

SEQUENZIELLE GENEXPRESSIONSANALYSE PRO- UND
ANTIINFLAMMATORISCHER ZYTOKINE IN
DURCHFLUSSZYTOMETRISCH AUFGEREINIGTEN
ALVEOLARMAKROPHAGEN VON PATIENTEN MIT AKUTER
RESPIRATORISCHER INSUFFIZIENZ.

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Theodoros Pavlidis

aus Gießen

Gießen 2003

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik II

Klinische Forschergruppe: Respiratorische Insuffizienz

Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. J. Lohmeyer

Gutachter: Prof. Dr. A. Sziegoleit

Gutachterin: PD Dr. I. Welters

Tag der Disputation: 16.11.2004

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 <u>Einleitung</u>	1
1.1. Fragestellungen der eigenen Studie	7
2 <u>Material und Methoden</u>	8
2.1 Studiengruppen	8
2.1.1 ARDS-Patientenkollektiv	8
2.1.2 Normalpersonen-Kollektiv	8
2.2 Separation von Alveolarmakrophagen aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten und Normalpersonen	9
2.2.1 Bronchoalveoläre Lavage	9
2.2.2 Prinzip der Durchflusszytometrie	9
2.2.3 Durchflusszytometrische Isolation von Alveolarmakrophagen	10
2.2.4 Einfluss der Nozzlegröße auf die Alveolar-Makrophagenisolation	12
2.3 Analyse der Zytokingenexpression in Alveolar-makrophagen von ARDS- Patienten und Normalpersonen	12

2.3.1	Isolation der Gesamt-RNA	12
2.3.2	Reverse Transkription	13
2.3.3	Polymerasekettenreaktion	13
2.3.4	Semiquantitative Analyse der Zytokingen- Expressionsmuster	15
2.4	Kultivierung von Alveolarmakrophagen und Quanti- fizierung der Zytokinsekretion	16
2.4.1	Kultivierung durchflusszytometrisch separierter Alveolarmakrophagen	16
2.4.2	Quantifizierung der Zytokinkonzentrationen in den BAL- und Kulturüberständen von Alveolarmakrophagen septischer ARDS-Patienten und Kontrollprobanden	17
2.5	Statistik	17
3	<u>Ergebnisse</u>	19
3.1	Zytologische Differenzierung der bronchoalveolären Lavage von ARDS-Patienten und Kontrollprobanden	19
3.2	Einfluss der verwendeten Keramikdüse (Nozzlegröße) auf den Aufreinigungsgrad durchflusszytometrisch separierter Alveolarmakrophagen	20

3.3	Analyse der pro- und antiinflammatorischen Zytokingenexpression in Alveolarmakrophagen von ARDS-Patienten und Normalpersonen	21
3.3.1	Analyse der Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) Genexpression in Alveolarmakrophagen septischer ARDS-Patienten und Kontrollprobanden	22
3.3.2	Analyse der Interleukin 6 (IL-6) Genexpression in Alveolarmakrophagen septischer ARDS-Patienten und Kontrollprobanden	24
3.3.3	Analyse der Interleukin 8 (IL-8) Genexpression in Alveolarmakrophagen septischer ARDS-Patienten und Kontrollprobanden	25
3.3.4	Analyse der Genexpression des Monozyten Chemotaktischen Proteins-1 (MCP-1) in Alveolarmakrophagen septischer ARDS-Patienten und Kontrollprobanden	26
3.3.5	Analyse der Interleukin 1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra) Genexpression in Alveolarmakrophagen septischer ARDS-Patienten und Kontrollprobanden	27
3.3.6	Analyse der Interleukin 10 (IL-10) Genexpression in Alveolarmakrophagen septischer ARDS-Patienten und Kontrollprobanden	28

3.4	Analyse des pro- und antiinflammatorischen Zytokinprofils in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten und Normalpersonen	30
3.4.1	Analyse des Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) Zytokin- spiegels in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten und Kontrollprobanden	30
3.4.2	Analyse des Interleukin 8 (IL-8) Zytokinspiegels in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten und Kontrollprobanden	30
3.4.3	Analyse des Interleukin 6 (IL-6) Zytokinspiegels in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten und Kontrollprobanden	31
3.4.4	Analyse des Monozyten Chemotaktischen Proteins-1 (MCP-1) Zytokinspiegels in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten und Kontrollprobanden	32
3.4.5	Analyse des Interleukin 1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra) Zytokinspiegels in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten und Kontrollprobanden	33
3.4.6	Analyse des Interleukin 10 (IL-10) Zytokinspiegels in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten und Kontrollprobanden	33

4	<u>Diskussion</u>	35
	4.1 Durchflusszytometrische Alveolarmakrophagenseparation	35
	4.2 Die Rolle von Alveolarmakrophagen und Zytokinen im ARDS	36
	4.3 Ex vivo Zytokingenexpression von Alveolarmakrophagen und Zytokinkonzentrationen in bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten	37
5	<u>Zusammenfassung</u>	43
6	<u>Literaturverzeichnis</u>	45
7	<u>Anhang</u>	62
	7.1 Verwendete Lösungen	62
	7.2 Materialien und Bezugsquellen	63
	7.3 Verwendete Geräte und Herstellernachweis	66
	7.4 Danksagung	68
	7.5 Lebenslauf	69
	7.6 Eidesstattliche Erklärung	70
8	<u>Abstract</u>	71

ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
AS	Antisense
AU	Arbitrary Unit
BAL	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
CAM	Cell Adhesion Molecule
cpm	Counts per minute
CXC	CXC Chemokine
CXCR	CXC Chemokin Rezeptor
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IL	Interleukin
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
Ly	Lymphozyt
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
ml	Milliliter
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
µg	Mikrogramm
NF-κB	Nuclear Factor-κB
ng	Nanogramm
O ₂ ⁻	Sauerstoffperoxid
PAF	Platelet-Activating Factor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMN	Polymorphonuclear Neutrophil
rAM	Residenter Alveolarmakrophage
RT	Reverse Transcription
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

1. EINLEITUNG

Die akute Lungenentzündung stellt trotz bedeutender Fortschritte in der intensivmedizinischen Behandlung hinsichtlich Mortalität und Morbidität weltweit ein persistierendes intensivmedizinisches Problem dar. Ein wesentliches Charakteristikum der pulmonalen Inflammation ist die akute Funktionsstörung der Gasaustauschstrecke Alveole-Interstitium- Kapillarraum, welche in ein progredientes Organversagen der Lunge übergehen kann.

Eine akute generalisierte Funktionsstörung der Lunge, welche mit einem reduzierten Gasaustausch zwischen Alveolen, dem Interstitium und den Kapillaren einhergeht, wird als akutes Lungenversagen definiert. Das schwere akute Lungenversagen wurde erstmals von Ashbaugh 1967 (5) in Anlehnung an die Ähnlichkeit mit dem IRDS (Infant Respiratory Distress Syndrom) als ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrom) beschrieben. Die Inzidenz beträgt zwischen 3-75 pro 100.000 Einwohner mit einer Letalität von 50-70 % (4,155,165). Als Auslöser des ARDS sind multiple Faktoren beschrieben worden, welche pathogenetisch entweder zu einer direkten oder einer indirekten Lungenschädigung führen (137-139) (Abbildung 1). Die Aspiration von saurem Mageninhalt, die Inhalation toxischer Gase, diffuse Lungeninfektionen mit Bakterien, Viren, Protozoen oder Pilzen können zu einer primären alveolär getriggerten Lungenschädigung führen. Systemisch ausgelöste Lungenschädigungen können auf dem Boden einer Sepsis oder eines Polytraumas, bei Embolien, Verbrennungen, Pankreatitiden und primär vaskulärer Schädigung entstehen (47,67,99,125,145).

Pathophysiologisch wird das ARDS in drei Stadien unterteilt. Im ersten Stadium, welches auch als exsudative Frühphase bezeichnet wird, kommt es zur gesteigerten Kapillarpermeabilität mit interstitiellem Lungenödem. In der zweiten Phase folgt durch den Untergang von Typ II Pneumozyten eine verminderte Produktion von Surfactant, mit einer daraus resultierenden Zunahme der Oberflächenspannung. Das dritte Stadium des ARDS, auch als Spätphase oder Proliferationsphase bezeichnet, geht mit fibroproliferativen Prozessen (Entstehung einer Lungenfibrose) einher (2,75,105,134,156,157,159,163,164). Besonders das durch pulmonale Infektionserreger bedingte ARDS ist oft schwer von Pneumonien abzugrenzen.

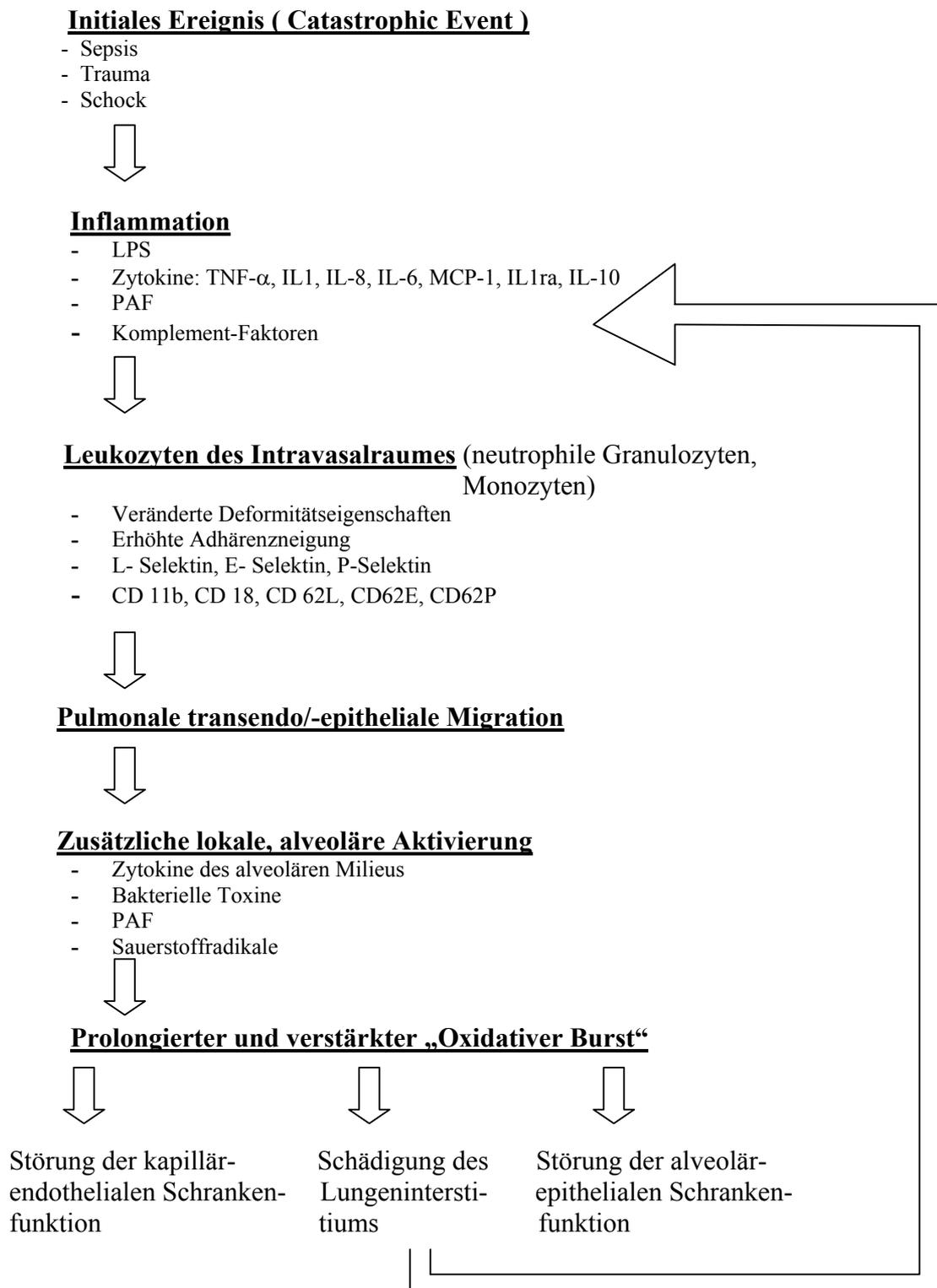


Abbildung 1. Hypothetisches Schema des Circulus Vitiosus in der Pathogenese des ARDS unter Beteiligung von Zellen des mononukleären Zellsystems und inflammatorischer Zytokine.

Pneumonien, nach der klassischen Definition lokal begrenzt, die durch diffuse Ausbreitung inflammatorischer Prozesse zu einer akuten Lungenfunktionsstörung führen, werden unter dem Begriff des parapneumonischen ARDS zusammengefasst. Zur Vermeidung von Problemen in der Zuordnung der Krankheitsbilder Pneumonie und ARDS hat die Amerikanisch-Europäische-Konsensus-Konferenz eine Definition für das ARDS gewählt (137), nach der das Krankheitsbild diagnostiziert wird, wenn eine schwere Gasaustauschstörung vorliegt, die Lungen beidseitig vom Krankheitsprozess befallen sind und das Lungenödem nicht kardio-gen bedingt ist. Sind diese Kriterien nach einer schweren Pneumonie, einem Polytrauma, einer Aspiration oder auch ohne spezielle Prädisposition gegeben, so ist die Definition eines ARDS erfüllt.

In der Entwicklung und im Verlauf des ARDS spielen Alveolarmakrophagen (AM) und polymorphkernige neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle (6,15,16,18,41,52,70,81,112,147). Polymorphkernige neutrophile Granulozyten sind im gesunden Alveolarraum nicht zu finden. Erst unter entzündlichen Bedingungen werden sie rasch aus dem vaskulären Kompartiment über die endo-epitheliale Barriere in den Alveolarraum der Lunge rekrutiert, von wo sie per bronchoalveolärer Lavage leicht isoliert werden können (147). AM sind die residenten, immunkompetenten Zellen des Alveolarraumes der gesunden Lunge und tragen durch ihr hohes Potential an Phagozytosefähigkeit massgeblich zur Eliminierung von inhalierten Fremdpartikeln bei. Alveolarmakrophagen repräsentieren eine morphologisch heterogene Zellpopulation, deren Grösse von 12 μ m bis 40 μ m (29) variiert. Die AM sind, wie die Kupffer-Zellen in der Leber, die Osteoklasten im Knochen, die Langerhans-Zellen in der Haut, die Peritonealmakrophagen im Peritoneum und die Mikroglia-Zellen im zentralen Nervensystem (143) Teil des retikuloendothelialen Systems. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Phagozytose, Mediatorenausschüttung wie auch Membranrezeptorexpression der mononukleären Phagozyten-Populationen variieren (25,26,142,143,144,146).

Eine Besonderheit von AM ist ihr breites sekretorisches Potential. Es sind mittlerweile mehr als 100 Sekretionsprodukte von Alveolarmakrophagen beschrieben worden. Ihr Molekulargewicht erstreckt sich von 17D (Hydroxyl-Radikale) bis 720kD (α_2 -Makroglobulin). Zu den Sekretionsprodukten von AM gehören diverse inflammatorische Mediatoren wie z.B. Sauerstoffradikale, lytische Proteasen und Arachidonsäuremetabolite. Eine besondere Stellung im Kontext akut pulmonaler Inflammation nehmen die von AM produzierten und sezernierten Zytokine ein (3,7,9,31,45,55,56,57,61,59,68,73,74,77,80,88,

90,91,107,112,118,124,135,154,165). Zytokine repräsentieren eine heterogene Gruppe biologisch aktiver, hochpotenter, löslicher extrazellulärer Signalproteine, welche von einer Reihe inflammatorischer wie nicht-inflammatorischer Zellen produziert werden. Die unterschiedlich verwendeten Bezeichnungen Lymphokin (von Lymphozyten produziert), Monokin (von Monozyten produziert) oder aber Interleukin (zwischen Leukozyten agierendes Zytokin) werden unter dem Oberbegriff Zytokin subsummiert. Durch die Erforschung von Zytokinrezeptorsystemen konnten einige der molekularen Signalwege, die die biologischen Effekte von Zytokinen vermitteln, aufgeklärt werden (84). Es wurde gezeigt, dass der biologische Effekt der Zytokine auf die Targetzelle über die Bindung des Zytokins an einen spezifischen membranständigen Rezeptor vermittelt wird, welcher „down stream“ mit Signaltransduktions-Proteinen interagiert (84), wobei verschiedene Zytokin-Rezeptoren mit den gleichen Signaltransduktionselementen assoziiert sein können.

Die Interaktion der Zytokine mit der Targetzelle kann entweder autokrin oder parakrin erfolgen. Eine autokrine Wirkung der Zytokine liegt vor, wenn Zytokinproduzierende- und Zielzelle identisch sind. Beeinflussen Zytokine hingegen andere Zellpopulationen, handelt es sich um eine parakrine Wirkungsweise. Des weiteren zeigen viele Zytokine redundante und pleiotrope Effekte. Die Redundanz zeigt sich in der Überschneidung der Wirkungsweise einzelner Zytokine. So können z.B. die Zytokine TGF- β und PDGF jeweils die Proliferation von Osteoblasten stimulieren (128,129) oder sowohl IL-4 wie auch IL-6 eine Antikörperproduktion in B-Lymphozyten induzieren (84,158,170). Bewirkt ein einzelnes Zytokin verschiedene biologische Effekte in unterschiedlichen Targetzellen, handelt es sich um eine pleiotrope Wirkung des Zytokins. So hat z.B. das Zytokin IL-6 die Fähigkeit, in der Leber die Produktion von Akut-Phase Proteinen zu induzieren und gleichzeitig die Produktion von Albumin zu drosseln (50). Aufgrund ihres Wirkungsprofils im Rahmen der Entzündungsantwort werden Zytokine oft in pro- und antiinflammatorische Zytokine unterteilt. Wichtige proinflammatorische Zytokine in der Genese des ARDS und anderer pulmonaler Erkrankungen sind der Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), das Monozytenchemotaktische Protein 1 (MCP-1), Interleukin 8 (IL-8) und z. T. Interleukin 6 (IL-6). Wichtige antiinflammatorische Zytokine sind Interleukin 10 (IL-10) und Interleukin 1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra) (3,9,23,31,56,57,82,83,88,101,102,103,118,119,126,160, 163).

Das proinflammatorische Akut-Phase Zytokin TNF- α wird primär von Zellen der Monozyten/Makrophagen Zellreihe als endogener Mediator LPS-vermittelter Effekte synthetisiert. Im Tiermodell konnte von Beutler (14) gezeigt werden, dass Mäuse eine per se letale

LPS- Dosis überlebten, wenn sie mit TNF- α Antikörpern vorbehandelt wurden. TNF- α ist zytotoxisch gegenüber verschiedenen Tumorzellen (24), es hat eine wachstumsfördernde Wirkung auf Fibroblasten und ist mitverantwortlich für systemische Effekte, wie Fieber und Kachexie (13). Weiterhin moduliert es Endothelzellfunktionen (20,21,113), Granulozytenfunktionen (49), das Wachstum von B-Lymphozyten (78), Angiogenese und die metabolische Aktivierung von Alveolarmakrophagen und Osteoklasten. Seine proinflammatorische Wirkung beruht nicht zuletzt auf den Synergismus mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 (40).

Das Monozyten-chemotaktische Protein MCP-1 (CCL2) gehört zur Familie der C-C oder β -Chemokine (48,94,104,129,130,131,174,175). Als Chemokine werden solche Zytokine bezeichnet, welche eine gerichtete chemotaktische Migration von Leukozytenpopulationen zum Entzündungsherd induzieren können. C-C Chemokine sind dadurch charakterisiert, dass die beiden aminoterminalen Cysteinreste nebeneinander liegen. Das C-C Chemokin MCP-1, hat eine zentrale Bedeutung für die inflammatorische Rekrutierung von zirkulierenden Monozyten in den Alveolarraum zur Expansion des residenten Alveolarmakrophagenpools (106,132). Eine weitere Familie von Zytokinen mit chemotaktischer Funktion sind die C-X-C oder α -Chemokine. Diese Klasse von Chemokinen unterscheidet sich von den C-C Chemokinen dadurch, dass die beiden aminoterminal gelegenen Aminosäurecysteinreste durch eine Aminosäure getrennt sind. Ein charakteristisches C-X-C Chemokin ist IL-8, welches von endotoxinstimulierten Alveolarmakrophagen sezerniert wird und primär auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirkt (8,53,90,176).

Interleukin 8 ist ein aus 72 Aminosäuren bestehendes, nicht glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 8 kDa. Goodman et al. (53) konnten in vitro nachweisen, dass IL-8 eine dominierende Rolle in der chemotaktischen Aktivierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten einnimmt.

Interleukin 6 ist ein Zytokin, das von Monozyten, T-Zellen, Fibroblasten und Tumorzellen produziert wird (85). Je nach Glykolysierungsgrad beträgt das Molekulargewicht des aus 184 Aminosäuren bestehenden Proteins zwischen 21,5 kDa und 28 kDa. Interleukin 6 hat viele pleiotrope Effekte auf diverse Zellpopulationen. So induziert IL-6 das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen, die Differenzierung von T-Zellen, die Synthese Akuter Phase Proteine durch Hepatozyten (85) und agiert wie TNF- α als endogenes Pyrogen (65,122,150). LPS induziert eine verstärkte IL-6 Produktion in Monozyten und Fibroblasten (66,71,86). Neben seiner inflammatorischen Potenz (57,85,172) vermittelt IL-6 auch an-

tiinflammatorische Funktionen, wie die Induktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-1-Rezeptorantagonist (1,79,117,135,142).

