

Aus der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock  
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. Virchow

**Validierung einer durchflusszytometrischen Methode zur  
Leukozytendifferenzierung in der bronchoalveolären  
Lavage-Flüssigkeit des Menschen**

Eine klinisch – prospektive Studie

---

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor medicinae**

**(Dr. med.)**

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät der Universität Rostock



von

Martin Weise aus Wismar

Rostock, im Mai 2023

**Dekan:** Herr Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

- Gutachter:**
1. Herr Prof. Dr. med. Marek Lommatzsch  
Universitätsmedizin Rostock  
Abteilung Pneumologie & Interdisziplinäre Internistische  
Intensivmedizin
  2. Herr Prof. Dr. med. Micha Löbermann  
Universitätsmedizin Rostock  
Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten
  3. Herr Prof. Dr. rer. nat. Armin Braun  
Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin  
(ITEM), Hannover

**Verteidigungsdatum:** 31.01.2024

**MEINEN ELTERN GEWIDMET.**

## **Anmerkung**

In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit die männliche Form verwendet. Das gewählte generische Maskulinum bezieht sich zugleich auf alle Geschlechteridentitäten.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Geschichte der Bronchoskopie</b>	<b>1</b>
1.1.1	Erste Schritte auf dem Gebiet der subglottischen Endoskopie	1
1.1.2	Weiterentwicklung der Bronchoskopie bis heute	3
1.2	<b>Geschichte der bronchoalveolären Lavage</b>	<b>5</b>
1.2.1	Vom Tiermodell zum Menschen	5
1.2.2	Vom starren Bronchoskop zur Fiberoptik	5
1.2.3	Von der Wissenschaft in die klinische Diagnostik	6
1.3	<b>Formen der Lavage</b>	<b>7</b>
1.3.1	Bronchiallavage	7
1.3.2	Bronchoalveoläre Lavage	7
1.3.3	Ganzlungenlavage	7
1.4	<b>Indikationen der Lavage</b>	<b>8</b>
1.4.1	Therapeutische Indikationen	8
1.4.2	Diagnostische Indikationen	9
1.4.3	Forschungsindikation	11
1.5	<b>Durchführung der BAL</b>	<b>11</b>
1.5.1	Ort der Durchführung	11
1.5.2	Instillationsvolumen und Rückgewinnung der Spülflüssigkeit	12
1.5.3	Prozessierung der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit	13
1.5.4	Risiken bei der Durchführung einer BAL	14
1.6	<b>Interpretation der BALF</b>	<b>14</b>
1.6.1	Der bisherige Standard: die mikroskopische Analyse	14
1.6.2	Durchflusszytometrische Analyse	18
1.7	<b>Fragestellung</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	<b>Ablauf der Studie</b>	<b>21</b>
2.1.1	Entwicklung der Methode	21
2.1.2	Prospektive Datenerhebung	21
2.1.3	Klinische Daten	22
2.1.4	Ein- und Ausschlusskriterien	22
2.2	<b>Bronchoalveoläre Lavage</b>	<b>23</b>
2.3	<b>Aufbereitung der BALF</b>	<b>25</b>
2.4	<b>Mikroskopische Analyse der BALF</b>	<b>27</b>
2.5	<b>Durchflusszytometrische Analyse der BALF</b>	<b>30</b>
2.6	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1	<b>Charakteristika der Untersuchungspopulation</b>	<b>35</b>
3.2	<b>Erhebung der Differentialzytologie der Leukozyten</b>	<b>35</b>
3.3	<b>Gating-Strategie in der FACS-Messung</b>	<b>38</b>
3.3.1	Möglicher Fallstrick: „falsche Eosinophile“	40
3.4	<b>Vergleich der mikroskopischen und der durchflusszytometrischen Messmethode</b>	<b>42</b>
3.4.1	Korrelationsanalyse	42

3.4.2	Bland-Altman-Plots .....	43
3.4.3	Subgruppenanalysen .....	46
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>51</b>
4.1	Diskussion der Gating-Strategie .....	51
4.2	Bisherige Forschung zur Durchflusszytometrie von BALF-Leukozyten .....	53
4.3	Vorteile der durchflusszytometrischen Leukozytendifferenzierung in der BALF .....	54
4.4	Limitationen der durchflusszytometrischen Leukozytendifferenzierung in der BALF .....	55
4.5	Methodologische Stärken und Schwächen der Studie .....	58
4.5.1	Stärken der vorliegenden Studie .....	58
4.5.2	Schwächen der vorliegenden Studie .....	58
4.6	Ausblick .....	59
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>67</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	67
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	69
7.3	Tabellenverzeichnis .....	70
7.4	Publikation .....	71
7.5	Curriculum Vitae .....	72
7.6	Danksagung .....	74
7.7	Eidesstattliche Erklärung .....	75
<b>8</b>	<b>Thesen .....</b>	<b>77</b>

# 1 EINLEITUNG

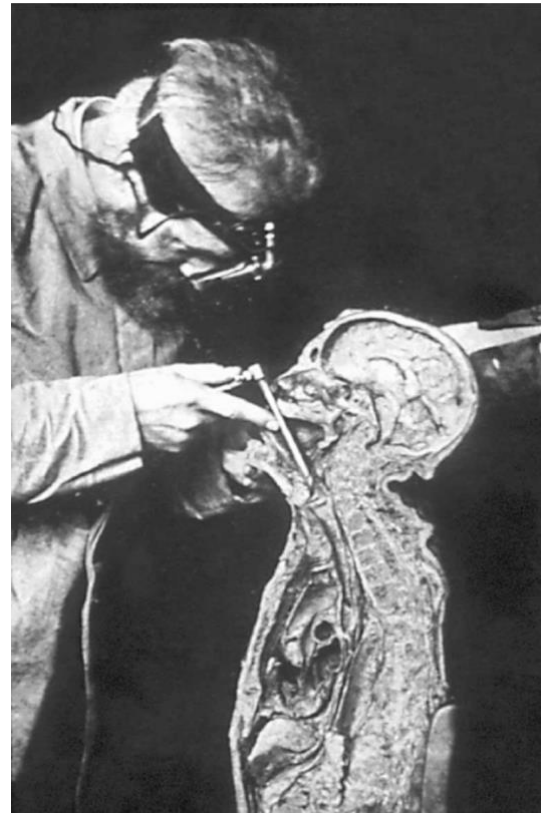
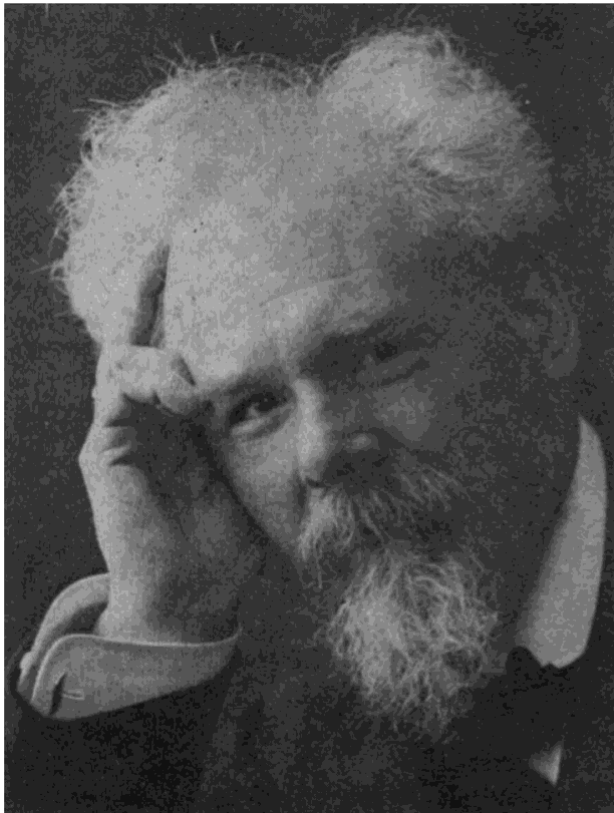
## 1.1 Geschichte der Bronchoskopie

Seit Jahrhunderten sind Inspektion, Palpation, Perkussion und Auskultation die Dreh- und Angelpunkte der ärztlichen Untersuchung und darauf fußender Diagnosen und Therapien. Bis heute nehmen diese vier Standardmaßnahmen bei jeder systematischen Patientenuntersuchung eine wichtige Rolle ein. Heute sind Ärzte bei der Beurteilung eines Patienten jedoch nicht mehr ausschließlich auf die eigenen fünf Sinne angewiesen. Eine Vielzahl von Möglichkeiten apparativer Diagnostik kann immer dann zu Hilfe genommen werden, wenn eine Beurteilung nur durch die Sinne des untersuchenden Arztes Auffälligkeiten ergibt oder aber nicht genügend klinische Informationen liefert. So waren Erkrankungen der unteren Atemwege für die längste Zeit der Medizingeschichte eine gefürchtete Krankheitsdomäne. Die schwer einsehbare Lage des Larynx unterhalb des Zungengrundes und der anatomische Verschluss durch die Epiglottis machten eine Inspektion der unteren Atemwege lange Zeit unmöglich. In der Folge waren Pathologien, welche hier ihren Ursprung hatten, schlecht untersucht und großen Teils nicht behandelbar. Dies sollte sich mit der Entwicklung von Untersuchungsverfahren ändern, die es möglich machten, Strukturen unterhalb der Glottis zu inspizieren. Ihre Weiterentwicklung führte zum heute etablierten Verfahren der Bronchoskopie.

### 1.1.1 Erste Schritte auf dem Gebiet der subglottischen Endoskopie

Die ersten Bemühungen, Sicht auf den Larynx zu erlangen, fanden in den 1850er Jahren statt. So gelang es den Ärzten Ludwig Türck in Wien und Johann Czermak in Budapest etwa zeitgleich, den Larynx mithilfe eines oral eingeführten Zahnarztspiegels darzustellen. Dieses Verfahren etablierte sich als indirekte Laryngoskopie <sup>2</sup>. Im Jahr 1895 gelang es Alfred Kirstein, erstmals direkte Sicht auf den Larynx und die Stimmlippen zu gewinnen. Hierfür nutzte er ein bereits bekanntes Ösophagoskop und verband es mit einem Elektroskop genannten Handgriff, der gleichzeitig als Leuchtmittel diente und dessen Lichtstrahlen bis zur Spitze des Ösophaguskops fortgeleitet wurden. Den Verbund aus Ösophagoskop und Elektroskop bezeichnete er als „Autoskop“ <sup>3</sup>. Bereits Kirstein verwendete für seine Untersuchungen mit dem

Autoskop das 1884 als Lokalanästhetikum eingeführte Kokain, welches die direkte Laryngoskopie bei wachen Patienten ermöglichte <sup>4</sup>. Auf Kirsteins Erkenntnissen aufbauend, entwickelte der deutsche HNO-Arzt Gustav Killian dieses Verfahren weiter und ging so als „Urvater der Bronchoskopie“ in die Medizingeschichte ein. Ihm gelang es am 30. März 1897 erstmals mit Hilfe der direkten Bronchoskopie, einen aspirierten Fremdkörper aus dem rechten Hauptbronchus eines Patienten zu entfernen. Über diesen Erfolg berichtete Killians Assistent Kollofrath anschließend in der Münchner Medizinischen Wochenschrift. Killian selbst veröffentlichte seine Ergebnisse erst nach zwei weiteren erfolgreichen Fremdkörperextraktionen am 29. Mai 1898 auf einem Kongress in Heidelberg <sup>5</sup>.



**Abbildung 1: Gustav Killian: „Urvater der Bronchoskopie“**

Links: Gustav Killian (1860-1921) etablierte die starre Bronchoskopie in Deutschland <sup>4</sup>. Rechts: Killian bei der Durchführung der starren Bronchoskopie zu Vorführungs zwecken an einem Präparat in situ <sup>6</sup>.

Inspiriert durch Killians Erfolge bei der bronchoskopischen Fremdkörperextraktion, eignete sich auch der amerikanische Laryngologe Chevalier Jackson Fertigkeiten auf diesem Gebiet an <sup>1</sup>. Im Jahr 1904 entwickelte er in Philadelphia selbst ein starres Bronchoskop mit Sichtfeldbeleuchtung und Arbeitskanal <sup>7</sup>. In den Folgejahren



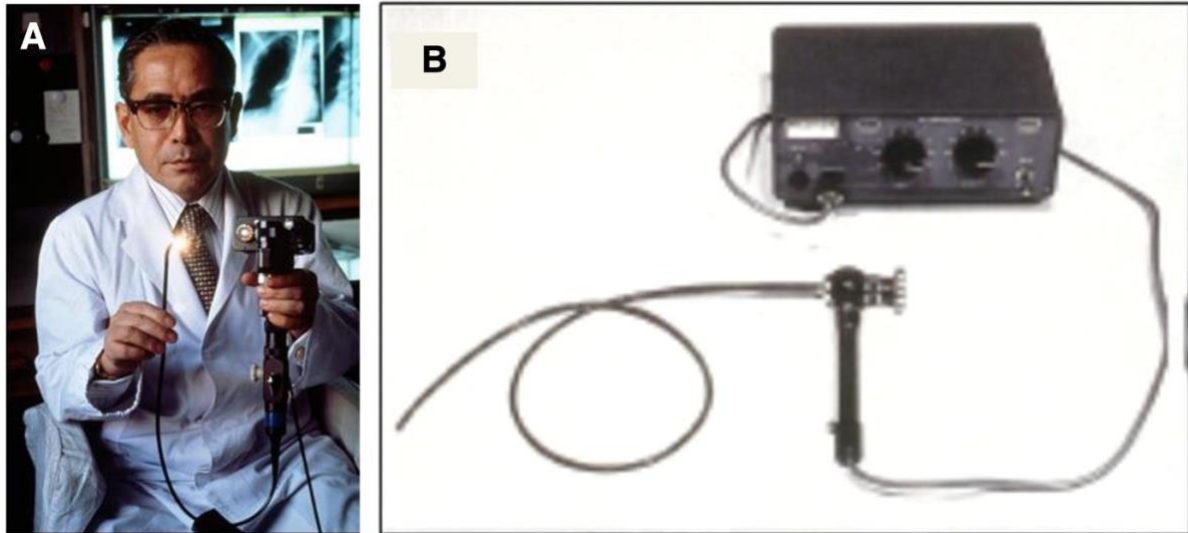
etablierte Jackson die starre Bronchoskopie in den USA und führte unzählige Fremdkörperentfernungen aus Trachea und Hauptbronchien seiner Patienten durch.



