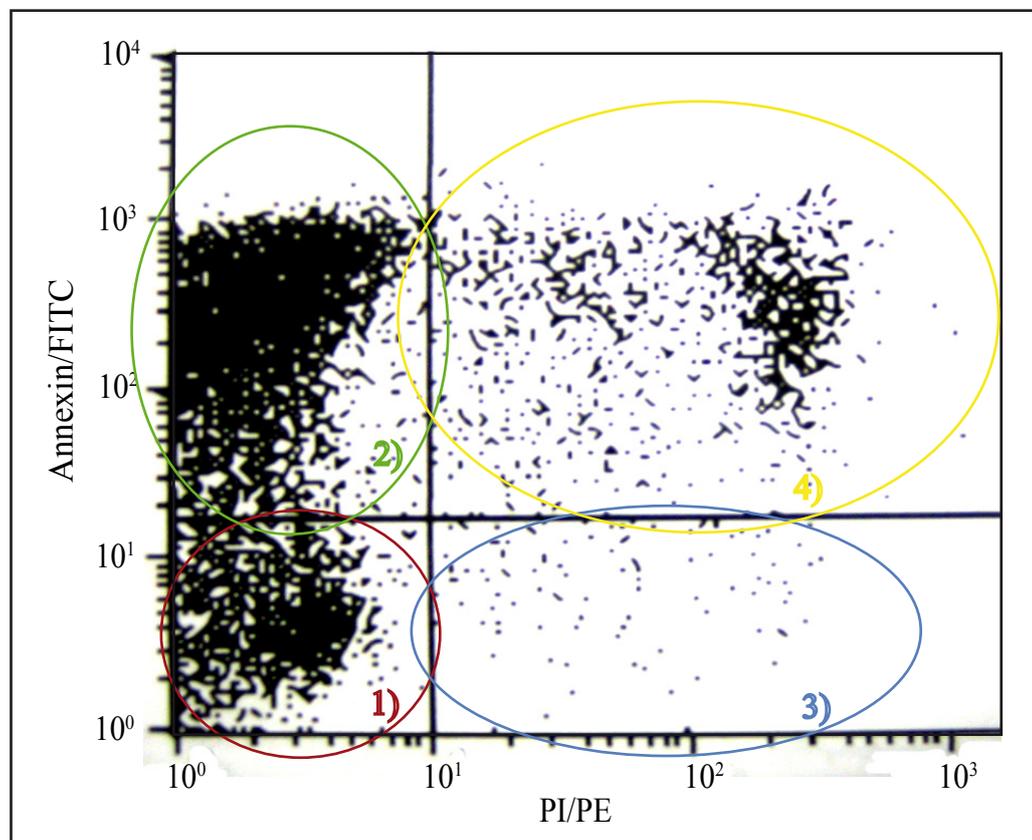


Abb. 12: Zellpopulationen im Dotplot

Für die Doppelfärbung wurden vier Falcon Röhren mit Zellsuspension benötigt. Jedes Falcon Röhren enthielt 500µl Annexinpuffer, sowie 5×10^6 neutrophile Granulozyten /ml. Ansatz eins wurde nicht gefärbt. Um die Kompensation am Durchflußzytometer einzustellen wurden zu Ansatz zwei 5µl Annexin V und zu Ansatz drei 10µl Propidiumjodid hinzu pipettiert. Ansatz vier wurde mit jeweils 5µl Annexin V und 10µl Propidiumjodid doppelt gefärbt. Nach einer Ruhe-

zeit von 15min, im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Proben innerhalb einer Stunde am Durchflußzytometer gemessen. Wichtig war die Verwendung von neutrophilen Granulozyten, die aus EDTA antikoagulierte Vollblut gewonnen wurden, da Vollblut, das durch Heparin antikoaguliert ist, die Apoptose induziert.

Um die Korrektheit der Annexin V/ Propidiumjodid Doppelfärbung zu sichern, wurden apoptotische und nekrotische Zellen ebenfalls anhand der May-Grünwald gefärbten Zytospins über Mikroskop ausgezählt (Abb.13a und 13b).

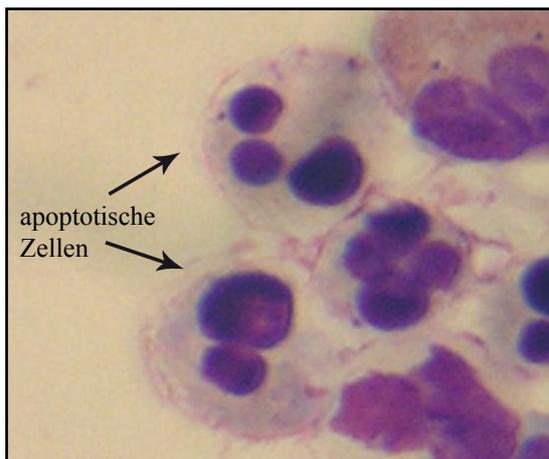


Abb. 13a: Apoptotische Zellen

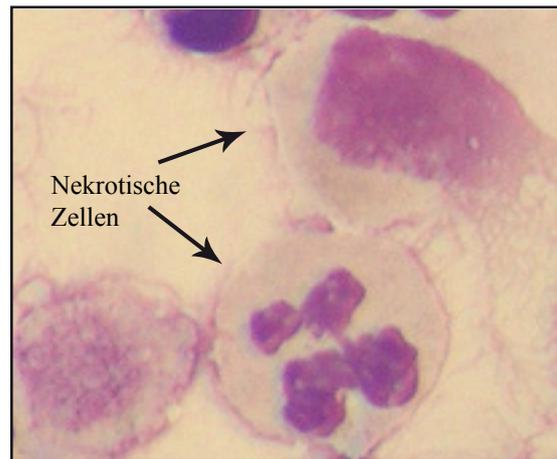


Abb. 13b: Nekrotische Zellen

3.6.2. Vorbereitung der Zellen für die Durchflußzytometrie - Anfärbung der Oberflächenantigene

Zu den nach der Zellkultur vorbereiteten Falcon Röhrchen, die 100µl FACS Puffer und 5×10^6 neutrophile Granulozyten /ml enthielten, wurde jeweils 5µl fluoreszenzmarkierte Antikörper hinzugegeben. Die meisten Ansätzen verlangten die Herstellung von Doppelfärbungen. Dort wurden die 5µl Antikörper nacheinander hinzupipettiert. Danach wurden die Falcon Röhrchen gut gemischt um eine gute Verteilung der Antikörper zu sichern. Für die Inkubation erfolgte die Lagerung der Falcon Röhrchen 20 Minuten bei -4°C im Kühlschrank. Nach abgelaufener Inkubation wurden die Ansätze mit jeweils 2ml FACS Puffer gewaschen und in 200µl FACS Puffer aufgenommen.

Um die Zellen zu konservieren wurde an die extrazelluläre Markierung der neutrophilen Granulozyten eine Fixierung mit 3% Paraformaldehyd angeschlossen. Hierfür wurde zu den Ansätzen 200µl 3% Paraformaldehyd hinzugefügt und die Proben gemischt. Die Falcon Röhrchen konnten so bei 4°C bis zu 24h im Dunkeln gelagert werden. Vor der Messung wurde das Paraformaldehyd

mit 2ml FACS Puffer ausgewaschen. Die Proben wurden in 200ml FACS Puffer aufgenommen und im Dunkeln zum Durchflußzytometer transferiert.

3.6.3. Vorbereitung der Zellen für die Durchflußzytometrie - Oxidativer Burst

Gesunde Leukozyten produzieren Sauerstoffradikale zur Abwehr von Krankheitserregern. Wichtig für die intrazelluläre Produktion dieser Substanzen ist die NADPH-Oxidase. Dieser Enzymkomplex wandelt während des oxidativen Bursts Superoxid Anionen schnell in Hydrogenperoxide und Hydroxylradikale um. Heute weiß man bereits, dass dieser Mechanismus der Infektabwehr bei zahlreichen Krankheiten gestört ist. So werden entweder zu wenige oder zu viele Sauerstoffradikale gebildet, was Folgen für die Immunabwehr und die Integrität des Gewebes hat.

Um die Menge an gebildeten Sauerstoffradikalen nachzuweisen wurde in diesem Versuch Dihydrorhodamin 123 (DHR) verwendet. DHR 123 ist ein fluoreszierendes Substrat, welches frei in der Zelle permeabel ist und sich in den Mitochondrien anlagert. Durch das, während des oxidativen Bursts in den Mitochondrien produzierte O_2^- , H_2O_2 oder O_2 wird Dihydrorhodamin 123 zu Rhodamin 123 reduziert. Dieses hat eine maximale Absorption bei 530nm und kann so im grünen Bereich im Durchflußzytometer gemessen werden. Um Unterschiede des oxidativen Bursts zwischen den verschiedenen Kollektiven möglichst sensitiv nachzuweisen wurden die neutrophilen Granulozyten zusätzlich mit zwei verschiedenen Substanzen stimuliert. Dies war einerseits das chemotaktische Peptid N-formyl-Met-Leu-Phe (FMLP) als membranvermittelter Stimulus. Andererseits wurde für eine maximale Stimulation der neutrophilen Granulozyten Phorbol-12-Mystrat-13-Acetat (PMA) verwendet. Sowohl DHR, als auch FMLP und PMA wurden vor jedem neuen Versuch mit PBS +1% FCS auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Für den oxidativen Burst Test verwendeten wir 3 Falcon Röhrchen, die nach der Zellkultur auf Eis gestellt wurden. Alle enthielten zunächst 100µl PBS + 1% FCS, sowie eine halbe Millionen Zellen/ml, die zuvor aus heparinisiertem Vollblut isoliert wurden. Zu allen Ansätzen wurde zunächst 4µl verdünntes DHR zupipettiert und danach mit einer Pipettenspitze kräftig gemischt. Danach folgte eine genau 10-minütige Inkubation im Wasserbad mit 37°C. Nach Ablauf der Zeit erfolgte die sofortige Lagerung der Proben auf Eis. 4µl FMLP wurde zu Ansatz zwei pipettiert, während 2µl PMA nur zu Ansatz drei zugefügt wurde. Alle Röhrchen wurden erneut gemischt und noch einmal 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach erfolgte die Messung.

3.7. ELISA

Für den Nachweis von Interleukin 8 (IL-8) und Metalloproteinase 9 (MMP9) wurden die Überstände der 24h Zellkulturansätze mittels ELISA untersucht. Die Durchführung des ELISA folgte anhand der Arbeitsanweisungen. Zunächst wurde eine Mikropipettierplatte mit einem für das Zytokin spezifischem Antikörper beschichtet. Dieser Primärantikörper reagierte nach Zugabe der Probe mit den in der Probe enthaltenen Zytokinen. Danach wurde ein biotin-konjugierter Sekundärantikörper auf die Zytokine gegeben, sodass das in einem zweiten Schritt hinzugefügte Enzym Streptavidin-Peroxidase mit dem Biotin reagieren konnte. Nach Zugabe eines Farbstoffes wurde ein Farbumschlag sichtbar, dessen Intensität direkt proportional zur Zytokinkonzentration in der Probe war. Nachweisbar wurden so Zytokinkonzentrationen in einem Messbereich zwischen 31 - 2000 pg/ml.

3.8. Statistische Auswertung

Die empirisch erhobenen Daten der einzelnen Messungen wurden tabellarisch gesammelt. Unter Bildung des Medians als Lagemaß und der Standardabweichung als Streuungsmaß erfolgten Vergleiche zwischen den beiden Kollektiven mit und ohne Stimulation durch BAL bzw. LPS. Die Signifikanzprüfung für nicht gepaarte, parametrische Stichproben erfolgte mit dem 1-ANOVA Test. Eine Normalverteilung der Werte ergab sich bei jeder Messung. Dargestellt wird der p-Wert als Ausdruck der Stabilität. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Korrelationen wurden mit der Rangkorrelation nach Spearman errechnet. Die Berechnungen erfolgten mit dem Programm SPSS for Windows, 21.0.

Die Darstellungen der Daten in den Abbildungen erfolgte als Median \pm Interquartilsabstand. Es wurde das Programm Graph pad prism 16.0 verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Oberflächenexpression der CXC-Rezeptoren, CXCR1 und CXCR2

Bei der ex vivo Expression von CXCR1 der neutrophilen Granulozyten der untersuchten Kollektive konnten zum Zeitpunkt 0h keine Unterschiede sichtbar gemacht werden (COPD: $14,80 \pm 5,01$ vs. Kontrolle: $15,07 \pm 3,28$; $p = 0,976$). Es findet sich jedoch ex vivo eine signifikant erhöhte CXCR2 Expression auf den PMN der COPD-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen (COPD: $40,29 \pm 15,64$ vs. Kontrolle: $28,69 \pm 9,57$; $p < 0,027$), (Abb.14).

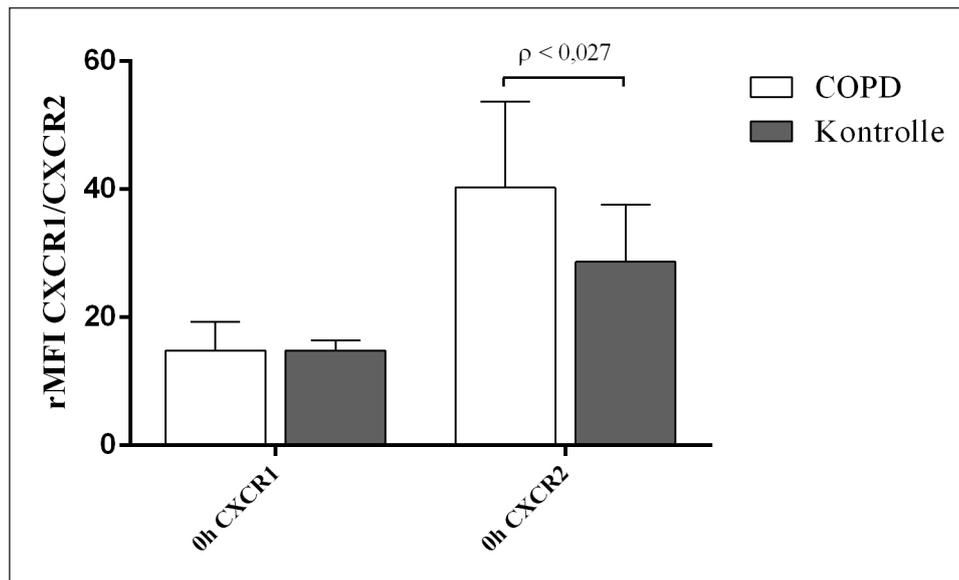


Abb. 14: Expression von CXCR1 und CXCR2 peripherer neutrophiler Granulozyten von COPD-Patienten und Kontrollen ex vivo. Dargestellt als Median und Interquartilsabstand. (n CXCR1/COPD = 13, n CXCR1/Kontrolle = 11; n CXCR2/COPD = 11, n CXCR2/Kontrolle = 12)

Nach 3h zeigten die PMN der COPD-Patienten ohne Stimulation und unter Stimulation mit BAL bzw. LPS eine gesteigerte Expression von CXC-Rezeptoren im Vergleich zu den Kontrollen. Die gesteigerte Expression von CXCR1 auf den COPD PMN zeigte sich jedoch nicht signifikant. Bei Betrachtung der CXCR2 Expression fanden sich signifikante Unterschiede zwischen der CXCR2 Expression nach 3h ohne Stimulation und unter Stimulation mit BAL, (Abb. 15).