Interleukin 1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra) ist der erste beschriebene, natürlich auftretende Zytokinantagonist des inflammatorisch wirkenden Zytokins Interleukin 1. Durch Bindung an IL-1 Rezeptoren inhibiert IL-1ra die proinflammatorischen Effekte von IL-1 ohne selbst Rezeptoraktivierung zu induzieren. Da nur 5% der IL-1 Rezeptoren gebunden werden müssen, um eine Inflammation auszulösen, muß die Konzentration von IL-1ra die Konzentration von IL-1 um das 100-fache übersteigen, um inhibitorisch wirksam werden zu können (59). Durch die Inhibition von IL-1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* reduziert IL-1ra die Inflammation bei unterschiedlichen Krankheitsprozessen (30,173). So konnten Ohlsson et al. (117) im Tiermodell zeigen, dass IL-1ra die durch IL-1 induzierte Lungenschädigung herabsetzt.

Interleukin 10 besitzt ähnlich wie IL-1ra vorwiegend antiinflammatorische Eigenschaften (17,34,44,60,155). IL-10 ist ein säuresensitives Protein mit einem Molekulargewicht von 35-40 kDa und wird von vielen Leukozytenpopulationen wie z.B. Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten sezerniert (44). Ursprünglich wurde IL-10 vor allem wegen seiner inhibitorischen Wirkung auf die Interferon- γ Produktion von Th₁ Zellen bekannt (43). Aufgrund seiner pleiotropen Effekte auf Leukozytenpopulationen spielt IL-10 eine wichtige regulatorische Rolle im Entzündungsgeschehen. Hierbei inhibiert IL-10 antigenpräsentierende Zellfunktionen, reguliert die Expression von MHC II Molekülen (33,36) und hemmt die Zytokinproduktion aktivierter Monozyten (32), Makrophagen (44) und neutrophiler Granulozyten (167). Weiterhin potenziert IL-10 die IL-1ra Sekretion von aktivierten neutrophilen Granulozyten (28). Im Tiermodell zeigte IL-10 eine protektive Wirkung gegenüber experimenteller Endotoxinprovokation (51). Donnelly et al. haben gezeigt, dass niedrige Konzentrationen von IL-1ra und IL-10 in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BAL) von ARDS-Patienten mit einer schlechten Prognose assoziiert waren (38).

Während in zahlreichen *in vitro* Untersuchungen das Potential alveolärer Makrophagen zur Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine gut charakterisiert ist, wurde bislang die Beteiligung von Alveolarmakrophagen an der Initiation und Propagation des klinischen ARDS *in vivo* nur unzureichend untersucht. Dies lässt sich zum Teil durch den Umstand erklären, dass neben residenten AM im Verlauf akuter pulmonaler Insuffizienz auch polymorphkernige Granulozyten, Monozyten, Fibroblasten und Epithelzellen im Alveolarraum proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine sezernieren können. Daher ist

eine effiziente Aufreinigung von Alveolarmakrophagen aus bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten nötig, um die Funktion von AM im Kontext des ARDS gezielt untersuchen zu können. Die herkömmliche Isolation von AM mittels Dichtegradientenzentrifugation erbringt lediglich eine Aufreinigung von 80-85% (19,62), da diese Zellen eine große Dichteheterogenität besitzen. Die in Kombination hierfür oder auch alternativ praktizierte Aufreinigung von AM durch Adhärenz an Polystyren birgt den Nachteil, dass der Aktivierungsgrad der AM durch diesen Adhärenzschritt verändert wird. Darüber hinaus können neben Alveolarmakrophagen auch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (46) an Plastik adhären und so die Effizienz der AM-Aufreinigung negativ beeinflussen. Zur gezielten Analyse des pro- und antiinflammatorischen Potentials alveolärer Makrophagen im Kontext des ARDS muss aber sowohl eine Kontamination der Alveolarmakrophagenpopulation mit PMN als auch eine durch den Aufreinigungsprozess induzierte Veränderung des Aktivitätszustandes der AM vermieden werden.

1.1 Fragestellungen der eigenen Studie

Die Beteiligung von Alveolarmakrophagen via Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Verlauf des Akuten Respiratorischen Distress Syndroms (ARDS) ist bisher unzureichend untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von Alveolarmakrophagen im Kontext des septischen ARDS mit folgenden Fragestellungen untersucht:

1. Charakterisierung des Genexpressionsprofils proinflammatorischer (TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1) und antiinflammatorischer Zytokine (IL-1ra, IL-10) in durchflusszytometrisch separierten Alveolarmakrophagen sequentiell lavagierter septischer ARDS Patienten.
2. Analyse des Sekretionsprofils pro- (TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1) und antiinflammatorischer (IL-1ra, IL-10) Zytokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiengruppen

Die untersuchten Kollektive in der vorliegenden Arbeit waren 1) Patienten mit septischem ARDS und 2) gesunde Probanden (Normalpersonen) als Kontrolle. Die Durchführung der Untersuchung wurde von der medizinischen Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Giessen genehmigt. Alle Patienten, freiwillige Versuchsteilnehmer und nächste Angehörige wurden über das Vorhaben und dessen Risiken aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Durchführung der Studie.

2.1.1 ARDS-Patienten-Kollektiv

Das ARDS Patientenkollektiv umfasste 10 Männer und 5 Frauen im Alter zwischen 20 und 56 Jahren. Eine primäre Lungeninfektion war nicht vorhanden. Häufigster Auslöser des ARDS war bei diesen Patienten das klinische Bild einer Sepsis, bei einem Patienten zeigte sich eine Sepsis bei hämatologischer Grunderkrankung, und bei einem Patienten fand sich eine nekrotisierende Pankreatitis. Klinische Kriterien für die Diagnose eines ARDS waren Dyspnoe und radiologisch nachweisbare diffuse, bilaterale, alveoläre Infiltrate ohne Zeichen einer akuten oder chronischen Herzinsuffizienz. Aus diagnostischen Gründen wurde eine fiberoptische Bronchoskopie und eine bronchoalveoläre Lavage innerhalb von 72 Stunden nach Intubation der Patienten durchgeführt. Bei progressivem Krankheitsverlauf folgten weitere diagnostische bronchoalveoläre Lavagen. Die Patienten erhielten keine Kortikosteroide. Die mikrobiologische Analyse der BAL-Flüssigkeit zur Identifikation von pathogenen Keimen im unteren Respirationstrakt erbrachte in keiner der untersuchten Proben den Nachweis einer mikrobiellen Infektion.

2.1.2 Normalpersonen-Kollektiv

In dieser Gruppe wurden 9 gesunde Personen evaluiert (6 Männer und 3 Frauen) im Alter zwischen 23 und 26 Jahren. Alle Teilnehmer waren Nichtraucher, hatten keine respiratorischen Vorerkrankungen, nahmen keine Medikamente ein und wiesen normale Lungenfunktionsparameter auf.

2.2 Separation von Alveolarmakrophagen aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten und Normalpersonen

2.2.1 Bronchoalveoläre Lavage

Zur Gewinnung alveolärer Makrophagen von Normalpersonen und Patienten mit ARDS wurde eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. Es wurden 200 ml einer physiologischen Kochsalzlösung (37°) in 20 ml Aliquots in einen subsegmentalen Bronchus des rechten Mittellappens bzw. der Lingula instilliert und anschliessend mittels einer Spritze über den Bronchoskopkanal aspiriert. Zur Entfernung von Schleimpartikeln wurde die gewonnene BAL-Flüssigkeit durch sterile Gaze filtriert. Die in der Lavageflüssigkeit enthaltenen BAL-Zellen wurden in kalzium- und magnesiumfreiem HBSS resuspendiert, anschließend abzentrifugiert und bis zur durchflußzytometrischen Separation in MEM-Medium aufbewahrt. Die Gesamtzellzahl der jeweiligen BAL wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und der Prozentsatz vitaler Zellen durch Trypanblaufärbung (0,5% w/v in PBS) bestimmt. Zur morphologischen Differenzierung der komplexen Zellgemische wurden Zytozentrifugenpräparate hergestellt, indem ca. 100.000 BAL-Zellen auf vertikal montierte Objektträger vier Minuten lang bei 400 rpm zentrifugiert und anschließend bei Raumtemperatur luftgetrocknet wurden. Es folgte eine Fixierung dieser Zytozentrifugenpräparate für 10 min. in May-Grünwald-Lösung mit anschließender Färbung in Giemsa-Lösung (10 % v/v in Aqua dest.; Pappenheim-Färbung). Die Bestimmung der prozentualen Anteile an Alveolarmakrophagen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten sowie Lymphozyten erfolgte mit Hilfe eines Leitz-Mikroskopes bei 500facher Vergrößerung.

2.2.2 Prinzip der Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie erlaubt die Analyse der zellulären Bestandteile komplexer Zellgemische auf Einzelzellbasis. Die Einzelzellerfassung erfolgt hierbei mittels hydrodynamischer Fokussierung in einem Flüssigkeitsstrahl (161). Hierbei werden die zu analysierenden Zellen aus einem Probenröhrchen, in dem sie in Suspension vorliegen, mittels Luftdruck über einen Probenschlauch in einer dünnen Flüssigkeitssäule eingeschlossen, in ein zweites Flüssigkeitssystem eingeleitet, welches in Form einer grossen Flüssigkeitssäule die kleinere Flüssigkeitssäule mit den darin eingeschlossenen Zellen umhüllt. Diese „Mantelflüssigkeit“ weist eine im Vergleich zur kleinen Flüssigkeitssäule höhere Fliessgeschwindigkeit auf, wodurch eine Ver-

einzelung und Fokussierung der Zellen im Zentrum des Flüssigkeitsstrahles erzielt wird (Hydrodynamische Fokussierung). Jede im Flüssigkeitszylinder eingeschlossene Zelle wird anschliessend in einem sogenannten Laser-Intersect vom Licht eines bei 488 nm emittierenden Argonionen-Lasers angestrahlt, wobei jede Zelle ein zelltypcharakteristisches Vorwärts (FCS)- und Seitwärts (SSC)-Streulicht erzeugt, sowie darüber hinaus zur Emission spezifischer Fluoreszenzlichtcharakteristika angeregt wird. Die Fluoreszenzlichtcharakteristika können bei 530 nm (FL1, grüne Fluoreszenz) und 575 nm (FL2, rote Fluoreszenz) mit Hilfe sogenannter Sekundärelektronenvervielfacher (Photomultiplier) amplifiziert und nach Konvertierung in elektrische Signale quantitativ erfasst werden. Sie dienen neben den Streulichtcharakteristika zur Diskriminierung der verschiedenen BAL-Zellpopulationen.

2.2.3 Durchflusszytometrische Isolation von Alveolarmakrophagen

In der vorliegenden Arbeit wurden residente Alveolarmakrophagen, welche mit Hilfe der bronchoalveolären Lavage bei septischen ARDS-Patienten gewonnen wurden, zur Analyse des Genexpressionsprofils pro- und antiinflammatorischer Zytokine mit Hilfe eines durchflusszytometrischen Separationsverfahrens von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten separiert, welche ebenfalls in der BAL-Flüssigkeit von septischen ARDS Patienten enthalten sind.

Zur Separation von AM wurde ein FACStar^{PLUS} Durchflusszytometer verwendet, das zur effizienten Separation grosser biologischer Partikel mit einer MakroSort Einrichtung ausgestattet war. Nach hydrodynamischer Fokussierung der BAL Zellen wird der die Zellen umhüllende Flüssigkeitsstrahl mittels eines piezo-elektrischen Transducers zu Vertikalschwingungen angeregt, so dass der die Zellen umhüllende Flüssigkeitsstrahl im sogenannten Tropfenabrisspunkt (stream breakoff) in Tropfen (droplets) übergeht. Erreicht eine zu separierende Zelle den Tropfenabrisspunkt, so wird der gesamte Flüssigkeitsstrahl kurzzeitig elektrisch geladen, so dass der sich ablösende Tropfen mit der darin enthaltenen Zelle eine elektrische Restladung trägt. Diese Restladung dient nun der Deflexion dieses Tropfens (und damit der zu separierenden Zelle) in einem elektrischen Feld, das zwischen zwei Ablenkungsplatten (deflection plates) anliegt. Die separierten Zellen werden anschliessend in sterilen Probenröhrchen aufgefangen. Der Differentialdruck des Durchflusszytometers wurde auf 8,5 psi (pound force per square inch; $\text{lbf/in}^2 = 68,95 \text{ mbar}$) eingestellt und der piezo-elektrische Transducer mit einer Frequenz von 17,1 kHz betrieben, so dass eine Tröpfchenverzögerung (droplet de-

lay) von 15,2-15,7 Tröpfchen resultierte. Vor der Separation von AM erfolgte die exakte Justierung des Tropfenabrisspunktes durch experimentelle Separation fluoreszierender Kalibrierungsbeads, bis eine Separationsreinheit von >99% erreicht war. Die während der Zellseparation verwendete sterile Kochsalzlösung wurde mit Hilfe eines Limulus-Amöbozytenlysats-Assays routinemässig auf ihren Endotoxingehalt untersucht, der < 10 pg/ml Kochsalzlösung betrug.

Parameter	Justierung
Nozzle-Öffnung (µm)	100
Flussrate (Partikel/s)	ca. 400
Probenflüssigkeitsdruck (psi)	8,5
Transducer- Frequenz (kHz)	17,164
Tröpfchenverzögerung	15,2-15,7
Anzahl deflektierter Tröpfchen	2

Tabelle 1. Durchflusszytometrische Geräteeinstellungen

Für die Separation der AM wurde ein FACStar^{PLUS} Durchflußzytometer verwendet, das mit einem 5W Argon-Ionen Laser mit einem Laser-Output von 200 mW und einer Emissionswellenlänge von 488 nm betrieben wurde. Die Kalibrierung des optischen Systems erfolgte routinemässig mittels standardisierter Kalibrierungsbeads. Als Trägerlösung wurde sterile physiologische Kochsalzlösung verwendet. Die Montage der Flüssigkeitsvorratsbehälter wurde nach Harkins und Galbraith (61) vorgenommen. Vor jeder Separation erfolgte eine Sterilisierung des Probenschlauches mit 0,1%iger (w/v) Natrium-Hypochloridlösung, gefolgt von einem Nachspülen mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Vor der Separation der AM wurden die BAL-Zellen durch ein steriles Nylonsieb (70 µm Maschenweite) gefiltert, um Zellaggregate zu entfernen. Die Separation der AM erfolgte nach den Kriterien der 1) Vorwärtsstreulicht- (FCS) und 2) Autofluoreszenz-Eigenschaften dieser Zellen bei 530 nm. Hierdurch war eine effektive Diskriminierung der AM von sowohl neutrophilen Granulozyten als auch Lymphozyten gewährleistet. Der Probenflüssigkeitsdruck wurde so gewählt, dass eine durchflusszytometrische Analyse von 400 events/s erfolgte. Während der Separationsexperimente wurden die zu separierenden Zellsuspensionen, sowie die bereits separierten AM auf Eis inkubiert. Die Reinheit

der sortierten AM-Präparationen wurde 1) durch eine post-sort Analyse der separierten Zellen überprüft und 2) durch differentialzytologische Auswertung Pappenheim-gefärbter Zellausstrichpräparate bestimmt. Die mittels Trypanblau-Färbung bestimmte Vitalität der sortierten AM war unabhängig von der verwendeten Nozzlegrösse stets >92%. Die Daten der Zellseparationsprozedur wurden computergestützt gespeichert und mit Hilfe der PCLYSYS Software (Becton Dickinson, Heidelberg) für graphische Auswertungen prozessiert.

2.2.4 Einfluss der Nozzlegrösse auf die Alveolarmakrophagenseparation

Da Alveolarmakrophagen eine sehr heterogene Morphologie aufweisen, wurde der Einfluss von Keramikdüsen (Nozzle) verschiedenen Öffnungsdurchmessers (70 µm, 100 µm und 200 µm) auf die Reinheit der separierten AM-Präparationen untersucht. Hierzu wurden zunächst fluoreszierende Kalibrierungspartikel sowie anschliessend alveoläre Makrophagen unter Verwendung der verschiedenen „Nozzles“ separiert und die in Abhängigkeit von der jeweils verwendeten Nozzlegrösse erreichte Reinheit der Separationsfraktionen bestimmt.

2.3 Analyse der Zytokingenexpression in Alveolarmakrophagen von ARDS-Patienten und Normalpersonen

2.3.1 Isolation der Gesamt-RNA

Die Isolation von Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) aus AM erfolgte mit Hilfe eines Rota-Quick Kits gemäss Herstellerangaben. Dieses Verfahren zur Isolation von RNA beruht auf der von Chomczynski und Sacchi (27) beschriebenen sauren Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktions-Methode. Genomische DNA-Kontaminationen in den RNA-Präparationen wurden mittels RNase-freier DNase eliminiert. Hierfür wurden 0,5 µg Gesamt-RNA in 50 mM Tris-HCL (ph 7,8), 100 U RNAsin, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT und 2 U RNase freier Desoxyribonuklease I für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Enzyminaktivierung erfolgte durch Zugabe von 2 µl einer 0,2 % SDS-Lösung. Die RNA-Extraktion erfolgte in 100 µl Phenol-Chloroform-Isopropanol (PCI). Die Ausfällung der RNA wurde mit 2,5fachem Volumen 100 % Ethanol und 0,1 Volumen 2 M Natriumacetat durchgeführt. Die Rücklösung der RNA erfolgte nach zweimaligem Waschen mit 70 % Ethanol in RNase freiem Aqua dest.

2.3.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription der mRNA erfolgte unter Herstellung eines Mastermixes aus 1 x first strand Puffer (10 nM Tris-HCL, pH 8,3, 10 mM MgCL₂, 50 mM KCL, 10 mM Dithiothreitol), 15 nM random Hexanukleotiden (als Primer), 20 U RNAsin, 1 mM der jeweiligen dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und 100 U Moloney murine leukemia virus (MMLV) Reverse Transkriptase in einem Endvolumen von 25 µl. Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) erfolgte in einem GeneAmp PCR System 2400 während einer 50-minütigen Inkubation bei 37°C; in einem anschließenden Schritt wurde die Enzymaktivierung durch Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 94°C (7 min.) erreicht. Bis zur anschließenden PCR-Analytik wurden die cDNA Präparationen bei -85°C gelagert.

2.3.3 Polymerasekettenreaktion

Der Nachweis der Zytokingenexpression in Alveolarmakrophagen von septischen ARDS-Patienten und Kontrollprobanden erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente zum Nachweis der AM-Zytokingenexpression für proinflammatorische (TNF α , IL-6, IL-8, MCP-1) und antiinflammatorische Zytokine (IL-10, IL-1ra). Als interner Standard wurde das Haushaltsgen β -Aktin bei jeder PCR-Amplifikation mitbestimmt. Zur semiquantitativen Analyse der pro- und antiinflammatorischen Zytokingenexpressionsmuster in Alveolarmakrophagen von septischen ARDS Patienten und Kontrollpersonen wurden die unterschiedlichen cDNA Konzentrationen der einzelnen Proben durch Verdünnung mit Aqua dest. einander angeglichen, so dass in PCR-Reaktionen zur Analyse des Haushaltsgens β -Aktin vergleichbare Bandenintensitäten nachgewiesen wurden. Vor Analyse der Zytokingenexpression wurden die Magnesium- und Primerkonzentrationen sowie die Anzahl der PCR-Zyklen so optimiert, dass die Amplifikation der cDNA in der exponentiellen Phase der PCR verlief. Abbildung 2 (A und B) illustriert die lineare Korrelation zwischen Input-cDNA-Konzentration und IL-8 PCR-Produkt (35 Zyklen Amplifikation) nach Hybridisierung mit [³²P]-markierter IL-8 Sonde (A), Abb. 2B zeigt die korrespondierend hybridisierte Nylonmembran. Die Validität der Ergebnisse der PCR Analysen wurden überprüft, indem jede cDNA Präparation mindestens drei unabhängigen Reaktionsansätzen unterworfen wurde. Tabelle 2 listet die spezifischen Sequenzen der verwendeten Intron-übergreifenden Primer

sowie die Fragmentgrösse der PCR-Produkte. Die Validität der resultierenden PCR-Produkte wurde mit Hilfe einer automatischen DNA-Sequenzierungsapparatur in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Bad Nauheim analysiert. Durch Vergleich der resultierenden cDNA-Sequenzen mit den publizierten cDNA Sequenzen der korrespondierenden Zytokine wurden die PCR-Produkte eindeutig als Segmente der gespleißten Zytokin- bzw. β -Aktin mRNA Spezies identifiziert. Der PCR-Ansatz bestand aus 1 x PCR-Puffer (mit 1,5 mM $MgCl_2$ Konzentration), 2 % Formamid, 1mM der jeweiligen dNTPs, 1 μ M der zytokinspezifischen 5` und 3`Primer, 0,75U AmpliTaq DNA Polymerase und 2 μ l der zu analysierenden cDNA-Proben. Die PCR-Amplifikation erfolgte in einem Volumen von 25 μ l in einem GeneAmp PCR System 2400. Initial wurde der PCR-Ansatz bei 94°C für 90 Sekunden denaturiert mit darauffolgendem „primer annealing“ bei 60°C für 45 Sekunden und „primer extension“ bei 72°C für ebenfalls 45 Sekunden. Dieser Zyklus wurde für β -Aktin 25mal und für die proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokine 35mal wiederholt. Am Ende wurde eine „ primer extension“ bei 72°C für 7 min. durchgeführt.