**Abbildung 2: Chevalier Jackson**  
Chevalier Jackson als Pionier der starren Bronchoskopie in den USA präsentiert eine Sammlung von ihm entfernter Fremdkörper <sup>1</sup>.

### 1.1.2 Weiterentwicklung der Bronchoskopie bis heute

Nach der Etablierung der starren Bronchoskopie Anfang des 20. Jahrhunderts fand die diagnostische und therapeutische Tragweite des neuen Verfahrens schnell internationale Anerkennung <sup>8</sup>. Durch die ständige Weiterentwicklung von Material und Arbeitsabläufen wurde das Komplikationsrisiko gesenkt und die Endoskopie der Atemwege entwickelte sich zu einem Standardverfahren der Lungenheilkunde. Nachdem die starre Bronchoskopie über die erste Hälfte des 20. Jahrhunderts weltweit in Lungen- und Thoraxzentren Einzug gehalten hatte, stellte die Einführung der flexiblen Bronchoskopie den nächsten historischen Meilenstein dar. Der Japaner Shigeto Ikeda entwickelte Anfang der 1960er Jahre ein fiberoptisches Bronchoskop, welches 1967 in Japan erstmals eingeführt wurde <sup>7,9,10</sup>. (**s. Abb. 3**) Ab etwa 1970 fand die flexible Bronchoskopie auch in Europa und den USA schnell Verbreitung <sup>11</sup>, da sich so vor allem die peripheren Abschnitte des Bronchialsystems wesentlich besser darstellen ließen <sup>9</sup>.



**Abbildung 3: Dr. Shigeto Ikeda entwickelte 1967 in Japan das erste fiberoptische Bronchoskop**  
Dr. Shigeto Ikeda (A) mit dem von ihm entwickelten fiberoptischen Bronchoskop (B) <sup>12</sup>.

In der Folge löste die fiberoptische Bronchoskopie das starre Verfahren auf dem diagnostischen Sektor immer weiter ab. Heute beschränkt sich der Einsatz der starren Bronchoskopie hauptsächlich auf den therapeutischen Bereich <sup>13</sup>. Im Gegensatz zur flexiblen Bronchoskopie wird sie in Allgemeinanästhesie durchgeführt <sup>13</sup>. Im Laufe der Zeit konnte die flexible Bronchoskopie immer weiter optimiert werden, so dass nach und nach, zusätzlich zur rein visuellen Begutachtung des Bronchialsystems, weitere diagnostische Möglichkeiten hinzukamen. So wurden flexible Bronchoskope mit Arbeitskanal entwickelt, über den es beispielsweise möglich wurde, Biopsien des Bronchialgewebes unter Sicht durchzuführen. Im Rahmen der Diagnostik mittels flexibler Bronchoskopie konnten flexible Biopsienadeln entwickelt werden, die eine transbronchiale Nadelaspiration (TBNA) zur minimalinvasiven Probengewinnung aus peribronchialen Lymphknoten ermöglichten <sup>14</sup>. Anfang der 2000er Jahre etablierte sich die Kombination aus flexibler Bronchoskopie und endobronchialen Ultraschall (EBUS). Somit war es möglich, nicht nur intrabronchiale Bereiche, sondern auch benachbarte Strukturen visuell zu beurteilen. Besonders in Hinsicht auf Neoplasien und möglichen Lymphknotenbefall ist dieses Verfahren von besonderem diagnostischen Wert <sup>15</sup>. Im Jahr 2004 erschien das erste Bronchoskop auf dem Markt, welches die transbronchiale Nadelaspiration und den endobronchialen Ultraschall miteinander verband und somit die Entnahme einer Gewebeprobe unter direkter sonographischer Sicht ermöglichte. Dieses EBUS-TBNA genannte Kombinationsverfahren wird heute regelmäßig im Staging des Bronchialkarzinoms sowie bei der Beurteilung mediastinaler Raumforderungen eingesetzt <sup>16</sup>.

## 1.2 Geschichte der bronchoalveolären Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) ist aus der täglichen Arbeit pneumologischer Kliniken und Praxen auf der ganzen Welt nicht mehr wegzudenken. Obwohl es sich um ein vergleichsweise „junges“ Verfahren handelt, welches in der heute üblichen Form erst seit wenigen Jahrzehnten durchgeführt wird, ist die BAL sowohl als Verfahren für diagnostische, als auch für wissenschaftliche Fragestellungen international etabliert <sup>17</sup>.

### 1.2.1 Vom Tiermodell zum Menschen

Wann die erste bronchoalveoläre Lavage am Menschen stattgefunden hat, ist umstritten. So gibt es bereits aus dem Jahr 1922 Berichte über die Durchführung einer Form der Lungenlavage zur Therapie der Phosgen-Intoxikation an der University of Yale <sup>18</sup>. Die erfolgreiche Isolation von Alveolarmakrophagen mittels BAL aus der Hasenlunge im Jahr 1961 durch Q.N. Myrvik weckte das wissenschaftliche Interesse an der zellbiologischen Untersuchung des Lungensekrets <sup>19</sup>. 1964, nur drei Jahre nach Myrviks erfolgreichen Tierversuchen, gelang R. I. Keimowitz die Lavage der menschlichen Lunge. Zwar wurde diese erste Lavage am Menschen zur Untersuchung von Immunglobulinen in der Tracheobronchialflüssigkeit noch mit starrem Bronchoskop durchgeführt, so war doch der Grundstein für eine neue Untersuchungsmethode der unteren Atemwege gelegt <sup>20</sup>.

### 1.2.2 Vom starren Bronchoskop zur Fiberoptik

Das hohe Komplikationsrisiko der starren Bronchoskopie und die Unmöglichkeit, gezielt einzelne Lungenbereiche zu lavagieren, brachten das Verfahren schnell an seine technischen Grenzen. Zur Untersuchung von Sekretbestandteilen bei chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen verwendeten T.N. Finley et al. 1967 einen sogenannten Metras-Ballonkatheter anstatt des starren Bronchoskops für die Lavage <sup>21</sup>. Hierbei handelte es sich um einen halb rigiden Gummikatheter mit röntgendichter Spitze. Unter röntgenologischer Durchleuchtung des Patienten war es nun möglich, den Katheter bis auf Segmentbronchus-Ebene einzuführen. Da jedoch keine Lagekontrolle unter direkter Sicht erfolgen konnte, war die anatomische Lokalisierung des distalen Katheterendes stets recht ungenau <sup>7</sup>. Der entscheidende Durchbruch der BAL gelang durch die Entwicklung des fiberoptischen Bronchoskops (**s. Abschnitt**

**1.1.2).** Die erste BAL nach dem bis heute gebräuchlichen Verfahren mit Fiberglasbronchoskop und lokaler Betäubung führten 1974 H.Y. Reynolds und H.H. Newball primär aus akademischem Interesse durch<sup>22</sup>. Durch den Einsatz des flexiblen Bronchoskops und einer lokalen Anästhesie konnte sich das komplikationsarme Verfahren etablieren und wurde in den Folgejahren sehr erfolgreich zur Erforschung pathogenetischer Konzepte von Erkrankungen des unteren Respirationstraktes genutzt<sup>23</sup>.

### 1.2.3 Von der Wissenschaft in die klinische Diagnostik

Nachdem H.Y. Reynolds und H.H. Newball die flexible Bronchoskopie als Mittel der Wahl zur Durchführung der bronchoalveolären Lavage eingeführt hatten, gewann das Verfahren international an Popularität. Schnell wurde neben dem wissenschaftlichen Nutzen der Beurteilung von Zellen und Proteinen aus den distalen Lungenabschnitten auch die diagnostische Relevanz der BAL erkannt. So wurden nach den ursprünglichen Untersuchungen an gesunden Probanden, bald auch Patienten mit spezifischen Atemwegserkrankungen mittels bronchoalveolärer Lavage untersucht. Davis et al. führten 1975 BAL-Untersuchungen an Patienten mit diffusen interstitiellen Lungenerkrankungen durch und es gelang, charakteristische Zellprofile für diese Erkrankungsgruppe zu ermitteln<sup>24</sup>. Im Jahr 1977 analysierten Reynolds et al. Zellen und Proteine aus Lavage-Proben von Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose und exogen allergischer Alveolitis (EAA). Erneut zeigten sich charakteristische Unterschiede in Zell- und Antikörperzusammensetzung sowie veränderte Proteinkonzentrationen in der Lavage-Flüssigkeit der Erkrankten<sup>25</sup>. In der Folge zeichnete sich die Möglichkeit ab, anhand von spezifischen immunologischen Veränderungen in BAL-Proben Rückschlüsse auf zugrunde liegende Erkrankungen ziehen zu können. Dies sorgte für ein enormes Interesse der internationalen Wissenschaft an der neuen Untersuchungsmethode. Die Verbindung aus ubiquitärer Durchführbarkeit, geringem Komplikationsrisiko und hoher diagnostischer Aussagekraft ließen die bronchoalveoläre Lavage in den folgenden Jahrzehnten zu einem bedeutenden diagnostischen Verfahren in der Pneumologie werden<sup>17</sup>.

## 1.3 Formen der Lavage

### 1.3.1 Bronchiallavage

Bei der Bronchiallavage handelt es sich um eine offene Spülung des Bronchialbaums mit etwa 10-30 ml Kochsalzlösung. Die Bronchiallavage gewinnt Bakterien, Schleim und Zellen nicht nur aus den distalen Atemwegsbereichen, sondern auch aus weniger tiefen Bereichen der Bronchien. Die Suche nach Tumorzellen und Bakterien steht hierbei im Vordergrund <sup>26a</sup>.

### 1.3.2 Bronchoalveoläre Lavage

Bei der bronchoalveolären Lavage handelt es sich um eine geschlossene Spülung eines Lungensegmentes. Dieses primär diagnostische Verfahren macht es möglich, bronchoskopisch die distalsten Bereiche der unteren Atemwege, nämlich die terminalen Bronchiolen und Alveolen, zu beurteilen. Mit Hilfe dieser Methode können organische und anorganische Partikel, Zellen, Krankheitserreger, sowie Flüssigkeiten aus dem Bronchoalveolarraum ausgewaschen werden. Die relative Zusammensetzung dieser Bestandteile sowie deren Morphologie liefern häufig wegweisende diagnostische Informationen <sup>27</sup>.

### 1.3.3 Ganzlungenlavage

Bei der Ganzlungenlavage handelt es sich um die Spülung eines kompletten Lungenflügels. Die Spülflüssigkeit durchströmt somit das gesamte Bronchialsystem bis in den Alveolarraum. Die Ganzlungenlavage wird in Allgemeinanästhesie durchgeführt, wobei über einen Doppellumentubus ein Lungenflügel beatmet wird, während im anderen Lungenflügel die Lavage stattfindet. Der Patient wird für dieses Verfahren auf einem kippbaren Tisch gelagert, Instillation und Rückgewinnung der Spülflüssigkeit erfolgen unter Nutzung der Schwerkraft über entsprechende Neigung des Patienten und damit der lavagierten Lunge <sup>28</sup> (**s. Abb. 4**).

## 1.4 Indikationen der Lavage

### 1.4.1 Therapeutische Indikationen

Bei der therapeutischen Lavage liegt das Augenmerk nicht darauf, Material zu Untersuchungszwecken aus den Atemwegen zu gewinnen, sondern vielmehr besteht das Ziel darin, dem Patienten durch Auswaschen biologischen Materials Linderung einer respiratorischen Symptomatik zu verschaffen. Die bedeutendste Technik zur therapeutischen Lavage ist die Ganzlungenlavage. Ihre Hauptindikation besteht in der Behandlung der Alveolarproteinose und somit in der Auswaschung von Proteinablagerungen aus dem Bronchialsystem. Das Gesamtvolumen der Spülflüssigkeit beträgt zwischen 15 und 30 Litern, wobei pro Zyklus etwa ein Liter Flüssigkeit instilliert wird. Die Trübung der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit nimmt von Zyklus zu Zyklus ab und das Prozedere wird so lange fortgeführt, bis die zurückgewonnene Flüssigkeit klar erscheint <sup>28</sup>(s. **Abb. 4**).



**Abbildung 4: Therapeutische Ganzlungenlavage**

Links: PD Dr. med Stoll bei der Instillation von 0,9% NaCl-Lösung im Rahmen einer therapeutischen Ganzlungenlavage. Rechts: Zurückgewonnene Spülflüssigkeit einer Ganzlungenlavage bei Alveolarproteinose, die Trübung nimmt im Verlauf der Spülung ab (links Vergleich: NaCl-Lösung).

Auch die Bronchiallavage bietet einen therapeutischen Aspekt. So können bei geringer Invasivität und kleinen Spülvolumina Schleimablagerungen im Rahmen von Asthma bronchiale oder zystischer Fibrose gelöst werden, sofern sie nicht mehr selbstständig abgehustet werden können. Auch in der Intensivmedizin spielt die therapeutische

Bronchiallavage eine Rolle. So können bei intubierten Patienten Schleimablagerungen aus dem Bronchialtrakt gelöst werden, um die Oxygenierung zu verbessern<sup>29</sup>.

### 1.4.2 Diagnostische Indikationen

Jede Form der Lungenlavage bringt ein diagnostisches Potenzial mit sich. In der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit befinden sich Zellen und biologisches Material, welches zu mikrobiologischen, laborchemischen oder histologischen Untersuchungen verwendet werden kann. In dieser Arbeit soll es um die spezifische Bedeutung der bronchoalveolären Lavage in der pneumologischen Diagnostik gehen. Aufgrund des geringen Komplikationsrisikos und ihrer hohen Aussagekraft bezüglich intrapulmonal ablaufender entzündlicher und immunologischer Prozesse hat sich die BAL zu einem essentiellen Diagnostikverfahren entwickelt. Die Hauptindikationen zur Durchführung einer diagnostischen BAL lassen sich in Infektion, interstitielle Lungenerkrankung und Tumor aufteilen<sup>27</sup>.

#### *Infektion*

Die Infektion der unteren Atemwege ist eine der häufigsten Indikationen zur Durchführung einer BAL. Ein besonderer diagnostischer Nutzen besteht bei der beatmungsassoziierten Pneumonie und bei pulmonalen Infiltraten immunsupprimierter Patienten<sup>30-32</sup>. Der Nutzen einer systematischen BAL-Untersuchung bei Patienten mit Verdacht auf eine ambulant erworbene Pneumonie ist bislang nicht nachgewiesen<sup>33-35</sup>. Diagnostiziert werden können mittels bronchoalveolärer Lavage sowohl Infektionen mit Viren und Bakterien als auch mit Pilzen. Das gewonnene Material kann für verschiedene mikrobiologische Untersuchungen genutzt werden, häufige Verwendung finden kulturelle Anzucht, Mikroskopie und PCR<sup>27</sup>.