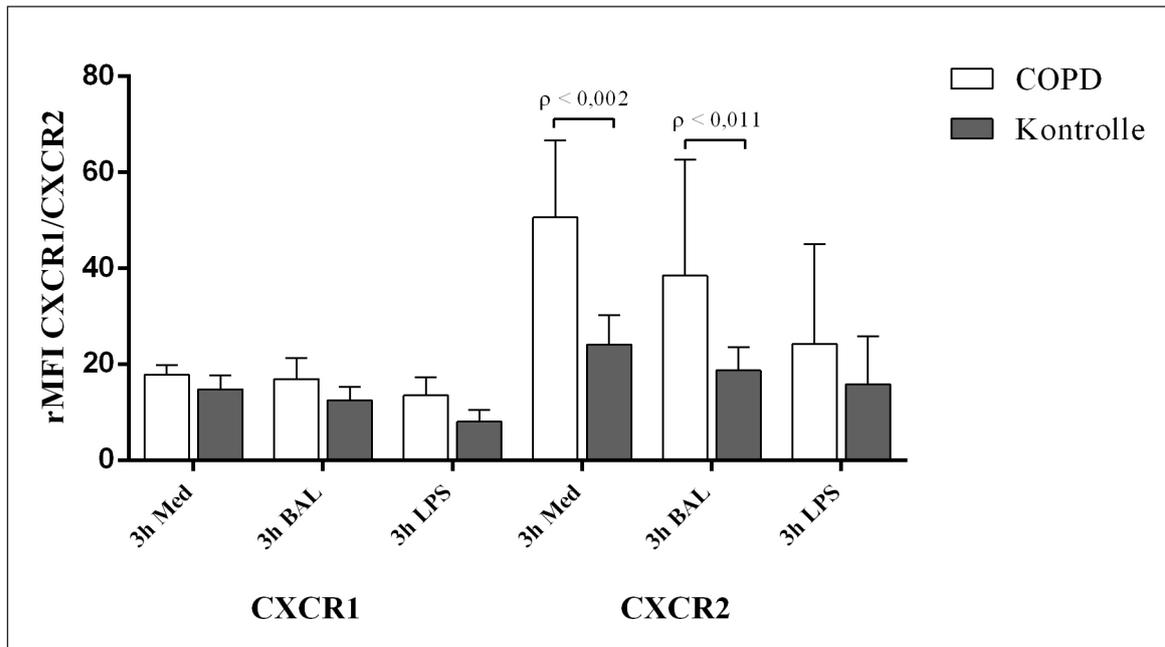


Abb. 15: Expression von CXCR1 und CXCR2 peripherer neutrophiler Granulozyten von COPD-Patienten und Kontrollen nach 3h unter Stimulation mit BAL/LPS im Vergleich zu Medium. Dargestellt als Median und Interquartilsabstand. (n CXCR1/COPD/Med = 14, n CXCR1/Kontrolle/Med = 11, n CXCR1/COPD/BAL = 5, n CXCR1/Kontrolle/BAL = 4, n CXCR1/COPD/LPS = 13, n CXCR1/Kontrolle/LPS = 11; n CXCR2/COPD/Med = 14, n CXCR2/Kontrolle/Med = 10, n CXCR2/COPD/BAL = 14, n CXCR2/Kontrolle/BAL = 10, n CXCR2/COPD/LPS = 13, n CXCR2/Kontrolle/LPS = 11)

4.2. Oberflächenexpression der Adhäsionsantigene: CD11b und CD62L

Im Vergleich der ex vivo Expression von CD11b auf den PMN zwischen den beiden Kollektiven konnte kein Unterschied dargestellt werden (COPD: $34,86 \pm 12,77$ vs. Kontrolle: $29,75 \pm 10,15$; $p = 0,935$; N CD11b/COPD = 14, N CD11b/Kontrolle = 13), (Abb. 16).

Auch nach 3h bestehen zwischen der Expression von CD11b auf PMN von COPD-Patienten und Kontrollen keine signifikanten Unterschiede.

Unter Vergleich der PMN der Kollektive nach Stimulation durch BAL findet sich eine nicht signifikante Steigerung der CD11b Expression bei den COPD-Patienten (COPD: $38,84 \pm 16,28$ vs. Kontrolle: $30,95 \pm 11,99$; $p = 0,714$), während nach Stimulation mit LPS die CD11b Expression der Kontrollgruppe numerisch erhöht ist (COPD: $57,00 \pm 24,56$ vs. Kontrolle: $65,43 \pm 14,25$; $p = 0,977$), (Abb. 17).

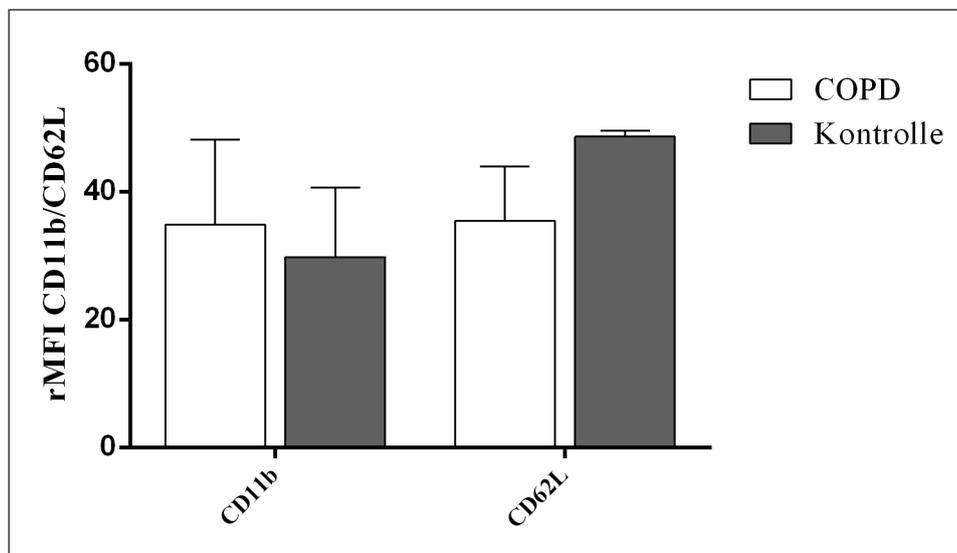


Abb. 16: Expression von CD11b und CD62L peripherer neutrophiler Granulozyten von COPD-Patienten und Kontrollen ex vivo. Dargestellt als Median und Interquartilsabstand. (n CD11b/COPD = 14, n CD11b/Kontrolle = 13, n CD62L/COPD = 12, n CD62L/Kontrolle = 11)

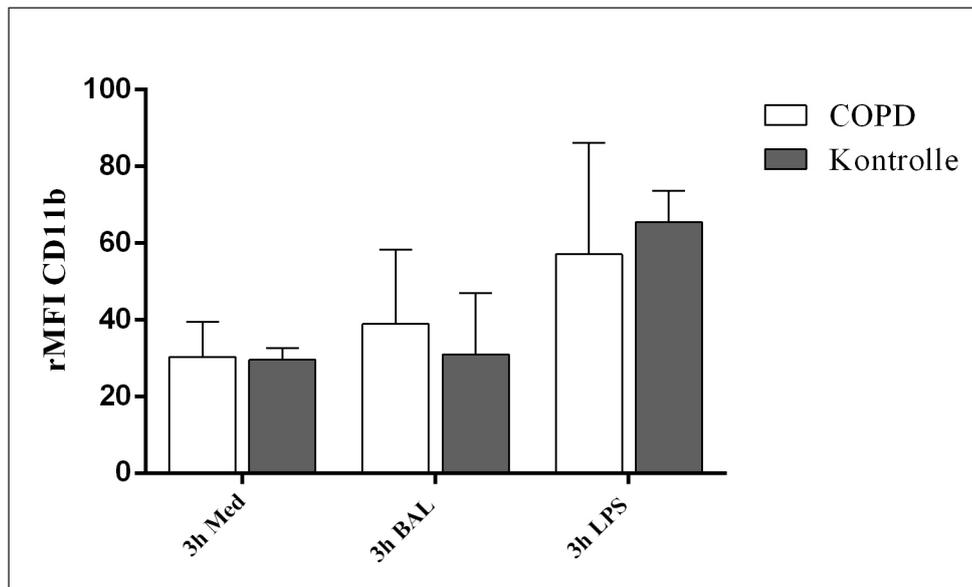


Abb. 17: Expression von CD11b peripherer neutrophiler Granulozyten von COPD-Patienten und Kontrollen nach 3h unter Stimulation mit BAL/LPS im Vergleich zu Medium. Dargestellt als Median und Interquartilsabstand. (n COPD/Med = 13, n COPD/BAL = 8, n COPD/LPS = 13, n Kontrolle/Med = 12, n Kontrolle/BAL = 8, n Kontrolle/LPS = 12)

Die PMN von COPD-Patienten zeigten ex vivo keine signifikant verringerte Expression von CD62L an der Zelloberfläche im Vergleich zu den Probanden. (COPD: $35,42 \pm 9,13$ vs. Kontrolle: $48,63 \pm 10,51$; $p = 0,178$), (Abb. 16).

Die PMN beider Kollektive lassen sich nach 3h gut durch LPS stimulieren, was zu einer deutlichen Reduktion der gemessenen Werte bei beiden Kollektiven führt. Unter Vergleich der Expression von CD62L ohne Stimulation und nach BAL-Stimulation zeigt sich ein leichter Abfall der CD62L-Rezeptorexpression an der Zelloberfläche auf den COPD-PMN, (Abb. 18).

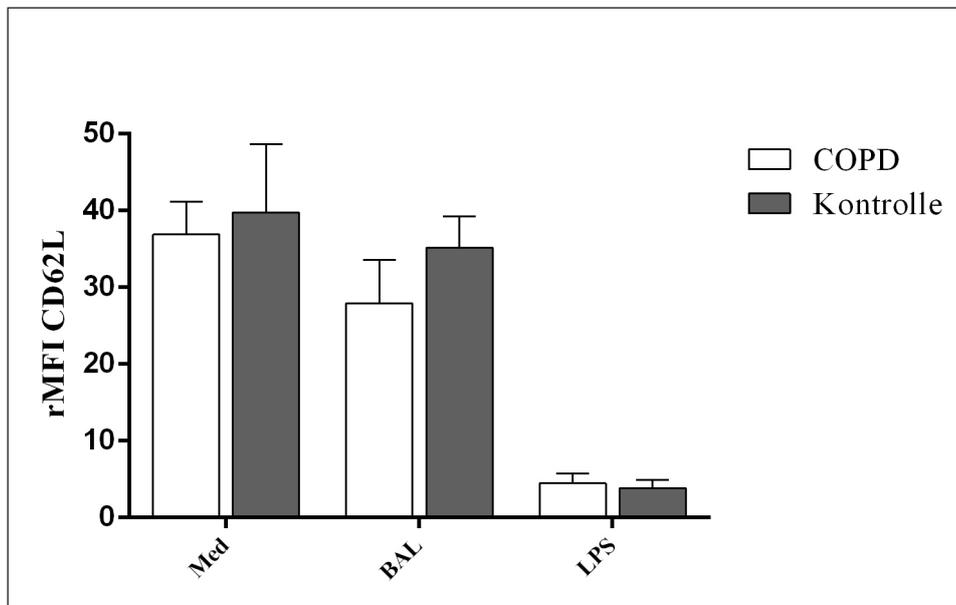


Abb. 18: Expression von CD62L peripherer neutrophiler Granulozyten von COPD-Patienten und Kontrollen nach 3h unter Stimulation mit BAL/LPS im Vergleich zu Medium. Dargestellt als Median und Interquartilsabstand. (n COPD/Med = 13, n COPD/BAL = 8, n COPD/LPS = 13, n Kontrolle/Med = 12, n Kontrolle/BAL = 8, n Kontrolle/LPS = 12)

4.3. Aktivitätsmarker CD16 & Neutrophilenmarker CD66b

Zum Zeitpunkt 0h unterscheidet sich die CD16 Expression beider Kollektive nicht (COPD: $558,95 \pm 180,03$ vs. Kontrolle: $554,88 \pm 147,40$; $p = 0,723$; N COPD/Kontrolle = 13).

Dies ändert sich jedoch nach 3 Stunden: die Expression von CD16 auf den PMN der COPD-Patienten bleibt in etwa konstant zur Expression ex vivo (3h: Med: $586,64 \pm 122,17$, BAL: $582,92 \pm 119,91$, LPS: $543,12 \pm 144,17$). Dagegen fällt der rMFI Wert bei den Kontrollen sowohl bei den unstimulierten, als auch bei den stimulierten Zellen nach 3h ab (Med: $475,30 \pm 88,70$, BAL: $443,43 \pm 136,74$, LPS: $385,20 \pm 132,76$). Es ergibt sich so eine erniedrigte Expression von CD16 der Kontrolle im Vergleich zu den COPD-Patienten nach 3h, die nach LPS-Stimulation signifikant ausfällt (COPD vs. Kontrollen: 3h Med: $p = 0,369$, 3h BAL: $p = 0,176$, 3h LPS: $p < 0,048$), (Abb. 19).

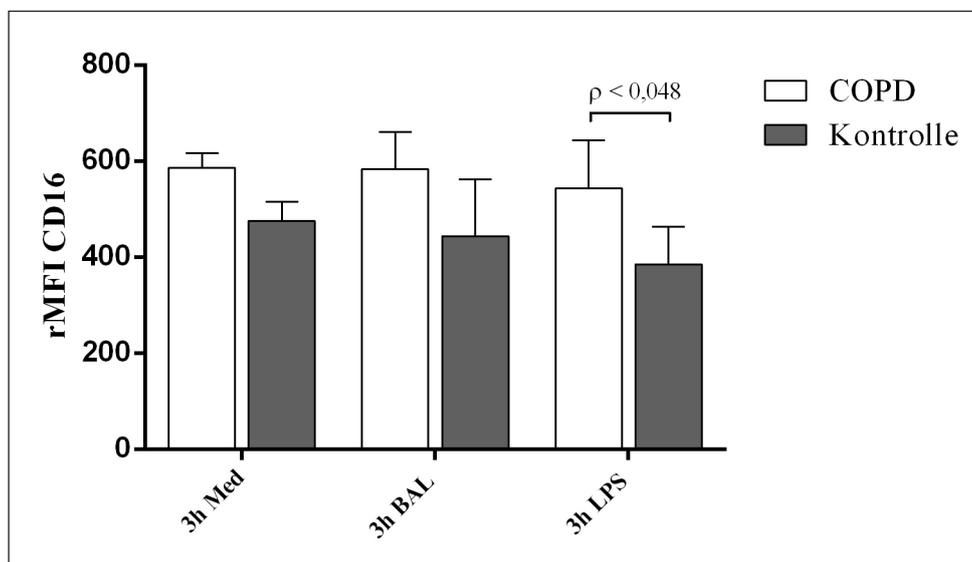


Abb. 19: Expression von CD16 peripherer neutrophiler Granulozyten von COPD-Patienten und Kontrollen nach 3h unter Stimulation mit BAL/LPS im Vergleich zu Medium. Dargestellt als Median und Interquartilsabstand. (n COPD/Med = 13, n COPD/BAL = 12, n COPD/LPS = 12, n Kontrolle/Med = 13, n Kontrolle/BAL = 13, n Kontrolle/LPS = 13)

Für CD66b ergeben sich zu allen Zeitpunkten keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Unter Stimulation mit LPS zeigt sich eine deutliche Steigerung der Rezeptorexpression bei beiden Kollektiven (3h COPD: Med: $15,89 \pm 10,89$ vs. LPS: $27,20 \pm 13,6$; $p < 0,016$; Kontrolle: Med: $16,29 \pm 5,50$ vs. LPS: $32,30 \pm 9,02$; $p < 0,001$).