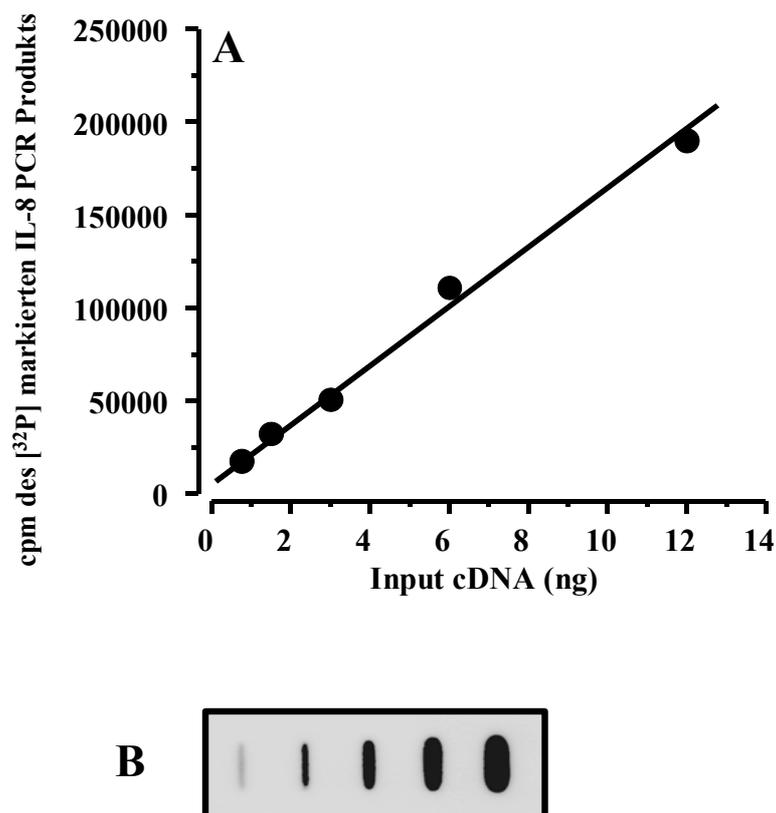


Abbildung 2. Korrelation zwischen Input cDNA-Konzentration und IL-8 PCR-Produktausbeute nach 35 Zyklen der Amplifikation.

Jede PCR-Reaktion schloss eine positive und eine negative Kontrolle ein. Als Positivkontrolle wurden zum PCR-Reaktionsgemisch 2 µl einer cDNA-Präparation von AM verwendet, welche ex vivo 6h mit LPS (100 ng/ml) stimuliert wurden. Die jeweiligen PCR-Produkte wurden über ein 1,8 %iges Nusieve/Agarosegel bei 75 V für 120 min. elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Kodak X 667 Film photographiert.

Spec.	Oligonukleotid-Primersequenzen	Fragmentgrösse	Referenz
β-Aktin	5'-AAAGACCTGTACGCCAACACAGTGCTGTCT-3' 5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTG-3'	220 bp	(121)
TNF-α	5'-CGGGACGTGGAGCTGGCCGAGGAG-3' 5'-CACCAGCTGGTTATCTCTCAGCTC-3'	355 bp	(166)
IL-6	5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC-3' 5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'	628 bp	(69)
IL-8	5'-AGATGTCAGTGCATAAAGACA-3' 5'-TGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAA-3'	202 bp	(111)
MCP-1	5'-TGAAGCTCGCACTCTCGCCT-3' 5'-GTGGAGTGAGTGTTC AAGTC-3'	338 bp	(174)
IL-1ra	5'-CCTCCGCAGTCACCTAATCA-3' 5'-GCTTCCATCGCTGTGCAG-3'	438 bp	(39)
IL-10	5'-AAGGATCCATGCACAGCTCAGCACTGC-3' 5'-CTG CTC CAC TGC CTT GCT CTT ATT-3'	204 bp	(168)

Tabelle 2. Spezifikationen der verwendeten Oligonukleotid-Primer

2.3.4 Semiquantitative Analyse der Zytokingenexpressionsmuster

Die Analyse der proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokingenexpressionsmuster in AM von ARDS-Patienten und Normalpersonen erfolgte semiquantitativ mittels radioaktiv markierter zytokinspezifischer Sonden. Nach Ablauf der PCR wurden 4µl Aliquots der PCR-Produkte für β- Aktin, TNF-α, IL-6, IL-8, MCP-1, IL-10 und IL-1ra bei 94°C für 6 min. denaturiert und auf 4°C abgekühlt. Es folgte ein „Blotten“ der PCR- Produkte auf eine

Nylonmembran mittels einer slot-blot Apparatur, eine irreversible Bindung der PCR-Fragmente auf der Membran wurde durch eine zweistündige Inkubation der Membranen in einem Hybridisierungssofen bei 80°C erreicht. Der Hybridisierungspuffer bestand aus 5 x SSC, 1% SDS, 5% Denhardt's Lösung und 100µg/ml hitzedenaturierter Heringssperma-DNA. Auch die für die Quantifizierung erforderlichen spezifischen Zytokinsonden wurden mittels PCR hergestellt, indem cDNA-Proben LPS-stimulierter AM in der PCR amplifiziert und anschliessend säulenchromatographisch aufgereinigt wurden. Die Radioaktivmarkierung der Sonden erfolgte mit α [³²P] dCTP. Die Aufreinigung der Sonden und die Entfernung nicht gebundener Radioaktivität erfolgte säulenchromatographisch mit Hilfe von Sephadex G 50 Säulen. Mit diesen zytokinspezifischen radioaktivmarkierten Hybridisierungssonden erfolgte anschliessend eine Hybridisierung der Nylonmembranen mit den darauf geblotteten Zytokin cDNAs aus Alveolarmakrophagen von ARDS-Patienten und Kontrollpersonen für 12 Stunden. Anschliessend wurden die Membranen bei 24°C und 42°C in Waschpuffer I und II gewaschen. Danach erfolgte die Autoradiographie für 90 Minuten und eine Auswertung der jeweiligen Bandenintensitäten mit Hilfe eines Phospho-Imagers. Die Daten zur Zytokinexpressionanalyse sind in der vorliegenden Arbeit als Quotienten der jeweiligen Zytokinexpression relativ zur Genexpression des Haushaltsgens β -Aktin in willkürlichen Einheiten (AU) dargestellt.

2.4 Kultivierung von Alveolarmakrophagen und Quantifizierung der Zytokinsekretion

2.4.1 Kultivierung durchflusszytometrisch separierter Alveolarmakrophagen

Zur Charakterisierung des inflammatorischen Potentials durchflusszytometrisch separierter Alveolarmakrophagen von ARDS Patienten im Vergleich zu dem von Kontrollprobanden wurden die separierten AM in MEM-Medium, welches mit 10% FCS, 100U/ml Penicillin/Streptomycin und 2mM Glutamin supplementiert wurde, kultiviert. Es wurden 2×10^4 AM/ml in 24 Well Polystyren Kulturplatten bei 37°C/5%CO₂ in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre 16 h lang unstimuliert, mit LPS (100 ng/ml) bzw. LPS plus IFN γ (300 U/ml) inkubiert. Anschliessend wurden die zellfreien Kulturüberstände in 500 µl Aliquots bis zur Quantifizierung der Zytokinkonzentrationen bei -85°C eingefroren.

2.4.2 Quantifizierung der Zytokinkonzentration in den BAL- und Kulturüberständen von Alveolarmakrophagen septischer ARDS-Patienten und Kontrollprobanden

Die Quantifizierung der sezernierten proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokine in BAL- oder Kulturüberständen separierter Alveolarmakrophagen erfolgte unter Verwendung eines enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 4°C mit 50 µl/well eines polyklonalen Ziegen Antikörpers (1 µg/ml in Beschichtungspuffer) mit Spezifität für humanes TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1, IL-1ra und IL-10 Zytokin inkubiert. Nicht gebundenes Reagens wurde durch Waschen der Platten mit Waschlösung (0,05 % v/v Tween-20 in Aqua dest.) entfernt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurden die Wells 2h mit je 200 µl eines Caseinpuffers (0,2% w/v in PBS) bei RT inkubiert. Nach Zugabe der zu testenden Probe und erneutem Waschen wurden 50 µl eines monoklonalen Antikörpers (1µg/ml in 0,2% Caseinpuffer) mit Spezifität für das zu quantifizierende Zytokin in die wells pipettiert und wiederum 2h bei RT inkubiert. In einem dritten Reaktionsschritt wurden die Wells zunächst 1h mit je 50µl eines biotinylierten polyklonalen Ziege anti Maus Ig Antikörpers (1µg/ml in Caseinpuffer) bei 37°C inkubiert und nach anschliessendem Waschen 1h mit 50µl einer ca. 1:50 verdünnten Avidin/biotinylierte Meerrettichperoxidase-Lösung (ABC-Lösung) bei 37°C inkubiert. Abschliessend erfolgte die Detektion des gebundenen Enzyms durch einstündige Inkubation der Wells mit ABTS sowie H₂O₂ als Substrat bei RT. Durch serielle Verdünnungen des jeweiligen rekombinanten Zytokins wurden Standardkurven erstellt und für die Quantifizierung der Zytokine herangezogen, welche in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Die Absorptionsmessungen erfolgten bei 405 nm unter Verwendung eines ELISA-Plattenphotometers. Die untere bzw. obere Nachweisgrenze der Zytokin-Assays lag bei 5 bzw. 1000 pg Protein pro ml Kulturüberstand.

2.5 Statistik

Die Daten sind als Median \pm Standardabweichung angegeben. Zur Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen Gruppen-Medianen wurde ein ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Unter Verwendung der Pearson Korrelationskoeffizienten-Berechnung erfolgte die Korrelation zwischen den Parametern. Werte von $p < 0,05$ wurden als

statistisch signifikant betrachtet. Die statistischen Erhebungen wurden unter Zuhilfenahme des Statistikprogrammes SPSS[®] für MS Windows[®] berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Zytologische Differenzierung der bronchoalveolären Lavage von ARDS-Patienten und Kontrollprobanden

Tabelle 3 zeigt das Ergebnis der Differentialzytologie der bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten (BAL-Flüssigkeiten) von Normalpersonen und ARDS-Patienten. In den BAL-Flüssigkeiten von Normalpersonen stellten residente AM den grössten prozentualen Anteil an der Gesamtzellzahl dar, der PMN Anteil war sehr gering. Dagegen fand sich in den BAL-Flüssigkeiten von ARDS-Patienten ein sehr hoher prozentualer Anteil an PMN, der Anteil der Alveolarmakrophagen war gegenüber den Normalpersonen entsprechend erniedrigt. Interessanterweise war die Absolutzahl der Alveolarmakrophagen in den BAL-Flüssigkeiten von ARDS-Patienten nicht erniedrigt (ca. 14 Mio. AM bei ARDS vs. 12.7 Mio. bei Normalpersonen). Die Unterschiede in der Zellzusammensetzung der BAL-Flüssigkeiten von ARDS-Patienten und Normalpersonen beeinflusste nicht den durchflusszytometrisch erzielten Aufreinigungsgrad der separierten Alveolarmakrophagen.

Studiengruppe	Differentialzytologie			
	Zellen ($\times 10^6$) (mean \pm SEM)	AM (%) (mean \pm SEM)	PMN (%) (mean \pm SEM)	LY (%) (mean \pm SEM)
Normalpersonen (n=9)	14 \pm 2	90.5 \pm 1.5	0.3 \pm 0.2	8.5 \pm 1.5
ARDS (n=15)	38 \pm 4.5	37 \pm 2.4	57 \pm 2.4	5 \pm 0.9

Tabelle 3. Leukozytenpopulationen in den bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten von Patienten mit ARDS und Normalpersonen

3.2 Einfluss der verwendeten Keramikdüse (Nozzlegröße) auf den Aufreinigungsgrad durchflusszytometrisch separierter Alveolarmakrophagen

Die besten Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Separation von AM wurden bei Verwendung einer 100 µm Keramikdüse erzielt. Der Vorteil der Verwendung einer 100 µm Keramikdüse gegenüber der 70 µm und der 200 µm Keramikdüse lag in der Erzielung höherer Aufreinigungsgrade zusammen mit einer geringeren Verstopfungswahrscheinlichkeit und einer grösseren Zellausbeute.

Die mit Verwendung einer 100 µm Keramikdüse erreichten Aufreinigungsgrade lagen bei ca. 96% mit einer Zellausbeute von ca. 50-60%. Demgegenüber wurden bei Verwendung einer 200 µm Keramikdüse Zellausbeuten von lediglich 30% gegenüber den mit einer 100 µm Keramikdüse erreichten Zellausbeuten erzielt. Die Vitalität der Alveolarmakrophagen wurde durch die verwendeten Düsen nicht beeinträchtigt; unabhängig von der jeweils getesteten Keramikdüsenweite wurden Zellvitalitäten > 92% erreicht. Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Separationsexperimente wurden daher durchweg 100 µm Keramikdüsen verwendet.

Abbildung 3 zeigt die repräsentative Analyse durchflusszytometrisch separierter Alveolarmakrophagen eines ARDS-Patienten sowie einer Normalperson. In der BAL von Normalpersonen stellen Alveolarmakrophagen die dominierende Zellpopulation dar. Demgegenüber führt der starke PMN-Einstrom in den Alveolarraum bei ARDS-Patienten zu einer deutlichen Reduktion des Alveolarmakrophagenanteils. Die durchflusszytometrische Separation von AM von ARDS-Patienten bzw. Normalpersonen liefert indes vergleichbar hochaufgereinigte (>96%) Alveolarmakrophagen-Präparationen.

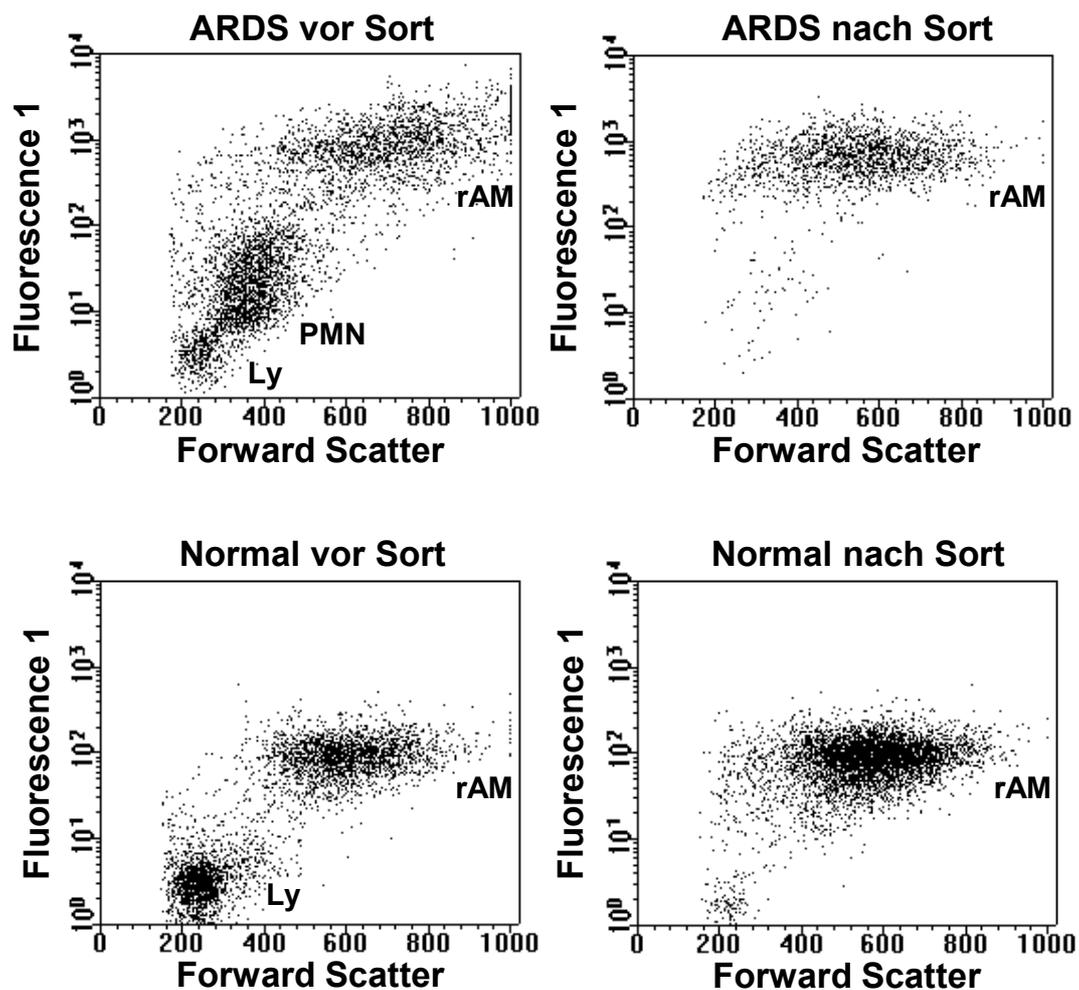


Abbildung 3. Repräsentative Analyse der durchflusszytometrischen Separation residenter Alveolarmakrophagen aus der bronchoalveolären Lavage von ARDS Patienten und Normalpersonen. Die linken Dot Plots zeigen die zelluläre Verteilung in der BAL der Studienkollektive vor Separation; die rechten Dot Plots zeigen die Re-Analyse der separierten BAL-Zellen nach Separation.

3.3 Analyse der pro- und antiinflammatorischen Zytokingenexpression in Alveolarmakrophagen von ARDS-Patienten und Normalpersonen

Abbildung 4 illustriert ein repräsentatives Autoradiogramm zur Quantifizierung der Zytokingenexpression in durchflusszytometrisch separierten Alveolarmakrophagen von Patienten mit ARDS bzw. Normalpersonen.

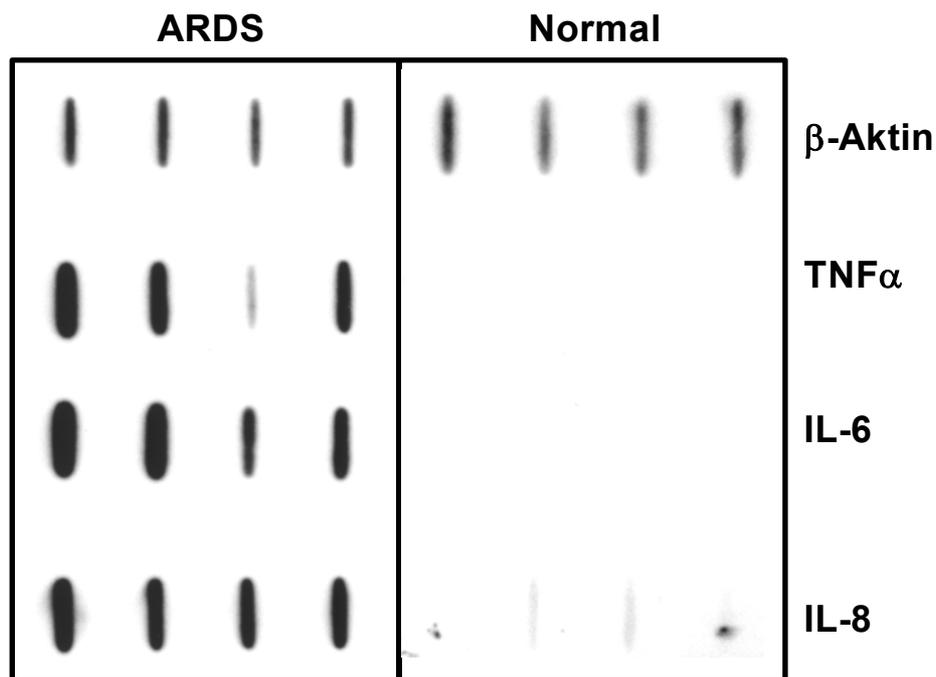


Abbildung 4. Repräsentatives Autoradiogramm der Zytokingenexpressionsanalyse (TNF- α , IL-6, IL-8) relativ zur β -Aktinexpression in durchflusszytometrisch separierten Alveolarmakrophagen von 4 Patienten mit ARDS und 4 Normalpersonen.

3.3.1 Analyse der TNF- α Genexpression in Alveolarmakrophagen septischer ARDS Patienten und Normalpersonen

Die Analyse der TNF- α Genexpression primär lavagierter ARDS-Patienten (BAL I) zeigte im Vergleich zur TNF- α Genexpression der AM von Normalpersonen signifikant erhöhte Werte (ARDS-Patienten $0,3 \pm 0,1$ AU vs NP $0,04 \pm 0,01$ AU; $p < 0,01$). Die Analyse der TNF- α Genexpression sekundär lavagierter ARDS-Patienten (BAL II) zeigte eine deutliche Abnahme der TNF- α Genexpression (BAL II $0,1$ AU) um den Faktor 3 im Vergleich zur TNF- α Genexpression primär lavagierter ARDS-Patienten. Die weitere Evaluierung der TNF- α Genexpression aus AM tertiär lavagierter ARDS-Patienten (BAL III) ergab eine weitere Abnahme der TNF- α Genexpression (BAL III $0,035$ AU) um den Faktor 8,6 im Vergleich zur TNF- α Genexpression primär lavagierter ARDS-Patienten und um den Faktor 2,9 im Vergleich zur TNF- α Genexpression sekundär lavagierter ARDS-Patienten (Abb.5). Der individuelle Verlauf der TNF- α Genexpression eines ARDS-Patienten wird in Abbildung 5a illustriert und zeigt exemplarisch den Abfall der TNF- α Genexpression im Krankheitsverlauf.