#### *Interstitielle Lungenerkrankung (ILD)*

Der Einsatz der bronchoalveolären Lavage in der Diagnostik interstitieller Lungenerkrankungen wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert<sup>36</sup>, ist heute allerdings umfassend etabliert<sup>37</sup>. Die häufigsten Vertreter dieser Erkrankungsgruppe sind Sarkoidose, exogen allergische Alveolitis, nicht spezifische interstitielle Pneumonie (NSIP) und idiopathische Lungenfibrose (IPF)<sup>38</sup>. Zu berücksichtigen ist, dass die diagnostische Potenz der BAL alleine in der Regel nicht ausreicht, um die

Diagnose einer interstitiellen Lungenerkrankung stellen zu können<sup>39</sup>. Vielmehr ist es eine diagnostische Trias aus Klinik, Bildgebung und bronchoalveolärer Lavage, die in ihrem Zusammenspiel die Diagnose ILD erlauben. So kann die zelluläre Analyse der BAL bei entsprechender Klinik und nicht eindeutigen Befund einer hochauflösenden Computertomographie ein entscheidender diagnostischer Wegweiser sein. Anhand einer unauffälligen BAL, ohne Erhöhung von Entzündungszellen, kann eine interstitielle Lungenerkrankung jedoch nicht ausgeschlossen werden<sup>40</sup>. Eine besondere Rolle in der Gruppe der interstitiellen Lungenerkrankungen nehmen die berufsbedingten Lungenerkrankungen ein. Die häufigsten Lungenerkrankungen in Folge von beruflicher Schadstoffexposition sind die EAA und Pneumokoniosen. Der EAA liegt eine Sensibilisierung in Folge der Inhalation organischer Partikel zugrunde. Durch charakteristische Verschiebungen der Immunzellzahlen in der BAL kann die Erkrankung weiter eingegrenzt werden. Die Entstehung von Pneumokoniosen beruht auf der chronischen Inhalation anorganischer Stäube, oft Mineral- oder Metallpartikel. Die BAL ist hier insbesondere zum Ausschluss anderer entzündlicher Differentialdiagnosen indiziert<sup>41</sup>. Bei einigen wenigen Erkrankungen lassen sich direkt lichtmikroskopisch inhalierte Pathogene erkennen. So sind beispielsweise bei der Asbestose dünne Asbestfasern, die so genannten Asbestkörperchen, nach chronischer Asbestexposition mikroskopisch zu sehen<sup>27</sup>.

### *Tumor*

Durch die Möglichkeit der Detektion maligner Zellen in der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit stellt die BAL ein klinisch bedeutsames Verfahren zur Tumordiagnostik dar. Besonders nützlich ist die BAL bei der Suche nach diffusen, bronchoskopisch nicht sichtbaren Tumordinfiltrationen der Lunge. Insgesamt ist der diagnostische Wert der BAL bei diffus wachsenden Tumoren höher als bei soliden Knoten<sup>42</sup>. Mit einer Sensitivität von 60-90% erzielt die bronchoalveoläre Lavage vor allem bei bronchoalveolärem Karzinom, Lymphangiosis carcinomatosa, und malignen Lymphomen sowie Leukämien mit Lungenmanifestation gute Ergebnisse<sup>43-47</sup>. Zusätzlich gibt es Bestrebungen, molekulare Tumorcharakteristika durch freie DNA zu bestimmen<sup>47</sup>. Zu beachten ist bei der Interpretation der BAL, dass Erkrankungen wie das akute Lungenversagen (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS), die akute interstitielle Pneumonitis und die Exazerbation einer IPF zelluläre Veränderungen induzieren können, die fälschlicherweise wie Neoplasien imponieren<sup>48</sup>.



### 1.4.3 Forschungsindikation

Nach der Etablierung der BAL mittels fiberoptischer Bronchoskopie, als sicheres und schonendes Untersuchungsverfahren, konnte durch Analyse der Spülflüssigkeit ein enormer Erkenntnisgewinn für das Verständnis pulmonaler Erkrankungen erzielt werden. Seit Mitte der 1970er Jahre entwickelte sich dank intensiver Forschung ein detailliertes Wissen über das zelluläre und immunologische Milieu der distalen Atemwege und dessen pathologischen Veränderungen<sup>22,25,49</sup>. Die mittels der BAL gewonnenen Erkenntnisse über immunologische Veränderungen der tiefen Atemwege in Folge verschiedener Lungenerkrankungen spielten eine entscheidende Rolle für das Verständnis zugrundeliegender Pathomechanismen<sup>50,51</sup>. Trotz der umfangreichen Erkenntnisse, die bereits gewonnen werden konnten, wird die BAL noch immer intensiv in der Erforschung von Atemwegserkrankungen genutzt. Dank des geringen Komplikationspotentials der Untersuchung kann sie auch an Patienten mit aktiven Atemwegserkrankungen, wie dem Asthma bronchiale, sicher durchgeführt werden<sup>52,53</sup>. So liegt ein Forschungsschwerpunkt der Abteilung für Pneumologie der Universitätsklinik Rostock in der segmentalen Allergenprovokation bei Patienten mit allergischem Asthma mittels BAL<sup>54,55</sup>. Hierbei wird eine geringe Allergendosis in die Segmente B4, B5 und B8 der rechten Lunge instilliert. Als Kontrolle wird in die analogen Segmente der linken Lunge physiologische Kochsalzlösung instilliert. Die Segmente B8 werden jeweils nach 10 Minuten und die Segmente B4/B5 nach 24 Stunden lavagiert und so miteinander verglichen<sup>56</sup>.

## 1.5 Durchführung der BAL

### 1.5.1 Ort der Durchführung

Zur Durchführung der bronchoalveolären Lavage gibt es keinen international festgelegten Handlungsablauf. Die Klinik für Pneumologie an der Universitätsmedizin Rostock orientiert sich an der Guideline der American Thoracic Society aus dem Jahr 2012<sup>40</sup>. So wird die BAL mit Hilfe des flexiblen Bronchoskops transoral oder transnasal in Lokalanästhesie durchgeführt. Eine hinreichende Lokalanästhesie ist von entscheidender Bedeutung, um den Hustenreiz des Patienten während der Untersuchung zu unterdrücken und somit ein Verrutschen des Bronchoskops zu vermeiden. Bei der diagnostischen BAL ohne konkreten Fokus in der Bildgebung

erfolgt die BAL in einem Subsegmentbronchus des Mittellappens. Ist es durch anatomische Besonderheiten nicht möglich, den Mittellappen zu lavagieren, erfolgt die BAL in der Lingula. Liegt vor der Untersuchung bereits ein konkreter röntgenologischer Fokus vor, wird die Lavage in entsprechendem Segment durchgeführt <sup>40</sup>.

### 1.5.2 Instillationsvolumen und Rückgewinnung der Spülflüssigkeit

Für die diagnostische Verwertbarkeit ist es von entscheidender Bedeutung, dass ein ausreichend großes Flüssigkeitsvolumen instilliert und anschließend wieder zurückgewonnen wird. Das empfohlene Instillationsvolumen liegt zwischen 100 ml und 300 ml physiologischer Kochsalzlösung <sup>40</sup>. Im Falle eines besonders sensiblen Bronchialsystems kann die Kochsalzlösung vor der Spülung auf Körpertemperatur erwärmt werden. Um zu gewährleisten, dass die Spülflüssigkeit ausschließlich in den distalsten Bereichen des Bronchialbaums, also den terminalen Bronchiolen und den Alveolen zirkuliert, ist es entscheidend, das Bronchoskop so weit wie möglich in die unteren Atemwege einzuführen. So sollte die Spitze des Instruments direkt an der Wand des Bronchus anliegen, so dass der instillierten Spülflüssigkeit der Weg zu proximaleren Bereichen des Bronchialsystems versperrt ist. Diese Position, in der das Bronchoskop den Bronchus abdichtet, wird als „Wedge-Position“ bezeichnet. Dichtet die Bronchoskopspitze den Bronchus nicht komplett ab, besteht das Risiko, dass ein zu geringer Anteil der instillierten Flüssigkeit zurückgewonnen wird, um eine differentialzytologische Aussage zu treffen <sup>26g</sup>. Befindet sich das Bronchoskop in Wedge-Position, kann die physiologische, sterile Kochsalzlösung entweder direkt durch den Arbeitskanal des Bronchoskops oder über einen BAL-Spülkatheter, welcher über den Arbeitskanal eingeführt wird, appliziert werden. Das Gesamtvolumen der zu instillierenden Kochsalzlösung wird in kleinere Fraktionen aufgeteilt. Empfohlen wird, 4-5 Einzeldosen zu je 20-60 ml zu instillieren <sup>57</sup>. Nach der Instillation jeder Einzeldosis wird die Spülflüssigkeit durch vorsichtige Aspiration in die Instillationsspritze zurückgewonnen (sogenannte „Recovery“). Hierbei sollte der entstehende Unterdruck weniger als 100 mmHg betragen, um einen Kollaps der gespülten Atemwege zu vermeiden <sup>40</sup>. Die Aspiration sollte unter Sicht erfolgen, um einen möglichen Atemwegskollaps frühzeitig zu erkennen. Bei Instillation und Rückgewinnung der Einzeldosen steigt das Volumen der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit in der Regel von Zyklus zu Zyklus, so dass bei der 4. oder 5. Einzeldosis das Recovery-Volumen in etwa dem Instillationsvolumen entspricht. In der Regel liegt das gesamte Recovery-

Volumen bei 40-70% des Volumens der Instillationsflüssigkeit, jedoch kann es bei obstruktiven Bronchialleiden und Lungenemphysem auf unter 30% fallen. Auch bei gesunden Rauchern und älteren Menschen ist das Recovery-Volumen erniedrigt <sup>26d</sup>. Sollte die Differenz zwischen instillierter und zurückgewonnener Spülflüssigkeit mehr als 100 ml betragen, sollte die Lavage in diesem Lungenareal beendet werden <sup>58</sup>.



**Abbildung 5: Durchführung der bronchoalveolären Lavage**

Prof. Dr. med. Lommatzsch mit zwei Funktionsschwestern der Bronchoskopie bei der Durchführung einer BAL mittels fiberoptischer Bronchoskopie.

Ziel sollte es sein, für eine diagnostische Verwertbarkeit mindestens 30% des Gesamtinstillationsvolumens zurückzugewinnen. Gelingt es nicht, mindestens 5% jeder Einzelinstillation zurückzugewinnen, sollte das Verfahren abgebrochen werden. Ein Mindestvolumen von 5 ml BAL-Flüssigkeit (BALF) wird für eine zelluläre Analyse benötigt <sup>40</sup>.

### 1.5.3 Prozessierung der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit

Nach erfolgreicher Durchführung der BAL erfolgt der schnellstmögliche Transport des Probenmaterials in ein geeignetes Labor. Die Probenflüssigkeit sollte in Behältern

transportiert werden, deren Wände möglichst schlechte Adhäsionseigenschaften für Zellen bieten. Hierfür geeignet sind Plastik- oder Silikongefäße. Bei direkter Überstellung ins Labor kann die Probe bei Raumtemperatur transportiert werden. Ist dies nicht möglich, kann die BAL-Flüssigkeit nach Zentrifugation und Versatz mit einer Nährlösung bei 4°C bis zu 24 Stunden gelagert werden, ohne das Ergebnis der Differentialzytologie zu beeinflussen <sup>40</sup>.

#### 1.5.4 Risiken bei der Durchführung einer BAL

Aufgrund der geringen Invasivität des Verfahrens kann die BAL ambulant durchgeführt werden. Es bedarf keiner stationären Überwachung im Anschluss an die Untersuchung <sup>26b</sup>. Die Mortalität des Verfahrens liegt bei 0%, die Komplikationsrate bei 0-3% <sup>59</sup>. Die spezifischen Komplikationen, die sich der BAL zuordnen lassen, sind neben dem Bronchospasmus und vorübergehenden Lungenfunktionseinschränkungen unklares Fieber und passagere segmentale Verschattungen. Die beiden letzten Phänomene unterliegen einer spontanen Remission innerhalb der ersten 24 Stunden <sup>57</sup>. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Fieber ist abhängig von der Größe des Spülvolumens, so beträgt sie bei geringem Instillationsvolumen von 100 ml 2,5%, steigt allerdings bei größeren Volumina auf 10-30%. Das Risiko von unter 1% für das Auftreten eines Bronchospasmus kann durch das Verwenden körperwarmer Spülflüssigkeit weiter gesenkt werden <sup>26c</sup>.