4.7. Oxidativer Burst

4.7.1. Oxidativer Burst unter FMLP Stimulation

Um den oxidativen Burst der PMN zwischen COPD-Patienten und Kontrollen zu vergleichen, wurden die Versuchsansätze zunächst mit FMLP, einem schwachen, rezeptorvermittelten Stimulus des oxidativen Bursts versetzt. Die Ergebnisse wurden in % dargestellt, d.h. es wird angegeben wie viele Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl der Probe eine höhere Fluoreszenzintensität als die Negativkontrolle aufweisen. Bei diesem Anteil der Zellen findet eine Umwandlung von Dihydrohodamin zu Rhodamin, also oxidativer Burst statt.

Ex vivo, nach 10minütiger Prästimulation mit FMLP, zum Zeitpunkt 0h, zeigt sich eine tendenziell höhere Bereitschaft der PMN der COPD-Patienten zum oxidativen Burst (COPD: $33,11 \pm 23,47$ vs. Kontrolle: $16,74 \pm 15,46$; $p = 0,238$). Der Median-Wert des prozentualen Anteils ROS-positiver Zellen in der COPD Gruppe ist dabei annähernd doppelt so hoch wie der Median Wert in der Kontrollgruppe (Abb. 20).

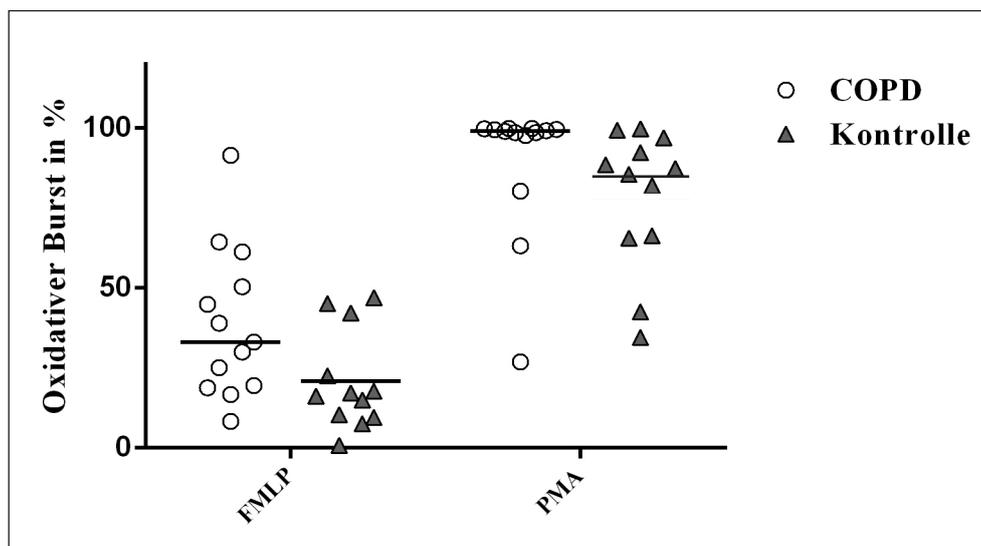


Abb. 20: Oxidativer Burst peripherer neutrophiler Granulozyten von COPD-Patienten und Kontrollen ex vivo nach Stimulation mit FMLP oder PMA. Dargestellt als Scatter plot mit Median. (n FMLP/COPD = 13, n FMLP/Kontrolle = 12; n PMA/COPD = 13, n PMA/Kontrolle = 12)

Vergleicht man den oxidativen Burst nach FMLP Stimulation innerhalb der Kollektive nach einer Stunde finden sich keine Unterschiede, (Abb. 21).

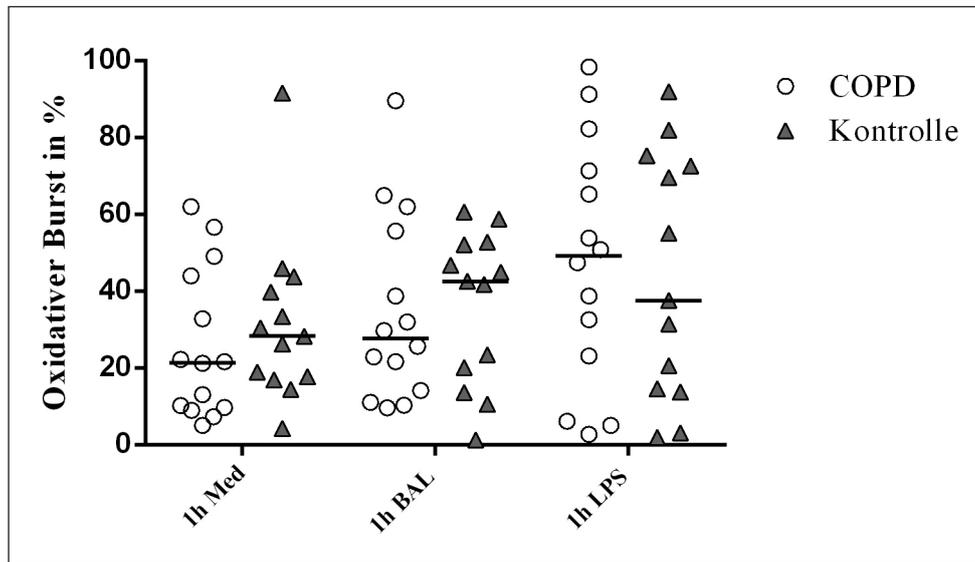


Abb. 21: Oxidativer Burst peripherer neutrophiler Granulozyten von COPD-Patienten und Kontrollen nach Prästimulation mit FMLP, ohne Stimulation und nach Stimulation mit BAL oder LPS. Dargestellt als Scatter plot mit Median. (n COPD/Med = 14, n COPD/BAL = 14, n COPD/LPS = 14, n Kontrolle/Med = 13, n Kontrolle/BAL = 13, n Kontrolle/LPS = 13)

4.7.2. Oxidativer Burst unter PMA Stimulation

Um die Kapazität des oxidativen Burst der PMN zwischen COPD-Patienten und Kontrollen zu vergleichen, wurden die Versuchsansätze mit PMA, einem starken, rezeptorunabhängigen Stimulus des oxidativen Bursts, versetzt. Die Ergebnisse wurden ebenfalls prozentual angegeben. Allen Ansätzen ist gemeinsam, dass bereits initial, sowohl bei COPD-Patienten als auch bei Kontrollen, interindividuell starke Schwankungen in der Produktion von oxidativen Spezies bestehen. Trotzdem zeigen die PMN von 10 der 13 COPD-Patienten zum Zeitpunkt 0h bereits eine maximal gesteigerte Sauerstoffradialproduktion (COPD: $99,00 \pm 21,67$ vs. Kontrolle: $85,60 \pm 29,57$; $p = 0,265$), (Abb. 20).

In allen Ansätzen nach einer Stunde findet sich weiterhin ein stark erhöhter oxidativer Burst der PMN in der COPD-Gruppe, wobei sich die Unterschiede zur Probandengruppe nicht signifikant darstellen. (Med: COPD: $99,42 \pm 12,82$ vs. Kontrolle: $85,77 \pm 29,26$; $p = 0,624$; BAL: COPD: $99,65 \pm 14,63$ vs. Kontrolle: $77,47 \pm 29,54$; $p = 0,417$; LPS: COPD: $99,69 \pm 1,46$ vs. Kontrolle: $97,16 \pm 38,55$; $p < 0,116$), (Abb. 22).

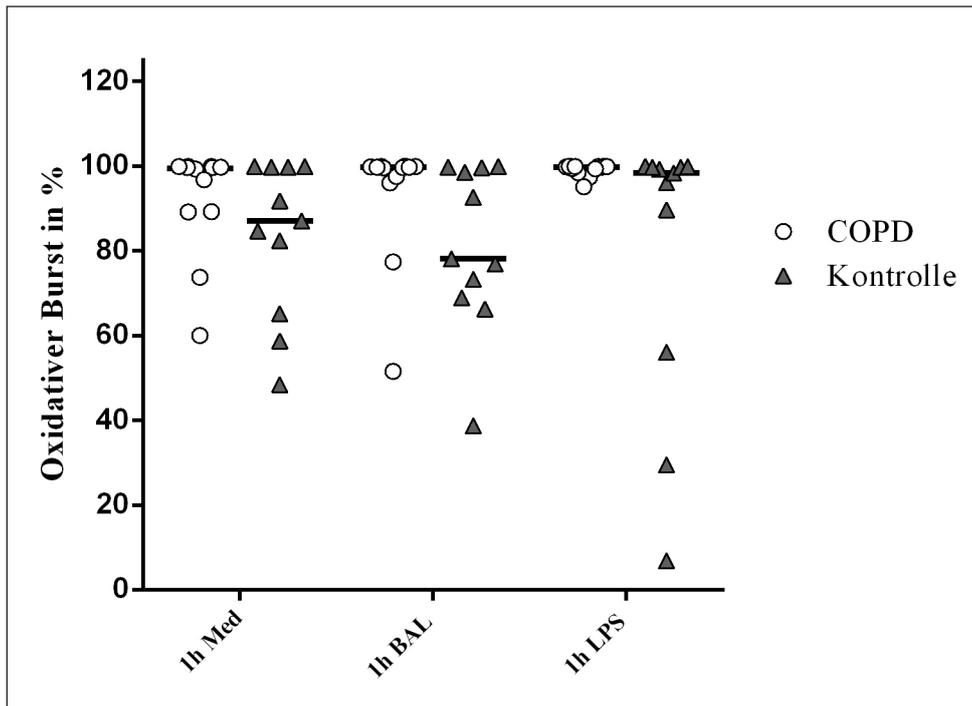


Abb. 22: Oxidativer Burst peripherer neutrophiler Granulozyten von COPD-Patienten und Kontrollen nach Stimulation mit PMA, ohne Prästimulation und nach Prästimulation mit BAL oder LPS. Dargestellt als Scatter plot mit Median. (n COPD/Med = 12, n COPD/BAL = 12, n COPD/LPS = 12, n Kontrolle/Med = 12, n Kontrolle/BAL = 12, n Kontrolle/LPS = 12)

4.8. IL-8

Die IL-8 Konzentration wurde in den bronchoalveolären Lavagen der Patienten sowie in den Zellkulturüberständen nach 24h bestimmt. Nach 24h ergaben sich folgende Ergebnisse: In den Zellkulturüberständen der Kontrollen befindet sich bei allen 3 Stimulationsarten mehr IL-8 als in denen der Patienten (Med: COPD: $6,89 \pm 20,06$ vs. Kontrolle: $25,62 \pm 138,36$; $p = 1,0$; BAL: COPD: $680,79 \pm 601,39$ vs. Kontrolle: $1248,45 \pm 1423,14$; $p < 0,031$; LPS: COPD: $85,20 \pm 406,69$ vs. Kontrolle: $420,88 \pm 701,20$; $p = 0,883$), (Abb. 23). Dieser Unterschied zeigt sich nach Stimulation mit BAL signifikant. Wie bei der Messung des oxidativen Bursts unterliegt die Produktion von IL-8 großen interindividuellen Schwankungen.

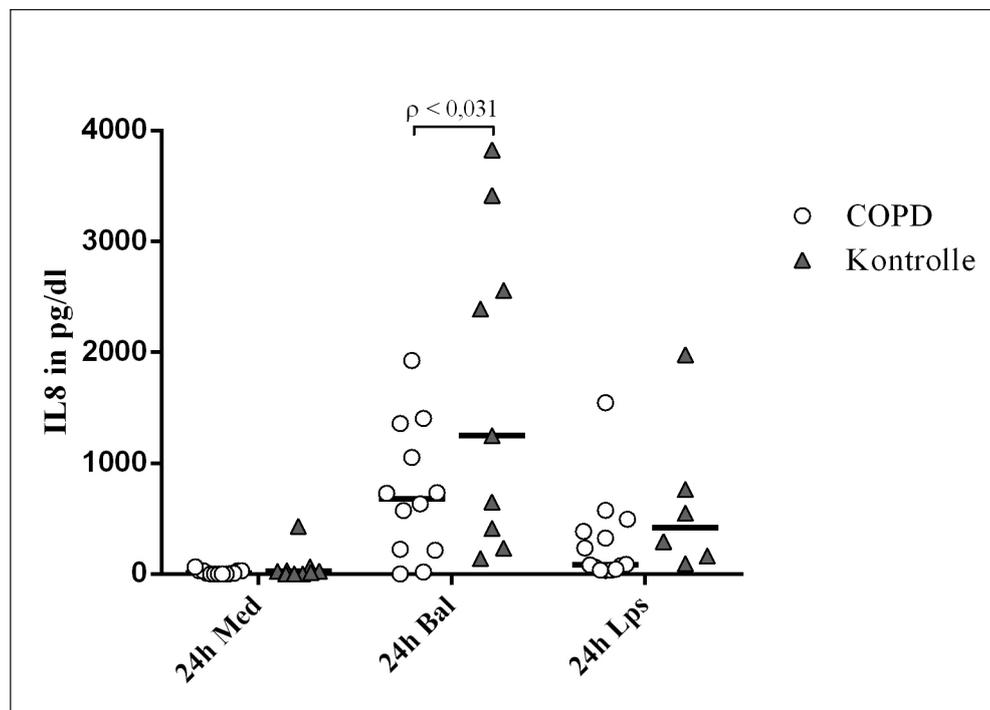


Abb. 23: IL-8 in pg/dl in den Zellkulturüberständen neutrophiler Granulozyten von COPD-Patienten und Kontrollen nach 24h ohne Stimulation und unter Stimulation mit BAL/LPS. Dargestellt als Scatter Plot und Median. (n COPD/Med = 13, n COPD/BAL = 11, n COPD/LPS = 14, n Kontrolle/Med = 9, n Kontrolle/BAL = 9, n Kontrolle/LPS = 6)

4.9. MMP9

Die MMP9 Konzentration wurde in den bronchoalveolären Lavagen, sowie in den Zellkulturüberständen nach 1h bestimmt. Nach dieser Zeit zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven, wobei die Freisetzung von MMP9 in der Kontrollgruppe unter Stimulation mit BAL oder LPS wenig gesteigert war, (Abb. 24).