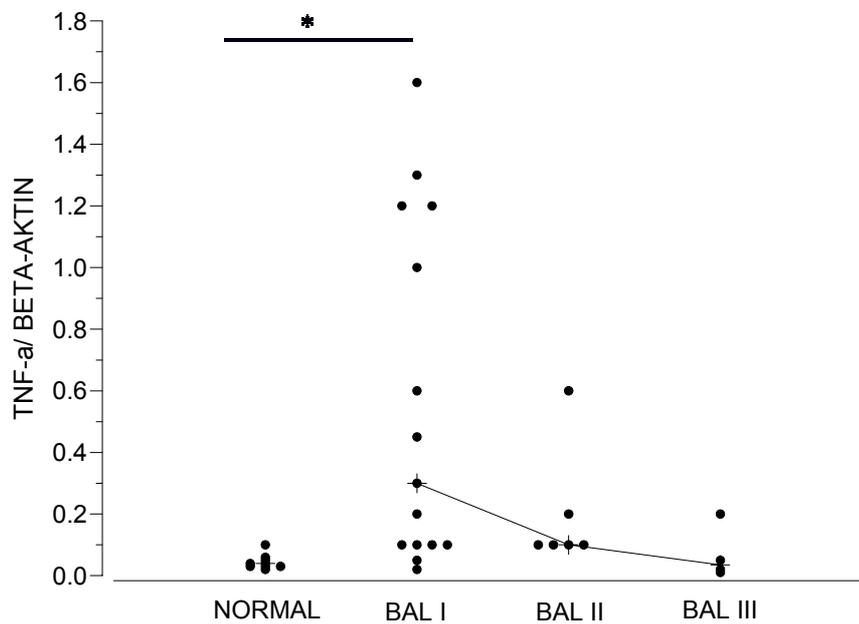


Abbildung 5. Analyse der TNF α Genexpression in durchflusszytometrisch separierten Alveolarmakrophagen von ARDS-Patienten (BAL I n=15; BAL II n=6; BAL III n=4) und Normalpersonen (n=9). Die Mittelwerte sind im Verlauf als Linie gekennzeichnet.

(* p < 0.01 ARDS vs. NP)

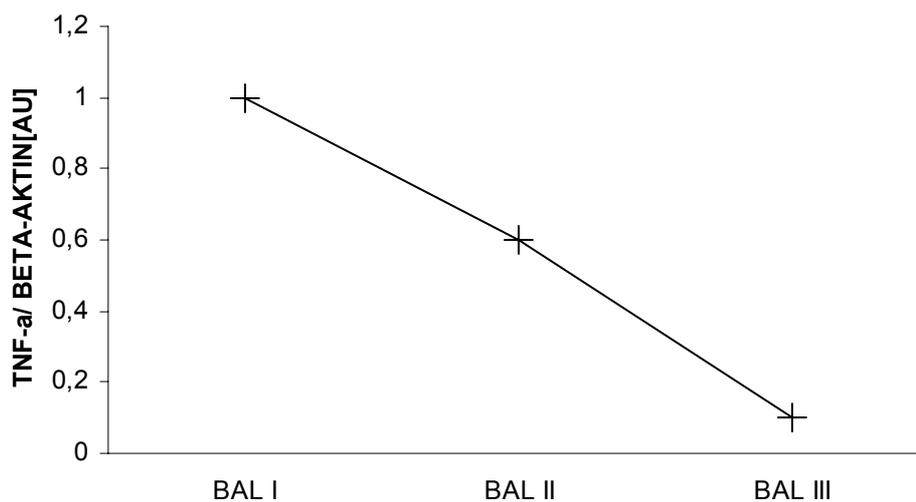


Abbildung 5a. Exemplarische Analyse der sequentiellen TNF α Genexpression in durchflusszytometrisch separierten Alveolarmakrophagen eines ARDS-Patienten.

3.3.2 Analyse der Interleukin 6 (IL-6) Genexpression in Alveolarmakrophagen septischer ARDS-Patienten und Kontrollprobanden

Die Evaluierung der IL-6 Genexpression von AM primär lavagierter ARDS-Patienten (BAL I) zeigte im Vergleich zur IL-6 Genexpression der AM von Normalpersonen signifikant erhöhte Werte (Abb. 6) (ARDS-Patienten $0,9 \pm 0,1$ AU vs. NP $0,1 \pm 0,01$ AU; $p < 0,01$), wohingegen in AM sekundär lavagierter ARDS-Patienten (BAL II) eine deutliche Abnahme der IL-6 Genexpression (BAL II $0,1$ AU) um den Faktor 9 im Vergleich zur IL-6 Genexpression primär lavagierter ARDS-Patienten zu beobachten war (Abb.6). Die nähere Analyse der IL-6 Genexpression in AM tertiär lavagierter ARDS-Patienten (BAL III) zeigte eine weitere Abnahme der IL-6 Genexpression (BAL III $0,06$ AU) um den Faktor 15 vergleichend zur IL-6 Genexpression primär lavagierter ARDS-Patienten (BAL I) und um den Faktor 1,7 vergleichend zur IL-6 Genexpression sekundär lavagierter ARDS-Patienten (BAL II).

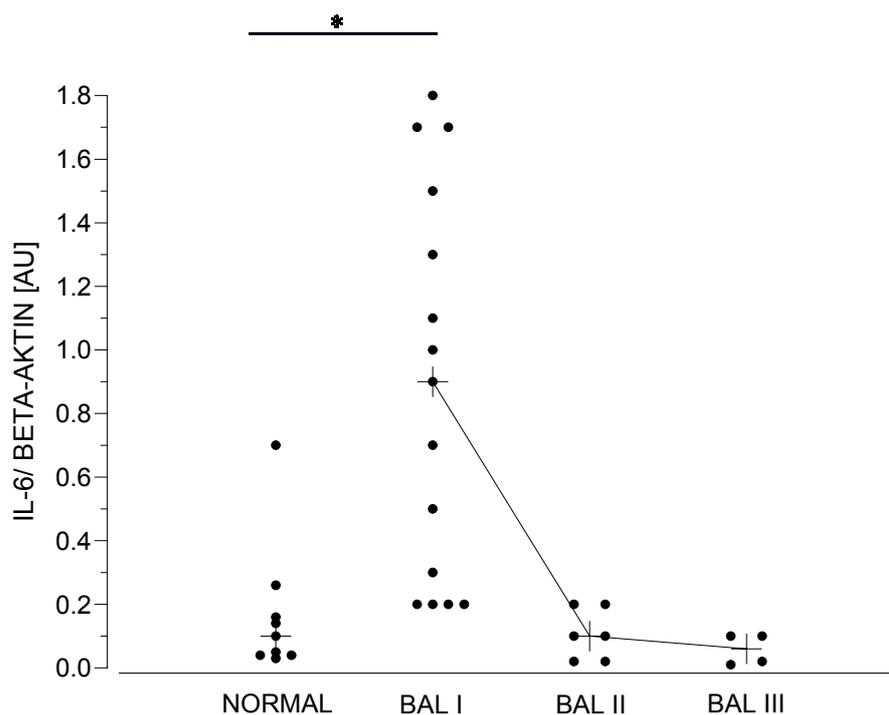


Abbildung 6. Analyse der IL-6 Genexpression in durchflusszytometrisch separierten Alveolarmakrophagen von ARDS-Patienten (BAL I n=15; BAL II n=6; BAL III n=4) und Normalpersonen (n=9). Die Mittelwerte sind im Verlauf als Linie gekennzeichnet. (* $p < 0,01$ ARDS vs. NP)

3.3.3 Analyse der Interleukin 8 (IL-8) Genexpression in Alveolarmakrophagen septischer ARDS-Patienten und Kontrollprobanden

Die Analyse der IL-8 Genexpression in Alveolarmakrophagen primär lavagierter ARDS Patienten (BAL I) zeigte signifikant erhöhte Werte im Vergleich zur IL-8 Genexpression in Alveolarmakrophagen von Kontrollprobanden (Abb.7) (ARDS-Patienten $1,0 \pm 0,1$ AU vs. NP $0,3 \pm 0,01$ AU; $p < 0,01$). In Alveolarmakrophagen sekundär lavagierter ARDS-Patienten (BAL II) war der IL-8 Genexpressionsspiegel um den Faktor 1,8 gegenüber der IL-8 Genexpression in Alveolarmakrophagen primär lavagierter ARDS-Patienten (BAL I) reduziert. In Alveolarmakrophagen tertiär lavagierter ARDS-Patienten (BAL III) zeigte sich eine weitere Abnahme der IL-8 Genexpression im Vergleich zu Alveolarmakrophagen sekundär lavagierter ARDS-Patienten (BAL II) um den Faktor 1,9 (Abb. 7). Insgesamt zeigte sich eine Abnahme der IL-8 Genexpression tertiär lavagierter ARDS-Patienten (BAL III) zu AM primär lavagierter ARDS-Patienten (BAL I) um den Faktor 3,3 (Abb.7).

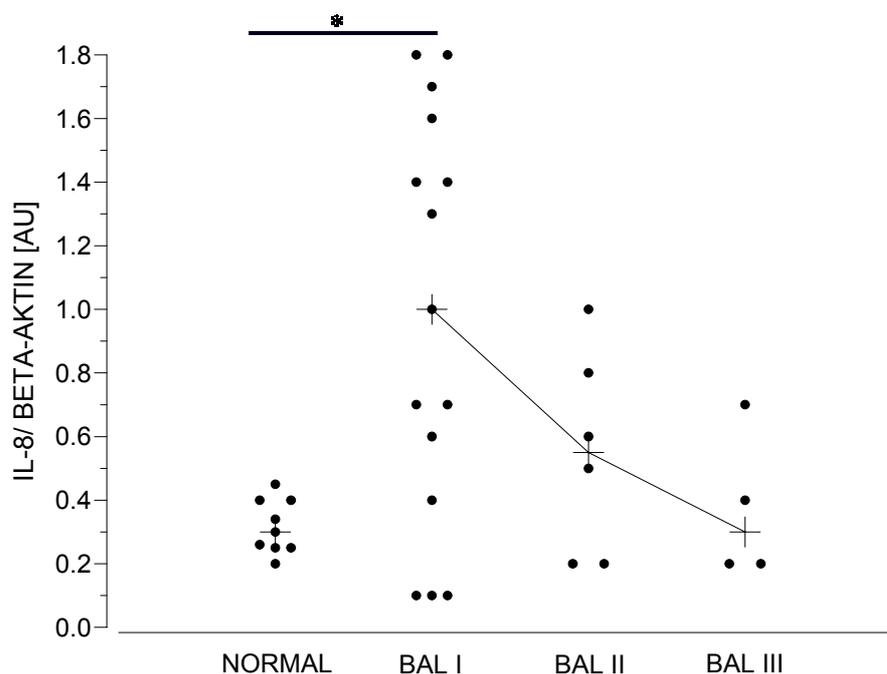


Abbildung 7. Analyse der IL-8 Genexpression in durchflusszytometrisch separierten Alveolarmakrophagen von ARDS-Patienten (BAL I n=15; BAL II n=6; BAL III n=4) und Normalpersonen (n=9). Die Mittelwerte sind im Verlauf als Linie gekennzeichnet (* $p < 0.01$ ARDS vs. NP).

3.3.4 Analyse der Genexpression des Monozyten Chemotaktischen Proteins–1 (MCP-1) in Alveolarmakrophagen septischer ARDS-Patienten und Kontrollprobanden

Die Analyse der MCP-1 Genexpression primär lavagierter ARDS-Patienten (BAL I) zeigte im Vergleich zur MCP-1 Genexpression der AM von Normalpersonen signifikant erhöhte Werte (Abb.8)(ARDS-Patienten $0,77 \pm 0,01$ AU vs. NP $0,5 \pm 0,1$ AU; $p < 0,05$). Eine Abnahme der MCP-1 Genexpression fand sich in AM sekundär lavagierter ARDS-Patienten (BAL II) um den Faktor 1,3 gegenüber der MCP-1 Genexpression primär lavagierter ARDS-Patienten (BAL I). Die Abnahme der MCP-1 Genexpression fand sich auch in AM tertiär lavagierter ARDS-Patienten (BAL III), verglichen zur MCP-1 Genexpression der AM sekundär lavagierter ARDS-Patienten (BAL II) um den Faktor 2,2 (Abb.8). Insgesamt zeigte sich eine Abnahme der MCP-1 Genexpression primär lavagierter ARDS-Patienten (BAL I) zu AM tertiär lavagierter ARDS-Patienten (BAL III) um den Faktor 2,8 (Abb.8)

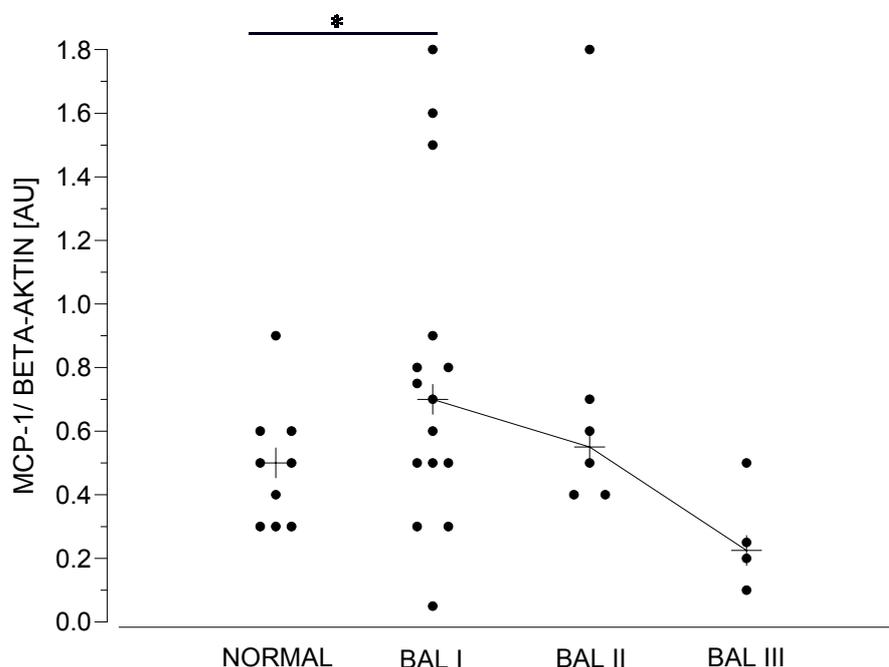


Abbildung 8. Analyse der MCP-1 Genexpression in durchflusszytometrisch separierten Alveolarmakrophagen von ARDS-Patienten (BAL I n=15; BAL II n=6; BAL III n=4) und Normalpersonen (n=9). Die Mittelwerte sind im Verlauf als Linie gekennzeichnet.

(* $p < 0.05$ ARDS vs. NP)

3.3.5 Analyse der Interleukin 1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra) Genexpression in Alveolarmakrophagen septischer ARDS-Patienten und Kontrollprobanden

Die Evaluierung der IL-1ra Genexpression primär lavagierter ARDS-Patienten (BAL I) zeigte im Vergleich zur IL-1ra Genexpression der AM von Normalpersonen nicht-signifikant erniedrigte Werte (ARDS-Patienten $0,9 \pm 0,1$ AU vs. NP $1,5 \pm 0,1$ AU). Die IL-1ra Genexpression in Alveolarmakrophagen sekundär lavagierter ARDS-Patienten (BAL II) zeigte im Vergleich zur IL-1ra Genexpression primär lavagierter ARDS-Patienten (BAL I) eine gleichbleibende IL-1ra Genexpression (Abb.9 BAL I $0,9$ AU vs. BAL II $0,85$ AU). Die IL-1ra Genexpression in AM tertiär lavagierter ARDS-Patienten (BAL III), war zwar gegenüber der IL-1ra Genexpression primär lavagierter ARDS-Patienten um den Faktor 1,3 erhöht, diese Steigerung der IL-1ra Genexpression war jedoch nicht statistisch signifikant. Ein ebenfalls nicht signifikanter Anstieg um den Faktor 1,4 fand sich in der IL-1ra Genexpressionsanalyse von AM tertiär lavagierter ARDS-Patienten (BAL III) gegenüber der IL-1ra Genexpression in AM sekundär lavagierter ARDS-Patienten (BAL II). Somit ließ sich in Alveolarmakrophagen aller lavagierten ARDS-Patienten (BAL I-BAL III) im Vergleich zu Normalpersonen eine tendenziell, jedoch nicht signifikant erniedrigte IL-1ra Genexpression nachweisen.

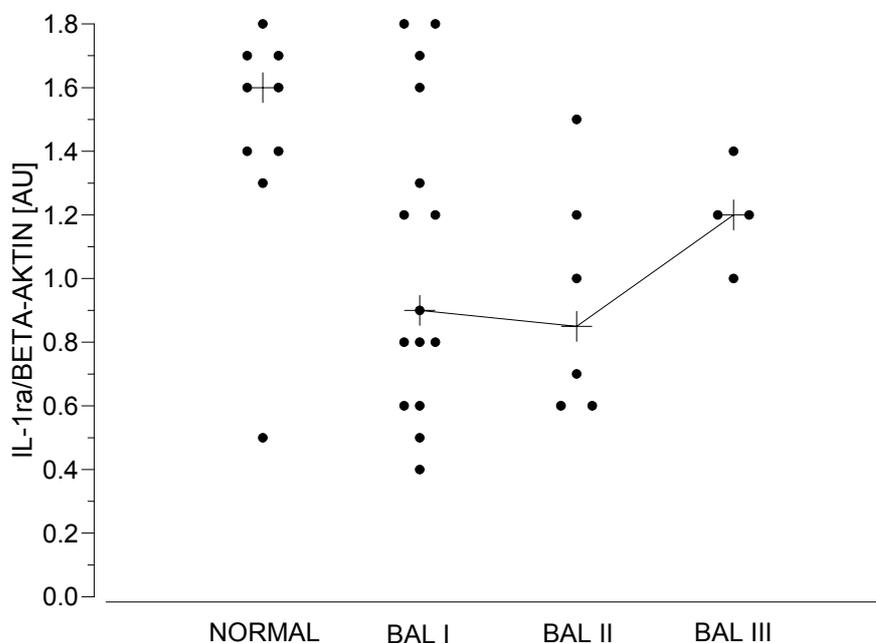


Abbildung 9. Analyse der IL-1ra Genexpression in durchflusszytometrisch separierten Alveolarmakrophagen von ARDS-Patienten (BAL I n=15; BAL II n=6; BAL III n=4) und Normalpersonen (n=9). Die Mittelwerte sind im Verlauf als Linie gekennzeichnet.

3.3.6 Analyse der Interleukin 10 (IL-10) Genexpression in Alveolarmakrophagen septischer ARDS-Patienten und Kontrollprobanden

Die Analyse der IL-10 Genexpression in Alveolarmakrophagen primär lavagierter ARDS-Patienten (BAL I) zeigte im Vergleich zur IL-10 Genexpression von AM lavagierter Normalpersonen hochsignifikant erhöhte IL-10 mRNA Spiegel (Abb.10) (ARDS-Patienten $0,3 \pm 0,1$ AU vs. NP $0,05 \pm 0,01$ AU; $p < 0,01$). Eine weitere hochsignifikante Steigerung der IL-10 Genexpression fand sich in AM sekundär lavagierter ARDS-Patienten (BAL II) im Vergleich zu der Genexpression in AM primär lavagierter ARDS-Patienten (BAL I) (Faktor 2,3). Demgegenüber war die IL-10 Genexpression in AM tertiär lavagierter ARDS-Patienten (BAL III) um Faktor 2 im Vergleich zu AM der BAL II von ARDS-Patienten und damit auf das Niveau von BAL I reduziert (Abb.10).

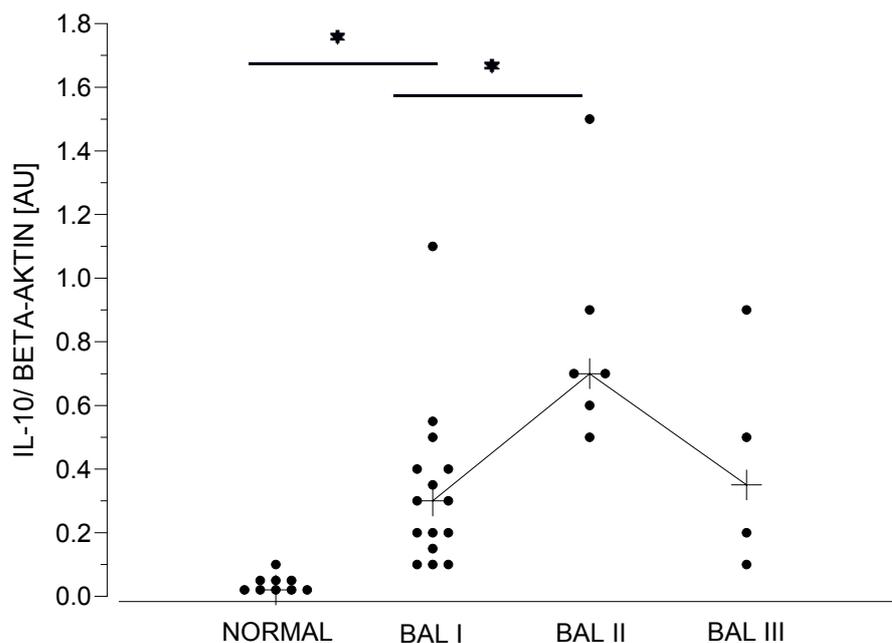


Abbildung 10. Analyse der IL-10 Genexpression in durchflusszytometrisch separierten Alveolarmakrophagen von ARDS-Patienten (BAL I n=15; BAL II n=6; BAL III n=4) und Normalpersonen (n=9). Die Mittelwerte sind im Verlauf als Linie gekennzeichnet (* $p < 0.01$ ARDS vs. NP) ($p < 0.05$ BAL I vs. BAL II).