### 1.6 Interpretation der BALF

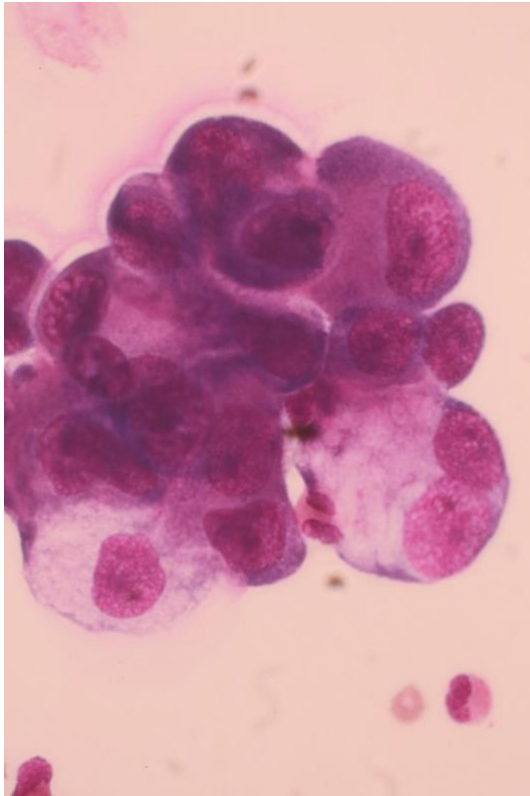
#### 1.6.1 Der bisherige Standard: die mikroskopische Analyse

Die Mikroskopie nimmt in der BALF-Diagnostik insofern eine besondere Rolle ein, als dass im mikroskopischen Präparat nicht nur eine Differenzierung der einzelnen Zelltypen möglich ist, sondern auch eine Beurteilung anhand morphologischer Kriterien. Diese morphologische Analyse des Zellmaterials durch einen erfahrenen Zytologen stellt das Alleinstellungsmerkmal der Mikroskopie dar und ist im rein durchflusszytometrischen Untersuchungsgang nicht möglich. In der mikroskopischen Beurteilung imponieren Veränderungen der Zellmorphologie, Einschlusskörperchen, sowie tumoröse Zellveränderungen. Die Kenntnis über derartige Veränderungen im zytologischen Bild kann dem Untersucher entscheidende diagnostische Informationen

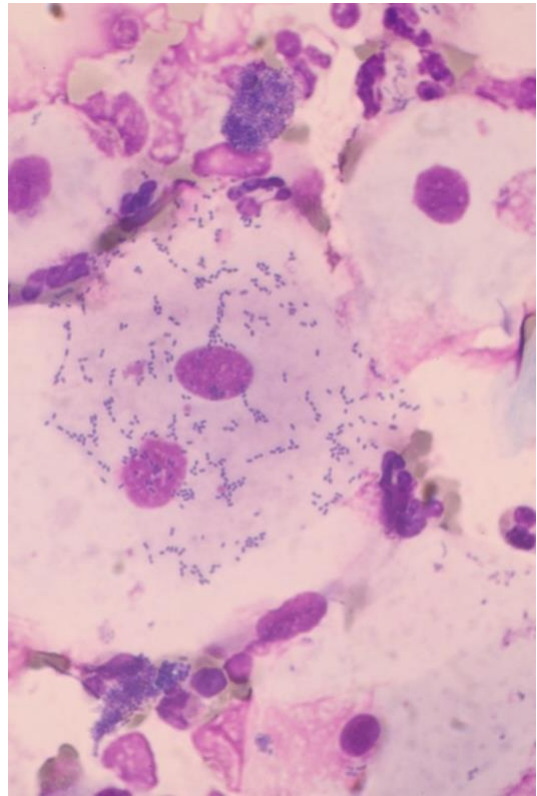
präsentieren. So können spezifische Veränderungen der einzelnen Zelltypen typische Merkmale pulmonaler Erkrankungen sein <sup>27</sup>.

Zur mikroskopischen Untersuchung muss ein gefärbtes Präparat des in der BAL gewonnenen Zellmaterials erstellt werden. Im Vordergrund der Untersuchung steht die Erhebung der Differentialzytologie der Leukozyten-Subpopulationen Makrophagen/Monozyten, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und eosinophile Granulozyten. Zu diesem Zweck sollten mindestens 400 Zellen mikroskopisch ausgezählt werden, anhand derer die prozentualen Anteile der einzelnen Leukozyten-Subpopulationen bestimmt werden. Hierbei können prozentuale Vermehrungen von > 15% Lymphozyten, > 3% neutrophile Granulozyten und > 1% eosinophile Granulozyten auf spezifische Erkrankungen hinweisen <sup>40</sup>. Bei der Durchmusterung des Präparates werden zusätzlich pathologische Veränderungen der Morphologie registriert, um diese später in einen Zusammenhang mit Differentialzytologie und Klinik des Patienten setzen zu können. Beispiele solcher Veränderungen sind Tumorzellen, Makrophagen-einschlüsse, Asbestkörperchen, CMV-Einschlüsse, *Pneumocystis jirovecii*, Pilze, Bakterien oder dysplastische Epithelien <sup>26e</sup>. Einige Lungenerkrankungen und die Exposition gegenüber bestimmten Noxen können sich in spezifischen morphologischen Veränderungen zeigen, welche von großem diagnostischen Wert sind. So sind die Alveolarmakrophagen von Rauchern häufig stark vergrößert und enthalten typische blau-schwarze Zytoplasmeeinschlüsse aus teer- und lipidhaltigen Pigmenten<sup>27</sup>. Bei der Sarkoidose, welche in der Regel mit lymphozytärer Alveolitis einhergeht, ist häufig eine ringförmige Anordnung von Lymphozyten um einen Makrophagen zu beobachten, das sogenannte Rosettenphänomen <sup>26f</sup>. Unter oder nach der Therapie mit Amiodaron kann es zu Phospholipiddepots im Zytoplasma der Alveolarmakrophagen kommen <sup>27</sup>. Beim alveolären Hämorrhagiesyndrom ist es mit Hilfe der mikroskopischen Untersuchung möglich, das Alter der stattgehabten Blutung einzuschätzen. Ein hoher Anteil freier Erythrozyten findet sich in den ersten Stunden nach oder während des Blutungsereignisses. Im Laufe der ersten 48 Stunden werden Erythrozyten durch Makrophagen phagozytiert und imponieren hier als gelbe, rundliche Einschlüsse. Erst im Verlauf nach 48 Stunden werden Hämosiderinablagerungen in den Makrophagen sichtbar. Somit ist eine adäquate zeitliche Einordnung möglich <sup>27</sup>. Im Falle einer überdurchschnittlich hohen Asbestexposition im Laufe des Lebens ist es möglich, im BALF-Präparat auf

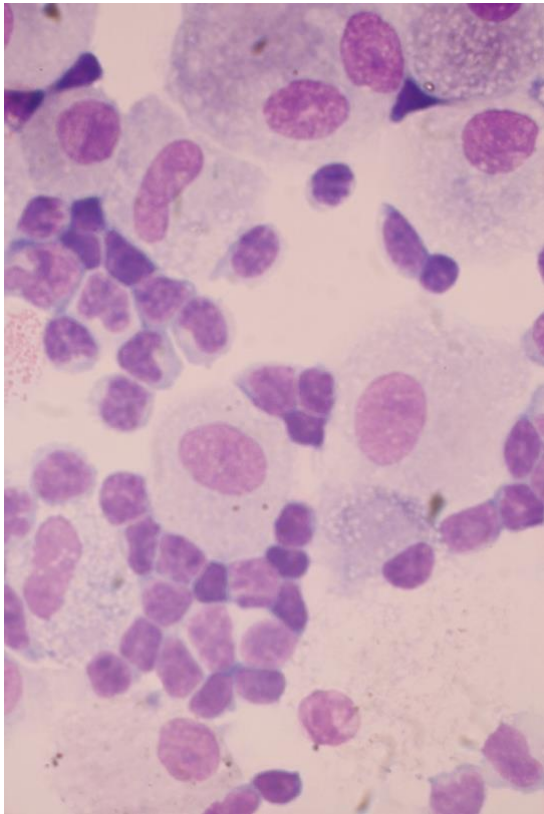
Asbestkörperchen zu stoßen. Hierbei handelt es sich um Asbestfasern, die von einer Hülle aus Hämosiderin, Ferritin und Glykoproteinen umgeben sind. Bereits ein Asbestkörperchen pro Milliliter BALF weist auf eine überdurchschnittlich hohe Asbestexposition hin <sup>27</sup>.



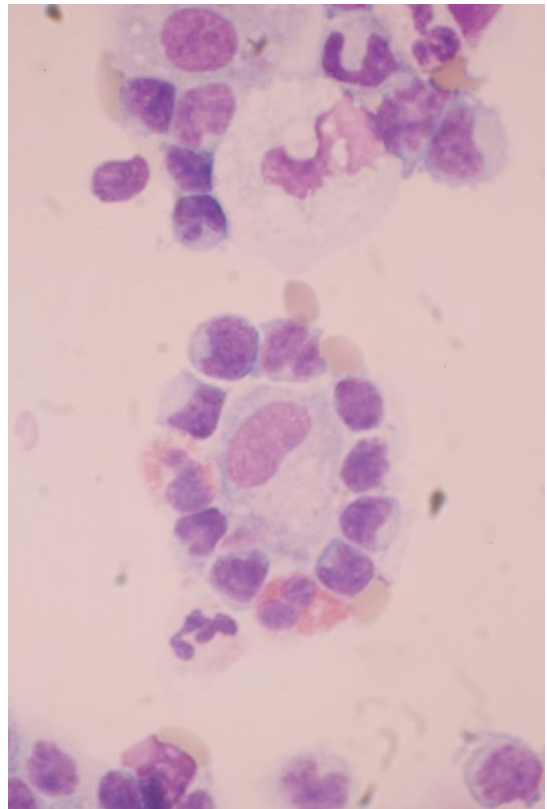
**A)** Tumorzellen



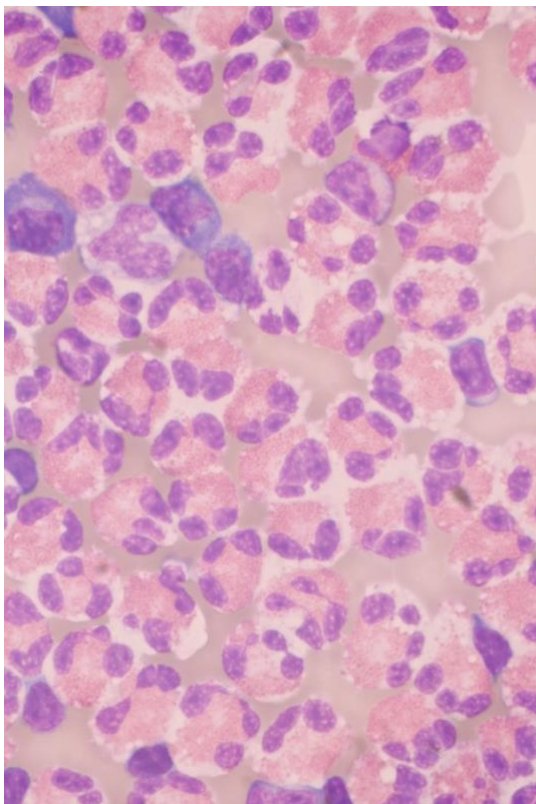
**B)** Bakterien



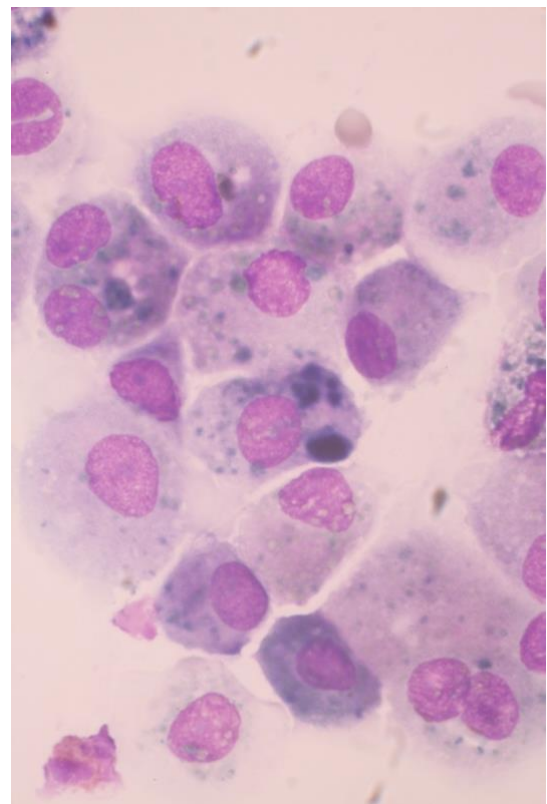
C) Sarkoidose



D) Sarkoidose



E) Eosinophilie



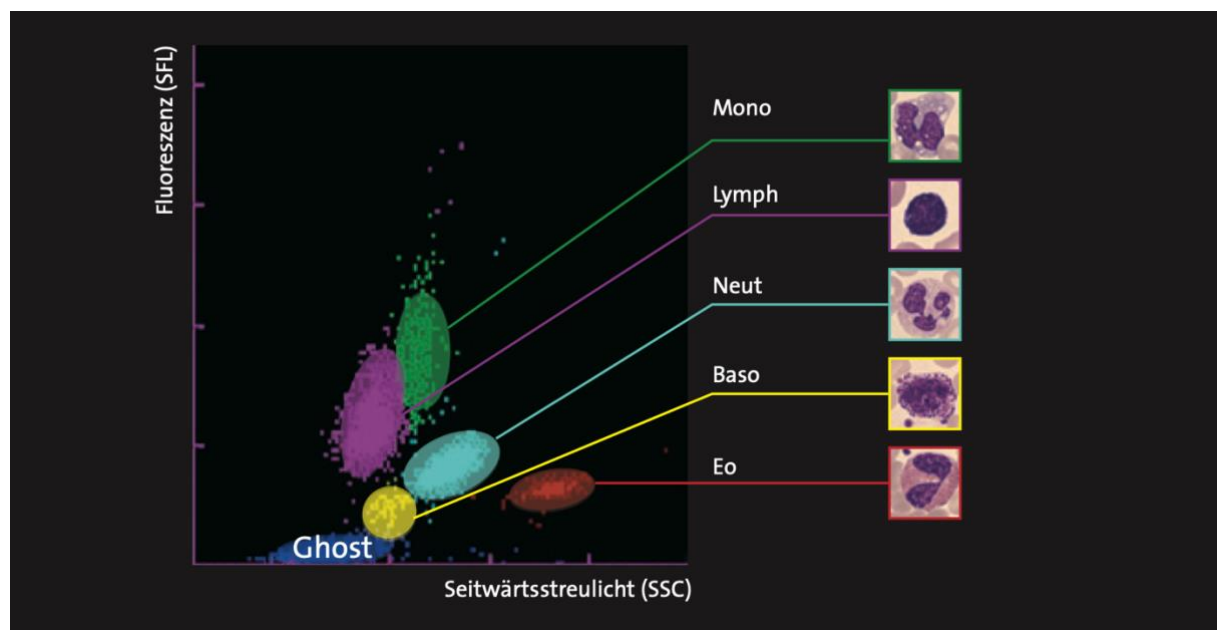
F) Raucher-Makrophagen

**Abbildung 6: Mikroskopische Ansicht verschiedener Zellmuster in der BALF**

Schnellfärbung „Hemacolor“, modifizierte Pappenheim-Färbung. **A)** Tumorzellen können in der mikroskopischen Untersuchung der BALF dargestellt werden. **B)** Im Zuge der Infektionsdiagnostik können Bakterien in der BAL-Zytologie nachgewiesen werden. **C)+D)** Lymphozytäre Alveolitis bei Sarkoidose mit Rosettenphänomen: Lymphozyten umlagern einen Makrophagen halbkreis- bis kreisförmig. **E)** Deutlich erhöhter Anteil eosinophiler Granulozyten mit typischen „brillenartigen“ Zellkernen<sup>26h</sup>. **F)** Alveolarmakrophagen mit dunklen Einschlusskörperchen bei einem Raucher. Die Fotos wurden freundlicherweise von Frau Anna Junge aus dem pneumologischen Labor der Universitätsklinik Rostock zur Verfügung gestellt.