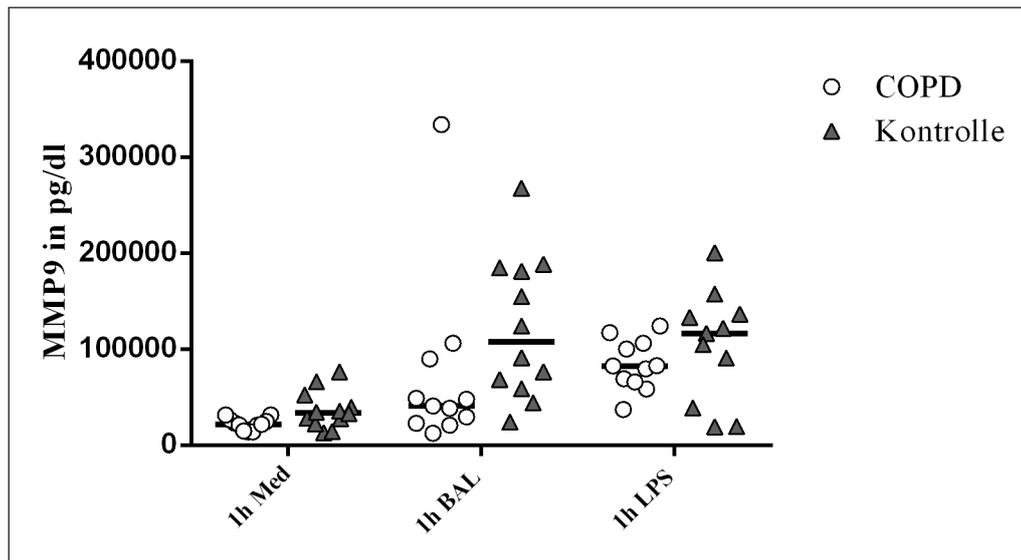


Abb. 24: MMP9 in pg/dl in den Zellkulturüberständen neutrophiler Granulozyten von COPD-Patienten und Kontrollen nach 24h ohne Stimulation und unter Stimulation mit BAL/LPS. Dargestellt als Scatter Plot und Median. (n COPD/Med = 11, n COPD/BAL = 12, n COPD/LPS = 11, n Kontrolle/Med = 11, n Kontrolle/BAL = 11, n Kontrolle/LPS = 11)

4.10. Apoptose und Nekrose

Um zu klären, ob die Expression von Oberflächenantigenen und der oxidative Burst durch vorzeitigen Zelltod ex vivo und in vitro beeinflusst wurden, wurde zu den Zeitpunkten 0h, 1h und 3h der prozentuale Anteil von apoptotischen und nekrotischen Zellen gemessen. Dabei lag der Median für den prozentualen Anteil apoptotischer Zellen in jedem Fall unter 5%. Der Median für den Anteil nekrotischer Zellen überschritt in keinem Fall 3%.

Tab. 20: Apoptose und Nekrose nach 0h,1h und 3h von COPD-Patienten und Kontrollen. Dargestellt in Prozent.

Kollektiv	Apoptose	Anzahl (N)	Nekrose	Anzahl (N)
COPD 0h	1,17 ± 2,08	14	0,90 ± 3,51	14
Kontrolle 0h	2,05 ± 0,86	12	0,95 ± 2,12	12
COPD 1h Med	1,70 ± 1,97	14	0,02 ± 0,19	14
Kontrolle 1h Med	1,83 ± 2,27	11	0,21 ± 0,14	11
COPD 1h LPS	1,61 ± 2,35	14	0,46 ± 0,45	14
Kontrolle 1h LPS	2,77 ± 2,37	11	0,50 ± 0,68	11
COPD 3h Med	3,00 ± 2,34	13	0,40 ± 0,26	13
Kontrolle 3h Med	3,40 ± 5,36	11	0,59 ± 0,84	12
COPD 3h BAL	4,91 ± 3,21	10	0,50 ± 0,26	11
Kontrolle 3h BAL	4,29 ± 5,95	9	0,66 ± 0,90	12
COPD 3h LPS	2,20 ± 2,27	13	0,63 ± 0,41	13
Kontrolle 3h LPS	4,90 ± 3,47	11	1,40 ± 2,86	12

5. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, die angeborene Immunität durch vergleichende Charakterisierung peripherenöser PMN von COPD-Patienten im stabilen Stadium mit PMN von Lungengesunden zu untersuchen. Dabei fokussierten wir uns auf Unterschiede der beiden Patientengruppen hinsichtlich Aktivierungsparametern, Oberflächenexpression von Chemokinrezeptoren und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Um die Zellen sowohl im Grundzustand, als auch unter inflammatorischen Stimuli vergleichen zu können, inkubierten wir die PMN neben LPS auch in bronchoalveolären Lavagen, die bei COPD-Patienten während einer akuten Exazerbation entnommen wurden. Die bronchoalveoläre Lavage wurde in dieser Studie erstmalig zum Stimulieren von Zellen benutzt, um ex vivo ein inflammatorisches Milieu zu schaffen, das dem intrapulmonalen Milieu bei exazerbierter COPD ähnlich ist.

Infektexazerbationen und Zigarettenrauch führen zu einer vermehrten Migration von PMN ins pulmonale Kompartiment (van der Vaart et al., 2005). Die Ergebnisse unserer Studie lassen vermuten, dass auch ohne Anwesenheit beider Faktoren ex vivo bereits eine erhöhte Aktivität der PMN bei COPD-Patienten existiert. CD16 als Aktivitätsmarker war auf den PMN von COPD-Patienten nach Stimulation mit LPS höher exprimiert als auf den PMN der Kontrollen. Der CD16 Rezeptor gilt nicht nur als Marker für eine erhöhte zelluläre Aktivität, sondern ist auch ein wichtiger Phagozytose-rezeptor. Über eine veränderte Phagozytosekapazität von Entzündungszellen in Zusammenhang mit Lungenerkrankungen wurde bereits in der Literatur diskutiert (Donnelly et al., 2012). Im Fokus hierbei standen bislang eher Makrophagen. Beispielsweise konnten Löfdahl und Kollegen (Löfdahl et al., 2006) eine erniedrigte Expression des CD16 Rezeptors auf Makrophagen von COPD-Patienten im Vergleich zu Nicht-Rauchern zeigen. So könnte die gesteigerte CD16 Expression in unseren Versuchen auf eine stärkere Phagozytosekapazität der PMN von COPD-Patienten hinweisen. Der CD16 Rezeptor ist neben seiner Funktion als Phagozytosevermittler auch ein Marker für Apoptose. Ein Verlust von CD16 auf der Zelloberfläche weist auf beginnende Apoptose hin (Dale et al., 1999). In unseren Versuchen zeigte sich, einhergehend mit einer verminderten Expression von CD16 auf den Kontrollzellen nach 3h, im Vergleich zur COPD Gruppe eine tendenziell erhöhte Apoptoserate der Kontrollzellen ohne Stimulation und unter Stimulation mit LPS. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse auf einen antiapoptotischen Effekt der entzündlichen

Stimulierung bei COPD-Patienten hin. Die Stimulation der Zellen der Probanden mit LPS führte zu einer deutlichen Downregulation des Rezeptors, während die Stimulation der Patientenzellen mit LPS nur in einer minimalen Downregulation resultierte. Hier zeigt sich ein Unterschied der Zellkollektive im entzündlichen Milieu. Ob eine verzögerte Apoptose von neutrophilen Granulozyten zur Perpetuierung der Inflammation bei COPD führt, wurde bereits in früheren Studien untersucht. So konnte Pletz (Pletz et al., 2004) eine erniedrigte Apoptoserate von peripheren PMN bei COPD-Patienten mit akuter Exazerbation nachweisen.

Bei der Expression von CD11b zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Kollektiven. Beide Gruppen zeigen eine deutliche Zunahme der Oberflächenexpression des Rezeptors unter Inkubation mit LPS. Die Expression von CD11b ist eine Voraussetzung für die Transmigration der Zellen aus der Zirkulation ins Entzündungsgebiet (Liu et al., 2004), die einen wichtigen Mechanismus in der Pathogenese der COPD darstellt. So wurde im Sputum von COPD-Patienten eine erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten gefunden (Keatings et al., 1996, 1997). Weiterhin konnten Yamagata et al. (Yamagata et al., 2007) eine signifikant negative Beziehung zwischen der Expression von CD11b und CXCR1 mit dem FEV1 bei COPD-Patienten herausarbeiten. In einer weiteren, erst kürzlich veröffentlichten Studie von Blidberg (Blidberg et al., 2012) wird eine erhöhte chemotaktische Reaktion von peripheren neutrophilen Granulozyten von Rauchern mit und ohne COPD auf Stimulation mit IL-8 beobachtet. Einhergehend damit konnten die Autoren eine tendenziell gesteigerte CD11b Expression auf PMN von COPD-Patienten nachweisen. Die Mehrzahl der zu diesem Thema durchgeführten Studien fanden erhöhte CD11b Expressionen auf PMN von COPD-Patienten. In einer Studie von 1998 (Noguera et al., 1998) wurde die Expression von Oberflächenmolekülen von Probanden, COPD-Patienten im stabilen Stadium und Exazerbation verglichen. Dabei konnte eine erhöhte CD11b Expression bei COPD-Patienten ohne Exazerbation dargestellt werden. Während der Exazerbation war die CD11b Expression auf ähnlichem Niveau wie bei den Lungengesunden. Pignatti und Kollegen (Pignatti et al., 2005) wiesen ebenfalls erhöhte CD11b Level auf PMN von COPD-Patienten nach. Die Unterschiede zwischen unserer Studie und den genannten Untersuchungen können verschiedene Gründe haben: COPD-Patienten werden häufig mit systemischen und/oder inhalativen Glukokortikosteroiden therapiert, von denen bekannt ist (Albelda et al., 1991), dass sie eine Herunterregulation von Adhäsionsmolekülen be-

wirken können. Weiterhin reduziert Zigarettenrauch vor der Blutentnahme die CD11b Expression und damit auch die Mobilität von PMN (Wehlin et al., 2005). Zusätzlich zeigen einige Studien eine Herunterregulierung von Adhäsionsmolekülen bei Anwesenheit von oxidativem Stress (Rahmann et al., 1996).

Als Vermittler des ersten Kontaktes zwischen Endothel und Zellen spielt auch CD62L bei der gesteigerten Migration von PMN ins Lungenparenchym eine zentrale Rolle (Salmi et al., 1997), (Butcher et al., 1996). Daher untersuchten wir durch Bestimmung von CD62L auf Patienten- und Kontrollzellen unter verschiedenen Konditionen vergleichend die Expression dieses Liganden. Es zeigte sich bereits ex vivo und zu allen folgenden Messzeitpunkten eine niedrige Expression von CD62L auf den Zellen der COPD-Patienten, die nach Inkubation der Zellen in Anwesenheit von LPS besonders deutlich war. Im Vergleich zu den Probandenzellen zeigten sich keine signifikanten Differenzen. Noguera et al 2004 konnten zeigen, dass die Expression von CD62L von COPD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen im stabilen Stadium sowie während der Exazerbation erniedrigt war. Dieser Zustand ging weiterhin einher mit einer verminderten Anwesenheit von sICAM, einem Marker für die Endothelexpression von ICAM (Rise et al., 1994, 1995), (Shiota et al., 1996). Selektine spielen danach ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese der COPD. Daher befassen sich auch aktuell Studien mit der Möglichkeit, Selektinkonzentrationen so zu beeinflussen, dass überschüssige Inflammation in der Lunge verhindert wird. So verringern u.a. die in der Therapie der COPD insbesondere bei Patienten mit häufigen Exazerbationen verwendeten inhalativen Steroide die Expression von Selektinen (Man et al., 2009). Außerdem wird versucht zur Therapie der COPD Selektinantagonisten herzustellen. Klinisch verwertbare Ergebnisse hierzu stehen jedoch noch aus (Romano, 2005), (Woodside et al., 2008).

Inflammation, Chemokinexpression und die Pathogenese der COPD hängen eng zusammen. Es wird vermutet, dass inhalativer Zigarettenrauch als entzündungsfördernde Noxe eine große Rolle spielt. So waren alle COPD-Patienten der Studie zumindest Exraucher. Eine signifikante Korrelation zwischen kumulativer Tabakexposition (Packyears) und IL-8 Konzentration im Zellüberstand konnten wir nicht finden. Dies entspricht den Ergebnissen einer kürzlich veröffentlichten Studie, die keine Korrelation zwischen Tabakexposition und der Expression von CXCR1 und CD11b zeigen konnte (Yamagata et al., 2007). Gründe hierfür sind u.a. das Fortbestehen der Inflammation

nach Beendigung des Nikotinkonsums sowie die erhebliche genetische Variabilität der Empfänglichkeit von Rauchern für die Entwicklung einer COPD. Dass CXCR2-Rezeptorexpression, Inflammation und Zigarettenrauch miteinander verknüpft sind, konnte dennoch in einer früheren Studie (Thatcher et al., 2005) nachgewiesen werden. Hierbei wurden Mäuse über drei Tage inhalativem Zigarettenrauch ausgesetzt. Ein Kollektiv wurde zusätzlich mit einem CXCR2-Antagonisten behandelt. Die Mäuse, die mit dem Antagonisten behandelt wurden, zeigten eine wesentlich geringere Inflammation mit Neutrophilen in der BAL. In Anbetracht dieser Erkenntnisse wird daher aktuell die Frage diskutiert, ob eine Behandlung mit CXCR- oder IL-8-Antagonisten eine überschüssige Inflammation und damit die Entstehung der COPD verhindern kann.

Um den möglichen Zusammenhang zwischen neutrophiler Inflammation und Dysregulation der angeborenen Immunantwort der PMN genauer zu charakterisieren, haben wir in unserer Studie die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 bestimmt. Für CXCR1 zeigte sich nach 3h keine signifikante Mehrexpression des Rezeptors auf den Patientenzellen. Nach Stimulation der Zellen in BAL oder LPS kam es in beiden Kollektiven erwartungsgemäß zu einer Downregulation des Rezeptors.

Ein signifikanter Unterschied fand sich dagegen zwischen Patienten und Kontrollen hinsichtlich der CXCR2-Rezeptorexpression auf den PMN. Hier zeigte sich eine ausgeprägt höhere Expression von CXCR2 bei den COPD-Patienten. Ex vivo bestand bereits zum Zeitpunkt t0 ein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen beiden Kollektiven.

In unseren Versuchen fanden sich darüberhinaus Unterschiede in der Expression von CXCR2 unter Stimulation der Zellen mit BAL und LPS. Hierbei reagierten die COPD Zellen mit einer signifikanten Downregulation des CXCR2 im Vergleich zu den Kontrollen. In früheren Studien, welche PMN von Patienten und Kontrollen nur im unstimulierten Zustand verglichen haben, konnten keine Unterschiede zwischen den Kollektiven in der Expression von CXCR1 und 2 festgestellt werden (Pignatti et al., 2005), (Sapey et al., 2011). Unterschiede in den Patientenkollektiven und das Fehlen des entzündlichen Reizes können diese Differenzen erklären. Unterstützt werden unsere Ergebnisse dadurch, dass in einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe (Strassburg et al., 2004) gezeigt werden konnte, dass PMN von Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und bestehender COPD eine höhere Expression von CXCR1 und CXCR2 aufwiesen, als PMN von Patienten mit Pneumonie ohne COPD. Aus den erhobenen Ergebnissen schließen wir daher, dass

PMN von COPD-Patienten, besonders im inflammatorischen Milieu, erhöhte Level von Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche exprimieren, wodurch die Ansprechbarkeit auf neutrophilenstimulierende Chemokine erhöht wird. Wir vermuten, dass dies zu einer gesteigerten Chemotaxis mit konsekutiv gesteigerter Entzündungsreaktion beiträgt. Dieser Mechanismus könnte ein wichtiger Angriffspunkt für neue Behandlungsoptionen gegen die COPD zu sein.

So existieren bereits einige Studien, welche sich mit dem Einsatz von CXCR-Antagonisten im Tiermodell für eine antiinflammatorische Therapie beschäftigt haben. Im Detail wurde dabei Nagetiere bzw. Affen mit Sch527123, einem CXCR1 und 2-Rezeptorantagonist behandelt. Hiernach konnten Effekte wie eine verringerte Chemotaxis von Entzündungszellen in die Lunge erreicht werden. (Chapman et al., 2007, 2009). Ähnliche Ergebnisse erzielte eine Studie, in welcher Meer-schweinchen zunächst inhalativ mit LPS behandelt wurden. Die daraufhin entstandene pulmonale Inflammation mit erhöhten Zahlen neutrophiler Granulozyten, erhöhtem IL-1 β und TNF- α Gehalt, sowie Fieber konnte unter vorheriger oder nachfolgender Behandlung mit dem Chemokinligand CXCL8(3-74)K11R/G31P, einem weiteren CXC-Rezeptorantagonist, reduziert werden (Gordon et al., 2005).