Tabelle 4 fasst die Analyse der pro- und antiinflammatorischen Zytokingenexpressionsprofile in durchflusszytometrisch separierten Alveolarmakrophagen von septischen ARDS-Patienten und Kontrollprobanden als Übersicht zusammen. Die statistische Auswertung erfolgte für die erste bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BAL I) der ARDS-Patienten im Vergleich zu Normalpersonen.

Zytokine		ARDS	NP	P-Wert <
Proinflammatorisch		[AU]	[AU]	
TNF- α	BAL I	0.30 (0.01-1.6)	0.04 (0.02-0.1)	0.01
	BAL II	0.10 (0.1-0.6)		
	BAL III	0.035 (0.02-0.2)		
IL-8	BAL I	1.00 (0.1-1.8)	0.3 (0.2-0.4)	0.01
	BAL II	0.58 (0.1-0.1.0)		
	BAL III	0.30 (0.2-0.7)		
IL-6	BAL I	0.90 (0.2-1.8)	0.1 (0.03-1.7)	0.01
	BAL II	0.10 (0.2-0.1.8)		
	BAL III	0.06 (0.01-0.1)		
MCP-1	BAL I	0.70 (0.05-1.8)	0.5 (0.3- 0.9)	0.05
	BAL II	0.55 (0.4-1.8)		
	BAL III	0.25 (0.1-0.5)		
Antiinflammatorisch				
IL- 1ra	BAL I	0.90 (0.5-1.8)	1.5 (0.5-1.8)	n.s.
	BAL II	0.85 (0.4-1.8)		
	BAL III	1.20 (1.0-1.4)		
IL-10	BAL I	0.30 (0.1-1.1)	0.05 (0.02-0.2)	0.01
	BAL II	0.70 (0.5-1.5)		
	BAL III	0.35 (0.1-0.9)		

Tabelle 4. Analyse der pro- und antiinflammatorischen Zytokingenexpressionsprofile in durchflusszytometrisch separierten Alveolarmakrophagen von septischen ARDS Patienten und Normalpersonen. Gegeben sind Mittelwerte sowie Minimum-Maximum Werte in Klammern. n.s. = nicht signifikant.

3.4 Analyse des pro- und antiinflammatorischen Zytokinprofils in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten und Normalpersonen

3.4.1 Analyse des Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) Zytokinspiegels in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten und Kontrollprobanden

Abbildung 11 zeigt die TNF- α Proteinkonzentrationen in der BAL- Flüssigkeit von ARDS-Patienten im Vergleich zur TNF- α Konzentration in der BAL-Flüssigkeit von Normalpersonen. BAL- Flüssigkeiten von ARDS Patienten wiesen gegenüber den TNF- α Proteinkonzentrationen in der BAL von Kontrollprobanden signifikant erhöhte Werte auf (Abb.11).

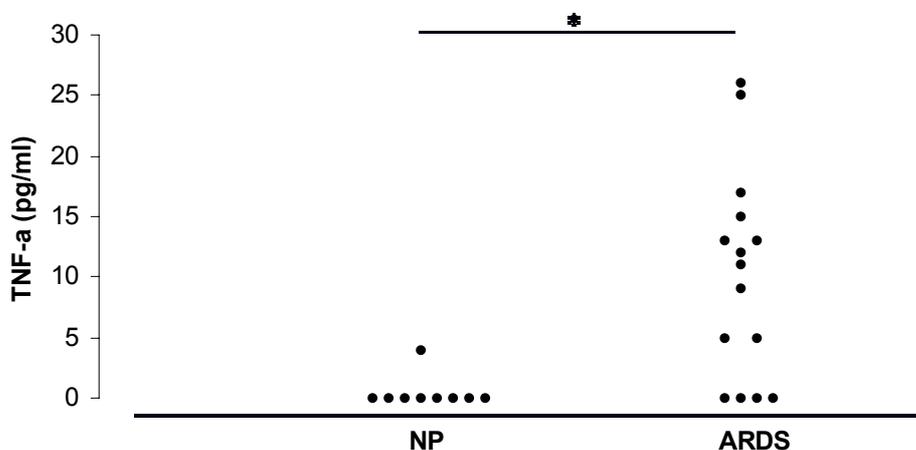


Abbildung 11. Analyse der TNF- α Proteinkonzentration in der BAL-Flüssigkeit von ARDS-Patienten (n=15) und Normalpersonen (n=9) (* p<0.01 ARDS vs. NP).

3.4.2 Analyse des Interleukin 8 (IL-8) Zytokinspiegels in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten und Kontrollprobanden

Die IL-8 Konzentration in den BAL- Flüssigkeiten von ARDS-Patienten war im Vergleich zur IL-8 Konzentration in den BAL-Flüssigkeiten von Normalpersonen signifikant erhöht (Abb.12, p<0,05). Der ermittelte Median bei den Proben der ARDS Patienten betrug 236 pg/ml. In den BAL- Flüssigkeit von Normalpersonen ließ sich kein IL-8 Protein nachweisen (Abb.12).

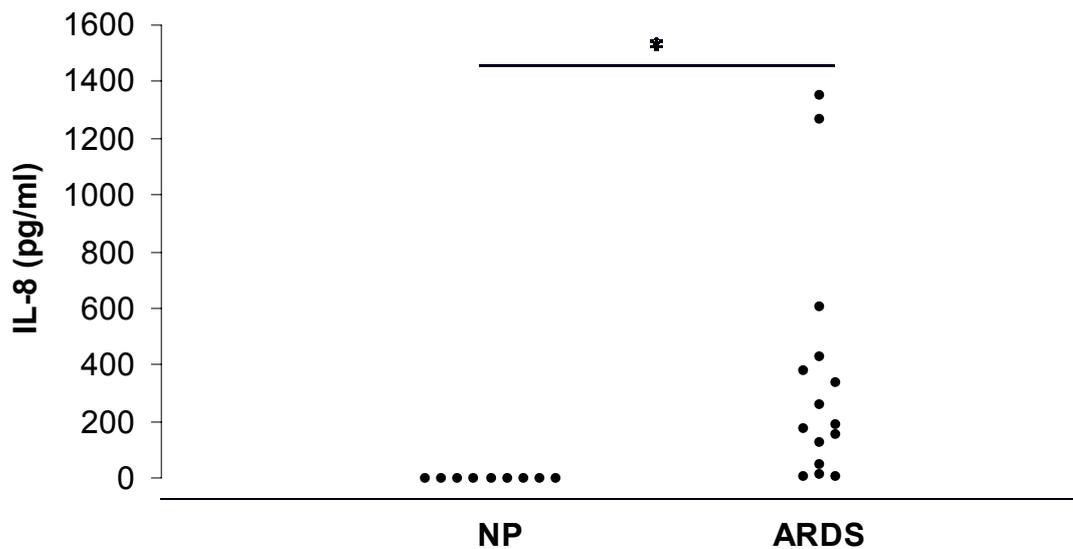


Abbildung 12. Analyse der IL-8 Konzentration in der BAL-Flüssigkeit von ARDS-Patienten (n=15) und Normalpersonen (n=9) (* $p < 0.05$ ARDS vs. NP).

3.4.3 Analyse des Interleukin 6 (IL-6) Zytokinspiegels in der bronchoalveolären Lava-geflüssigkeit von ARDS-Patienten und Kontrollprobanden

Wie in Abbildung 13 dargestellt, war die IL-6 Konzentration in den BAL- Flüssigkeiten von ARDS Patienten im Vergleich zur IL-6 Konzentration in den BAL- Flüssigkeiten von Normalpersonen signifikant erhöht (Abb.13; $p < 0.01$). Der ermittelte Median bei den Proben der ARDS Patienten betrug 99 pg/ml. Die Messung der IL-6 Konzentration in den BAL-Flüssigkeiten von Normalpersonen erbrachte keine detektierbaren Werte (Abb. 13).

3.4.5 Analyse des Interleukin 1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra) Zytokinspiegels in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten und Kontrollprobanden

Im Vergleich zu Normalpersonen ließ sich in der BAL Flüssigkeit von ARDS-Patienten ein signifikant erhöhter IL-1ra Proteinspiegel nachweisen (Abb.15; $p < 0.01$). Die Medianwerte für IL-1ra lagen in den BAL Proben von ARDS-Patienten bei 711pg/ml und in den BAL-Flüssigkeiten von Normalpersonen bei 68pg/ml (Abb.15).

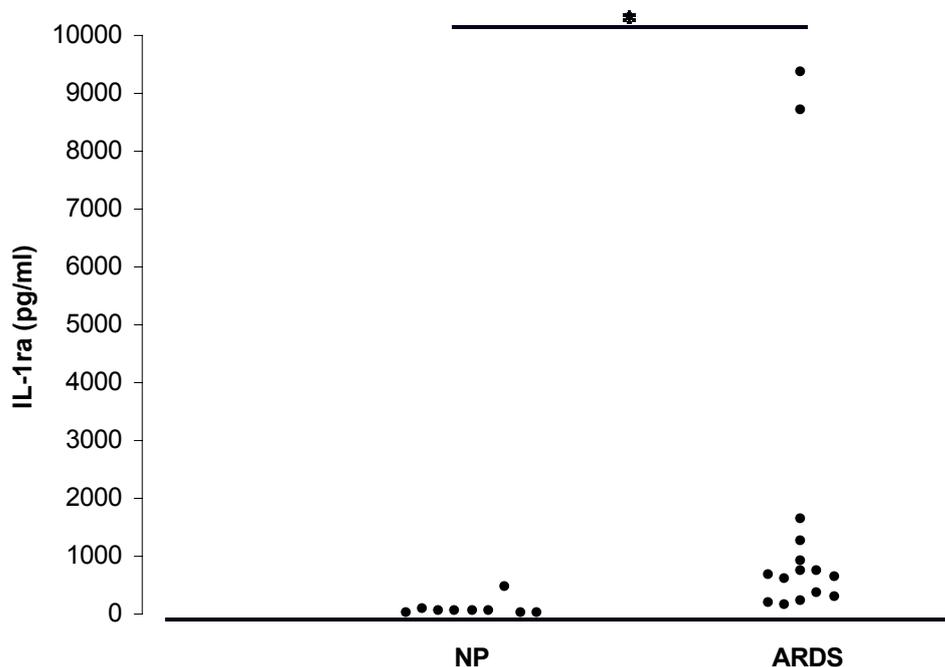


Abbildung 15. Analyse der IL-1ra Konzentration in der BAL-Flüssigkeit von ARDS-Patienten (n=15) und Normalpersonen (n=9) (* $p < 0.01$ ARDS vs. NP).

3.4.6 Analyse des Interleukin 10 Zytokinspiegels in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten und Kontrollprobanden

In der BAL-Flüssigkeit von ARDS-Patienten und Kontrollprobanden waren nur niedrige Konzentrationen des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 nachweisbar (Abb. 16). Der Median für IL-10 in der BAL-Flüssigkeit von ARDS-Patienten betrug lediglich 1 pg/ml, während in der BAL-Flüssigkeit von Normalpersonen in acht von neun Proben keine detektierbaren IL-10 Proteinwerte nachweisbar waren (Abb. 16).

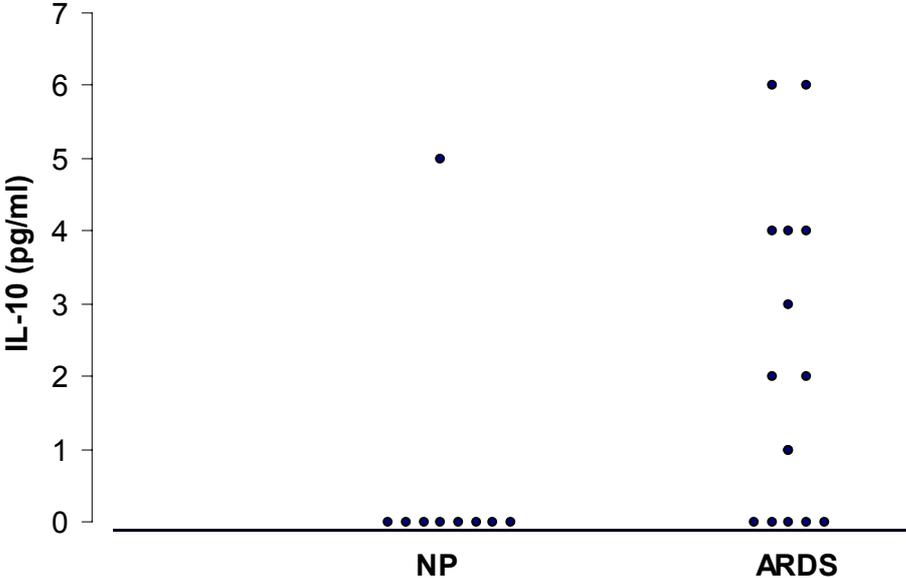


Abbildung 16. Analyse der IL-10 Konzentration in der BAL-Flüssigkeit von ARDS-Patienten (n=15) und Normalpersonen (n=9).

4. DISKUSSION

4.1 Durchflusszytometrische Alveolarmakrophagenseparation

Nur wenige Studien haben bislang die durchflußzytometrische Zellseparation zur Isolation von Alveolarmakrophagen verwendet. Dethloff und Lehnert (35) isolierten interstitielle Makrophagen aus Rattenlungen mittels einer Fc γ -Rezeptor-Affinitätstechnik in Kombination mit durchflußzytometrischer Zellseparation. Alveolarmakrophagen neugeborener Ratten wurden von Kradin et al. (87) hinsichtlich ihrer Lichtstreuungseigenschaften untersucht. Autofluoreszenzcharakteristika der zu separierenden Zellen und ihre Diskriminierung von niedrig autofluoreszierenden Populationen wurden sowohl von van Haarst et al. (161) als auch von Nicod et al. (114) genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde die präparative durchflußzytometrische Zellsortierung der bronchoalveolären Lavage zur schonenden Separation von Alveolarmakrophagen im klinischen Kontext eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass der Aufreinigungsgrad der AM-Population sowohl von einer stabilen Tröpfchenbildung als auch von einem optimalen Verhältnis zwischen dem Durchmesser der zu separierenden Zelle und dem Öffnungsdurchmesser der verwendeten Keramikdüse abhing (62,150). Mit dem Ziel bestmöglicher Aufreinigung, maximaler Zellausbeute sowie möglichst minimaler Veränderung des Aktivierungsstatus der zu separierenden Zellen wurden Keramikdüsen unterschiedlichen Durchmessers evaluiert. Übereinstimmend mit den Studien von Hawkins et al. (62) wurde festgestellt, dass der Einsatz einer 100 μ m weiten Keramikdüse in Kombination mit einer MakroSort-Einrichtung hochaufgereinigte Alveolarmakrophagen-Präparationen lieferte. Die Zellausbeute der Separation erreichte Werte zwischen 40% und 50%. Auch Keramikdüsen mit 200 μ m Öffnungsdurchmesser wiesen eine stabile Tröpfchenbildung auf, allerdings zeigte sich hier eine Reduktion der Zellausbeute. Dies kann durch die höhere Tröpfchengröße erklärt werden, die bei einer 200 μ m weiten Keramikdüse entsteht. Größere Tropfen, in welchen sich mehrere Zellen befinden, werden verworfen und nicht in den Separationsprozess integriert, was zu Zellverlusten führt. In der vorliegenden Untersuchung wurden Alveolarmakrophagen aus BAL-Flüssigkeiten von ARDS-Patienten und Normalpersonen durch die verwendeten Separationsmethoden mit einem Aufreinigungsgrad von > 96% isoliert. Überprüft wurde die Reinheit durch Post-Sort-Analysen separierter Zellen und durch differentialzytologische Auswertung Pappenheim-gefärbter Zytozentrifugenpräparate. Hieraus konnte gefolgert werden, dass die benutzten methodischen

Verfahren eine effektive Diskriminierung und Separation der Alveolarmakrophagenpopulation von anderen Zellen des alveolären Milieus ermöglichten (64,97,161). Interessanterweise belegten frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass Alveolarmakrophagen freiwilliger gesunder Probanden nach durchflusszytometrischer Zellseparation keine separationsbedingt gesteigerte TNF- α Genexpression aufwiesen. Demgegenüber zeigten derart separierte Zellen auf LPS-Stimulation *in vitro* eine rasch induzierbare TNF- α Genexpression, welches den Schluss zulässt, dass der durchflusszytometrische Separationsprozess keine wesentlichen Veränderungen im Aktivierungsstatus bzw. der Aktivierbarkeit der zu separierenden Zellen induziert (108).

4.2 Die Rolle von Alveolarmakrophagen und Zytokinen im ARDS

Die zelluläre und molekulare Pathogenese des ARDS ist 30 Jahre nach seiner Erstbeschreibung noch immer nicht im Detail verstanden. Die immense Informationsflut der letzten Jahre über die Beteiligung residenter Alveolarmakrophagen und Zytokine an dieser prototypischen Form einer akuten pulmonalen Inflammation spiegelt jedoch das grosse Interesse für das Verständnis der Pathoregulation im ARDS wider. Es gilt als akzeptiert, dass AM als residente immunkompetente Phagozyten der Lunge so wie die von ihnen sezernierten pro- und antiinflammatorischen Zytokine eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des ARDS spielen. Eine genauere Charakterisierung ihrer Funktion im klinischen ARDS ist bis dato jedoch nicht erfolgt. Dies lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass residente Alveolarmakrophagen eine hohe morphologische Heterogenität aufweisen, und die Isolation dieser Zellpopulation zur gezielten Funktionsanalyse besondere Anforderungen an die Separationsmethodik stellen. In der vorliegenden Arbeit wurden residente Alveolarmakrophagen von sequentiell lavagierten Patienten mit Akutem Respiratorischen Distress Syndrom sowie von Normalpersonen mit Hilfe eines in unserem Labor etablierten durchflusszytometrischen Separationsverfahrens isoliert. Insbesondere die sequentielle Analyse des Genexpressionsprofils pro- und antiinflammatorischer Zytokine in AM von ARDS Patienten erlaubte erstmals die nähere Charakterisierung der Rolle von AM im Kontext der pulmonalen Inflammation. Adhärenz führt bei Alveolarmakrophagen zu tiefgreifenden biophysikalischen und zellphysiologischen Veränderungen. Die alternativ oder in Kombination mit der bronchoalveolären Lavage praktizierte Aufreinigung von AM durch Adhäsion hat somit den gravierenden Nachteil, dass der Aktivierungsstatus der AM wesentlich verändert wird. Darüberhinaus können auch poly-

morphkernige neutrophile Granulozyten an Plastik adhären und so die Effizienz der AM-Aufreinigung negativ beeinflussen. Es ist bekannt, dass durch Adhärenz der AM eine rasche Induktion des inflammatorischen Zytokins IL-8 ausgelöst wird (148,149). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, welche zeigen, dass die IL-8 Genexpression in Alveolarmakrophagen von Normalpersonen nicht hochreguliert war, belegen, dass die hier durchgeführte Zellseparation nicht zu einer in vitro Aktivierung führt. Es ist weiterhin bekannt, dass schon niedrige Konzentrationen von Endotoxin in Alveolarmakrophagen die Genexpression inflammatorischer Zytokine induzieren. In der vorliegenden Studie war eine TNF- α Zytokingenexpression in Alveolarmakrophagen von Normalpersonen nicht nachweisbar. Hieraus lässt sich ableiten, dass die hier angewandte Alveolarmakrophagen-Separation in einer endotoxinfreien Weise erfolgte. Gleichzeitig zeigten eigene Versuche, in denen die separierten Alveolarmakrophagen in vitro mit LPS stimuliert wurden, eine starke Induktion des inflammatorischen Zytokins TNF- α (107). Dies spricht dafür, dass auch die Aktivierbarkeit der separierten AM in der vorliegenden Arbeit durch den Separationsprozess nicht beeinflusst wurde. Eine messbare Veränderung des in vivo Aktivierungsstatus von AM durch die Aufreinigung konnte somit weitgehend ausgeschlossen werden, welches die Erfassung der in vivo Funktion von Alveolarmakrophagen im klinischen Kontext ermöglicht.

4.3 Ex vivo Zytokingenexpression von Alveolarmakrophagen und Analyse des Zytokin-konzentrationen in bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten

Die inflammatorische Antwort auf exogene Gefahrensignale ist entscheidender Bestandteil der „Host Defense“ und stellt eine protektive Maßnahme des Organismus zur Erhaltung der Homöostase dar. Eine Entgleisung der „Host-Defense“-Mechanismen im Sinne dysregulierter Balance zwischen pro- und antiinflammatorischer Zytokinliberierung kann im Verlauf der akuten respiratorischen Insuffizienz zunächst zur Entwicklung einer „hyperinflammatorischen Phase“ führen, welche durch vermehrte Liberierung proinflammatorischer Zytokine geprägt ist. Dieser Phase folgt regelhaft die sogenannte „hypoinflammatorische Phase“, welche durch eine Verschiebung hin zur gesteigerten Liberierung antiinflammatorischer Zytokine gekennzeichnet ist. Der Wechsel dieser Entzündungsverläufe trägt zumindest partiell zur Etablierung der bei ARDS-Patienten gefürchteten Immunparalyse bei.