1.6.2 Durchflusszytometrische Analyse

Die durchflusszytometrische Untersuchung von Zellen in einem Flüssigmedium ist ein in Klinik und Forschung umfassend etabliertes Analyseverfahren<sup>60,61</sup>. Besonders die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (fluorescence activated cell sorting, FACS), bei der Oberflächenmoleküle, intrazelluläre Proteine oder Nukleinsäuren mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert werden, ist in vielen Zentrallaboren durchführbar. Aktuell kommt die Durchflusszytometrie in der klinischen Routine hauptsächlich auf dem Gebiet der Hämatologie zum Einsatz und ist aus der Diagnostik und Charakterisierung hämatologischer Neoplasien nicht mehr wegzudenken<sup>62</sup>. Neben der onkologischen Diagnostik hat sich die Durchflusszytometrie auch in der Differentialzytologie des Blutes etabliert<sup>63</sup>. So ist es beispielsweise möglich, über die Anfärbung von Nukleinsäuren durch Fluoreszenzfarbstoffe Leukozyten-Subpopulationen voneinander zu differenzieren (s. **Abb. 7**).



**Abbildung 7: Durchflusszytometrische Leukozytendifferenzierung in der Hämatologie**

Beispielhafte Darstellung verschiedener Leukozyten-Subpopulationen mittels FACS-Analyse in Abhängigkeit von Fluoreszenz und Seitwärtsstreulicht<sup>64</sup>.



In der BALF-Diagnostik beschränkt sich die Bedeutung der FACS-Messung aktuell auf die Differenzierung von Lymphozyten-Subpopulationen<sup>65</sup>. So können der relative Anteil an T-Zellen, sowie das Verhältnis von CD4-positiven zu CD8-positiven T-Zellen bestimmt werden. Ein erhöhter CD4:CD8-Quotient kann auf eine Sarkoidose hinweisen<sup>66</sup>. Des Weiteren wird die Durchflusszytometrie bei der Suche nach Lungenbeteiligung bei lymphatischen und hämatopoetischen Neoplasien<sup>46,67</sup> und bei der Diagnostik der pulmonalen Langerhanszell-Histiozytose (PLCH) durch CD1 positive Zellen eingesetzt<sup>68</sup>. Darüber hinaus wird der durchflusszytometrischen Bestimmung von Oberflächenmarkern in der klinischen Routinediagnostik der BALF noch wenig Bedeutung beigemessen. Eine valide und etablierte Methode zur Leukozytendifferenzierung der BALF mittels FACS existiert bisher nicht, obgleich vereinzelt Versuche diesbezüglich unternommen wurden. Die Forschungsgruppen um Barry et al. (2002)<sup>69</sup>, Hodge et al. (2004)<sup>70</sup> und Shanthikumar et al. (2020)<sup>71</sup> konnten in ihren Publikationen zum einen keine Möglichkeit zur Messung des Anteils an eosinophilen Granulozyten aufzeigen, zum anderen war eine Differenzierung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten nicht möglich. Die Studie der Forschungsgruppe um Tricas et al. (2011)<sup>72</sup> zeigte eine starke Abweichung der durchflusszytometrischen Messergebnisse von den mikroskopisch erhobenen Messergebnissen. In der Publikation um Pepedil-Tanrikulu et al. (2019)<sup>73</sup> wurden keine Angaben zur Quantifizierung der Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Messverfahren gemacht, die hierfür notwendigen Bland-Altman-Analysen fehlten. Eine Limitation aller bisher publizierten Studien ist die geringe Fallzahl der untersuchten BALF-Proben. In allen Veröffentlichungen betrug die Anzahl der eingeschlossenen Proben < 100.

## 1.7 Fragestellung

Die bronchoalveoläre Lavage nimmt eine Schlüsselrolle in der pneumologischen Diagnostik ein. Besonders wegweisend für die Beantwortung einer klinischen Fragestellung ist hier die Differentialzytologie. Im Gegensatz zu den etablierten durchflusszytometrischen Methoden der Blut-Leukozyten-Differenzierung<sup>63</sup>, gibt es kein valides Verfahren zur Differenzierung von Leukozyten in der BALF. Eine etablierte Methode zur Zelldifferenzierung mittels FACS wäre jedoch aus verschiedenen Gründen erstrebenswert. Als standardisierbare, untersucherunabhängigere Methode, bei der in kurzer Zeit viele Zellen analysiert werden können, brächte dieses Verfahren relevante Vorteile mit sich. Zudem stehen Durchflusszytometer weltweit in vielen Zentrallaboren zur Verfügung, wohingegen die Fachkenntnis zur mikroskopischen Auswertung sehr begrenzt verfügbar und an viel Erfahrung gebunden ist. Auch eine Kombination mit der Bestimmung von Oberflächenmarkern auf Lymphozyten wäre so möglich und diagnostisch sinnvoll.

Ziel dieser Untersuchung war daher die prospektive Validierung einer im Vorfeld durch den Leiter des Pneumologischen Labors der Universitätsmedizin Rostock, Dr. Kai Bratke, entwickelten durchflusszytometrischen Methode zur Leukozytendifferenzierung in der BALF.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Ablauf der Studie**

#### 2.1.1 Entwicklung der Methode

Im Jahr 2012 ist durch den leitenden Biologen des Pneumologischen Labors der Universitätsmedizin Rostock, Dr. Kai Bratke, eine Methode zur durchflusszytometrischen Differenzierung der in der BALF vertretenen Leukozyten-Subpopulationen mittels Mehrfarbenfluoreszenzanalyse entwickelt worden. Hierbei lag der Fokus auf der separaten Darstellung von Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und eosinophilen Granulozyten. Um diese Zellreihen isoliert voneinander in der FACS-Analyse darstellen zu können, ist es erforderlich, sie mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu markieren. Nur im Falle einer hohen Bindungsaffinität eines Antikörpers zu einem für die jeweilige Zellpopulation spezifischen Oberflächenantigen ist es möglich, die jeweiligen Zellpopulationen isoliert in der FACS-Analyse darzustellen. Hauptsächlich beschäftigte sich dieser Abschnitt der Studie mit der Testung verschiedener Antikörper und der Ermittlung geeigneter Konzentrationen.

#### 2.1.2 Prospektive Datenerhebung

Diese Phase der Untersuchung entspricht einer prospektiven Studie zur Validierung der beschriebenen Methode der durchflusszytometrischen Differenzierung von Leukozyten-Subpopulationen in der BALF. Zu diesem Zweck wurden in den Jahren 2013 bis 2018 BALF-Proben, die im Pneumologischen Labor der Universitätsklinik Rostock analysiert wurden, doppelt ausgewertet. Zum einen erfolgte eine mikroskopische Zelldifferenzierung durch die erfahrene Zytologin Petra Thamm, zum anderen wurde die Zelldifferenzierung nach der von Dr. Bratke entwickelten Methode durchflusszytometrisch durchgeführt. Die beiden Untersuchungsmethoden liefen separat ab und wurden in keinem Fall vom gleichen Untersucher durchgeführt. Die prospektive Datenerhebung war im Jahr 2013 durch Prof. Dr. Lommatzsch (Oberarzt der Abteilung für Pneumologie an der Universitätsklinik Rostock) und Dr. Bratke begonnen worden. Nach Abschluss der Datenerhebung 2018 wurden durch den

Promovenden die pseudonymisierten klinischen Daten der untersuchten Patienten und die zytologischen Daten der prospektiv erhobenen BALF-Messungen, bestehend aus Mikroskopie und Durchflusszytometrie, zusammenführt und vollständig ausgewertet. Damit konnte in der vorliegenden Arbeit eine Gesamtauswertung aller Daten vorgenommen werden.

### 2.1.3 Klinische Daten

Im Verlauf der Datenerhebung wurden die mikroskopischen und durchflusszytometrischen Messergebnisse zusammen mit klinischen Daten pseudonymisiert (P1-P745) und in analoger Form dokumentiert. Viele Patienten, bei denen eine Bronchoskopie mit BAL durchgeführt wurde, erhielten weder eine Lungenfunktionsanalyse noch eine Blutgasanalyse, so dass diese Charakteristika nicht bei allen Patienten erhoben werden konnten.

Die klinischen Daten werden daher auf folgende Parameter beschränkt:

- Alter des Patienten bei BAL
- Geschlecht des Patienten
- Raucheranamnese (aktiver Raucher bei BAL ja/nein)
- Verdachtsdiagnose
- Vorliegen einer Immunsuppression (systemische Steroidtherapie/Zytostatikatherapie)

### 2.1.4 Ein- und Ausschlusskriterien

Folgende Einschlusskriterien galten für die analysierten BALF-Proben:

- Gewinnung im Zeitraum von 2013 bis 2018 im Rahmen der klinischen Routinediagnostik der Abteilung für Pneumologie der Universität Rostock

Folgende Ausschlusskriterien galten für die analysierten BALF-Proben:

- Fehlen klinischer Daten über Alter, Geschlecht, Verdachtsdiagnose, Raucherstatus und Einnahme immunsupprimierender Medikamente
- Fehlende Informationen über das Volumen der BALF-Probe

- Eine zu niedrige Zellkonzentration in der BALF ( $< 0,3 \times 10^4/\text{ml}$ ), um eine doppelte Auswertung mikroskopisch und durchflusszytometrisch durchzuführen
- Durchführung nur einer Messmethode (Mikroskopie oder Durchflusszytometrie)

## 2.2 Bronchoalveoläre Lavage

### *Methode*

Bei der BAL handelt es sich um ein bronchoskopisches Verfahren zur Spülung der terminalen Abschnitte des Bronchialbaums. Im Vordergrund steht die Gewinnung von organischem und anorganischem Untersuchungsmaterial, welches für diagnostische Zwecke genutzt werden kann. Die Morphologie sowie spezifische Verteilungsmuster der BALF-Zellen in der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit können auf bestimmte pneumologische Erkrankungen hinweisen. Darüber hinaus kann der Nachweis entarteter Zellen oder anorganischer Bestandteile in der BALF entscheidende klinische Informationen liefern.

### *Material*

- Flexibles Bronchoskop Type P160 [Olympus, Tokio, JP]
- Video Prozessor EVIS EXERA III CV-190 [Olympus, Tokio, JP]
- Lichtquelle EVIS EXERA III CLV-190 [Olympus, Tokio, JP]
- ACOIN-Lidocainhydrochlorid 40 mg/ml Lösung [Combustin pharmazeutische Präparate, Hailtingen, DE]
- Xylocain® Gel 2% [Aspen, Dublin, IE]
- Xylocain® 2% Injektionslösung [Aspen, Dublin, IE]
- Spritze BD Discardit II® 5 ml weiß [Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA]
- Spritze BD Discardit II® 5 ml rot [Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA]
- Tracheal-Saugset [Unomedical, Lejre, DK]
- Sauerstoff-Nasensonde [ASID BONZ, Herrenberg, DE]
- Natriumchlorid Lösung 0,9% [Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE]

- Midazolam 5 mg in 5 ml [HamelN Pharma, Hameln, DE]
- BALF-Probenfalle [Covidien, Dublin, IE]
- Peripherer Venenkatheter Braunüle® 18G [B. Braun, Melsungen, DE]

### *Durchführung*

Zur Durchführung der bronchoalveolären Lavage befand sich der Patient in liegender Position mit etwa 30° erhöhtem Oberkörper. Der durchführende Arzt wurde während des Prozederes von mindestens einer spezifisch geschulten Fachkraft unterstützt. Die Untersuchung wurde mittels flexibler Bronchoskopie durchgeführt, wobei das Bronchoskop vorzugsweise transnasal, bei schwieriger Anatomie auch transoral, eingeführt wurde. Grundsätzlich fand die BAL erwachsener Patienten an der Universitätsklinik Rostock in wachem Zustand statt, auf Wunsch des Patienten konnte jedoch eine leichte Sedierung mittels intravenöser Midazolam-Applikation (2 - 5 mg) erfolgen. In diesem Falle erhielt der Patient prophylaktisch eine Sauerstoff-Nasensonde mit niedrigem Sauerstofffluss von etwa 2L/min, um eine suffiziente Oxygenierung zu gewährleisten. Im Vorfeld der Untersuchung erfolgte bei jedem Patienten eine Bildgebung des Thorax mittels Röntgen oder CT, sowie die Bestimmung der Laborwerte Quick, PTT und Thrombozytenzahl. Diese Vorkehrungen dienten der Risikoreduktion während der Lavage und zur Einschätzung des individuellen Blutungsrisikos. Darüber hinaus erhielt jeder Patient vor Beginn der Untersuchung einen möglichst großlumigen venösen Zugang, über den im Falle einer Komplikation schnell Medikamente und Volumen verabreicht werden konnten. Ein Kreislauf- und Oxygenierungsmonitoring erfolgte mittels nicht-invasiver Blutdruckmessung und Pulsoxymetrie bereits vor der Untersuchung und diente der Überwachung der Vitalfunktionen im Verlauf der Lavage. Bei einer adäquaten peripheren Sauerstoffsättigung von  $\geq 95\%$  wurde auf die prophylaktische Gabe von Sauerstoff verzichtet, sofern der Patient nicht sediert war. Um die Bronchoskopie möglichst schonend durchführen zu können, war eine suffiziente Lokalanästhesie notwendig. Sie diente der Toleranzerhöhung und somit der Reduktion von Husten und Würgen in Folge des durch das Bronchoskop ausgelösten Reizes. Zu diesem Zweck wurde dem Patienten etwa 2 Minuten vor Beginn der Untersuchung eine 4-prozentige Lidocainhydrochlorid-Lösung in Nase und Oropharynx appliziert. Zusätzlich wurde die Spitze des Bronchoskops mit einem 2-prozentigen Lidocain-Gel überzogen. Nach Einführen des Bronchoskops wurden 2 x 3 ml einer 4-prozentigen Lidocain-Lösung

supralaryngeal zur Anästhesie des Larynx und der Plicae vocales appliziert. Nach Durchtritt der Fiberoptik durch die Rima glottidis erfolgte die örtliche Betäubung der unteren Atemwegsanteile. Hierzu wurden jeweils 3 ml einer 2-prozentigen Lidocain-Lösung in Trachea, sowie linken und rechten Hauptbronchus appliziert. Um Verwechslungen zwischen den verschiedenen Konzentrationen des Anästhetikums zu vermeiden, wurde die 4-prozentige Lidocain-Lösung in einer rot markierten Spritze aufgezogen, die 2-prozentige Lösung hingegen in einer weißen. Nach der Durchführung einer suffizienten Anästhesie konnte der Vorschub des Bronchoskops in die distalen Atemwegsanteile erfolgen. Wenn sich aus der vorliegenden Bildgebung kein konkreter Fokus ergab, wurde die BAL in einem Subsegment des Mittellappens oder der Lingula durchgeführt. Der Vorschub des Bronchoskops erfolgte bis zur sogenannten „Wedge-Position“, in welcher das distale Ende des Instrumentes an der Wand des Subsegmentbronchus zirkumferenziell anlag und das Segment somit nach proximal abdichtete. In der Wedge-Position angelangt, konnte mit der Instillation der Spülflüssigkeit begonnen werden. Standardmäßig wurden an der Universitätsklinik Rostock 100 ml sterile Kochsalzlösung für die BAL verwendet, welche fraktioniert in 5 x 20 ml Einzeldosen appliziert und zurückgewonnen wurden. Die Aspiration der Spülflüssigkeit erfolgte unter bronchoskopischer Sicht, wobei darauf zu achten war, einen Kollaps des lavagierten Bronchialgewebes zu vermeiden. Die zurückgewonnene Spülflüssigkeit wurde in einer BALF-Probenfalle gesammelt und nach Abschluss der Lavage schnellstmöglich ins Labor transportiert. Der Patient verblieb nach Abschluss der Untersuchung zur klinischen Verlaufsbeobachtung für 30 Minuten auf der Station. Im Falle einer Sedierung mittels Midazolam verlängerte sich der Überwachungszeitraum auf zwei Stunden.