In einer aktuellen Studie (Hu et al., 2009) wurde erneut die wichtige Rolle von IL-8 für die Pathogenese der COPD bestätigt, indem eine direkte Beziehung zwischen der IL-8 Konzentration im Lungengewebe und der Lungenfunktion bzw. dem Stadium der COPD nachgewiesen werden konnte. IL-8 wird sowohl von Bronchialepithelzellen als auch von systemisch zirkulierenden und im Alveolarbereich residenten (Alveolarmakrophagen) Leukozyten produziert. Bindet IL-8 über CXCR1 und CXCR2-Rezeptoren an PMN, kann neben einer vermehrten Chemotaxis auch eine Aktivierung mit Degranulation und Freisetzung von Sauerstoffradikalen ausgelöst werden (Yao et al., 2008). Außerdem wird über die Bindung von IL-8 an zirkulierende Zellen die weitere autokrine und parakrine Bildung inflammatorischer Substanzen gefördert. So konnten Browning et al. 2000 zeigen, dass die Freisetzung von IL-8 durch Monozyten und PMN über Stimulation der Zellen durch „immobilisiertes IL-8“ gesteigert werden konnte, wobei der Effekt der autokrinen IL-8 Produktion der Monozyten sich im Vergleich zu den PMN wesentlich stärker darstellte. Neutrophile Granulozyten produzieren also IL-8, welches dann in parakriner und autokriner Weise seine Wirkung entfaltet (Bazzoni et al., 1991) (Atta-ur-Rahman et al., 1999). Daher untersuchten wir,

ob PMN von COPD-Patienten vermehrt IL-8 produzieren und so eine verstärkte Inflammation unterstützen.

Entgegen unseren Erwartungen fanden wir bei den Zellüberständen nach 24h keine Steigerung der IL-8 Konzentration bei den COPD-Patienten nach Stimulation mit BAL und LPS. Um dieses Ergebnis erklären zu können, muss die intrazelluläre Signalübertragung nach Bindung von IL-8 an CXC-Rezeptoren genauer betrachtet werden. In einer Studie von 1995 (Chuntharapai et al., 1995) konnte gezeigt werden, dass nach Inkubation von PMN mit IL-8 die CXC-Rezeptoren nach Koppelung mit IL-8 in die Zelle aufgenommen werden und nach Abbau des IL-8 wieder auf der Oberfläche exprimiert werden. Dabei ist der CXCR1 bereits nach 1,5 Stunden wieder vollständig auf der Zelloberfläche nachweisbar (Samanta et al., 1990). Der CXCR2 benötigt allerdings annähernd drei Stunden für eine vollständige Reexpression (Muehlstedt et al., 2001). Während der Koppelung von Rezeptor und Ligand findet nicht nur die Signaltransduktion statt, sondern es werden auch weitere Mechanismen zur Rezeptorregulation aktiviert. Wichtig hierbei ist v.a. die De- und Resensibilisierung des Rezeptors. Dieser Feed-Back Mechanismus schützt die Zelle vor akuter oder chronischer Überstimulation. Im Falle der CXC-Rezeptoren gibt es 3 Regulatorproteine, welche die Desensibilisierung beeinflussen: die „second-messenger“-abhängigen Proteinkinasen, die G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinasen (GRKs) und die Arrestine. Die durch GRK-hervorge-rufene Phosphorylierung führt zur Entkopplung von Rezeptor und G-Proteinen. Dass dieser Vorgang bei dem CXCR1 abläuft, konnte durch Richardson (Richardson et al., 1998) gezeigt werden. Auch CXCR2 durchläuft den Prozess der Rezeptorphosphorylierung an bestimmten Ser-Resten am C-Terminus (Mueller et al., 1997), der Desensibilisierung und Internalisierung (Feniger-Barish et al., 1999). Wichtig für den Prozess der Internalisierung ist auch, das β -Arrestin, welches an den phosphorylierten Rezeptor binden kann. Die Bindung verhindert zum einen die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und G-Protein, zum anderen initiiert es die Internalisierung des Rezeptors in Vesikel. Nach dieser Endozytose kann der Rezeptor zur Degradation ins Lysosom wandern (Herunterregulierung). Zusätzlich kann die Rezeptorzahl auch durch eine verminderte mRNA- und Proteinbiosynthese, bzw. durch Degradation bereits existierender Rezeptoren (Ferguson, 2001) reduziert werden. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass in einer Studie (Noguera et al., 1998) eine Dysexpression der G-Protein-Untereinheit Gas bei COPD-Patienten nachgewiesen werden konnte. Dies unterstützt die Idee, dass eine veränderte intrazelluläre Signalübermittlung

bei neutrophilen Granulozyten von COPD-Patienten besteht.

In unserer Studie unterscheidet sich die IL-8 Produktion der unstimulierten PMN von COPD-Patienten und Kontrollen nach 24h nicht. Wir fanden allerdings tendenzielle Unterschiede beider Kollektive in der IL-8 Produktion nach Stimulation unserer Zellen mit BAL und LPS. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Stimulation von gesunden PMN mit LPS zur gesteigerten Freisetzung von IL-8 führt (Altstaedt et al., 1996). Dies geht mit unseren Ergebnissen einher, bei denen der IL-8-Gehalt in den 24h Überständen der COPD-Patienten nach Stimulation mit LPS im Vergleich zu dem IL-8-Gehalt der Kontrollen numerisch reduziert war. Das Fehlen einer signifikanten Differenz führen wir auf die großen interindividuellen Unterschiede in der Chemokinsekretion und die begrenzte Zahl untersuchter Patienten zurück. Als Erklärungsmodell für diese Ergebnisse bietet sich an, dass über bislang noch unbekannte intrazelluläre Mechanismen eine Hyporesponsivität bezüglich der autokrinen IL-8 Produktion der COPD PMN nach Prästimulation durch inflammatorische Mediatoren wie LPS und BAL resultiert. Ähnliche Beobachtungen zum verminderten Ansprechen von monozytären Zellen nach Prästimulation konnten bereits bei Alveolarmakrophagen gefunden werden. Chen (Chen et al., 2007) zeigte in seinen Versuchen, dass sowohl die IL-8 mRNA Expression, als auch die IL-8 Zytokin Produktion von durch LPS prästimulierten Alveolarmakrophagen von Rauchern im Vergleich zu denen von Nicht-Rauchern deutlich reduziert war. Hervorzuheben bei unserem Erklärungsversuch ist allerdings, dass unser Versuchsaufbau ein geschlossenes Zellkulturssystem ex vivo darstellt. Ob ähnliche Ergebnisse, wie wir sie gefunden haben, auch in vivo zu finden sind, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Zusammen mit den Ergebnissen der CXC-Rezeptorexpression, deuten diese Experimente auf eine gesteigerte chemotaktische Aktivität der PMN von COPD-Patienten hin. Dieser Mechanismus könnte zu der für die Erkrankung charakteristischen chronisch persistierenden Entzündung beitragen. Ob diese Erkenntnisse sich für die Therapie nutzen lassen, bleibt abzuwarten. In den letzten Jahren wurden einige Studien publiziert, welche die Wirkung von Antagonisten gegen IL-8 bzw. CXCR2 auf die Aktivität von neutrophilen Granulozyten getestet haben. Auf zellbiologischer Ebene konnte de Boer (de Boer 2005, 2002) unter dieser Intervention eine verminderte Aktivität und Degranulation von neutrophilen Granulozyten zeigen. Einen ersten Hinweis auf klinische Effekte durch Chemokinantagonisten konnten Donald und Kollegen (Donald et al., 2004) verzeichnen, indem sie durch Behandlung von COPD-Patienten mit IL-8-Antikörpern eine Besserung des Dy-

spnoe-Index TDI (Transition Dyspnea Index) erreichten. Ein Effekt auf weitere klinisch bedeutende Endpunkte konnte bislang nicht gezeigt werden (rev Barnes, 2000).

Sauerstoffradikale werden in hoher Konzentration während des Zigarettenrauchens inhaliert. Es wird angenommen, dass pro Zug an einer Zigarette 10^4 oxidative Metaboliten eingeatmet werden (Church et al., 1985). Sauerstoffradikale werden aber auch von aktivierten neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen produziert. Dabei weisen neuere Studien daraufhin, dass Sauerstoffradikale aus verschiedenen Quellen unterschiedliche physiologische Effekte haben. So beeinflussen Sauerstoffradikale aus dem Umsatz der zytosolischen NADPH-Oxidase intrazellulär bevorzugt Wege der Signaltransduktion, während Sauerstoffradikale aus Mitochondrien zum programmierten Zelltod beitragen (Bindoli et al., 2008). Extrazellulär freigesetzte Sauerstoffradikale haben neben antimikrobiellen Eigenschaften die Fähigkeit, umgebendes Wirtsgewebe zu schädigen. Bei PMN steht hierbei die Freisetzung von Superoxidanionen, Hydrogenperoxid und Hydroxylradikalen im Vordergrund (Bowler et al., 2004).

In unserer Studie zeigten die PMN der COPD-Patienten ex vivo und eine Stunde nach PMA Stimulation eine maximale, im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell erhöhte Bereitschaft Sauerstoffradikale zu produzieren. Diese Ergebnisse sind gut mit einer Studie von 2001 vereinbar (Noguera et al., 2001). Hier konnte gezeigt werden, dass die von PMN produzierten Sauerstoffradikale von COPD-Patienten höher lagen, als bei Rauchern mit normaler Lungenfunktion oder Nicht-Rauchern. Unter FMLP Stimulation konnte dieser Unterschied in unserer Studie nicht reproduziert werden. Es zeigte sich nach einer Stunde die Sauerstoffradikalexpression der Kontrollen numerisch den Werten der Patientengruppe sogar überlegen (ebenfalls nicht signifikant). Unsere Ergebnisse sind insoweit mit den Ergebnissen einer früheren Studie vergleichbar (Wehlin et al., 2005), in der der oxidative Burst von PMN, von COPD-Patienten, Rauchern mit normaler Lungenfunktion und Nichtrauchern unter Stimulation mit FMLP, TNF- α , sowie FMLP und TNF- α verglichen wurde. Es zeigte sich eine signifikant verminderte Sauerstoffradikalproduktion der Raucher und COPD-Patienten im Vergleich zu den Nichtrauchern. Trotz des „Priming“ mit entzündungsförderndem TNF- α konnten die PMN in dieser Studie nicht zu einem verstärkten oxidativen Burst angeregt werden (Elbim et al., 1994). Die Diskrepanz der Sauerstoffradikalproduktion der neutrophilen Granulozyten nach PMA und FMLP Stimulation lässt sich am ehesten durch

die unterschiedliche intrazelluläre Signalübertragung erklären. Eine bereits früher beschriebene Desensibilisierung durch Überstimulation des FMLP Rezeptors (Blackwood et al., 1996) könnte die verminderte Ansprechbarkeit der Zellen von COPD-Patienten auf diesen Stimulus erklären. Weiterhin weist eine neuere Studie daraufhin, dass Rauchen die FMLP Rezeptorzahl auf PMN beeinflusst (Matheson et al., 2003). Daneben können auch methodische Aspekte eine Rolle spielen, da auch die Wahl des Fluoreszenzfarbstoffs einen Einfluss auf die Messung des oxidativen Bursts hat (Walrand et al., 2003). Unsere Ergebnisse sprechen in Zusammenschau mit den Daten aus der Literatur für eine wichtige Rolle des oxidativen Bursts in der Pathogenese der COPD, da eine maximale Produktion von Sauerstoffradikalen bei PMN von COPD-Patienten unter rezeptorunabhängiger Stimulation gefunden wurde. Dabei können Sauerstoffradikale die Struktur der Lunge nicht nur direkt schädigen, sondern bewirken auch die Aufrechterhaltung der Inflammation über die intrazelluläre Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Poli et al., 2004), Chromatinumgestaltung und vermehrte Genexpression proinflammatorischer Mediatoren (Jansen-Heininger et al., 2002), (Rahman et al., 2004). So werden Zytokine wie IL-8 und TNF- α durch Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B reguliert. NF- κ B liegt in seiner inaktivierten Form, gebunden an I κ B, im Zytosol vor. Oxidativer Stress bewirkt die Abspaltung von I κ B von NF- κ B und somit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Rahmann et al., 1998), (Schulze-Osthoff et al., 1995). In Studien konnte gezeigt werden, dass Oxidantien die Freisetzung von inflammatorischen Substanzen wie IL-8, Il-1 und NO bewirken. Zusätzlich wird dieser Vorgang begleitet von einer gesteigerten Expression der Gene dieser Mediatoren, sowie einer gesteigerten Aktivität von NF- κ B (Watchorn et al., 1998), (Parmentier et al., 1999). Ein Zusammenhang zwischen COPD und der Aktivität von NF- κ B konnte in einer unlängst veröffentlichten Studie (Kang-Yun et al., 2012) gefunden werden. Es zeigte sich in den untersuchten mononukleären Blutzellen von COPD-Patienten eine verminderte Expression des „NF- κ B repressing factors“ (NRF), welcher die Transkription von NF- κ B unterdrücken kann. Einhergehend damit stellte sich eine erhöhte IL-8-Konzentration und eine erhöhte Aktivität von NF- κ B in den untersuchten Zellen dar.

Die Erkenntnis, dass eine gesteigerte Produktion von Sauerstoffradikalen und eine verminderte Anwesenheit von Antioxidantien an der Entstehung der COPD beteiligt sind, eröffnet interessante Therapieoptionen. Eine Kohortenstudie mit 2633 Teilnehmern konnte einen Zusammenhang zwischen der Versorgung mit dem antioxidativ wirksamen Vitamin E und einer verbesserten Lungen-

funktion (Britton et al., 1995) demonstrieren. Diese Studie unterstützt die Hypothese, dass antioxidativ wirkende Vitamine möglicherweise als präventive Therapie gegen die Entstehung einer COPD eingesetzt werden könnten (Steinberg et al., 1995). In einer jüngst veröffentlichten Studie (Milara et al., 2012) zeigte sich nach Behandlung von peripheren neutrophilen Granulozyten von COPD-Patienten mit N-Acetyl-Cystein eine Minderung der Chemotaxis, sowie der Freisetzung von Elastase und Sauerstoffradikalen. Andere Antioxidantien, die zur Therapie der COPD eingesetzt werden könnten, sind Thiolgruppenspender, Polyphenole, Flavinoide, Nrf2-Aktivatoren, die als Induktoren der Glutathionbiosynthese wirken, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase Mimetics (Rahman, 2008), (Biswas et al., 2012). Bislang liegen überzeugende Ergebnisse klinischer Studien bezüglich der therapeutischen Wirksamkeit antioxidativer Substanzen jedoch nicht vor, sodass diese noch nicht für die Therapie der COPD eingesetzt werden können. Weitere Studien zu antioxidativen Substanzen als Therapieoption der COPD erscheinen erforderlich.