Ein zentrales Zytokin in der Frühphase dieser komplexen inflammatorischen Antwort ist TNF- α , welches einerseits via alveolarepitheliale IL-8 Induktion zur Neutrophilenrekrui-

tierung beiträgt, andererseits die vaskuläre Permeabilität fördert und die Fibroblastenproliferation induziert (72,113,141,162). Darüber hinaus verstärkt TNF- α die inflammatorische Antwort durch sekundäre Induktion weiterer inflammatorischer Zytokine. So wurde beschrieben, dass TNF- α die Expression und Sekretion von IL-1, IL-6 und IL-8 in Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten fördert (76,98,104). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Zytokingenexpression in AM der ersten BAL (BAL-I) von ARDS-Patienten für TNF- α , IL-6, IL-8 und MCP-1 signifikant gesteigert waren. Interessanterweise konnten in vitro Studien zeigen, dass TNF- α auch in der Regulation der Surfactantbildung eingreift. So zeigten Wispe et al. (169), dass TNF- α die pulmonale Surfactantsekretion inhibiert, wodurch das ARDS im Sinne eines Circulus Vitiosus verstärkt und die Progredienz des Krankheitsbildes gefördert wird. Suter et al. (153) fanden ebenfalls signifikant erhöhte Werte für TNF- α in BAL-Flüssigkeiten von ARDS Patienten. Darüber hinausgehend zeigt die vorliegende Arbeit, dass TNF- α im Anfangsstadium des ARDS verstärkt nicht nur in den BAL-Flüssigkeiten von ARDS-Patienten, sondern auch in durchflusszytometrisch separierten Alveolarmakrophagen vermehrt synthetisiert wird. Dies spricht für einen proinflammatorischen Aktivierungsstatus von Alveolarmakrophagen in der Frühphase des ARDS; zugleich deutet die Assoziation gesteigerter TNF- α mRNA Spiegel in AM mit erhöhten TNF- α Zytokinspiegel in der ersten BAL von ARDS-Patienten daraufhin, dass der Alveolarmakrophage die primäre TNF- α sezernierende Zelle im alveolären Kompartiment darstellt. Als Hinweis für die strikt regulierte TNF- α Genexpression ließ sich in durchflusszytometrisch separierten AM von Normalpersonen, sowie in der BAL-Flüssigkeit dieses Studienkollektivs keine TNF- α Aktivität nachweisen. Die strikte Regulation hochpotenter inflammatorischer Mediatoren scheint darüber hinaus auch noch in AM von ARDS-Patienten erhalten zu sein, da die sequentielle Analyse ihres TNF- α Genexpressionsprofils eindeutig eine signifikante Abnahme der TNF- α Genexpression im Verlauf der Erkrankung ergab. Somit identifiziert die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte sequentielle Analyse des Expressionsprofils pro- und antiinflammatorischer Zytokine in AM von ARDS-Patienten eine strikte zeitliche Regulation der Genexpression pro- und antiinflammatorischer Zytokinmediatoren. Diskrepanzen mit anderen Studien mit niedrigeren TNF- α Spiegel in korrespondierenden Patientenkollektiven lassen sich durch Verschiebungen auf der Zeitachse des Patientenmonitorings erklären.

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten, welche im Unterschied zu AM keine residenten Zellen des Alveolarraums, sondern aus der Zirkulation über die endo-epitheliale

Barriere in den Alveolarraum rekrutierte mobile Entzündungszellen darstellen, sind maßgeblich an der Initiation und Propagation des ARDS beteiligt (61,91,96,127,144,169). Auch in der vorliegenden Arbeit liess sich zeigen, daß neutrophile Granulozyten in BAL-Flüssigkeiten von ARDS-Patienten, nicht jedoch von Normalpersonen, die gegenüber Alveolarmakrophagen dominierende Zellpopulation darstellten. Die Rekrutierung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum erfolgt durch Chemokine, welche in zwei Klassen, α - und β -Chemokine, unterteilt werden. Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass IL-8, ein α -Chemokin, maßgeblich an der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten beteiligt ist (8,69,92,93,100,116,152). Miller et al. (110) beobachteten eine direkte Korrelation zwischen hohen IL-8 Werten und erhöhten Zellzahlen von neutrophilen Granulozyten. Der Nachweis hoher IL-8 Genexpressionsspiegel in AM von ARDS-Patienten in der vorliegenden Studie zeigt, dass Alveolarmakrophagen an der Produktion von IL-8 maßgeblich beteiligt sind. In anderen Studien wurde eine direkte Beziehung zwischen gesteigerten IL-8 Werten in der BAL und pulmonaler Gewebsschädigung als dem pathophysiologischen Schlüsselereignis der akuten Schocklunge beobachtet (10,37,79,110). Es ist jedoch zu bedenken, dass die gemessenen Chemokinkonzentrationen in den BAL-Flüssigkeiten keine exakte Reflektion der Quantität und Aktivität der Chemokine im alveolären Milieu darstellen können. Da α -Chemokine wie IL-8 heparinbindende Domänen aufweisen, welche die Bindung dieses Chemokins an interstitiellen Matrixkomponenten vermittelt, stellt sich vermutlich in der Akutphase des ARDS ein Gleichgewicht zwischen Matrixgebundenen Chemokinen und freien durch bronchoalveoläre Lavage zugänglichen Chemokinen ein (89). Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Zytokinspiegel der BAL von septischen ARDS-Patienten können somit nur ungefähr das Ausmass der in vivo Zytokinsekretion reflektieren. Erschwerend für die Interpretation von Zytokinprofilen in sequentiell lavagierten septischen ARDS-Patienten ist darüber hinaus, dass biologische Aktivitäten von Zytokinen in vivo durch Einschwemmung weiterer biologisch aktiver Komponenten aus dem vaskulären in das alveoläre Kompartiment moduliert werden. So ist beispielsweise bekannt, dass IL-8 ähnlich wie andere Chemokine mit α_2 Makroglobulin zur Inhibition proteolytischer Degradation interagieren kann. Dies trägt möglicherweise dazu bei, dass Chemokine wie IL-8 eine verlängerte in vivo Halbwertszeit aufweisen. Biologische Signifikanz gewinnt solch ein System prolongiert biologisch aktiver Chemokine wie IL-8 dadurch, dass primär für Leukozytenrekrutierung und Aktivierung zuständige Chemokinsysteme durch Etablierung eines von alveolär nach vaskulär gerichteten Chemokingradienten nur bei entsprechend langer Halbwertszeit eine ausreichende Leukozy-

tenimmigration aus dem vaskulären in das alveoläre Kompartiment zur Unterstützung der „Host Defense“ Mechanismen der Lunge induzieren können. Passend zu diesem Konzept liess sich in AM sequentiell lavagierter ARDS- Patienten eine Abnahme der IL-8 Genexpression in AM beobachten, welche zugleich assoziiert war mit steigenden IL-8 Zytokinkonzentrationen in der BAL-Flüssigkeit dieser Patienten.

Ähnliche Beobachtungen gelten auch für die kontinuierlich zu beobachtende Abnahme der MCP-1 Genexpression in AM sequentiell lavagierter ARDS- Patienten, während die MCP-1 Zytokinkonzentration in den BAL-Flüssigkeiten der korrespondierenden ARDS- Patienten persistierend hohe Werte aufwies. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen hohen MCP-1 Konzentrationen in den BAL-Flüssigkeiten von ARDS-Patienten sind insbesondere vor dem Hintergrund interessant, dass in einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe kürzlich gezeigt werden konnte, dass gesteigerte MCP-1 Spiegel in der BAL-Flüssigkeit von ARDS-Patienten mit einem erhöhten Einstrom von Monozyten in den Alveolarraum assoziiert waren und dieser Monozyteneinstrom mit dem Schweregrad der respiratorischen Insuffizienz korrelierte (132). Insofern kommt dem Monozyten Chemotaktischen Chemokin-1 (MCP-1) primäre Relevanz in der Induktion des alveolären Monozyteneinstroms zur Expansion des ortsständigen Alveolarmakrophagenpools zu. Darüber hinaus konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass über intratracheal appliziertes rekombinantes MCP-1 in den Alveolarraum rekrutierte zirkulierende Monozyten eine verstärkte CD 14-Expression aufweisen, welche als „transmigrationsassoziiertes Priming“ interpretiert wurde (106). In weitergehenden Untersuchungen konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass via MCP-1 in den Alveolarraum rekrutierte Monozyten auf Koapplikation von Endotoxin eine Amplifikation der pulmonalen Entzündungsresponse zeigten. Diese war charakterisiert durch gesteigerte intraalveoläre Zytokinspiegel (TNF- α , IL-6, IL-8), eine amplifizierte Neutrophilen- und amplifizierte Monozytenrekrutierung in das alveoläre Kompartiment, sowie eine hiermit assoziiert gesteigerte pulmonale Permeabilität. Interessanterweise war diese auf kombinierte Endotoxin und MCP-1 Instillation in Mäusen zu beobachtende amplifizierte pulmonale Entzündungsresponse in solchen Mäusen nicht zu beobachten, welche zur Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools vor Endotoxin und MCP-1 Applikation mit liposomalem Clodronate vorbehandelt wurden (109). Diese Daten verdeutlichen, dass residente AM an der Initiation alveolär getriggelter pulmonaler Entzündungsprozesse massgeblich beteiligt sind. Dieses Konzept einer Schlüsselfunktion residenter Alveolarmakrophagen in der Initiation und Aggravation

pulmonaler Entzündung wird durch Daten der vorliegenden Arbeit eindrucksvoll unterstützt, welche belegen, dass auch unter den Bedingungen eines septischen ARDS residente AM im Vergleich zu Kontrollprobanden signifikant gesteigerte proinflammatorische Zytokinexpressionen aufweisen, welche im weiteren Verlauf der akuten Entzündungsreaktion deutlich attenuiert werden. Ein weithin akzeptiertes Konzept zur Antagonisierung überschießender proinflammatorischer Zytokineffekte geht davon aus, dass im Verlauf einer Entzündung die Expression proinflammatorischer Zytokine durch gesteigerte Induktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und IL-1ra einen Übergang der hypersekretorischen Phase in die sogenannte hyposekretorische Phase bedingt. Für IL-10 ist ein breites antiinflammatorisches Wirkungsspektrum beschrieben worden, welches unter anderem die Zytokinproduktion LPS-stimulierter AM, Monozyten und neutrophiler Granulozyten inhibiert (32,44,123,165). In der vorliegenden Studie konnte klar gezeigt werden, dass in AM septischer ARDS-Patienten die maximale Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-6 und IL-8 der maximalen Expression des antiinflammatorischen IL-10 zeitlich vorausging. Eine Steigerung der IL-10 Genexpression in AM der BAL II von ARDS-Patienten war gekoppelt mit einer starken Abnahme der Genexpression für TNF- α , IL-6, IL-8 und MCP-1 in den gleichen Alveolarmakrophagen. Viele Studien bezeichnen diesen Zeitpunkt der Inflammation im ARDS, in welchem die protektiven antiinflammatorischen Effekte den potentiell destruktiveren Effekten proinflammatorischer Zytokine entgegenwirken, als sogenannten 'pivotalen' Zeitpunkt (120). Jedoch konnten in der vorliegenden Arbeit trotz der hohen IL-10 Genexpression in AM von ARDS-Patienten keine gesteigerten IL-10 Proteinkonzentrationen in der Lavageflüssigkeit nachgewiesen werden. Dies ist möglicherweise durch die für IL-10 beschriebene primär autokrine Wirkungsweise zu erklären. Interessanterweise zeigen LPS-stimulierte AM auch *in vitro* nur eine sehr geringe IL-10 Sekretionsleistung, so dass von den niedrigen IL-10 Zytokinspiegeln in den BAL von ARDS-Patienten nicht auf eine niedrige biologische Aktivität dieses antiinflammatorischen Zytokins *in vivo* geschlossen werden darf. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Blockade der systemischen IL-10 Aktivität durch funktionsblockierende Antikörper bei bakterieller Pneumonie die Bakterien Clearance hemmte und die Überlebenschancen der Tiere signifikant herabsetzte. Desweiteren konnte von Donnelly et al. (38) eine Korrelation zwischen niedrigen IL-10 Konzentrationen in der BAL-Flüssigkeit von Patienten im Anfangsstadium des ARDS und einer erhöhten Sterblichkeitsrate dieser Patienten aufgezeigt werden. Andererseits ist vor klinischem Hintergrund dokumentiert, dass eine prolongierte hyposekretorische Phase, welche durch antiinflammatorische Zytokine (IL-10,

IL-1ra) in schwer kranken ARDS-Patienten beobachtet wird, oftmals assoziiert ist mit der Induktion der sogenannten Immunparalyse. Diese trägt mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung des Multiorganversagens (MOF: Multi Organ Failure) bei, welches sich häufig im Verlauf eines septischen ARDS entwickelt. In diesem Zusammenhang fällt die differenzielle Regulation des IL-1ra sowohl auf mRNA-Ebene wie auch auf Proteinebene in dem untersuchten Patientenkollektiv auf. Initial als natürlicherweise auftretendes Akute Phase Protein mit antiinflammatorischem Wirkungsspektrum zur Antagonisierung IL-1 vermittelter Effekte beschrieben, scheint der IL-1ra eine Dämpfungsfunktion proinflammatorisch vermittelter Entzündungsprozesse zu besitzen (58).

Die Analyse der vorliegenden Studie zeigt, dass die Genexpression pro- und antiinflammatorischer Zytokine in Alveolarmakrophagen im Verlauf des Akuten Respiratorischen Distress Syndroms differentiell reguliert wird und dass residente Alveolarmakrophagen zwar an der initialen proinflammatorischen Zytokinantwort mitwirken, ihr Aktivierungszustand im Verlauf des Akuten Respiratorischen Distress Syndroms jedoch rasch wieder herunterreguliert wird. Somit stellen residente Alveolarmakrophagen potenzielle Zielzellen für therapeutische Interventionsstrategien dar, die die initiale überschüssige Zytokinantwort antagonisieren oder die in der Folgephase supprimierte 'Host Defense' stimulieren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde das proinflammatorische (TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1) und antiinflammatorische (IL-1ra, IL-10) Genexpressions- und Proteinsekretionsmuster in durchflußzytometrisch hoch aufgereinigten residenten Alveolarmakrophagen, sowie in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von primär und sequentiell lavagierten septischen ARDS-Patienten untersucht und mit denen von Normalpersonen verglichen. Durch Verwendung eines neu entwickelten durchflußzytometrischen Separationsverfahrens gelang es, residente Alveolarmakrophagen ohne vorherige in vitro Anfärbung aufgrund ihrer Grössen- und Autofluoreszenzcharakteristika flowzytometrisch von neutrophilen Granulozyten, welche regelmäßig in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit septischer ARDS-Patienten nachzuweisen sind, sicher zu diskriminieren und hochgradig aufzureinigen. Diese Separationstechnik erlaubte die zellspezifische Analyse des pro- und antiinflammatorischen Zytokingenexpressionsprofils residenter Alveolarmakrophagen bei gesunden Probanden und septischen ARDS-Patienten mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR. In der ARDS-Gruppe wurden sequentielle Lavagen alle 3 Tage durchgeführt und die Zytokingenexpression in residenten AM im Verlauf des septischen ARDS erfasst. Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6, IL-8 sowie MCP-1 waren hierbei in residenten Alveolarmakrophagen primär lavagierter ARDS Patienten im Vergleich zur Expression in Alveolarmakrophagen von Kontrollprobanden signifikant heraufreguliert, während das Expressionsprofil der antiinflammatorischen Zytokine IL-1ra und IL-10 im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert war. Demgegenüber zeigten die AM von sekundär und tertiär lavagierten ARDS-Patienten eine im Vergleich zur primären Lavage drastisch reduzierte Genexpression proinflammatorischer Zytokine, während zugleich die Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 im Verlauf deutlich zunahm. Komplementär zur Analyse des Zytokingenexpressionsprofils in aufgereinigten AM zeigte die Analyse der sezernierten pro- und antiinflammatorischen Zytokine in der BAL-Flüssigkeit sequentiell lavagierter ARDS-Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden initial drastisch gesteigerte proinflammatorische Zytokinspiegel, welche im Verlauf des ARDS für die meisten untersuchten Zytokine deutlich abnahmen.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Zytokingenexpressionsanalyse hochaufgereinigter Alveolarmakrophagen sequentiell lavagierter ARDS-Patienten zeigt, dass die Genexpression pro- und antiinflammatorischer Zytokine in Alveolarmakrophagen im Verlauf des septischen ARDS differentiell reguliert wird. Während in der Frühphase des ARDS ein „proinflammatorischer Phänotyp“ der residenten Alveolarmakrophagen nachweisbar ist, do-

miniert in der Spätphase des septischen ARDS ein antiinflammatorisches Genexpressionsmuster dieser Zellen. Diese aus klinischem Untersuchungsmaterial gewonnenen Daten unterstützen das Konzept, dass residente Alveolarmakrophagen als professionelle Phagozyten im Kontext des septischen ARDS zwar massgeblich an der initialen proinflammatorischen Zytokinantwort mitwirken, der Aktivierungszustand im Verlauf des septischen ARDS jedoch rasch wieder herunterreguliert wird. Residente Makrophagen des Alveolarraumes sind somit potentielle Zielzellen für therapeutische Interventionsstrategien, die die initiale überschießende Zytokinantwort antagonisieren oder die in der Folgephase supprimierte 'Host Defense' stimulieren.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADERKA D, LE J, VILCEK J. IL-6 inhibits lipopolysaccharid- induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U 937 cells, and in mice. *J Immunol* 143: 3517-3523, 1989.
2. ANZUETO A. Surfactant supplementation in the lung. *Respir Care Clin AM.* 8 (2): 211-236, 2002.
3. ARENZANA-SEISDEDOS F, VIRELIZER JL. Interferons as macrophage-activating factors: enhanced secretion of interleukin 1 by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *Eur J Immuno* 13: 437-440, 1983.
4. ARROLIGA AC, GHAMRA ZW, PEREZ TREPICHIO A, PEREZ TREPICHIO P, KOMARA JJ, SMITH A, WIEDEMANN HP. Incidence of ARDS in an adult population of northeast Ohio. *Chest* 121 (6): 1972-1976, 2002.
5. ASHBAUGH DG, BIGELOW DB, PETTY TL, LEVINE BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2: 317-323, 1967.
6. AUGER MJ, ROSS JA. The biology of the macrophage. *The macrophage: Oxford University Press, New York.* 1-74, 1992.
7. BAGGIOLINI M, DEWALD B, MOSER B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15: 675-705, 1997.
8. BAGGIOLINI M, WALZ MA, KUNKEL SL. Neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84: 1045-1049, 1989.
9. BAUER J, GANTER JU, GEIGER T, JACOBSHAGEN U, HIRANO T, MATSUDA T, KISHIMOTO T, ANDUS T, ACS G, GEROK W, CILIBERTO G. Regulation of interleukin-6 expression in cultured human blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Blood* 72: 1134, 1988.
10. BAUGHMAN RP, GUNTHER KL, RASHKIN MC, KEETON DA, PATTISHALL EN. Changes in the inflammatory response of the lung during acute respiratory distress syndrome- prognostic indicators. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 76-81. 1996
11. BELLINGAN GJ. The pulmonary physician in critical care * 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax* 57 (6): 540-546, 2002.
12. BERK BC, ALEXANDER RW, BROCK TA, GIMBRONE MA, WEBB RC. Vasoconstriction: a new activity for platelet-derived factor. *Science* 232: 87-90, 1986.

13. BEUTLER B, CERAMI A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Eng J Med* 316: 379-85, 1987.
14. BEUTLER BA, MILSARK IW, CERAMI A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J Immunol* 135: 3972-77, 1985.
15. BLUSSE VAN OUD ABLAS A, VAN DER LINDEN-SCHREVER B, VAN FURTH R. Origin and kinetics of pulmonary macrophages during an inflammatory reaction induced by intra-alveolar administration of aerosolised heat-killed BCG. *Am Rev Respir Dis* 128: 276-81, 1983.
16. BLUSSE VAN OUD ABLAS A, VAN FURTH R. Origin, kinetics and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J Exp Med* 149: 1504-18. 1979
17. BOGDAN C, VODOVOTZ Y, NATHAN C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 174:1549-1555, 1991.
18. BRANNEN AL, CHANDLER DB. Alveolar macrophage subpopulations responsiveness to chemotactic stimuli. *Am J Pathol* 132: 161-166, 1988 .
19. BRIELAND JK, KUNKEL RG, FANTONE JC. Pulmonary alveolar macrophage function during acute inflammatory lung injury. *Am Rev Respir Dis* 135: 1300-1306, 1987.
20. BROUDY VC, DAUSHANSKY K, SEGAL GM, HARLAN JM, ADAMSON JW. Tumor necrosis factor type a stimulates human endothelial cells to produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7467-71, 1986.
21. CAMUSSI G, BUSSOLINO F, SALVIDIO G, BAGLIONI C. Tumor necrosis factor/cachectin stimulates peritoneal macrophages polymorphonuclear neutrophils, and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet-activating factor. *J Exp Med* 166: 1390-1404, 1987.
22. CARLOS TM, HARLAN JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101, 1994.
23. CARRÈ PC, MORTENSON RL, KING TE, MOBLE PW, SABLE CL, RICHES DWH. Increased expression of the IL-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 88: 1802-1810, 1991.
24. CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RL, GREEN S, FIORE N, WILLIAMSON B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3666-3670, 1975.