## **2.3 Aufbereitung der BALF**

### *Method*

Mit dem Rohmaterial der in der BAL gewonnenen Probe kann weder eine mikroskopische, noch eine durchflusszytometrische Untersuchung durchgeführt werden. Für die differentialzytologische Analyse ist es zum einen notwendig, grobe Schleimstoffe aus der Probe zu entfernen und zum anderen ist es erforderlich, das Probenvolumen zu verringern, ohne die absolute Zellzahl zu verändern.

## Material

- Zentrifuge Labofuge 400R [Heraeus, Hanau, DE]
- Sterilbank HERA safe [Heraeus, Hanau, DE]
- 50 ml Röhrchen CELLSTAR [Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT]
- Zellsieb EASYstrainer 70  $\mu\text{m}$  [Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT]
- Zellsieb EASYstrainer 100  $\mu\text{m}$  [Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT]
- Phosphatpuffer PBS [SIGMA Life Science, St. Louis, USA]
- Fetales Kälberserum FCS [PAN BIOTECH, Aidenbach, DE]
- Einweg-Pasteurpipetten [Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE]

## Durchführung

Nach erfolgreich durchgeführter BAL wurde das gewonnene Probenmaterial schnellstmöglich in das Pneumologische Labor der Universitätsklinik Rostock überstellt. Im Labor erfolgte zunächst die Dokumentation der patientenbezogenen Daten in pseudonymisierter Form. Anschließend musste die Probe für die nachfolgenden Untersuchungen aufbereitet werden. Aus Sicherheitsgründen erfolgte diese Aufarbeitung in einer Sterilbank. Im ersten Aufarbeitungsschritt wurde die BAL-Flüssigkeit filtriert, um sie von Schleim und groben Verschmutzungen zu befreien. Hierfür wurde, je nach Konsistenz der Probe, ein 70  $\mu\text{m}$  oder 100  $\mu\text{m}$  Zellsieb verwendet, welches auf ein 50 ml Röhrchen gesetzt wurde. Bei besonders stark verunreinigtem Probenmaterial musste der Filtrationsvorgang zweimal erfolgen. Anschließend wurde das Volumen der filtrierten Flüssigkeit bestimmt. Die Probe wurde nun zur Sedimentierung des zellulären Materials für 10 Minuten bei 320g zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet wurde mit PBS (phosphate buffered saline, Phosphatpuffer) +2% FCS (fetal calf serum, Fetales Kälberserum) resuspendiert und auf 40 ml aufgefüllt. Das Material wurde nun erneut für 10 Minuten bei 320g zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals abgekippt und das Zellpellet in 1 ml PBS+2% FCS resuspendiert. Nach diesem Arbeitsschritt war die Aufbereitung der BALF abgeschlossen und die entstandene Zellsuspension konnte für den mikroskopischen oder durchflusszytometrischen Untersuchungsgang verwendet werden.



## 2.4 Mikroskopische Analyse der BALF

### *Method*

Die mikroskopische Analyse der BALF besteht aus zwei Arbeitsschritten. Zum einen muss die Gesamtzellzahl je Volumeneinheit bestimmt werden, zum anderen muss ein lichtmikroskopisches Präparat erstellt werden, welches eine differentialzytologische Auswertung ermöglicht. Um die in der BALF suspendierten Zellen lichtmikroskopisch zu erfassen, ist es erforderlich, zelluläre Strukturen in der aufbereiteten Probe (**s. Abschnitt 2.3**) anzufärben.

### *Material*

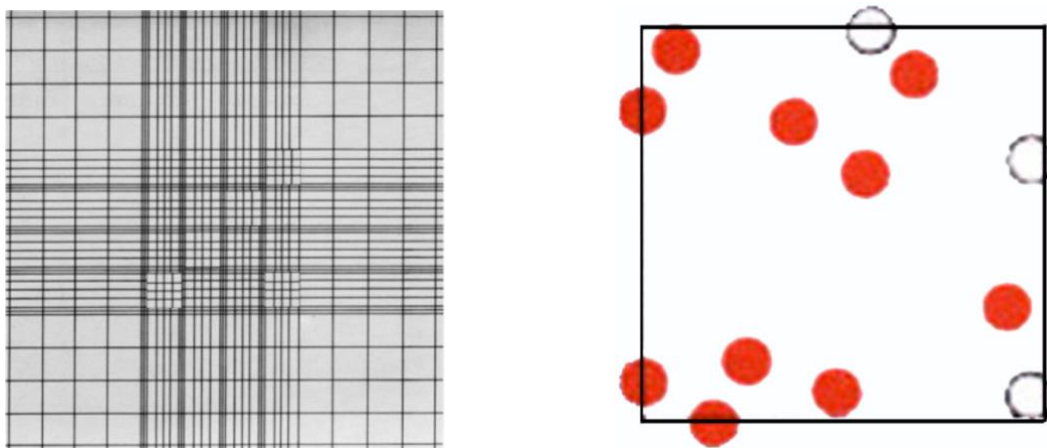
- Mikroskop Lab.A1 [Carl Zeiss, Oberkochen, DE]
- Reagiergefäß 1,5 ml [Eppendorf AG, Hamburg, DE]
- Neubauer-Zählkammer [Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim vor der Rhön, DE]
- Objektträger SHANDON CYTOSLIDE [Thermo Fisher Scientific, MA, USA]
- Deckglas [IDL GmbH, Nidderau, DE]
- EZ Single Cytofunnel [Thermo Fisher Scientific, MA, USA]
- Türkslösung [Merck KGaA, Darmstadt, DE]
- Pipette Research 20 µl - 200 µl [Eppendorf AG, Hamburg, DE]
- Pipettenspitzen 2 µl - 200 µl [Eppendorf AG, Hamburg, DE]
- Rinderalbumin 30% [Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH, Dreieich, DE]
- Zytospin Zentrifuge ROTOFIX 32A [A. Hettich GmbH, Tuttlingen, DE]
- Hemacolor Schnellfärbelösung [Merck KGaA, Darmstadt, DE]
- Pertex Eindeckmittel [Medite GmbH, Burgdorf, DE]
- Zell-COUNTER AC-8 [Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim vor der Rhön, DE]

### *Durchführung*

#### I. Bestimmung der Gesamtzellzahl

Für die mikroskopische Untersuchung wurden 10 µl der aufbereiteten BAL-Flüssigkeit in einem Mikroreaktionsgefäß mit 90 µl Türkslösung versetzt. Mit Hilfe dieser Lösung

konnten im Probenmaterial Leukozyten angefärbt und Erythrozyten lysiert werden. Um sicherzugehen, dass ausreichend Zellen gefärbt bzw. lysiert wurden, ruhte das Gemisch anschließend für 5 Minuten. Im nächsten Schritt wurde eine Neubauer-Zählkammer mit 10 µl der Zellsuspension befüllt und 3 Minuten ruhen gelassen, damit sich die Zellen absetzten. Bei der Neubauer-Zählkammer handelt es sich um ein Hämacytometer mit eingraviertem Zählnetz. Auf einer Messfläche von 3 x 3 mm befinden sich 9 Quadrate der Größe 1 mm<sup>2</sup>. Jedes der Zählquadrate ist 0,1 mm tief und fasst somit ein Volumen von 0,1 µl. Nachdem ein Deckglas auf die Zählkammer aufgebracht wurde, konnte die Zellsuspension in die Messfläche pipettiert werden, woraufhin sich die Zählkammer durch Adhäsionskräfte verschloss. Im Anschluss wurden in den vier Eckquadraten die Zellen bei geeigneter Vergrößerung ausgezählt. Zellen, die im jeweiligen Quadrat auf dem linken beziehungsweise unteren Rand lagen, wurden mitgezählt, wohingegen Zellen auf dem rechten oder oberen Rand nicht in die Zählung eingingen. (s. **Abb. 8**)



**Abbildung 8: Prinzip der mikroskopischen Zellzählung**

Links: Abbildung einer Neubauer-Zählkammer. Rechts: Rote Punkte entsprechen Zellen, die in die Zählung eingingen, weiße Punkte entsprechen Zellen, die nicht mitgezählt wurden.<sup>74</sup>

Aus der Gesamtzellzahl der vier Eckquadrate wurde der Mittelwert für ein einzelnes Quadrat berechnet. Hieraus ergab sich die Zellzahl für 0,1 µl der Probe. Multiplizierte man diesen Wert mit 10<sup>4</sup>, so ergab sich die Zellzahl pro ml Probenmaterial. Da die Zellsuspension vorher im Verhältnis 1:10 mit Türkslösung verdünnt wurde, musste erneut mit 10 multipliziert werden, um das endgültige Ergebnis zu erhalten.

$$\frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnung}} = \text{Zellen pro 1 } \mu\text{l BAL-Flüssigkeit}$$

$$\text{Zellen pro 1 } \mu\text{l BAL-Flüssigkeit} \times 10^3 = \text{Zellen pro 1 ml BAL-Flüssigkeit}$$

## II. Erstellung eines mikroskopischen Präparates

Sobald die Zellzahl bekannt war, konnte ein lichtmikroskopisches Präparat erstellt werden. Als Ausgangsmaterial hierfür diente die nach den in **Abschnitt 2.3** beschriebenen Aufarbeitungsschritten entstandene Zellsuspension. Verwendet wurde ein Objektträger, der in einer Zentrifugenhalterung („Cytofunnel“) befestigt und über diese mit Zellsuspension befüllt wurde. Das für die Präparatherstellung verwendete Probenvolumen war von der vorher bestimmten Gesamtzellzahl abhängig. Lag eine Probe mit hoher Gesamtzellzahl vor, reichte ein kleineres Volumen aus. War die Probe zellarm, musste ein größeres Probenvolumen verwendet werden, um ein adäquates Präparat zu ergeben. Das Minimalvolumen für zellreiche Proben lag bei 40 µl, bei zellarmen Proben konnten maximal 200 µl für ein Präparat verwendet werden. Bei einer sehr niedrigen Gesamtzellzahl von unter  $1,5 \times 10^4$  Zellen pro Milliliter konnte die Probe mit 1-3 Tropfen Rinderalbumin 30% versetzt werden, um die Zellbindung am Objektträger zu verbessern. Im nächsten Schritt wurde der Objektträger zur Sedimentation der Zellen für 5 Minuten bei 320g zentrifugiert. Anschließend wurde die Probenlösung auf dem Objektträger für etwa 10 bis 20 Minuten an der Luft getrocknet. Die eingetrocknete Zellsuspension konnte nun mittels einer Schnellfärbelösung („Hemacolor“) eingefärbt werden (modifizierte Pappenheim-Färbung). Hierbei wurde der Objektträger in einer vorgegebenen Reihenfolge in vier verschiedene Reagenzien getaucht:

- Reagenz 1 (Fixierlösung) 5 x 1 Sekunde
- Reagenz 2 (Färbelösung Rot) 3 x 1 Sekunde
- Reagenz 3 (Färbelösung Blau) 6 x 1 Sekunde
- Reagenz 4 (Pufferlösung pH 7,2) 2 x 10 Sekunden

Anschließend wurde das gefärbte Präparat erneut luftgetrocknet und mit einem Eindeckmittel versehen. Nach dem Auflegen eines Deckglases wurde gewartet, bis das Eindeckmittel ausgehärtet war, um im Anschluss mit der lichtmikroskopischen Untersuchung des Präparates zu beginnen. Für die Erhebung der Differentialzytologie wurde am Lichtmikroskop ein Objektiv mit 40- oder 100-facher Vergrößerung verwendet. Das verwendete Okular vergrößerte 10-fach. Mit Hilfe eines Zell-Counters wurden insgesamt 500 Zellen ausgezählt, wobei jede ausgezählte Zelle als neutrophiler Granulozyt, eosinophiler Granulozyt, Makrophage/Monozyt, oder

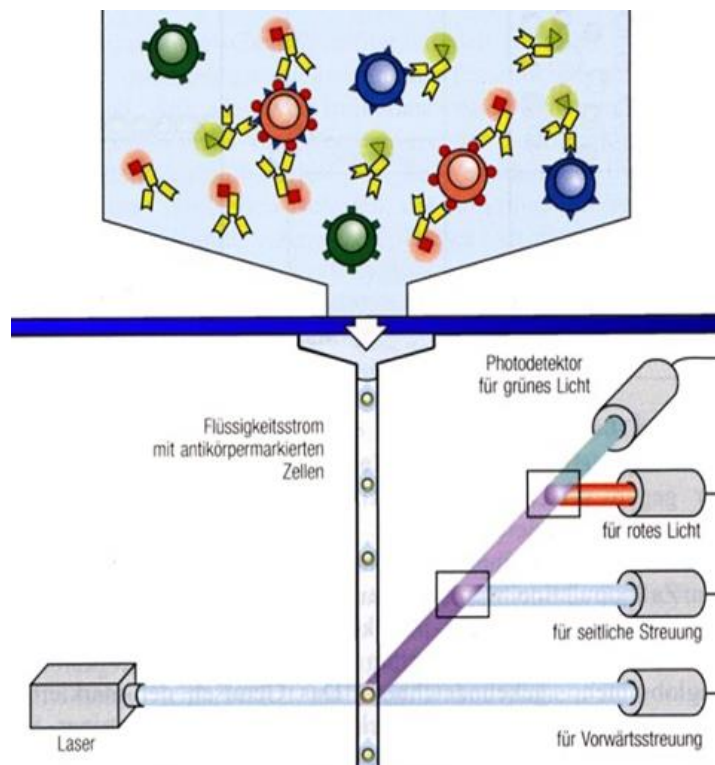
Lymphozyt deklariert wurde. Aus dem Ergebnis der Auszählung ergab sich die prozentuale Verteilung der einzelnen Zellreihen als mikroskopisch erhobene Differentialzytologie. Darüber hinaus wurden im Befund mikroskopische Auffälligkeiten, wie die Beimengung von Blut, zelluläre Atypien, oder das Vorhandensein von Mikroorganismen vermerkt.