Ähnlich wie beim panlobulären Lungenemphysem im Rahmen eines hereditären α 1-Antitrypsinmangels könnte ein unausgeglichenes Verhältnis zwischen Metalloproteasen (MMP) und tissue inhibitors of metalloproteases (TIMP) eine Rolle bei der Entstehung der COPD spielen. Auf der Basis experimenteller Studien wird angenommen, dass eine vermehrte Aktivität der MMP's sowie eine verminderte Aktivität der TIMP's zu einem Abbau der pulmonalen Matrix führt und dadurch die Entstehung einer COPD begünstigt wird. So konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass MMP9 sich vermehrt in den bronchoalveolären Lavagen von COPD-Patienten findet (Betsuyaku et al., 1995), (Finlay et al., 1997). Auch Tabakexposition bewirkt eine vermehrte Expression von MMP9 und MMP12 (Han et al., 2003; Lavigne et al., 2005). Im Sputum von COPD-Patienten konnte ebenfalls eine erhöhte Aktivität von MMP9 nachgewiesen werden (Vernooy et al., 2005). In einer weiteren Studie (Mercer et al., 2005) wurde eine erhöhte MMP9 Konzentration und eine erniedrigte TIMP1 Konzentration im Sputum während akuten Exazerbationen gefunden. Andererseits zeigte sich, dass die Expression von Genen von Gewebsreparaturenzymen, darunter MMP9, bei COPD-Patienten reduziert ist (Gosselink et al., 2010). Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse wurden bereits Versuche gestartet, mittels Pharmazeutika die Freisetzung von MMP's zu reduzieren, um so eine verminderte Inflammation in der Lunge zu erreichen. So konnten Ganesan und Kollegen (Ganesan et al., 2010) im Tiermodell das Fortschreiten der Emphysembildung durch Be-

handlung von Mäusen mit Quercetin erreichen, was mit einer verminderte Expression von MMP9 und MMP12 einherging. Die MMP-Produktion von PMN von COPD-Patienten ex vivo wurde bislang noch nicht im direkten Vergleich zu lungengesunden Patienten untersucht. Daher bestimmten wir in unserer Studie die Freisetzung von MMP9 nach 1h um zu untersuchen, ob aktivierte PMN zu einer Überproduktion der MMP's beitragen. Entgegen unserer Erwartungen fanden wir jedoch keine signifikant unterschiedlichen MMP9 Konzentrationen zwischen den beiden Kollektiven. Möglicherweise spielen PMN im Vergleich zu Monozyten/Makrophagen und strukturellen Zellen der Atemwege bei der COPD eine untergeordnete Rolle als MMP-Produzenten. Für die Pathogenese der COPD könnte sich eine wechselseitige Beziehung zwischen Sauerstoffradikalen und MMP9 Produktion als wichtig erweisen, da MMP9 auch eine wichtige Rolle beim Reparieren und Reorganisieren von Lungengewebe spielt (Yoon et al., 2007). Eine niedrige MMP9 Konzentration würde in diesem Fall für ein fehlendes Reparaturvermögen während akuter Inflammation sprechen.

Die von uns gefundene Aktivierung der Chemokinrezeptoren und von CD16 weisen auf eine vermehrte chemotaktische Aktivität der PMN hin. Dieser Mechanismus kann zu der für die COPD charakteristischen persistierenden Inflammation in den Atemwegen beitragen und somit zur Destruktion des pulmonalen Gewebes führen und bietet einen Ansatzpunkt für zielgerichtete anti-entzündliche Therapieoptionen dieser bislang nur unzureichend therapierbaren Erkrankung.

Bei Betrachtung unserer Ergebnisse müssen folgende Einschränkungen berücksichtigt werden: zunächst wurde versucht die zu untersuchenden Gruppen in ihren Eigenschaften so vergleichbar wie möglich zu halten. Dennoch war die Übereinstimmung zwischen den beiden Kollektiven hinsichtlich wichtiger Eigenschaften nicht komplett. So befanden sich fünf nichtrauchende Probanden in der Studie, obwohl alle COPD-Patienten zumindest Ex-Raucher waren. Darüberhinaus war die Zahl der untersuchten Individuen aufgrund des experimentellen Aufwands und der Einschlusskriterien limitiert. Weiterhin differiert die Anzahl der gemessenen Proben aufgrund der verfügbaren Materialmenge und methodischer Fehler im Einzelfall für verschiedene Parameter von Patient zu Patient. Schließlich muss noch beachtet werden, dass zahlreiche nicht standardisierbare Variablen auf die Aktivität der PMN Einfluss haben können. Zu nennen wären hier u.a. die Einnahme von inhalativen Steroiden und inhalatives Zigarettenrauchen vor der Blutentnahme.

6. Zusammenfassung

Die COPD ist durch eine chronische Entzündung der Atemwege gekennzeichnet. Warum die Entzündung sich ab einem bestimmten Punkt, ohne Trigger von außen, selbständig aufrechterhält, ist noch unzureichend erklärt. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Dysfunktion der angeborenen Immunität der PMN zu der kontinuierlichen Entzündung beiträgt. So handelt es sich bei der COPD nicht nur um eine lokal begrenzte, sondern vielmehr um eine systemische Erkrankung. Um die Dysfunktion der PMN zu charakterisieren, erfolgten Messungen der Expression von Aktivierungsmarkern, Chemokinrezeptoren, des oxidativen Bursts sowie der Freisetzung von IL-8 und MMP9. Dabei fokussierten wir uns auf die Darstellung von Unterschieden zwischen den PMN von COPD-Patienten und Probanden unter verschiedenen Bedingungen, welche durch Stimulation der PMN durch BAL und LPS geschaffen wurden. Die Messungen wurde nach Vorversuchen an für die jeweiligen Parameter optimalen Zeitpunkten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden bei 15 COPD-Patienten während einer akuten Exazerbation bronchoalveoläre Lavagen entnommen sowie Vollblut einige Wochen später während einer stabilen Phase. Zur Kontrolle wurde Vollblut von 13 Patienten entnommen, welche wegen extrapulmonaler Erkrankungen hospitalisiert waren. Die Messungen der Oberflächenmarker, sowie des oxidativen Bursts, erfolgte mittels Dreifarben-Durchflusszytometrie an einem FACScan Analyzer. Die Bestimmung der Konzentration der Chemokine erfolgte mittels handelsüblicher ELISA Kits.

Unsere Ergebnisse zeigten eine veränderte Expression von Oberflächenmarkern und Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Zytokinen der PMN von COPD-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen. Diese war charakterisiert durch eine signifikant gesteigerte Produktion von CXCR2-Rezeptoren der COPD-Patienten ex vivo (COPD: $40,29 \pm 15,64$ vs. Kontrolle: $28,69 \pm 9,57$; $p < 0,027$) sowie nach 3h (Med: COPD: $50,59 \pm 19,8$ vs. Kontrolle: $24,13 \pm 9,61$; $p < 0,002$, BAL: COPD: $38,41 \pm 18,98$ vs. Kontrolle: $18,67 \pm 8,07$; $p < 0,011$). Einhergehend damit war eine signifikant erniedrigte IL-8-Konzentration nach 24h in den Zellkulturüberständen der COPD-Patienten nach BAL Stimulation (BAL: COPD: $680,79 \pm 601,39$ vs. $1248,45 \pm 1423,14$ pg/dl; $p < 0,031$). Weiterhin fanden wir eine erhöhte Zellaktivierung der PMN der COPD-Patienten, repräsentiert durch eine erhöhte Expression von CD16 Rezeptoren im Vergleich zu den Kontrollen.

Nach Stimulation mit LPS zeigte sich der Unterschied signifikant (COPD: $543,12 \pm 144,17$ vs. Kontrolle: $385,20 \pm 132,76$; $p < 0,048$). CD62L war in allen Zellkulturansätzen auf den PMN der COPD-Patienten numerisch erniedrigt. Der oxidative Burst der COPD-PMN unter Stimulation mit FLMP, einem rezeptorvermittelten Stimulus des oxidativen Bursts, zeigte sich zum Zeitpunkt t0h im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant gesteigert. Wir fanden unter PMA-Stimulation, nach 0h und 1h, einen maximal gesteigerten oxidativen Burst bei den PMN der COPD-Patienten, welcher im Vergleich zu den Kontrollen jedoch nur tendenziell erhöht war. Es zeigten sich keine Unterschiede in der MMP9 Freisetzung nach Kollektivvergleich der PMN von COPD-Patienten und Probanden.

Anhand unseren Ergebnissen vermuten wir, dass bei COPD-Patienten eine angeborene Dysfunktion der PMN mit gesteigerter über CXC-Rezeptoren vermittelter Chemotaxis, höherem Aktivierungsgrad und erhöhter Freisetzung von Sauerstoffradikalen vorliegt. Hieraus resultiert die für die COPD charakteristische Inflammation. Insbesondere aus der erhöhten Expression von CXCR2 könnten sich neue Ansatzpunkte für dringend benötigte antiinflammatorische Therapien der bislang in ihrem Fortschreiten kaum beeinflussbaren Erkrankung ergeben.

7. Literatur

- 1) Albelda, S M. Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 4:195–203 (1991)
- 2) Altstaedt J, Kirchner H and Rink L. Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology* 89:563-568 (1996)
- 3) Anderson R, Theron AJ, Richards GA, et al.. Passive smoking by human sensitizes circulating neutrophils. *Am Rev Respir Dis.* 144:570–574 (1991)
- 4) Atta-ur-Rahman, Harvey K und Siddiqui RA. Interleukin-8: an autocrine inflammatory mediator. *Curr Pharm Des.* 5:241-253 (1999)
- 5) Baggiolini M, Dewald B und Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines - CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.* 55:97-179 (1994)
- 6) Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *Medical Progress.* 343:269-280 (2000)
- 7) Barnes PJ. Development of New Drugs for COPD. *Curr Med Chem.* (2012) / Epub ahead of print
- 8) Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B und Baggiolini M. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophilactivating peptide 1/Interleukin-8. *J Exp Med.* 173:771-774 (1991)
- 9) Beeh KM, Beier J, Kornmann O, et al.. Sputum matrix metalloproteinase- 9, tissue inhibitor of metalloprotease-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects. *Respir Med.* 97:634–9 (2003)

- 10) Bejo L. Einfluß von Streptococcus pneumoniae auf den oxidative burst und den Zelltod von Neutrophilen Granulozyten (2000)
- 11) Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Venge P, Xu S, Kawakami Y. Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 159:1985-1991 (1999)
- 12) Bieth JG. The antielastase screen of the lower respiratory tract. *Eur J Respir Dis Suppl.* 139:57–61 (1985)
- 13) Bindoli A, et al.. Thiol Chemistry in Peroxidase Catalysis and Redox Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling.* 10(9):1549–1564 (2008)
- 14) Biswas S, Hwang JW, Kirkham PA, Rahman I. Pharmacological and Dietary Antioxidant Therapies for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Curr Med Chem.* (2012) / Epub ahead of print
- 15) Black RA, Rauch CT, et al.. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385(6618):729-33 (1997)
- 16) Blackwood RA, Hartiala KT, Kwoh EE, et al.. Unidirectional heterologous receptor desensitization between both the fMLP and C5a receptor and the IL-8 receptor. *J Leukoc Biol.* 60:88–93 (1996)
- 17) Blanchette CM, Dalal AA, Mapel D. Changes in COPD demographics and costs over 20 years. *J Med Econ.* (2012) / Epub ahead of print
- 18) Blidberg K, Palmberg L, Dahlén B, Lantz AS, Larsson K. Increased neutrophil migration in smokers with or without chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology.* 17(5):854-60 (2012)

- 19) Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. Vol 89, No10:3503-21 (1997)
- 20) Bowler RP, Barnes PJ, Crapo JD. The role of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD*. 1:255–77 (2004)
- 21) Britton JR, Pavord ID, Richards KA, Knox AJ, Wisniewski AF, Lewis SA, Tattersfield AE, and Weiss ST. Dietary antioxidant vitamin intake and lung function in the general population. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 151:1383–1387 (1995)
- 22) Brown V, Elborn JS, Bradley J and Ennis M. Dysregulated apoptosis and NFκB expression in COPD subjects. *Respiratory Research*. 10:24 (2009)
- 23) Browning DD, Diehl WC, Hsu MH, Schraufstatter IU and Ye RD. Autocrine regulation of interleukine-8 production in human monocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L1129-L1136, 2000
- 24) Butcher EC and Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272(5258): 60-6 (1996)
- 25) Bux J, Dickmann JO, Stockert U, Mueller-Eckhardt C. Influence of granulocyte antibodies on granulocyte function. *Vox Sang*. 64: 220-225 (1993)
- 26) Cantin AM, North SL, Hubbard RC, et al.. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *Journal of Applied Physiology*. 63:152–7 (1987)
- 27) Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A and Deanfield JE. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N. Engl. J. Med*. 334:150–154 (1996)

- 28) Chapman RW, Minnicozzi M, Celly CS, Phillips JE, Kung TT, Hipkin RW, Fan X, Rindgen D, Deno G, Bond R, Gonsiorek W, Billah MM, Fine JS, Hey JA. A novel, orally active CXCR1/2 receptor antagonist, Sch527123, inhibits neutrophil recruitment, mucus production, and goblet cell hyperplasia in animal models of pulmonary inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 322(2):486-93. (2007)
- 29) Chapman RW, Phillips JE, Hipkin RW, Curran AK, Lundell D, Fine JS. CXCR2 antagonists for the treatment of pulmonary disease. *Pharmacol Ther.* 121(1):55-68 (2009)
- 30) Chen H, Cowan MJ, Hasday JD, Vogel SN and Medvedev AE. Tobacco Smoking Inhibits Expression of Proinflammatory Cytokines and Activation of IL-1R-Associated Kinase, p38, and NF- κ B in Alveolar Macrophages Stimulated with TLR2 and TLR4 Agonists. *J Immunol.* 179:6097-6106 (2007)
- 31) Chuntharapai A und Kim KJ. Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor. *J Immunol.* 155: 2587-2594 (1995)
- 32) Church T, Pryor WA.. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ.Health Perspect.* 64:111–26 (1985)
- 33) Cosio MG, Guerassimov A. Chronic obstructive pulmonary disease. Inflammation of small airways and lung parenchyma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (1999)
- 34) Dale A, Moulding, C, Anthony H and Steven WE. Regulation of neutrophil Fc γ RIIIb (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate. *Journal of Leukocyte Biology* Volume 65 (06/1999)
- 35) Damiá Ade D, Gimeno JC, Ferrer MJ, Fabregas ML, Folch PA, Paya JM. A study of the effect of proinflammatory cytokines on the epithelial cells of smokers, with or without COPD. *Arch Bronconeumol.* 47(9):447-53 (2011)

- 36) De Boer WI. Perspectives for cytokine antagonist therapy in COPD. *Drug Discov Today*. 10:93–106 (2005)
- 37) De Boer WI. Cytokines and therapy in COPD: a promising combination?. *Chest*. 121:209S–218S (2002)
- 38) DeForge LE, Kenney JS, Jones ML, Warren JS und Remick DG: Biphasic production of IL-8 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human whole blood. Separation of LPS- and cytokine-stimulated components using anti-tumor necrosis factor and anti-IL-1 antibodies. *J Immunol*. 148: 2133-2141 (1992)
- 39) Deshmukh HS, Shaver C, Case LM, Dietsch M, Wesselkamper SC, Hardie WD, Korfhagen TR, Corradi M, Nadel JA, Borchers MT, and Leikauf GD: Acrolein-Activated Matrix Metalloproteinase 9 Contributes to Persistent Mucin Production. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 446–454 (2008)
- 40) Donnelly LE, Barnes PJ: Defective Phagocytosis in Airways Disease. *Chest*. 141(4):1055-1062 (2012)
- 41) Droemann D, Hansen F, Aries SP, Braun J, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B: Neutrophil Apoptosis, Activation and Anti-Inflammatory Cytokine Response in Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Treated Patients with Community-Acquired Pneumonia. *Respiration*. 73:340-346 (2006)
- 42) Drost EM, Selby C, Lannan S, Lowe GD, MacNee W. Changes in neutrophil deformability following in vitro smoke exposure: mechanism and protection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 6:287–295 (1992)
- 43) Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, Soler N, Roca J, Agusti A, MacNee W. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax*. 60:293–300 (2005)