25. CHANDLER DB, FULLER JD. Prostaglandinsynthesis and release by subpopulations of rat alveolar macrophages. *J Immunol* 139: 893-8, 1987.
26. CHANDLER DB, FULLER WC, JACKSON RM, FULMER JD. Studies of membrane receptors and phagocytosis in subpopulations of rat alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 133: 461-467, 1986.
27. CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanat-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
28. CISSATELLA MA, MEDA L, GASPERINI S, CALZETTI F, BONORA S. Interleukin-10 (IL-10) upregulated IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. *J Exp Med* 179: 1695-1699, 1994.
29. COHEN AB, CLINE MJ. The human alveolar macrophage: isolation, cultivation in vitro, and studies of morphologic and functional characteristics. *J Clin Invest* 50: 1390-1398, 1971.
30. COMINELLI F, NAST CC, CLARK BD, SCHINDLER R, LIERENA R, EYSSELEIN VE, THOMPSON RC, DINARELLO CA. Interleukin 1 (IL-1) gene expression, synthesis, and effect of specific IL-1 receptor blockade in rabbit immune complex colitis. *J Clin Invest* 86: 972-980, 1990.
31. COX G. IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 271: L566-L571, 1996.
32. DE WAAL MALEFYT R, ABRAMS RJ, BENNET B, FIGDOR C, DE VRIES JE. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174: 1209-1220, 1991.
33. DE WAAL MALEFYT R, HAANEN J, SPITS H, RONCAROLO MG, TE VELDE A, FIGDOR C, JOHNSON K, KASTELEIN R, YSSEL H, DE VRIES JE. IL-10 and viral IL-10 strongly reduced antigen specific human T-cell proliferation by diminishing the antigen presenting capacity of monocytes via down-regulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174: 915-924, 1991.
34. DE WAAL MALEFYT R, YSSEL H, RONCAROLO MG, SPITS H, DE VRIES JE : Interleukin 10. *Curr Opin Immunol* 4: 314-320, 1992.

35. DETHLOFF LA , LEHNERT BE. Pulmonary interstitial macrophages: Isolation and flow cytometric comparison with alveolar macrophages and blood monocytes. *J Leukocyte Biol* 43: 80-90, 1988.
36. DING L, LINSLEY DS, HUANG LY, GERMAIN RN, SHERVACH EM. Il-10 inhibits macrophage co-stimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 151: 1224-1234, 1993.
37. DONNELLY SC, STRIETER RM, KUNKEL SL, WALZ A, ROBERTSON CR, CARTER DC, GRANT IS, POLLOK AJ, HASLETT C. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at risk patient groups. *Lancet* 341: 643-647, 1993.
38. DONNELLY SC, STRIETER RM, TEID PT, KUNKEL SL, BURDICK MD, ARMSTRONG I, MACKENZIE A, HASLET C. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 125: 191-196, 1996.
39. EISENBERG SP, EVANS RJ, AREND WP, VERDERBER E, BREWER MT, HANNUM CH, THOMPSON RC. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 343 (6256): 341-346, 1990.
40. ELIAS JA, GUSTILO K, BAEDER W, FREUNDLICH B. Synergistic stimulation of fibroblast prostaglandin production by recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 138: 3812-3816, 1987.
41. FELS AOS, COHEN ZA. The alveolar macrophage. *J Appl Physiol* 60: 353-369, 1986.
42. FINE A, GOLDSTEIN RH. The effect of transforming growth factor- β on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *J Biol Chem* 262: 3897-3902, 1987.
43. FIORENTINO DF, BOND MW, MOSMANN TR. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170: 2081-2095, 1989.
44. FIORENTINO DF, ZLOTNIK A, MOSMANN TR, HOWARD M, OGARRA A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol USA* 147 (11): 3815-22, 1991.

45. FOLEY NM, MILLAR AB, MEAGER A, JOHNSON MIN, ROOK GAW. TNF production by alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis and tuberculosis. *Sarcoidosis* 9: 29-34, 1992.
46. FOWLER AA, HYERS TM, FISHER BJ, BECHARD DE, CENTOR RM, WEBSTER RO. The adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 136: 1225-1231, 1987.
47. FOWLER RW. Ageing and lung function. *Age ageing* 14: 209-215, 1985.
48. FURUTANI Y, NOMURA H, NOTAKE M, OYAMADA Y, FUKUI T, YAMADA M, LARSEN , OPPENHEIM JJ, MATSUSHIMA K. Cloning and sequencing of the cDNA for human monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). *Biochem Biophys Res Commun* 159: 249-255, 1989.
49. GAMBLE JR, HARLAN JM, KLEBANOFF SJ, VADAS MA. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8667-8671, 1985.
50. GAULDIE J, RICHARDS C, HARNISH D, LANSDORP P, BAUMANN H. Interferon- β_2 /BSF-2 shares identity with monocyte derived hepatocyte stimulating factor and regulates the major acute phase response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 7251-7255, 1987.
51. GERARD C, BRUYNS C, MARCHANT A, ABRAMOWICZ D, VANDENABEELE P, DELVAUX A, FIERS W, GOLDMAN M, BELU T. Interleukin-10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med* 177: 1205-1208, 1993.
52. GODLESKI J, BRAIN JD. The origin of alveolar macrophages in mouse radiation chimeras. *J Exp Med* 136: 630-43, 1972.
53. GOODMAN RB, STRIETER RM, FREVERT CW, CUMMINGS CJ, TEKAMP-OLSON P, KUNKEL SL, WALZ A, MARTIN T. Quantitative comparison of C-X-C chemokines produced by endotoxin-stimulated human alveolar macrophages. *Am J Phys* 275: L87-L95, 1998.
54. GOUSTIN AS, LEOF EB, SHIPLEY GD, MOSES HL. Growth factors and cancer. *Cancer Res* 46: 1015-1029, 1986.
55. GROTENDORST G, SEPPA HEJ, KLEINMAN HK, MARTIN G. Attachment of smooth muscle cells and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3669-3672, 1982.

56. GRUSS HJ, BRACH MA, SCHUMANN RR, HERRMANN F. Regulation of MCP-1/JE Gene Expression During Monocytic Differentiation. *J Immunol* 153: 4907-4914, 1994.
57. HACK CE, DE GROOT ER, FELT-BERSMA RJF, NUIJENS JH, STRACK VAN SCHIJNDEL RJM, EERENBERG-BELMER AJM, THIJIS LG, AARDEN LA. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* 74: 1704-1710, 1989.
58. HALLEGUA DS, WEISMAN MH. Potential therapeutic uses of interleukin 1 receptor antagonists in human diseases. *Ann Rheum Dis* 61 (11): 960-967, 2002.
59. HAMACHER J, LUCAS R, LIJNEN HR, BUSCHKE S, DUNANT Y, WENDEL A, GRAU GE, SUTER PM, RICOU B. Tumor necrosis factor-alpha and angiostatin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 166 (5): 651-656, 2002.
60. HANNUM CH, WILCOX CJ, AREND WP, JOSLIN FG, DRIPPS DJ, HEIMDAL PL, ARMES LG, SOMMER A, EISENBERG SP, THOMPSON RC. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 343: 336-340, 1990.
61. HARADA A, SEKIDO N, AKAHOSI T, WADA T, MUKAIDA N, MATSUSHIMA K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukocyte Biol* 56: 559-564, 1994.
62. HARKINS SP, GALBRAITH DW. Factors governing the flow cytometric analysis and sorting of large biological particles. *Cytometry* 8: 60-70, 1987.
63. HAVENITH CEG, BREEDIJK AJ, HOEFSMIT ECM. Effect of bacillus calmette-Guérin inoculation on numbers of dendritic cells in bronchoalveolar lavages of rats. *Immunobiology* 184: 336-347, 1992.
64. HAVENITH CEG, BREEDIJK AJ, VAN MIERT PP, BLIJLEVEN N, CALAME W, BEELEN RHJ, HOEFSMIT EC. Separation of alveolar macrophages and dendritic cells via autofluorescence: phenotypical and functional characterization. *J Leukocyte Biol* 53: 504-510, 1993.
65. HEINRICH PC, CASTELL JV, ANDUS T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265: 621-636, 1990.
66. HELFGOTT DC, MAY LT, STHOEGER Z, TAMM I, SEHGAL PB. Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of β 2 interferon by human fibroblasts. *J Exp Med* 166: 1300-1309, 1987.

67. HENCE AJ, DOUCHES S, WINCHESTER RJ, FERRANS VJ, CRYSTAL RG. Characterization of monoclonal antibodies: changes in alveolar macrophage phenotype associated with pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 134: 284-92, 1985.
68. HIRANI N, ANTONICELLI F, STRIETER RM, WIESENER MS, RATCLIFFE PF, HASLETT C, DONNELLY SC. The regulation of interleukin-8 in human macrophages- a potential role in the pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Mol Med* 7 (10): 685-697, 2001.
69. HIRANO T, YASUKAWA K, HARADA H, TAGA T, WATANABE Y, MATSUDA T, KASHIWAMURA S, NAKAJIMA K, KOYAMA K, IWAMATSU A. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324: 73-76, 1986.
70. HOLT P.G. Down-regulation of immune responses in the lower respiratory tract: The role of alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 63: 261-270, 1986.
71. HORII Y, MURAGUCHI A, SUEMATSU S, MATSUDA S, YOSHIZAKI K, HIRANO T, KISHIMOTO T. Regulation of BSF-2/IL-6 by T cells production by human mononuclear cells: macrophage dependent synthesis of BSF-2/ IL-6 by T cells. *J Immunol* 141: 1529-1535, 1988.
72. HORVARTH CJ, FERRO TJ, JESMOK G, MALIK AB. Recombinant TNF increases pulmonary vascular permeability independent of neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9219-9223, 1988.
73. HYERS TM, TRICOMI SM, DETTENMEIER PA, FOWLER AA. Tumor necrosis factor levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 144: 268-271, 1991.
74. IGNOTZ RA, MASSAGUE J. Transformic growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261: 4337-4342, 1986.
75. IRIBAREN C, JACOBS DR, SIDNEY S, GROSS MD, EISNER MD. Cigarette smoking, alcohol consumption, and risk of ARDS: a 15-year cohort study in a managed care setting. *Chest* 117 (1): 163-168, 2000.
76. JABLONSKA DM, MULÉ JJ, MCINTOSH JK, SEHGAL PB, MAY LT, HUANG CM, ROSENBERG SA, LOTZE MT. IL-6/IFN- β -2 as a circulating hormone. *J Immunol* 142: 1542-1547, 1989.

77. JACOBS RF, TABOR DR, BURKS AW, CAMPBELL GD. Elevated IL-1 release by human alveolar macrophages during ARDS. *Am Rev Respir Dis* 140: 1686-1692, 1989.
78. JELINEK DF, LIPSKY PE. Enhancement of human B cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor- α and interleukin 1. *J Immunol* 139: 2970-2976, 1987.
79. JORDAN M, OTTERNESS IG, NG R, GESSNER A, RÖLLINGHOFF M, BEUSCHER HU. Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* 154: 4081-4090, 1995.
80. JORENS PG, VAN DAMME J, DE BACKER W, BOSSAERT L, DE JONGH RF, HERMAN AG, RAMPART M. Interleukin-8 (IL-8) in the bronchoalveolar lavage fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome (ARDS) and patients at risk for ARDS. *Cytokin* 4: 592-597, 1992.
81. KALTREIDER HB. Alveolar macrophages. Enhancers or suppressors of pulmonary immune reactivity. *Chest* 82: 261-262, 1982.
82. KELLEY J, STIREWALT WS, CHRIN L. Protein synthesis in rat lung: measurements in vivo based on leucyl-tRNA and rapidly turning-over procollagen. *J Biochem J* 222: 77-83, 1985.
83. KELLY J: Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 141: 765-788, 1990.
84. KISHIMOTO T, TAA T, AND AKIRA S. Cytokine signal transduction. *Cell* 76: 253-262, 1994.
85. KISHIMOTO T. The biology of interleukin-6. *Blood* 74: 1-10, 1989.
86. KNOFF HP, OTTO F, ENGELHARDT R, FREUDENBERG MA, GALANOS C, HERRMANN F, AND SCHUMANN R. Discordant adaption of human peritoneal macrophages to stimulation by lipopolysaccharide and the synthetic lipid A analogue SDZ MRL953: down-regulation of TNF- α and IL-6 is paralleled by up-regulation of IL-1 and granulocyte colony-stimulating factor expression. *J Immunol* 153: 287-299, 1994.
87. KRADIN RL, MCCARTHY KM, PREFFER FI, SCHNEEBERGER EE. Flow-cytometric and ultrastructural analysis of alveolar macrophage maturation. *J Leukocyte Biol* 40: 407-417, 1986.
88. KURDOWSKA A, CARR FK, STEVENS MD, BAUGHMAN RP, MARTIN TR. Studies on the interaction of IL-8 with human plasma α_2 -macroglobulin. *J Immunol* 158: 1930-1940, 1997.

89. KURDOWSKA A, MILLER EJ, NOBLE JM, BAUGHMAN RP, MATTHAY MA, BRELSFORD WG, COHEN AB. Anti-IL-8 autoantibodies in alveolar fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome. *J Immunol* 157: 2699-2706, 1996.
90. KUSCHERT GS , HOOGEWERF AJ, PROUDFOOT AE, CHUNG CW, COOKE RM, HUBBARD RE, WELLS TN, SANDERSON PN. Identification of a glycosaminoglycan binding surface of humaninterleukin-8. *Biochemistry* 37: 11193-11201, 1998.
91. LEE CT, FEIN AM, LIPPMAN M, HOLTZMAN G, KIMBEL P, WEINBAUM G. Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 304: 192-196, 1981.
92. LEONARD EJ, SKEEL A, YOSHIMURA T, NOER K, KURVIRT S, VAN EPPS D. Leukocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/activation protein-1. *J Immunol* 144: 1323-1330, 1990.
93. LEONARD EJ, YOSHIMURA T. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1, interleukin-8). *Am J Respir Cell Mol Biol* 2: 479-486, 1990.
94. LEONARD EJ, YOSHIMURA T. Human monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1). *Immunol Today*. 11: 97-101, 1990.
95. LIM CM, JUNG H, KOH Y, LEE JS, SHIM TS, LEE SD, KIM WS, KIM DS, KIM WD. Effect of alveolar recruitment maneuver in early acute respiratory distress syndrome according to antiderecruitment strategy, etiological category of diffuse lung injury, and body position of the patient. *Crit Care Med* 31 (2): 411-418, 2003.
96. LO SK, EVERITT J, GU J, MALIK AB. Tumor necrosis factor mediates experimental pulmonary edema by ICAM- 1 and CD 18- dependant mechanisms. *J Clin Invest* 89: 981-988, 1992.
97. LOHMEYER J, FRIEDRICH J, ROSSEAU S, PRALLE H, SEEGER W. Multi-parameter flow cytometric analysis of inflammatory cells contained in bronchoalveolar lavage fluid . *J Immunol Methods* 172: 59-70, 1994.
98. MANTOVANI A, DEJANA E. Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol Today* 10: 370-375, 1989.
99. MARCY TW, MERRILL WW. Cigarette smoking and respiratory tract infection. *Clin Chest Med* 8: 381-391, 1987.

100. MARTICH GD, DANNER RL, CESKA M, SUFFREDINI AF. Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of anti-inflammatory agents. *J Exp Med* 173: 1021-1024, 1991.
101. MARTIN TR. Lung cytokines and ARDS. *Chest* 116: 2S-8S, 1999.
102. MARTIN TR. Cytokine and the acute respiratory distress syndrome (ARDS): a question of balance. *Nat Med* 3: 272-273, 1997.
103. MATSUSHIMA K, LARSEN CG, DUBOIS GC, OPPENHEIM JJ. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med*. 169: 1484-1490, 1989.
104. MATSUSHIMA K, MORISHITA K, YOSHIMURA T, LAVU S, KOBAYASHI Y, LEW W, APPELLA E, KUNG HF, LEONARD EJ, OPPENHEIM JJ. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by IL-1 and TNF. *J Exp Med* 167: 1883-1889, 1988.
105. MATTHAY MA, WIENER-KRONISH JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *Am Rev Respir Dis* 142: 1250-1257, 1990.
106. MAUS U, HEROLD S, MUTH H, MAUS R, ERMERT L, ERMERT M, WEIS-MANN N, ROSSEAU S, SEEGER W, GRIMMINGER F, LOHMEYER J. Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L58-L68, 2001.
107. MAUS U, ROSSEAU S, KNIES U, SEEGER W, LOHMEYER J. Expression of pro-inflammatory cytokines by flow-sorted alveolar macrophages in severe pneumonia. *Eur Respir J* 11: 534-541, 1998.
108. MAUS U, ROSSEAU S, SEEGER W, LOHMEYER J. Separation of human alveolar macrophages by flow cytometry. *Am Phys Soc*: L566-L571, 1997.
109. MAUS U, VON GROTE K, KUZIEL WA, MACK M, MILLER EJ, CIHAK J, STANGASSINGER M, MAUS R, SCHLONDORFF D, SEEGER W, LOHMEYER J. The role of CC chemokine receptor 2 in alveolar monocyte and neutrophil immigration in intact mice. *Am J Resp Crit Care Med* 166 (3): 268-273, 2002.
110. MILLER EJ, COHEN AB, NAGAO S, GRIFFITH D, MAUNDER RJ, MARTIN TR, WEINER-KRONISH JP, STICHERLING M, CHRISTOPHERS E, MATTHAY MA. Elevated levels of NAP-1/Interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the

- adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am Rev Respir Dis* 146: 427-432, 1992.
111. MUKAIDA N, SHIROO M, MATSUSHIMA K. Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol* 143: 1366-1371, 1989
 112. NATHAN CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79: 319-326.1987
 113. NAWROTH PP, STERN DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 163: 740-745, 1986.
 114. NICOD LP, LIPSCOMB MF, TOWS GB, WEISSLER JC. Separation of potent and poorly functional human lung accessory cells based on autofluorescence. *J Leukocyte Biol* 45: 458-465, 1989.
 115. NIEWOEHNER DE, KLEINERMAN J, RICE DB. Pathologic-changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. *N Engl J Med* 291: 755-758, 1974.
 116. NOURSHARGH S, PERKINS JA, SHOWELL HJ, MATSUSHIMA K, WILLIAMS TJ, COLLINS PD. A comparative study of the neutrophil stimulatory activity in vitro and pro-inflammatory properties in vivo of 72 amino acid and 77 amino acid IL-8. *J Immunol* 148: 106-111, 1992.
 117. OHLSSON K, BJÖRG P, BERGENFELDT M, HAGEMANN R, THOMPSON RC. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature* 348: 550-552, 1990.
 118. PARK WY, GOODMAN RB, STEINBERG KP, RUZINSKI JT, RADELLA F, PARK DR, PUGIN J, SKERRETT SJ, HUUDSON LD, MARTIN TR. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1896-1903, 2001.
 119. PARSON PE, MOSS M, VANICE JL, MOORE EE, MOORE FA, REPINE JE. Circulating IL-1ra and IL-10 levels are increased but do not predict the development of acute respiratory distress syndrome in at-risk patients. *Am J Respir Care Med* 155: 1469-1473, 1997.
 120. PERRY VH, LAWSON LJ. Macrophages in the central nervous system. The macrophage. Oxford University Press, New York: 391-414, 1992.
 121. PONTE P, NG SY, ENGEL J, GUNNING P, KEDES L. Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res*12: 1687-1696, 1984.

122. RAMADORI G, VAN DAMME J, RIEDER H, MEYER ZUM BÜSCHENFELDE KH. Interleukin 6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin 1 β and tumor necrosis factor- α . *Eur J Immunol* 18: 1259-1264, 1988.
123. RAMANI M, OLLIVIER V, KHECHAI F, VU T, TERNISIEN C, BRIDEY F, DE PROST D. Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced tissue factor mRNA production by human monocytes. *FEBS Lett* 334 (No.1 November): 114-116, 1993.
124. REDMOND HP, DC CLAVIN, BROMBERG JS, DALY JM. Inhibition of macrophage-activating cytokines is beneficial in the acute septic response. *Ann Surg* 214: 502-509, 1991.
125. REYNOLDS HY. Bronchoalveolar Lavage. *Am Rev Respir Dis* 135: 250-263, 1987.
126. REYNOLDS HY. Pulmonary host defenses. *Chest* 95: 223S-230S, 1989.
127. RINALDO JE, BOROVETZ H. Deterioration of oxygenation and abnormal lung microvascular permeability during resolution of leukopenia in patients with diffuse lung injury. *Am Rev Respir Dis* 131: 579-583, 1985.
128. ROBERTS AB, ANZANO MA, WAKEFIELD LM, ROCHE NS, STERN DF, SPORN MB. Type- β transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 119-23, 1985.
129. ROBINSON EA, YOSHIMURA T, LEONARD EJ, TANAKA S, GRIFFIN PR, SHABANOWITZ J, HUNT DF, APPELLLA E. Complete amino acid sequence of a human monocyte chemoattractant, putative mediator of cellular immune reactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1850-1854, 1989.
130. ROLLINS BJ, STIER P, ERNST TE, WONG GG. The human homologue of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol Cell Biol* 9: 4687-4695, 1989.
131. ROLLINS BJ. Chemokines. *Blood* 90 (3): 909-928, 1997.
132. ROSSEAU S, HAMMERL P, MAUS U, WALMRATH HD, SCHÜTTE H, GRIMMINGER F, SEEGER W, LOHMEYER J. Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L25-L35, 2000.
133. SAKAMAKI F, ISHIZAKA A, HANDA M, FUJISHIMA S, URANO R, SAYAMA K, NAKAMURA H, KANAZAWA M, KAWASHIRO T, KATAYAMA M. Soluble form of P-selectin in plasma is elevated in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 1821-1826, 1995.