## 2.5 Durchflusszytometrische Analyse der BALF

### *Methode*

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Analyseverfahren von Zellen in einem Flüssigmedium, welches es ermöglicht, die Zellen nach ihrer Größe und der Granularität ihres Zytoplasmas zu charakterisieren. Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens ist die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (fluorescence activated cell sorting; FACS-Analyse), bei der fluoreszierende Farbstoffe an spezifischen Zellstrukturen binden. Im Rahmen dieser Studie wurden Oberflächenantigene der zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern markiert. Bei der FACS-Analyse passieren die zuvor für die Messung aufbereiteten (**s. Abschnitt 2.3**) und mit fluoreszierenden Antikörpern versetzten BALF-Zellen durch hydrodynamische Fokussierung einzeln einen engen Kanal. Innerhalb dieses Kanals, der Durchflusszelle, werden die Einzelzellen von einem monochromatischen Laser mit spezifischer Wellenlänge bestrahlt. Durch den Lichteinfall des Lasers entstehen zum einen Streulichtsignale, die durch Größe und innerer Struktur der Zellen hervorgerufen werden und zum anderen Fluoreszenzsignale, die durch die Fluoreszenzfarbstoffe an den gebundenen Antikörpern entstehen. Die Streulichtmessung durch nachgeschaltete Photosensoren beruht auf der Messung von Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht. Das Vorwärtsstreulicht (FSC; forward scatter) wird in der Achse des auf die Zelle treffenden Laserstrahls gemessen und steht im Verhältnis zur Größe der bestrahlten Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC; side scatter) entspricht den durch die Zelle abgelenkten Lichtstrahlen außerhalb der Achse des Laserstrahls und steht im Verhältnis zur Granularität der bestrahlten Zelle. Auch die Fluoreszenzsignale werden über nachgeschaltete Photosensoren erfasst. Durch den Einfall des Laserlichtes auf die Elektronen des antikörpergebundenen Fluoreszenzfarbstoffes werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach der Bestrahlung wird die

von den Elektronen kurzfristig aufgenommene Energie in Form von Photonen wieder abgegeben. Die von den Photosensoren gemessene Abstrahlung von Photonen steht im Verhältnis zur Menge der an die Zelle gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper. Durch die Verwendung verschiedenfarbiger Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb eines Messzyklus ist es möglich, verschiedene Oberflächenstrukturen auf einer Zelle zu markieren. Im Anschluss an die Messung werden die Ergebnisse mit Hilfe einer Software als Punkte in einem Koordinatensystem dargestellt („Dotplots“). Je zwei der gemessenen Parameter Größe, Granularität und Expression von Oberflächenmolekülen werden auf Abszisse und Ordinate eingetragen und jede Zelle bildet entsprechend ihrer gemessenen Eigenschaften einen Punkt. Die so entstehenden Punktwolken der einzelnen Diagramme charakterisieren die verschiedenen Populationen der in der BALF suspendierten Zellen. Durch eine anschließende manuelle Begrenzung der Punktwolken („Gating“) ist es möglich, die Auflösung der Messdaten zu erhöhen und Rückschlüsse auf die prozentuale Verteilung der Zellpopulationen zu ziehen. Nach Erhebung aller Messdaten können die gemessenen Zellpopulationen im Back-Gating zusammengeführt und in einem Dotplot dargestellt werden.



**Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der FACS-Analyse**

Es werden neben Streulichtsignalen auch Fluoreszenzsignale der Antikörper-gebundenen Farbstoffe gemessen. Hier beispielhaft dargestellt für Zellen, die mit einem rot fluoreszierenden Antikörper versetzt wurden <sup>75</sup>.

## Material

- Durchflusszytometer FACS Calibur [Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA]
- Zentrifuge Labofuge 400R [Heraeus, Hanau, DE]
- Zentrifuge Multifuge 1L-R [Thermo Fisher Scientific, MA, USA]
- Phosphatpuffer PBS [SIGMA Life Science, St. Louis, USA]
- Fetales Kälberserum FCS [PAN BIOTECH, Aidenbach, DE]
- FACS-Messröhrchen [SARSTEDT AG, Nümbrecht, DE]
- Deionisiertes Wasser Ampuwa [Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE]
- Lysing Solution 10-fach Lösung [Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA]
- Vortexer MS 3 digital [IKA, Staufen, DE]
- Pipette Research 20-200 µl [Eppendorf AG, Hamburg, DE]
- Pipette Research 100-1000 µl [Eppendorf AG, Hamburg, DE]
- Pipettenspitzen 20-200 µl [Eppendorf AG, Hamburg, DE]
- Pipettenspitzen 100-1000 µl [Eppendorf AG, Hamburg, DE]
- Antikörper siehe Tab.1
- CellQuest Pro [Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA]
- Computer MacPro3.1 [Apple, Cupertino, USA]
- Antikörper – Verdünnungslösung:  
49,5 ml FACS – Puffer + 0,5 ml NaN<sub>3</sub> – Stammlösung  
(FACS-Puffer: PBS + 2% FCS, NaN<sub>3</sub> – Stammlösung [10%]: 1 g NaN<sub>3</sub> –  
Pulver aufgelöst in 10 ml Aquadest)

## Durchführung

Zur durchflusszytometrischen Analyse war es erforderlich, die aufbereitete BALF (**s. Abschnitt 2.3**) mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern (**s. Tab.1**) zu versetzen. Zur Erstellung dieser Messansätze wurden je 5 µl der Antikörper gegen CD45, CD52 und HLA-DR, sowie 10 µl einer 1:10 Verdünnung des Antikörpers gegen CD66b in einem FACS-Messröhrchen vorgelegt. Das Volumen der dazugegebenen BALF war abhängig von der Gesamtzellzahl der Probe. Um eine akkurate Messung durchführen zu können, sollten die vorgelegten Antikörper mit minimal 100.000 und maximal 2.000.000 BALF-Zellen versetzt werden. Anschließend wurde der Ansatz für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde 1 ml Lysing Solution (10-fach Lösung, mit deionisiertem Wasser zu 1-fach Lösung verdünnt) hinzugegeben und für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zur Sedimentation der Zellen für 5 Minuten bei 400g

zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der flüssige Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Waschpuffer (PBS+2% FCS) resuspendiert. Erneut wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert, der flüssige Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert. Der Ansatz wurde nun mittels 4-Farben-Durchflusszytometer analysiert. Je Ansatz wurden 100.000 Ereignisse gezählt. Die erhobenen Messdaten wurden anschließend mit der Software CellQuest Pro weiterverarbeitet. Hierüber erfolgte das Gating der Dotplots und die anschließende Ausgabe der finalen Messergebnisse.

	<b>Antigen</b>	<b>Farbstoff</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Antikörper</b>	CD45	FITC	J33	Beckmann Coulter
	CD66b	PE	G10F5	BioLegend
	HLA-DR	PerCP	L243	BD Biosciences
	CD52	APC	HI186	BioLegend

**Tabelle 1: Antikörper für die durchflusszytometrische Untersuchung**

*Abkürzungen:* **CD**: Cluster of Differentiation, **HLA-DR**: Human leukocyte antigen–antigen D related, **FITC**: Fluoresceinisothiocyanat, **PE**: Phycoerythrin, **PerCP**: Peridinin-Chlorophyll-Protein, **APC**: Allophycocyanin.

## 2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm IBM SPSS (IBM SPSS, Armonk, New York, USA) durchgeführt. Ein Teil der klinischen Daten war nicht normalverteilt, daher wurde als statistische Messzahl für die mittlere Lage der Median verwendet. Die Korrelationsanalyse wurde über den Korrelationskoeffizienten nach Spearman durchgeführt. Zum Vergleich der Übereinstimmung der beiden Messverfahren wurden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Methode und der mikroskopischen Methode in Bland-Altman-Diagrammen dargestellt <sup>76</sup>. Diese Diagramme stellen die Differenz zweier Messungen auf der Y-Achse und den Mittelwert der beiden Messungen auf der X-Achse dar. Die kräftige horizontale Linie entspricht dem Mittelwert der Differenzen. Von dieser mittleren Differenz der Werte wird der Bereich von  $\pm 1,96$  Standardabweichungen durch zwei gestrichelte Linien markiert. Dieser Bereich entspricht dem 95%-Referenzbereich der mittleren Differenz. Wahrscheinlichkeitswerte von  $p < 0,05$  wurden als signifikant gewertet.



### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Charakteristika der Untersuchungspopulation

Insgesamt konnten 745 Patienten, bei denen im Zeitraum von 2013 bis 2018 im Zuge der klinischen Diagnostik eine BAL an der Abteilung für Pneumologie der Universitätsklinik Rostock durchgeführt wurde, in die Studie eingeschlossen werden. Die Charakteristika der Patienten und BALF-Proben sind in **Tabelle 2** dargestellt. Die untersuchten Patienten waren zwischen 14 bis 90 Jahre alt und 39,5% waren zum Untersuchungszeitpunkt aktive Raucher (**s. Tab.2**). Das mediane Instillationsvolumen betrug 100 ml und die mediane Recovery lag bei 55 ml BALF (**s. Tab.2**). Die Verdachtsdiagnosen, die zur Durchführung der BAL führten, wurden in vier Diagnosegruppen eingeordnet (**s. Tab. 3**). Patienten mit exogen allergischer Alveolitis oder Sarkoidose wurden der Gruppe 1 zugeordnet und entsprachen 27% der untersuchten Population. Gruppe 2 enthielt Patienten mit sonstigen interstitiellen Lungenerkrankungen und entsprach 34% der Gesamtpopulation. Gruppe 3 wurden Patienten mit akuten oder chronischen Infektionen zugeordnet und machten einen Anteil von 26% aus. Sonstige Diagnosen wurden der Gruppe 4 zugeordnet, die 13% der untersuchten Patienten umfasste. Zu jedem untersuchten Patienten wurden Alter, Geschlecht und Raucherstatus erhoben (**s. Tab.2**). Im Zuge der Durchführung der BAL wurden instilliertes und zurückgewonnenes Volumen erfasst und in der anschließenden Aufbereitung die Zellzahl pro Milliliter BALF bestimmt (**s. Tab.2**). In den Kategorien Alter, Instillationsvolumen, Recovery und Zellzahl sind stets Minimum, Maximum und Median aufgeführt.

#### 3.2 Erhebung der Differentialzytologie der Leukozyten

Bei allen eingeschlossenen Patienten wurde die Erhebung der Differentialzytologie zum einen mikroskopisch, zum anderen mittels FACS-Messung durchgeführt. Die beiden Erhebungen liefen separat ab und wurden von unterschiedlichen Untersuchern durchgeführt. Es wurde jeweils der Anteil von Makrophagen/Monozyten, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und eosinophilen Granulozyten bestimmt. Entsprechend der pathophysiologischen Veränderungen in den verschiedenen

Diagnosegruppen nahmen die einzelnen Zellpopulationen einen unterschiedlich großen Anteil an der Gesamtleukozytenpopulation ein. So war in der Diagnosegruppe EAA/Sarkoidose der mediane Anteil an Lymphozyten sowohl in der FACS-Messung, als auch in der Mikroskopie signifikant im Vergleich zu den anderen 3 Diagnosegruppen erhöht (medianer Lymphozytenanteil: 26-28,5%). Ebenfalls zeigte sich in beiden Messverfahren eine signifikante Erhöhung des medianen Anteils an neutrophilen Granulozyten in der Diagnosegruppe Infektion im Vergleich zu den anderen Diagnosegruppen (medianer Anteil an neutrophilen Granulozyten: 25-31%) (s. Tab.4).

Diagnosegruppe	n	Alter	Geschlecht	Raucherstatus	Instill. Vol.	Recovery	Zellzahl
		Jahre	Frauen (%)	Aktiv (%)	ml 0.9% NaCl	ml BALF	10 <sup>4</sup> Zellen / ml BALF
<b>Alle Patienten</b>	745	64	328	294	100	55	7.3
		(14-90)	(44.0 %)	(39.5 %)	(60-160)	(13-120)	(0.3-312.0)
<b>Gruppe 1:</b>	204	55	95	71	100	55	6.5
EAA/ Sarkoidose		(21-85)	(46.6 %)	(34.8 %)	(60-150)	(25-120)	(0.3-132.0)
<b>Gruppe 2:</b>	251	68	105	101	100	55	8.2
ILD		(27-90)	(41.8 %)	(40.2 %)	(60-150)	(13-100)	(0.3-125.0)
<b>Gruppe 3:</b>	194	64	85	86	100	53	7.9
Infektion		(18-88)	(43.8 %)	(44.3 %)	(60-160)	(20-90)	(0.6-312.0)
<b>Gruppe 4:</b>	91	66	43	36	100	50	6.7
Sonstiges		(14-89)	(47.3 %)	(39.6 %)	(60-140)	(18-70)	(0.5-217.0)

**Tabelle 2: Patienten- und BALF-Charakteristika**

Aufschlüsselung der Patienten- und BALF-Charakteristika nach Diagnosegruppen, absolute Zahlen angegeben als Median, Minimum und Maximum in Klammern. *Abkürzungen:* **Instill. Vol.:** Instilliertes Volumen **EAA:** exogen allergische Alveolitis, **ILD:** interstitielle Lungenerkrankung.