- 44) Drost EM, Selby C, Bridgeman MM, MacNee W. Decreased leukocyte deformability after acute cigarette smoking in humans. *AmRev Respir Dis.* 148:1277–1283 (1993)
- 45) Dobashi K, Asayama K, Hayashibe H, et al.. Immunohistochemical study of copper-zinc and manganese superoxide dismutases in the lungs of human fetuses and newborn infants: developmental profile and alterations in hyaline membrane disease and bronchopulmonary dysplasia. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 423:177–84 (1993)
- 46) Elbim C, Bailly S, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidallo MA. Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infect Immun.* 62: 2195-201 (1994)
- 47) Evans MD, Pryor WA. Damage to human alpha-1-proteinase inhibitor by aqueous cigarette tar extracts and the formation of methionine sulfoxide. *Chem Res Toxicol.* 5:654–660 (1992)
- 48) Fabel H, Konietzko N, Weißbuch Lunge, Thieme Verlag Stuttgart, 2005
- 49) Feniger-Barish R, Ran M, Zaslaver A and Ben Baruch A. Differential modes of regulation of cxc chemokine-induced internalization and recycling of human CXCR1 and CXCR2. *Cytokine* 11, 996-1009 (1999)
- 50) Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* 53:1-24 (2001)
- 51) Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 156:240-247 (1997)
- 52) Flesch BK, Maas W, Neppert J. NA1/NA2 antisera inhibit FcγRI but not FcγRII-mediated phagocytosis. *Vox Sang.* 75: 247-252 (1998)

- 53) Fujita J, Nelson NL, Daughton DM, et al.. Evaluation of elastase and antielastase BALance in patients with chronic bronchitis and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis.* 142: 57–62 (1990)
- 54) Gallatin, WM, Weissman IL et al.. A cell-surface molecule involved in organspecific homing of lymphocytes. *Nature* 304(5921):30-4 (1983)
- 55) Ganesan S, Faris AN, Comstock AT, Chattoraj SS, Chattoraj A, Burgess JR, Curtis JL, Martinez FJ, Zick S, Hershenson MB, Sajjan US. Quercetin prevents progression of disease in elastase/LPS-exposed mice by negatively regulating MMP expression. *Respir Res.* 28;11:131 (2010)
- 56) Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M et al.. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature.* 370:555–7 (1994)
- 57) St. Geme JW. Insights into the mechanism of respiratory tract colonisation of nontypable *Haemophilus influenzae*. *The pediatric Infectious Disease Journal.* 16:931-935 (1996)
- 58) Gordon JR, Li F, Zhang X, Wang W, Zhao X, Nayyar A. The combined CXCR1/CXCR2 antagonist CXCL8(3-74)K11R/G31P blocks neutrophil infiltration, pyrexia, and pulmonary vascular pathology in endotoxemic animals. *J Leukoc Biol.* 78(6):1265-72. (2005)
- 59) Gosselink JV, Hayashi S, Elliott WM, Xing L, Chan B, Yang L, Wright C, Sin D, Paré PD, Pierce JA, Pierce RA, Patterson A, Cooper J, Hogg JC. Differential expression of tissue repair genes in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 181(12):1329-35 (2010)
- 60) Grievink L, Smit HA, Ocké MC, et al.. Dietary intake of antioxidant (pro)-vitamins, respiratory symptoms and pulmonary function: the MORGEN study. *Thorax.* 53:166-171 (1998)

- 61) Hackett TL, Holloway R, Holgate ST and Warner JA: Dynamics of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine release during acute inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: an ex vivo study. *Respiratory Research*. 9:47 (2008)
- 62) Hale KA, Niehwoehner E, Cosio MG. Morphologic changes in the muscular pulmonary arteries: relationship to cigarette smoking, airway disease and emphysema. *American Review of Respiratory Disease*. 122: 273-278 (1980)
- 63) Han Z, Junxu, Zhong N. Expression of matrix metalloproteinases MMP-9 within the airways in asthma. *Respir Med*. 97:563–7 (2003)
- 64) Harju T, Kaarteenaho-Wiik R, Sirvio R, et al.. Manganese superoxide dismutase is increased in the airways of smokers' lungs. *Eur Respir J*. 24:765–71 (2004)
- 65) Hibbs ML, Tolvanen M, Carpén O. Membrane-proximal Ig-like domain of FcγRIII (CD16) contains residues critical for ligand binding. *J Immunol*. 152: 4466-4474 (1994)
- 66) Higashimoto Y, Yamagata Y, Iwata T, Okada M, Ishiguchi T, Sato H, Masuda M and Itoh H. Increased serum concentrations of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in COPD patients. *Eur Respir J*. 25:885–890 (2005)
- 67) Hill, AT, Gompertz S, Stockley R. Factors influencing airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 55:970-977 (2000)
- 68) Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F and Wymann MP. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287:1049-1053 (2000)

- 69) Homburg CH, de Haas M, dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos, D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 85 (2): 532-40 (1995)
- 70) Hu XR, Han SX, Wang T, Zhang MK, Chen L, Wen FQ. Association between interleukin-8 in lung tissues and stages of chronic obstructive pulmonary diseases. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 40(5):885-8 (2009)
- 71) Hu G, Cassano P. Antioxidant nutrients and pulmonary function: the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J. Epidemiol.* 151:75 (2000)
- 72) Huizinga TWJ, van der Schoot CE, Jost C, Klaassen R, Kleijer M, von dem Borne AEGKr, Roos D and Tetteroo PAT. The PI-linked receptor Fc-gamma R III is released on stimulation of neutrophils. *Nature (Lond.).* 333:667-669 (1988)
- 73) Huizinga TWJ, Roos D, von dem Borne AEGKr. Neutrophil Fc receptors: a two-way bridge in the immune system. *Blood* 75(6): 1211-1214 (1990a)
- 74) Huizinga TWJ, Dolman KM, van der Linden NJM, Kleijer M, Nuijens JH, von dem Borne AEGKr, Roos D. Phosphatidylinositol-linked FcRIII mediates exocytosis of neutrophil granule proteins, but does not mediate initiation of the respiratory burst. *J Immunol.* 144:1432-1437 (1990b)
- 75) Hunninghake GW, Crystal RG. Cigarette smoking and lung destruction. Accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *American Review of Respiratory Disease* 128: 833-838 (1983)
- 76) Hynes, RO. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25 (1992)

- 77) Ikeda M, Schroeder KK, Mosher LB, Woods CW and Akhtar AJ. Suppressive effect of antioxidants on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 103:791–796 (1994)
- 78) Janssen-Heininger YM, Macara I, Mossman BT. Cooperativity between oxidants and tumor necrosis factor in the activation of nuclear factor (NF)- κ B: requirement of RAS/mitogen-activated protein kinases in the activation of NF- κ B by oxidants. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 20:942-952 (1999)
- 79) Janssen-Heininger YMW et al. Reactive Nitrogen Species and Cell Signaling: Implications for Death or Survival of Lung Epithelium. *Am J Respir Crit Care.* 166(12):9S–16S. (2002)
- 80) Kähäri VM and Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* 6: 199-213 (1997)
- 81) Kang MJ, Oh YM, Lee JC et al.. Lung matrix metalloproteinase-9 correlates with cigarette smoking and obstruction of airflow. *J Korean Med Sci.* 18: 821–827 (2003)
- 82) Kang-Yun L, Shu-Chuan H, Yao-Fei C, Chun-Hua W, Chien-Da H, Wen-Te L, Shu-Min L, Yu-Lun L, Ya-Ling C, Lu-Wei K, Han-Pin K. Reduced nuclear factor- κ B repressing factor: a link toward systemic inflammation in COPD. *Eur Respir J.* 40:863-873 (2012)
- 83) Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 155:449–453 (1997)
- 84) Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care medicine.* 153:530-534 (1996)

- 85) Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*. 111:383-89 (1999)
- 86) Kuijpers TW, van der Schoot CE, Hoogerwerf M und Roos D. Cross-linking of the carcinoembryonic antigen-like glycoproteins CD66 and CD67 induces neutrophil aggregation. *J.Immunol*. 151:4934-4940 (1993)
- 87) LaRosa GJ, Thomas KM, Kaufman ME, Mark P, White M, Taylor L, Gray G, Witt D und Navarro J. *Journal of biological Chemistry*. 267:18263-18266 (1992)
- 88) Li H, Cui D, Tong X, et al.. The role of matrix metalloproteinases in extracellular matrix remodelling in chronic obstructive pulmonary disease rat models. *Chinese Journal of Internal Medicine*. 41:393–8 (2002)
- 89) Lingappa VL, Farey K. *Physiological Medicine: A Clinical Approach to Basic Medical Physiology*. ISBN-13: 9780070381285. Publisher: McGraw-Hill Companies, The (2000)
- 90) Liu Y, Shaw SK, Ma S, et al.. Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. *J Immunol* 172:7–13 (2004)
- 91) Li W, Xu Y, Zhang Z.. Activity of matrix metalloproteinase in airway epithelial cells of COPD patients. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 25:151–4 (2005)
- 92) Li XY, Donaldson K, Rahman I, MacNee W. An investigation of the role of glutathione in increased epithelial permeability induced by cigarette smoke in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med*. 149:1518–1525 (1994)
- 93) Li XY, Rahman I, Donaldson K, et al.. An investigation of the mechanism of the increased epithelial permeability induced by cigarette smoking in vivo and in vitro models. *Am J Respir Crit Care Med*. 149:1518–25 (1994)

- 94) Löfdahl JM, Wahlström J, Sköld CM. Different inflammatory cell pattern and macrophage phenotype in chronic obstructive pulmonary disease patients, smokers and non-smokers. *Clin Exp Immunol.* 145(3):428–437 (09/2006)
- 95) Lu Y and Wahl LM. Oxidative Stress Augments the Production of Matrix Metalloproteinase-1, Cyclooxygenase-2, and Prostaglandin E2 through Enhancement of NF- κ B Activity in Lipopolysaccharide-Activated Human Primary Monocytes. *J Immunol.* 175:5423-5429 (2005)
- 96) Lundback B, Lindberg A, Lindström M et al. Not 15 but 50% of smokers develop COPD? Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. *Respir Med.* 97: 115–122 (2003)
- 97) MacNee W, Selby C. New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 2. Neutrophil traffic in the lungs: role of haemodynamics, cell adhesion, and deformability. *Thorax* 48:79–88 (1993)
- 98) Mahler DA, Huang S, Tabrizi M and Bell GM. Efficacy and Safety of a Monoclonal Antibody Recognizing Interleukin-8 in COPD : A Pilot Study. *Chest.* 126:926-934 (2004)
- 99) Man SF, Zhang X, Vessey R, Walker T, Lee K, Park D, Sin DD. The effects of inhaled and oral corticosteroids on serum inflammatory biomarkers in COPD: an exploratory study. *Ther Adv Respir Dis.*(2):73-80. (2009)
- 100) Matheson M, Rynell AC, McClean M, Berend N. Cigarette Smoking Increases Neutrophil Formyl Methionyl Leucyl Phenylalanine Receptor Numbers. *Chest* 123:1642-1646 (2003)
- 101) Mercer PF, Shute JK, Bhowmik A, Donaldson GC, Wedzicha JA , Warner JA. MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. *Respiratory Research* 6:151 (2005)

- 102) Migliacci R and Gresele P. Smoking and impaired endothelium dependent dilatation. *N. Engl. J. Med.* 334:1674 (1996)
- 103) Milara J, Juan G, Peiró T, Serrano A, Cortijo J. Neutrophil activation in severe, early-onset COPD patients versus healthy non-smoker subjects in vitro: effects of antioxidant therapy. *Respiration* 83(2):147-58 (2012)
- 104) Mocchegiani E, Giacconi R, Costarelli L. Metalloproteases/anti-metalloproteases imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: genetic factors and treatment implications. *Curr Opin Pulm Med. Suppl* 1:11-9 (2011)
- 105) Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W. Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 159:473–479 (1999)
- 106) Muehlstedt SG, Richardson CJ, West MA, Lyte M und Rodriguez JL: Cytokines and the pathogenesis of nosocomial pneumonia. *Surgery* 130:602-609 (2001)
- 107) Mueller SG, White JR, Schraw WP, Lam V and Richmond A. Ligand-induced desensitization of the human CXC chemokine receptor-2 is modulated by multiple serine residues in the carboxyl-terminal domain of the receptor. *J. Biol. Chem.* 272:8207-8214 (1997)
- 108) Murav`ev RA, Fomina VA, Rogovin VV. Gelatinase of the neutrophil granulocytes. *Izv Akad Nauk Ser Biol.* 4:389-94 (2003)
- 109) Murray CJL, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990—2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349:1498-1504 (1997)

- 110) Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJP. Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem J.* 277:277-279 (1991)
- 111) National Heart, Lung and Blood Institute. Morbidity and mortality: chartbook on cardiovascular, lung and blood diseases (Bethesda, MD.US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health (1998)
- 112) Nadel JA. Role of epidermal growth factor receptor activation in regulating mucin synthesis. *Respir Res.* 2:85–89 (2001)
- 113) Noguera A, Busquets X, Sauleda J, Villaverde JM, MacNee W, Agusti AGN with the Technical Assistance of Santos C. Expression of Adhesion Molecules and G Proteins in Circulating Neutrophils in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 158:1664–1668 (1998)
- 114) Noguera A, Batle S, Miralles C, Iglesias J, Busquets X, MacNee W, Agusti AGN. Enhanced neutrophil reponse in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 56:432-437 (2001)
- 115) Noguera A, Sala E, Pons AR, et al.. Expression of adhesion molecules during apoptosis of circulating neutrophils in COPD. *Chest* 125:1837–1842 (2004)
- 116) Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N und Matsushima K. Properties of the novel pro-inflammatory supergene „intercrine“ cytokine family. *Annu Rev of Immunol.* 9:617-648 (1991)
- 117) Orië NGM, Sluiter HJ. The host factor in bronchitis. *Bronchitis, an international symposium.* Assen, Netherlands: Royal Vangorcum, 1961:43-59

- 118) Palmer LB. Bacterial colonization: pathogenesis and clinical significance. *Clinics in Chest Medicine* 3:455-466 (1987)
- 119) Parmentier M, Drost E, Hirani N et al.. Thiol antioxidants inhibit neutrophil chemotaxis by decreasing release of IL-8 from macrophages and pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 159:A286 (1999)
- 120) Pignatti P, Moscato G, Casarini S, Delmastro M, Poppa M, Brunetti G, Pisati P, BALbi B. Downmodulation of CXCL8/IL-8 receptors on neutrophils after recruitment in the airways. *J Allergy Clin Immunol.* 115(1):88-94 (2005)
- 121) Pittet JF, MacKersie RC, Martin TR, Matthay MA. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med.* 155:1187-205 (1997)
- 122) Pletz MW, Ioanas M, de Roux A, et al.. Reduced spontaneous apoptosis in peripheral blood neutrophils during exacerbation of COPD. *Eur Respir J.* 23:532–537 (2004)
- 123) Poli G et al.. Oxidative Stress and Cell Signalling. *Current Medicinal Chemistry* 11:1163–1182 (2004)
- 124) Profita M, Chiappara G, Mirabella F, Di Giorgi R, Chimenti L, Costanzo G, Riccobono L, Bellia V, Bousquet J, Vignola AM. Effect of cilomilast (Ariflo) on TNF-alpha, IL-8, and GM-CSF release by airway cells of patients with COPD. *Thorax* 58:573–579 (2003)
- 125) Rahman I. Antioxidant Therapeutic Advances in COPD. *Ther Adv Respir Dis.* 2(6): 351–374 (2008)
- 126) Rahman I and Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J.* 28: 219–242 (2006)