134. SCHAEFER-PROKOP C, NOBAUER I, WEIDEKAMM C, KATZ-PAPATHEOPHILOU E. Bildgebung bei Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *Wien Med Wochenschr*: 151:520-523, 2001.
135. SCHINDLER R, MANCILLA J, ENDRES S, GHORBANI R, CLARK SC, DINARELLO CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75: 40-47, 1990.
136. SCHUMANN RR, LAMPING N, KIRSCHNING C, KNOFF HP, HERRNAMM F. The function and potential therapeutic value of lipopolysaccharide binding protein (LBP) during Gram-negative sepsis : recombinant expression and promoter studies. In *Sepsis: Current Perspectives in Pathophysiology and therapy*. Springer, Berlin: 391-402, 1994.
137. SEEGER W, GÜNTHER A, WALMRATH HD, GRIMMINGER F, LASCH HG. Alveolar surfactant and adult respiratory distress syndrome. *Clin. Invest* 71: 177-190, 1993.
138. SEEGER W, LASCH HG. Respiratorische Insuffizienz *Internist* 36: 318-326, 1995.
139. SEEGER W, WALMRATH D, GRIMMINGER F. ARDS. Intensivtherapie des akuten Lungenversagens. *Internist* 36: 785-801, 1995.
140. SEHGAL PB, MAY LT, TAMM I, VILCEK J. Human β_2 interferon and B-cell differentiation factor BSF-2 are identical. *Science* 235: 731-732, 1987.
141. SHABALY MR, AGGARWAL BB, AINDERKNECHT E, SVENDERSKY LP, FINKLE BS, PALLADINO JR A. Activation of human polymorphonuclear functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *J Immunol* 135: 2069-2073, 1985.
142. SHANDRON D, REYNOLDS HY, LAVAL AM, VENET A, ISRAEL-BIET D, CHRETIEN J. Human alveolar macrophage subpopulations isolated on discontinuous albumin gradients: cytological data in normals and sarcoid patients. *Eur J Respir Dis* 68: 177-85, 1986.
143. SHANDRON D, REYNOLDS HY, VENET A, LAVAL AM, ISRAEL-BIET D, CHRETIEN J. Human alveolar macrophage subpopulations isolated on discontinuous albumin gradients: functional data in normals and sarcoid patients. *Eur J Respir Dis* 69: 226-34, 1986.

144. SHASBY DM, FOX RB, HARADA RN, REPINE JE. Reduction of the edema of acute hyperoxic lung injury by granulocyte depletion. *J Appl Physiol* 52: 1237-1244, 1982.
145. SHELLITO J, KALTREIDER HB. Heterogeneity of immunological function among subfractions of normal rat alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 129: 747-53, 1984.
146. SIBILLE Y, NAEGEL GP, MERRILL WW, YOUNG KR JR, CARE SB, REYNOLDS HY. Neutrophil chemotactic activity produced normal and activated human bronchoalveolar lavage cells. *J Lab Clin Med* 110: 624-33, 1987.
147. SIBILLE Y, REYNOLDS HY. Macrophages and Polymorphonuclear Neutrophils in Lung Defense and Injury. *Am Rev Respir Dis* 141: 471-501, 1990.
148. SPORN SA, EIERMANN DF, JOHNSON CE, MORRIS J, MARTIN G, LADNER M, HASKILL S. Monocyte adherence results in selective induction of novel genes sharing homology with mediators of inflammation and tissue repair. *J Immunol* 144: 4434-4441, 1990.
149. STANDIFORD TJ, KUNKEL SL, KASAHARA K, MILIA MJ, ROLFE MW, STRIETER RM. Interleukin 8 gene expression from human alveolar macrophages: The role of adherence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 579-585, 1991.
150. STEEL DM, WHITEHEAD AS. The acute phase response. Humoral factors. IRL Press, Oxford: 1-20, 1993.
151. STOVEL RT. The influence of particles on jet breakoff. *J Histochem Cytochem* 25: 813-820, 1977.
152. STRIETER RM, CHENSUE SW, BASHA MA, STANDIFORD TJ, LYNCH JP, BAGGIOLINI M AND KUNKEL SL. Human alveolar macrophage gene expression of interleukin-8 by tumor necrosis factor- α , lipopolysaccharide, and interleukin-1 β . *Am J Respir Cell Mol Biol* 2: 321-326, 1990.
153. SUTER PM, SUTER S, GIRARDIN E, ROUX-LOMBARD P, GRAU GE, DAYER JM. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Respir Dis* 145: 1016-1022, 1992.
154. SYLVESTER I, YOSHIMURA T, SRICHERLING M, SCHRODER JM, CESKA M, PEICHL P, LEONARD EJ. Neutrophil attractant protein-1-immunoglobulin G im-

- immune complexes and free anti-NAP-1 antibody in normal human serum. *J Clin Invest* 90: 471-481, 1992.
155. TE VELDE AA, DE WAAL-MALEFIJT R, HUIJBENS RJ, DE VRIES JE, FIGDOR C. IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependant cellular cytotoxicity by IFN- γ , IL-4 and IL-10. *J Immunol* 149: 4048-4052, 1992.
156. TEN HOOR T, MANNINO DM, MOSS M. Risk factors for ARDS in the United States: analysis of the 1993 National Mortality Followback Study. *Chest* 119 (4): 1179-1184, 2001.
157. THICKETT DR, ARMSTRONG L, CHRISTIE SJ, MILLAR AB. Vascular endothelial growth factor may contribute to increased vascular permeability in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 164 (9): 1601-1605, 2001.
158. TILG H, TREHU E, ATKINS MB, DINARELLO CA, MIER JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: Induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83: 113-18, 1994.
159. TOVEY MG. The expression of cytokines in the organs of normal individuals; role of homeostasis. A review. *J Biol Regul Homeost Agents* 48: 5624-37, 1988.
160. TRAN VAN NHIEU J, MISSET B, LEBATGY F, CARLET J, BERNAUDIN JF. Expression of TNF- α gene in alveolar macrophages from patients with ARDS. *Am Rev Respir Dis* 147: 1585-1589, 1993.
161. VAN HAARST JMW, HOOGSTEDEN HC, DE WIT HC, VERHOEVEN GT, HAVENITH CEG, DREXHAGE HA. Dendritic cells and their precursors isolated from human bronchoalveolar lavage: Immunocytologic and functional properties. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 344-350, 1994.
162. VILCEK J, PALOMBELLA VJ, HENRIKSEN-DE STEFANO D, SWENSON C, FEINMAN R, HIRAI M, TSUYIMOTO M. Fibroblast growth-enhancing activity of TNF and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* 163: 632-643, 1986.
163. VILLAR J, SLUTSKY AS. The incidence of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 140: 814-816, 1989.
164. VINCENT JL. New management strategies in ARDS. *Immunomodulation Crit Care Clin* 18 (1): 69-78, 2002.

165. WAAL MALEFYT DE R, ABRAMS J, BENNETT B, FIDGOR CG, DE VRIES JE . Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174: 1209-1220, 1991.
166. WANG AM, CREASEY AA, LADNER MB, LIN LS, STRICKLER J, VAN ARSDELL JN, YAMAMOTO R, MARK DF. Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science* 228: 149-154, 1985.
167. WEBSTER NR, COHEN AT, NUNN JF. Adult respiratory distress syndrome. How many cases in the UK? *Anaesthesia* 43: 923-926, 1988.
168. VAN VOORHIS WC. Coculture of human peripheral blood mononuclear cells with *Trypanosoma cruzi* leads to proliferation of lymphocytes and cytokine production. *J Immunol* 148(1):239-48, 1992.
169. WISPE JR, CLARK JC, WARNER BB, FAJARDO D, HULL WE, HOLTZMAN RB, WHITSETT JA. Tumor necrosis factor-alpha inhibits expression of pulmonary surfactant protein. *J Clin Invest* 86: 1954-1960, 1990.
170. WONG GG AND CLARK SC. Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network. *Immunol Today* 9: 137-139, 1988.
171. WONG HR. ARDS. The future. *Crit Care Clin* 18 (1): 177-196, 2002.
172. WOOLEY PH, WHALEN JD, CHAPMAN DL, BERGER AE, RICHARD KA, ASPAR DG, STAITE ND. The effect of interleukin-1 receptor antagonist protein on type II collagen-induced arthritis and antigen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 9: 1305-1314, 1993.
173. YOSHIMURA T , ROBINSON EA, TANAKA S, APPELLA E, KURATSU J, LEONARD EJ. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp Med* 169: 1449-1459, 1989.
174. YOSHIMURA T, YUHKI N, MOORE SK, APPELLA E, LERMAN MI, LEONARD EJ. Human monocyte chemoattractant protein (MCP-1): full length c DNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett* 244: 487-493, 1989.
175. ZEE VAN KJ, DEFORGE LE, FISCHER E, MARANO MA, KENNEY JS, REMICK DG, LOWRY SF, MOLDAWER LL. IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J Immunol* 146: 3478-3482, 1991.

-
176. ZHANG Y, LEE TC, GUILLEMIN B, YU MC, ROM WN. Enhanced IL-1 β and TNF- α release and mRNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J Immunol* 150: 4188-4196, 1993.
 177. ZHONG WW, BURKE PA, HAND AT, WALSH MJ, HUGHES LA, FORSE RA. Regulation of cytokine mRNA expression in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *Arch Surg* 128: 158-164, 1994.
 178. ZILBERSTEIN A, RUGGIERI R, KORN JH, REVEL M. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J* 5: 2529-2537, 1986.

7. ANHANG

7.1 Verwendete Lösungen

Denhardt Lösung (50) :	Ficoll MW 400.000	10,0 g
	Polyvinylpyrrolidon	10,0 g
	BSA	10,0 g
	ad 1000ml Aqua dest.	
Hank´s gepufferte Salzlösung (HBSS)	CaCl ₂	2,00 g
	KCl	0,40 g
	KH ₂ PO ₄	0,06 g
	MgCl ₂ 6 H ₂ O	0,10 g
	MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,10 g
	NaCl	8,00 g
	NA ₂ HCO ₃	0,35 g
	NA ₂ HPO ₄ 7 H ₂ O	0,09 g
ad 1000ml Aqua dest.		
Prähybridisierung/ Hybridisierungslösung:	Denhardt´s Lösung	5 x
	SSC	5 x
	SDS	1 %
	Formamid deionisiert	50 %
	Hitze- denaturierte DNA	5 mg
	aus Heringssperma ad 50ml Aqua dest.	
SSC- Lösung (20 x)	NaCl	173,3 g
	tri-Na-citrat	128,2 g
	pH 7,0 (Ad 1000ml Aqua dest.)	
TAE-Puffer (50 x):	Tris	484,0 g
	Eisessig	114 ml

	0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1000ml Aqua dest.	200 ml
T ₁₀ E ₁ - Puffer:	Trizma-base EDTA pH 7,5 ad 1000ml Aqua dest.	1,21 g 0,37 g
Waschlösung I :	SSC SDS in Aqua dest.	2 x 0,1 %
Waschlösung II :	SSC SDS in Aqua dest.	1 x 0,1%

7.2 Materialien und Bezugsquellen

ABC- Lösung	Dako, Glastrup, Dänemark
ABTS	Sigma, D-Deisenhofen
Agarose, Nusieve	Biozym, D-Oldendorf
α [³² P] dCTP	Amersham, D- Braunschweig
Ampli Taq [®] DNA Polymerase	Perkin Elmer, Norwalk, CA, USA
Anti-Maus-Immunglobulin Antikörper aus der Ziege, (F (ab') ₂ Fragment, biotinyliert)	An der Grub, Kaumberg, Österreich
anti- Maus- Immunglobulin (Antikörper aus dem Esel, biotinyliert)	Dianova, D-Hamburg
Aqua destillata	Braun, D-Melsungen
β Aktin Primer (PCR)	Clontech, Palo Alto, CA, USA

Bovines Serumalbumin	Sigma, D-Deisenhofen
Casein	Sigma, D-Deisenhofen
Deoxyribonuklease I, RNase-frei	Sigma, D-Deisenhofen
dNTP	Perkin Elmer, Noewalk, CA, USA
DTT	Gibco, D-Eggenstein
Einwegmaterial aus Polypropylen, Polyethylen, Polyesterol	Eppendorf, D-Hamburg Falcon, D-Heidelberg Greiner, D-Nürtingen Nunc, Roskilde, Dänemark
Ethanol	Reidel de Haen, D-Seelze
EDTA	Merck, D-Darmstadt
Ficoll, Molekulargewicht 400.000	Sigma, D-Deisenhofen
First strand Synthesepuffer	Gibco, D-Eggenstein
Fluorochrom- Kalibrierungs- Partikel Calibrite™	Becton Dickinson, D- Heidelberg
Formamid (deionisiert)	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Giemsa Azur- Eosin- Methylenblau- Lösung	Merck, D-Darmstadt
Glutamin	Gibco, D-Eggenstein
HBSS	Gibco, D-Eggenstein
Heringssperma- DNA	Boehringer, D-Mannheim
HRP	Dako, Glostrup, Dänemark
Hybond™-N Nylon-Membran	Amersham, D-Braunschweig
Interferon- γ	Thomae, D-Biberach
Limulus Amöbozytenlysat Assay	Chromogenix, Mölndal, Schweden
Lipopolysaccharid (Salmonella abortus equi)	Sebak, D-Aldenbach

Magnesiumchlorid	Merck, D-Darmstadt
Maus- Immunglobulin, IgG1	Dako, D-Hamburg
May- Grünwald Eosin- Methylenblau-Lösung	Merck, D-Darmstadt
Minimum Essential Medium	Gibco, D-Eggenstein
MMLV Reverse Transkriptase	Gibco, D-Eggenstein
Natriumacetat	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Natriumchlorid	Merck, D-Darmstadt
Natriumhypochlorid	Hedinger, D-Stuttgart
OKT9 CD 71 Monoklonaler Antikörper aus der Maus	Ortho, D-Neckargemünd
PBS	Gibco, D-Karlsruhe
PCR- Puffer	Perkin Elmer, Norwalk, CA, USA
Penicillin	Gibco, D-Eggenstein
Phenol: Chloroform: Isopropanol	Roth, D-Karlsruhe
Random Hexanukleotide	Boehringer, D-Mannheim
RNAasin	Serva, D-Heidelberg
Roti-Quick Kit	Roth, D-Karlsruhe
SDS	Sigma, D-Deisenhofen
Sephadex G- 50 Säulen	Boehringer, D- Mannheim
Streptomycin	Gibco, D-Eggenstein
TRICOLOR [®] Phycoerythrin- Cyanin- 5 Tandem- Konjugat, Streptavidin- konjugiert	Medac, D-Hamburg
Tri- Natriumcitrat- Dihydrat	Merck, D-Darmstadt

TRIS	USB, Cleveland, Ohio, USA
Trizma- base	Sigma, D-Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, D-Deisenhofen
TWEEN- 20	Sigma, D-Deisenhofen
Wasserstoffperoxyd	Merck, D-Darmstadt
Zytokinspezifische PCR-Primer (TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1, IL-1ra, IL-10)	Stratagene, D-Heidelberg (Synthese partiell über Fa. Roth, D-Karlsruhe)

7.3 Verwendete Geräte und Herstellernachweis

Bronchoskop	Olympus, D-Hamburg
Brutschrank	Heraeus, D- Hanau
Elektrophoresekammern	von Keutz, D-Reiskirchen
ELISA- Plattenphotometer	Medgenix, D-Rattigen
FACStar ^{PLUS} Durchflußzytometer	Becton Dickinson, D-Heidelberg
Geigerzähler	Morgan, Burnham on Crouch, England
Heizrührgerät	Janke & Kunkel, D-Staufen i.Br.
Hybridisierungsofen	Biometra, D-Göttingen
Kühlzentrifugen	Heraeus, D-Hanau
Laminar Flow Sterilbank	Heraeus, D-Hanau
Mikroskop Laborlux D	Leitz, D-Wetzlar
PCR Maschinen	Perkin Elmer, D-Überlingen
PH - Meter	Schott, D-Hofheim
Photographiereinrichtung für Gele	Polaroid, St. Albans, England
Photomaterial	Polaroid, St. Albans, England

Pipetten	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Rüttelgerät	Janke & Kunkel, D- Staufen
Slot- Blot- Apparatur	Stratagene, D- Heidelberg
Spannungsgeber	Consort, Turnhout, Belgien
Spektrometer, UV/VIS	Perkin Elmer, D- Überlingen
Tischzentrifuge	Heraeus, D- Hanau
	Hettich, D- Tuttlingen
UV- Transluminator	MAGV, D- Rabenau
Wasserbad	Julabo, D- Seelbach
Zytozentrifuge	Shandon- Elliot, London, England

7.4 DANKSAGUNG

Herrn Dr. U. Maus spreche ich meinen ganz besonderen Dank für die intensive Betreuung dieser Arbeit aus. Seine Hilfe bei der Bewältigung anstehender Probleme zu jeder Zeit hat einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung dieser Arbeit genommen. Ich danke ihm weiterhin für die Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken und für die Freundschaft, die sich aus der Zusammenarbeit der letzten Jahre entwickelt hat.

Herrn Prof. Dr. J. Lohmeyer möchte ich für sein Interesse am Fortgang der Arbeit und seine hilfreiche Diskussionsbereitschaft danken. Ein herzliches Dankeschön für die besondere Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Humanmedizin.

Frau H. Muth hat mir durch viele sachkundige Diskussionen sowie durch ihre Unterstützung beim molekularbiologischen Arbeiten sehr geholfen. Ich möchte ihr an dieser Stelle sehr herzlich danken.

Frau R. Maus danke ich herzlich für die vielfältige Zusammenarbeit während vieler methodischer Arbeiten und für das positive Arbeitsklima, das durch ihre Persönlichkeit geschaffen wurde.

Meinen Eltern und insbesondere meiner lieben Frau Katrin sowie unseren Söhnen Eleftherios und Philonas, die durch ihre moralische Unterstützung wesentlich zum Gelingen beigetragen haben, möchte ich diese Arbeit widmen.

7.5 LEBENS LAUF

15.09.1971	Geburt in Flensburg Vater: Eleftherios Pavlidis Mutter: Klito Kalampaka
1977-1981	Grundschule, Iserlohn
1981-1983	Gymnasium an der Stenner, Iserlohn
1983-1992	Gymnasium Laurentianum, Arnsberg
1989-1990	Lake Central High School, Madison, SD, USA
Mai 1992	Abitur
August 1995	Ärztliche Vorprüfung, JLU- Giessen
August 1996	1. Ärztliche Staatsexamen, JLU- Giessen
Herbst 1997	Beginn der Dissertation als Mitarbeiter der klinischen Forschergruppe „Respiratorische Insuffizienz“ am Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig- Universität Giessen (Leiter: Prof. Dr. W. Seeger) im Projekt „Alveoläre Makrophagen und ARDS“ (Leiter: Prof. Dr. J. Lohmeyer)
März 1999	2. Ärztliche Staatsexamen, JLU- Giessen
PJ 26.04.- 15.08.1999	Chirurgie, Aristoteles Universität Thessaloniki, GR American Hellenic Educational Program Association
16.08.-07.11.1999	Orthophädie, Oswestry, GB Robert Jones And Agnes Hunt Orthopaedic Hospital
08.11.99-02.01.2000	Orthopädie, JLU-Giessen
03.01.-25.04.2000	Innere Medizin, Hämatologie Onkologie, JLU-Giessen
Mai 2000	3. Ärztliche Staatsexamen, JLU-Giessen
01.08.2000-30.04.2002	AiP und wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Orthopädischen Universitätsklinik Heidelberg
13.05.2002 bis heute	Arzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie Justus-Liebig-Universität Giessen

7.6 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Giessen, im Dezember 2003

Theodoros Pavlidis

SEQUENTIAL GENE EXPRESSION ANALYSIS OF PRO- AND ANTIINFLAMMATORY CYTOKINES IN ALVEOLARMACROPHAGES FROM PATIENTS WITH ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROM ISOLATED BY FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTING

The aim of the present study was to further characterize the role of alveolar macrophages (AM) in Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) by evaluating their capacity to produce pro- [tumor necrosis factor (TNF)-alpha, interleukin (IL)-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1] and antiinflammatory cytokines [IL-10 and IL-1 receptor antagonist (IL1ra)].

Patients with ARDS (n=15) underwent sequential bronchoalveolar lavage (BAL), whereas healthy volunteers (n=9) had a single BAL. AM were separated to high purity (>96%) using fluorescence-activated cell sorting. We determined the pro- (TNF-alpha, IL-6, IL-8, MCP-1) and anti-inflammatory (IL-10, IL-1ra) cytokine gene expression in AM ex vivo using semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Moreover, we evaluated samples of BAL fluids for the same pro- and anti-inflammatory cytokines using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

We found increased TNF-alpha, IL-6, IL-8 and MCP-1 messenger ribonuclein acid (mRNA) levels in resident AM from primary lavaged ARDS patients in comparison to the control group, whereas there was no significant difference in the low expression of IL-10 and IL-1ra between these groups. AM from secondary and tertiary lavaged ARDS patients showed a reduction of proinflammatory cytokines in comparison to the primary lavage, at the same time expression of anti-inflammatory cytokine IL-10 was increased. Complementary to the cytokine gene expression profiles an initially increased secretion of proinflammatory cytokines was observed. Consequently, resident AM are possible target cells for therapeutic intervention strategies to suppress the exaggerated inflammatory process or stimulate the downregulated 'host defense'.