- 127) Rahman I, Li XY, Donaldson K et al. Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress. *Am J Physiol.* 269:L285–92 (1995)
- 128) Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* 53:601–612 (1998)
- 129) Rahman I, Morrison D, Donaldson K and MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154:1055–1060 (1996)
- 130) Rahman I and MacNee W. Oxidant antioxidant imBALance in smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 51:348– 350 (1996)
- 131) Rahman I et al.. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF- κ B and pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* 68:1255–1267 (2004)
- 132) Richardson RM, Ali H, Pridgen BC, Haribabu B and Snyderman R. Multiple signaling pathways of human interleukin-8 receptor A. Independent regulation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 273:10690-10695 (1998)
- 133) Riise, GC, Larsson S, Löfdahl C-G and Andersson BA. Circulating cell adhesion molecules in bronchial lavage and serum in COPD patients with chronic bronchitis. *Eur. Respir. J.* 7:1673–1677 (1994)
- 134) Riise GC, Larsson S, Löwhagen O, and Andersson BA. Circulating leukocyte adhesion molecules in stable asthma and nonobstructive chronic bronchitis. *Allergy* 50:693–698 (1995)
- 135) Rogers DF. Mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease. In: Chadwick D, Goode JA, editors. *Chronic obstructive pulmonary disease: pathogenesis to treatment*. Chichester, UK: John Wiley & Sons. pp. 65–83 (2001)

- 136) Romano SJ. Selectin antagonists : therapeutic potential in asthma and COPD. *Treat Respir. Med.* 4(2):85-94 (2005)
- 137) Rusznak C, Mills PR, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ, Lozewicz S. Effect of cigarette smoke on the permeability and IL-1 β and sICAM-1 release from cultured human bronchial epithelial cells of never-smokers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23:530–536 (2000)
- 138) Sietta M. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160: S17-S20 (1999)
- 139) Sietta M, Baraldo S, Corbino S, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cvalessco G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P, Ciacci A, Fabbri LM. CD8⁺-cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal Respiratory and Critical Care Medicine* 160: 711-717 (1999)
- 140) Sietta M, Turato G, Baraldo S, Zanin A, Braccioni F, Mapp CE, Maestrelli, Cavallesco G, Papi A, Fabbri LM. Goblet cell hyperplasia and epithelial inflammation in peripheral airways of smokers with both symptoms of chronic bronchitis and airflow limitation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161: 1016-1021 (2000)
- 141) Sietta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163: 1304-1309 (2001)
- 142) Salmi, M. and Jalkanen S. How do lymphocytes know where to go: current concepts and enigmas of lymphocyte homing. *Adv Immunol.* 64: 139-218 (1997)

- 143) Samanta AK, Oppenheim JJ und Matsushima K: Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J Biol Chem.* 265, 183-189 (1990)
- 144) Santos-Beneit AM, Mollinedo F. Expression of genes involved in initiation, regulation and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells. *J. Leukoc. Biol.* 67: 712-724 (2000)
- 145) Sapey E, Stockley JA, Greenwood H, Ahmad A, Bayley D, Lord JM, Insall RH, Stockley RA. Behavioral and Structural Differences in Migrating Peripheral Neutrophils from Patients with COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 183(9):1176-86 (2011)
- 146) Schröder JM, Mrowietz U, Morita E and Christophers E. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J. Immunol.* 139:3474-3483 (1987)
- 147) Schulze-Osthoff K, Los M, Baeuerle PA. Redox signalling by transcription factors NF-kappa B and AP-1 in lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 50:735-41 (1995)
- 148) Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of MAC-1 (amb2) in human neutrophils. *J Clin Invest* 92:1467-76 (1993)
- 149) Sengelov H, Follin P, Kjeldsen L, Lollike K, Dahlgren C, Borregaard N. Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J Immunol.* 154:4157-65 (1995)
- 150) Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* 10:602-608 (1998)

- 151) Shiota Y, Wilson JG, Marukawa M, Ono T and Kaji M. Soluble intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) antigen in sera of bronchial asthmatics. *Chest* 109:94–99 (1996)
- 152) Skubitz KM, Campbell KD und Skubitz AP. CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J.Leukoc.Biol.* 60:106-117 (1996)
- 153) Smith WB, Gamble JR, Clark-Lewis I and Vadas MA. Interleukin-8 induces neutrophil transendothelial migration. *Immunology* 72:65-72 (1991)
- 154) Stanescu D, Sanna A, Veriter C, Kostianev S, Calcagni PG, Fabbri LM, Maestrelli P. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax* 51:267-271 (1996)
- 155) Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR, Maunder RJ, Cockrill BA, Hudson LD. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 150:113-122 (1994)
- 156) Steinberg FM and Chait A. Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers. *Am. J. Clin. Nutr.* 68:319–327 (1998)
- 157) Stockley RA. The pathogenesis of chronic pulmonary lung disease. *The Quarterly Journal of Medicine* 88: 141-146 (1995)
- 158) Stoebner P, Mezin P, Vila A, Grosse R, Kopp N and Paramelle B. Microangiopathy of endoneural vessels in hypoxemic chronic pulmonary disease (COPD): a quantitative ultrastructural study. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 78:388–395 (1989)
- 159) Stringer KA, Freed BM, Dunn JS et al.. Particulate phase cigarette smoke increases MnSOD, NQO1, and CINC-1 in rat lungs. *Free Radic Biol Med.* 37:1527–33 (2004)

- 160) Tager IB, Segal MR, Speizer FE, Weiss ST. The natural history of forced expiratory volumes. Effect of cigarettesmoking and respiratory symptoms. *Am Rev Respir Dis.* 138:837-49 (1988)
- 161) Thelen M, Peveri P, Kernen P, Von D, Walz A and Baggiolini M. Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. *FASEB J.* 2:2702-2706 (1988)
- 162) Tobar N, Villar V, Santibanez JF. ROS-NF- κ B mediates TGF-beta1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion. *Mol Cell Biochem.* 340(1-2):195-202 (2010)
- 163) Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A et al.. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96:2673–81 (2000)
- 164) Van der Vaart H, Postma DS, Timens W et al.. Acute effects of cigarette smoking on inflammation in healthy intermittent smokers. *Respir Res.* 6:22 (2005)
- 165) Van Zandbergen G, Gieffers J, Kothe H. Chlamydia pneumoniae Multiply in Neutrophil Granulocytes an Delay their spontaneous Apoptosis. *Journal of Immunology* 0022-1767 (2004)
- 166) Vernooy JH, Lindeman JH, Jacobs JA, Hanemaaijer R, Wouters EF. Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-9 in induced sputum from patients with COPD. *Chest* 126:1802-1810 (2004)
- 167) Vestweber D and Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev.* 79(1): 181-213 (1999)
- 168) Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 59(9):1428-59 (2002)

- 169) Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A et al. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 158: 1945–1950 (1998)
- 170) Walrand S, Valeix S, Rodriguez C et al.. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta* 331:103–110 (2003)
- 171) Watchorn T, Mulier B, MacNee W. Does increasing intracellular glutathione inhibit cytokine-induced nitric oxide release and NF- κ B activation. *Am J Respir Crit Care Med.* 157:A889 (1998)
- 172) Wehlin L, Löfdahl M, Lundahl J, Sköld M. Reduced Intracellular Oxygen Radical Production in Whole Blood Leukocytes From COPD Patients and Asymptomatic Smokers. *Chest* 128:2051-2058 (2005)
- 173) Wilkinson T, Hurst J, Perera W, Wilks M, Donaldson G, Wedzicha J. Effect of Interactions Between Lower Airway Bacterial and Rhinoviral Infection in Exacerbations of COPD. *Chest* 129:317-324 (2006)
- 174) Woessner JF. The matrix metalloproteinase family. In *Matrix Metalloproteinases*. (Parks WC and Mecham RP, eds.) pp.1-14, Academic Press, San Diego (1998)
- 175) Woodside DG, Vanderslice P. Cell adhesion antagonists: therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *BioDrugs* 22(2):85-100 (2008)
- 176) Writght JL. Small airways disease: Its role in chronic airflow obstruction. *Seminars in Respiratory Medicine* 13: 72-84 (1992)

- 177) Wuyts A, Proost P and Van Damme J. In Thomson, A.W. (ed.). *The Cytokine Handbook*. Academic Press, San Diego, Calif. pp. 271-311 (1998)
- 178) Yamagata T, Sugiura H, Yokoyama T, Yanagisawa S, Ichikawa T, Ueshima K, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Yamagata Y, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M. Overexpression of CD11b and CXCR1 on Circulating Neutrophils: It's possible role in COPD. *Chest* 132:890-899 (2007)
- 179) Yamashita K, Takahashi A, Kobayashi S, Hirata H, Mesner PW Jr, Kaufmann SH, Yonehara S, Yamamoto K, Uchiyama TM, Sasada. Caspases mediate tumor necrosis factor- α -induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. *Blood* 93:674-685 (1999)
- 180) Yao H, Boer W, Rahman I. Targeting lung inflammation: novel therapies for the treatment of COPD. *Curr Respir Med Rev.* 4(1): 57–68 (2008)
- 181) Yoon HK, Cho HY and Kleeberger SR: Protective Role of Matrix Metalloproteinase-9 in Ozone-Induced Airway Inflammation. *Environ Health Perspect* 115:1557–1563 (2007)
- 182) Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes and Development* 14:163–76 (2000)
- 183) Zhou Y, Wang C, Yao W, Chen P, Kang J, Huang S, Chen B, Wang C, Ni D, Wang X, Wang D, Liu S, Lu J, Zheng J, Zhong N. and Ran P. COPD in Chinese nonsmokers. *Eur Respir J.* 33:509–518 (2009)

8. Abkürzungen

AT2-Zellen	Alveolarepithelzellen Typ 2
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CXCR1/2	Chemokin Receptor Typ 1/2
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CRP	C-reaktives Protein
DALY	Disability adjusted life years
DHR 123	Dihydrorhodamine 123
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENA-78	Epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide 78
FCS	Fetal calf serum
FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde (Einsekundenkapazität)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FMLP	N-Formylmethionyl-Lencyl-Phenylalanin
FSC	Forward-Scatter
GCP-2	Human granulocyte chemotactic protein-2
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GOLD	GloBAL Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GRK	G protein-regulated protein kinase
GRO- $\alpha/\beta/\gamma$	Growth regulated oncogene- $\alpha/\beta/\gamma$
GTP	Guanosintriphosphat
H	Hour

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IκB	Inhibitor of NF-κB
INF-g	Interferon-g
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL-	Interleukin-
LPS	Lipopolysaccharid
LTB ₄	Leukotrien B ₄
Med	Medium
MMP	Matrix Metalloproteinase
MORGEN	The monitoring project on risk factors and health in The Netherlands
MRNA	Messenger ribonucleic acid
MSOD	Magnesium Superoxid Dismutase
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat-hydrate
NAP-2	Neutrophil-activating protein-2
NF-κB	Nuclear factor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanat
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PVA	Polyvinylalkohol
PMN	Polymorphonuclear neutrophils
rMFL/rMFI	Relative mean fluorescence intensity
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium

SD	Standard deviation
SICAM	Soluble Intercellular Adhesion Molecule
SSC	Side-Scatter
TDI	Transition dyspnea index
TGF- α/β	Transforming growth factor- α/β
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF- α	Tumor necrosis Factor α
VK	Vitalkapazität
ZKR	Zellkulturreihe

9. Anhang

9.1. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Isabel Munkel
Geburtsdatum	03.02.1984
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	ledig

Schulbildung:

1990 - 1994	Grundschule Wachbach
1994 - 2003	Deutsch-Ordens Gymnasium, Bad Mergentheim Abschluß Abitur

Hochschulbildung:

10/2003 - 05/2010	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
04/2006	1. Staatsexamen
05/2010	2. Staatsexamen
11/2006	Beginn der Dissertation (experimenteller Teil)

Praktisches Jahr:

02/2009 - 06/2009	Plastische Chirurgie, Schön Klinik Neustadt
06/2009 - 10/2009	Innere Medizin, Kantonsspital St. Gallen, Schweiz
10/2009 - 01/2010	Chirurgie, Sana Kliniken Lübeck

Berufliche Weiterbildung:

seit 2011	Assistenzärztin in der Abteilung für Chirurgie am Klinikum Nordfriesland
-----------	---

9.2. Publikationsverzeichnis

Postervorträge:

A.Strassburg, I. Münkkel, K. Dalhoff: „Gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies peripherenöser PMN von COPD-Patienten nach autologer Stimulation durch Lavage Überstände im Vergleich zu lungengesunden Kontrollen.“

DGP Kongress 2009, Mannheim, Deutschland, 18.- 21.03.2009.

http://www.dgp-kongress.de/2009/v_print.php?V_id=223

A. Strassburg, I. Muenckel, K. Dalhoff: „Increased production of reactive oxygen species of systemic PMN from COPD patients in comparison to healthy controls.“

ERS (European Respiratory Society Congress) 2010, Barcelona, Spanien, 18.-22.09.2010

9.3. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, welche Entscheidendes zu dieser Dissertation beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Dalhoff für die Bereitstellung des Labors und der finanziellen Mittel, welche die Durchführung der Arbeit erst ermöglicht haben, sowie für die kontinuierliche Betreuung der Dissertation, welche intensiven Rat und Unterstützung erforderte.

Für die Überlassung des Themas und für die Betreuung der Studie danke ich Dr. Alan Strassburg. Seine geduldige Einführung in wissenschaftliches Arbeiten, Statistik und den Hintergrund der Studie, sowie Anregungen und beständiges Auseinandersetzen mit der Thematik, bildete die Grundlage für die Entstehung der Promotion. Außerdem leistete er hervorragende Arbeit bei der Vorstellung der Studie auf Kongressen, sowie der Veröffentlichung der Ergebnisse.

Im Besonderen möchte ich ein großes Dankeschön für die tolle Arbeitsatmosphäre und die ständige fachkundige Hilfestellung an die im Labor tätigen MTA's Heike Richartz und Ute Knupperts aussprechen. Ohne sie wäre die Durchführung der Arbeit halb so nett und erfolgreich gewesen.

Weiterhin gilt mein Dank den Stationsärzten der Pneumologie der Medizinischen Klinik III, sowie denen der Neurologie, welche mich immer rechtzeitig über potentielle Patienten oder Probanden für die Studie informiert haben.

Den vielen freiwilligen Patienten und Probanden, danke ich für ihre Bereitschaft Blut zu spenden, ohne welches die wissenschaftlichen Versuche nicht zustande gekommen wären.

Bei meinen Eltern und meinem Freund möchte ich mich für die stetige Motivierung und Unterstützung, sowie für Hilfe bei grafischen und formellen Inhalten bedanken.