Ergebnisse

Diagnosegruppen	Gruppe 1 EAA/ Sarkoidose	Gruppe 2 ILD	Gruppe 3 Infektion	Gruppe 4 Sonstiges
<b>Verdachtsdiagnosen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>EAA</li> <li>Sarkoidose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>idiopathische Lungenfibrose (IPF)</li> <li>nicht spezifische interstitielle Pneumonie (NSIP)</li> <li>respiratorische Bronchiolitis mit interstitieller Lungenerkrankung (RB-ILD)</li> <li>ILD bei Rheumatoider Arthritis</li> <li>ILD bei systemischer Sklerose</li> <li>ILD bei Vaskulitiden</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pneumonie</li> <li>Infektion der unteren Atemwege (LRTI)</li> <li>Tuberkulose</li> <li>unklares Fieber</li> <li>Infektion unter Immunsuppression</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Malignome</li> <li>Asthma</li> <li>COPD</li> <li>Bronchiektasen</li> <li>Herzinsuffizienz</li> <li>ARDS</li> </ul>

**Tabelle 3: Verdachtsdiagnosen**

Aufführung der in den Diagnosegruppen zusammengefassten Erkrankungen.

**Abkürzungen:** **EAA:** exogen allergische Alveolitis, **ILD:** interstitielle Lungenerkrankung, **COPD:** chronisch obstruktive Bronchitis, **ARDS:** Acute Respiratory Distress Syndrome (akutes Atemnotsyndrom).

Diagnosegruppe	n	% MM	% MM	% Lym	% Lym	% Neu	% Neu	% Eos	% Eos
		MS	FC	MS	FC	MS	FC	MS	FC
<b>Alle Patienten</b>	745	54	52	16	16	10	9	1	1
		(0-99)	(0-100)	(0-94)	(0-94)	(0-96)	(0-94)	(0-84)	(0-90)
<b>Gruppe 1:</b>	204	60	57	26	28,5	4	4	1	1
EAA/ Sarkoidose		(4-97)	(0-99)	(2-88)	(0-86)	(0-94)	(0-88)	(0-34)	(0-26)
<b>Gruppe 2:</b>	251	54	58	14	12	11	11	2	2
ILD		(2-97)	(5-100)	(1-94)	(0-93)	(0-93)	(0-92)	(0-84)	(0-90)
<b>Gruppe 3:</b>	194	38,5	39,5	11	12	31	25	2	1
Infektion		(0-95)	(0-98)	(0-94)	(0-94)	(0-96)	(0-94)	(0-19)	(0-15)
<b>Gruppe 4:</b>	91	61	52,5	12	12,5	8	9	1	1
Sonstiges		(2-99)	(0-99)	(1-84)	(0-81)	(0-96)	(0-92)	(0-79)	(0-76)

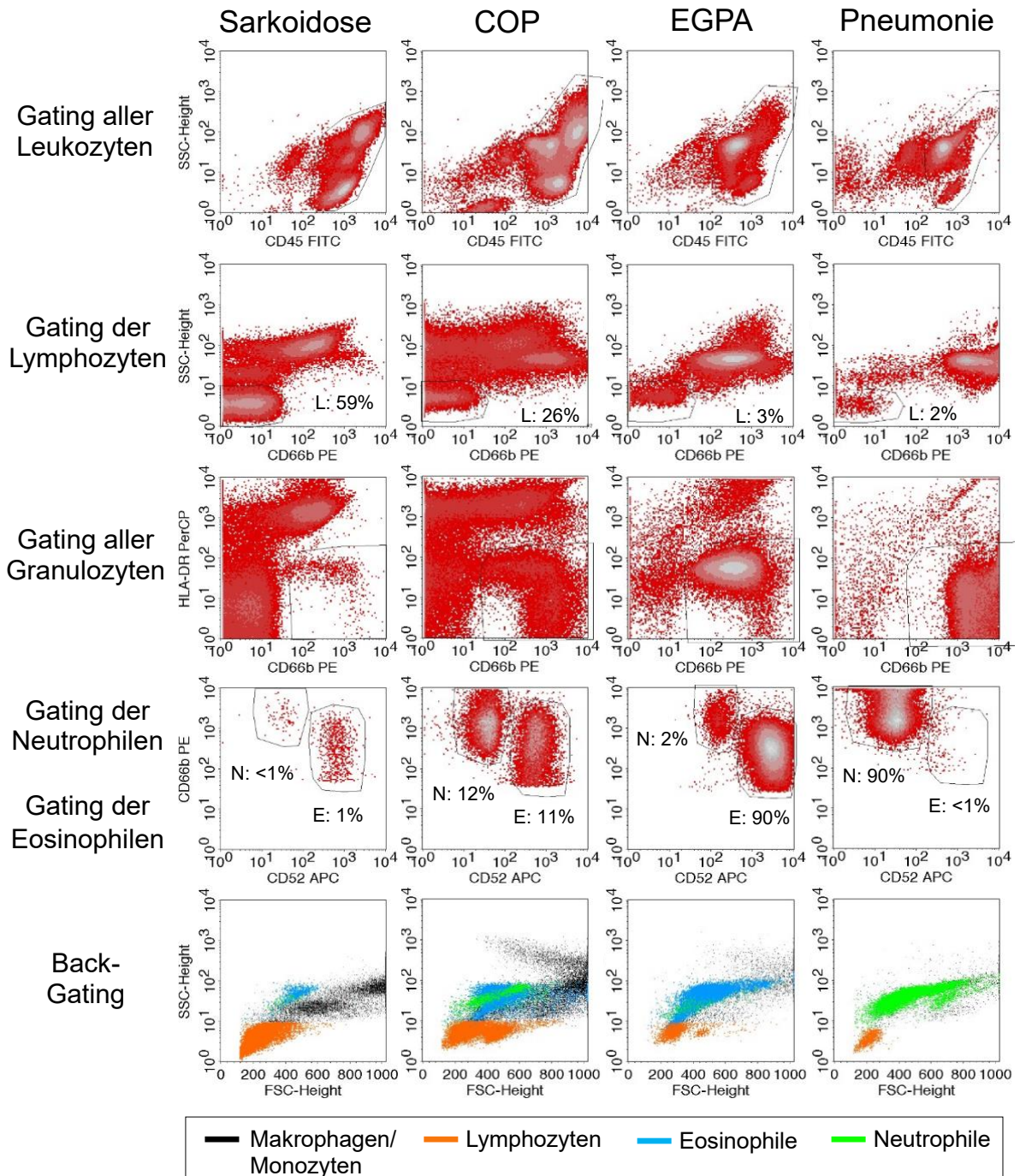
**Tabelle 4: Ergebnisse der mikroskopischen und durchflusszytometrischen Messungen**

Prozentwerte angegeben als Median, Minimum und Maximum in Klammern **Abkürzungen:** **MM:** Makrophagen/Monozyten, **Lym:** Lymphozyten, **Neu:** neutrophile Granulozyten, **Eos:** eosinophile Granulozyten, **MS:** mikroskopisch erhoben, **FC:** mittels FACS-Messung erhoben, **EAA:** exogen allergische Alveolitis, **ILD:** interstitielle Lungenerkrankung.

### 3.3 Gating-Strategie in der FACS-Messung

Die von Dr. Bratke im Rahmen dieser Studie neu entwickelte Gating-Strategie beruht auf der Ausprägung physikalischer Eigenschaften wie Größe und Granularität, sowie der Expression spezifischer Oberflächenmarker der einzelnen Zellpopulationen. Wie in **Abb.10** dargestellt, konnten die im Rahmen der Differentialzytologie zu ermittelnden einzelnen Leukozyten-Subpopulationen in mehreren Schritten voneinander separiert dargestellt werden. Exemplarisch ist hier die durchflusszytometrische BALF-Analyse für vier Beispielerkrankungen gezeigt (Sarkoidose; kryptogen organisierende Pneumonie (COP); eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA) und Pneumonie). Im ersten Schritt wurde die Gesamt-Leukozytenpopulation dargestellt. Um die CD45-positiven Leukozyten von in der BALF suspendierten Zelltrümmern zu trennen, wurde ein SSC/CD45-Ansatz verwendet. Die Abtrennung erfolgte über das im Vergleich zu den heilen Zellen schwächere CD45-Signal der Zelltrümmer. (**Zeile 1, Abb.10**). Im folgenden Schritt wurden die Lymphozyten aufgrund ihrer geringen Granularität und der fehlenden CD66b-Expression dargestellt (**Zeile 2, Abb.10**). Um die Gesamtpopulation der Granulozyten darzustellen, wurde deren Expression von CD66b der niedrigen, bis nicht vorhandenen Expression von HLA-DR gegenübergestellt (**Zeile 3, Abb.10**). Anschließend mussten eosinophile von neutrophilen Granulozyten separiert werden. Dies wurde über die unterschiedliche Expression von CD52 erreicht. Durch die hohe CD52-Expression der eosinophilen Granulozyten konnten diese von den wenig CD52 exprimierenden neutrophilen Granulozyten getrennt erfasst werden (**Zeile 4, Abb.10**). Der prozentuale Anteil an Makrophagen/Monozyten wurde anschließend berechnet, indem die gemessenen Anteile von Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und eosinophilen Granulozyten von 100% subtrahiert wurden. Im Back-Gating konnten so, basierend auf den erhobenen Daten, die einzelnen Populationen von Makrophagen/Monozyten, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und eosinophilen Granulozyten farblich markiert in einem FSC/SSC-Dotplot dargestellt werden (**Zeile 5, Abb.10**).

Ergebnisse

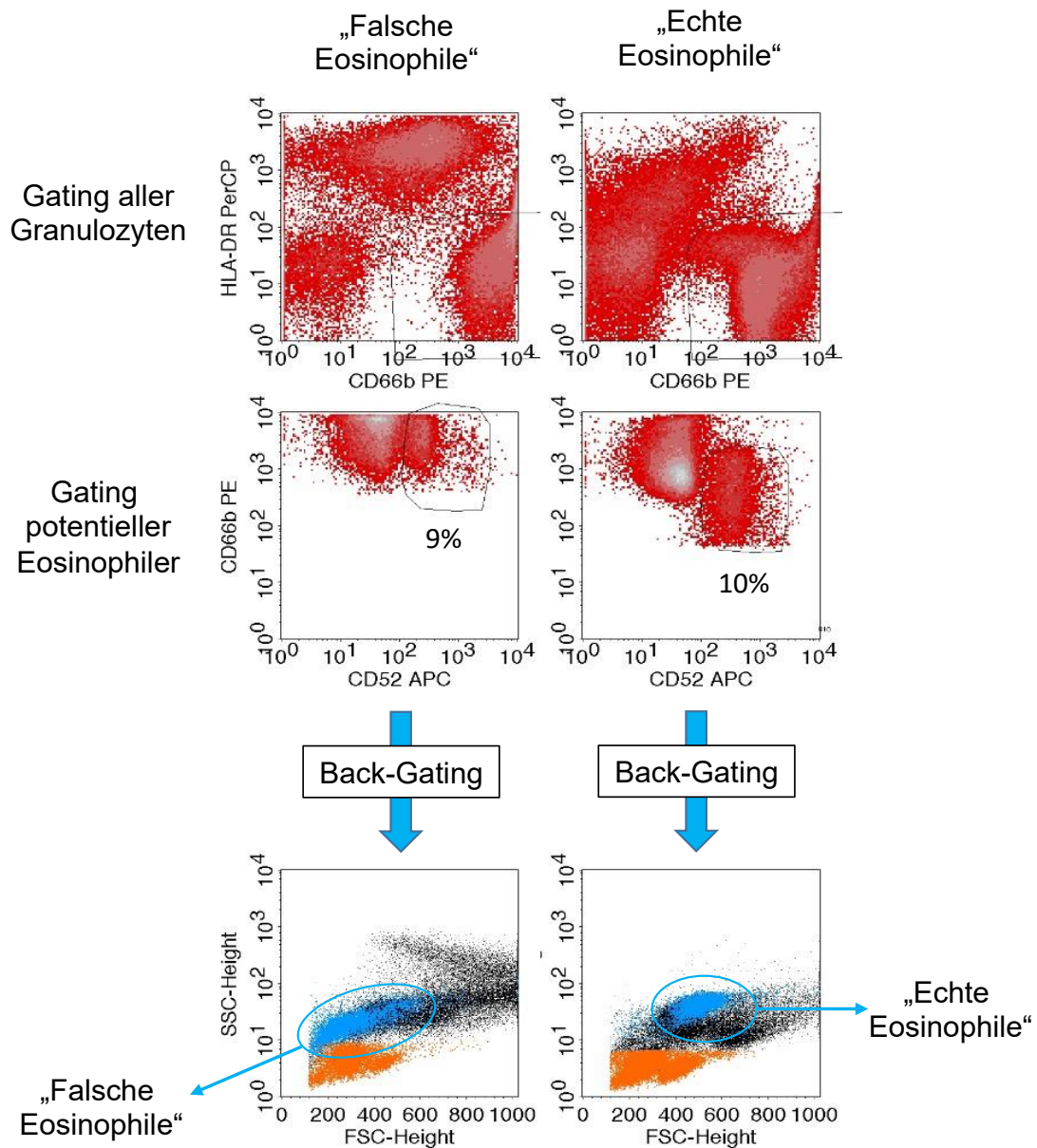


**Abbildung 10: Gating-Strategie**

Darstellung der Gating-Strategie anhand von vier Beispielerkrankungen (Sarkoidose; kryptogen organisierende Pneumonie; eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis und Pneumonie). *Abkürzungen:* **COP:** kryptogen organisierende Pneumonie, **EGPA:** eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis.

### 3.3.1 Möglicher Fallstrick: „falsche Eosinophile“

Wenn eine BALF-Probe hohe Anzahlen an neutrophilen Granulozyten enthält, können sich darunter auch große Mengen an fragmentierten neutrophilen Granulozyten befinden. Diese teilweise sehr großen Zelltrümmer können durch das CD45-Gating zum Teil nicht von der Messung ausgeschlossen werden. Zusätzlich zeigen diese Zelltrümmer ein hohes, unspezifisches CD52-Signal. Hierdurch können diese im Gating fälschlicherweise eine Population eosinophiler Granulozyten imitieren (**s. Abb. 11**). Um diese „falschen Eosinophilen“ als solche zu erkennen, war es notwendig, die korrekte Bestimmung der eosinophilen Granulozyten im Back-Gating zu überprüfen. Hier waren „falsche Eosinophile“ (geringes FSC-Signal, vereinbar mit Zelltrümmern) deutlich von „echten Eosinophilen“ zu unterscheiden, die im FSC/SSC-Dotplot eine deutlich abgrenzbare Population mit mittlerem FSC-Signal bildeten. Auf diese Weise konnte mittels Back-Gating ausgeschlossen werden, dass die Messergebnisse für die Population der eosinophilen Granulozyten durch Signalüberlagerungen mit fragmentierten neutrophilen Granulozyten verfälscht wurden. (**s. Abb.11**)



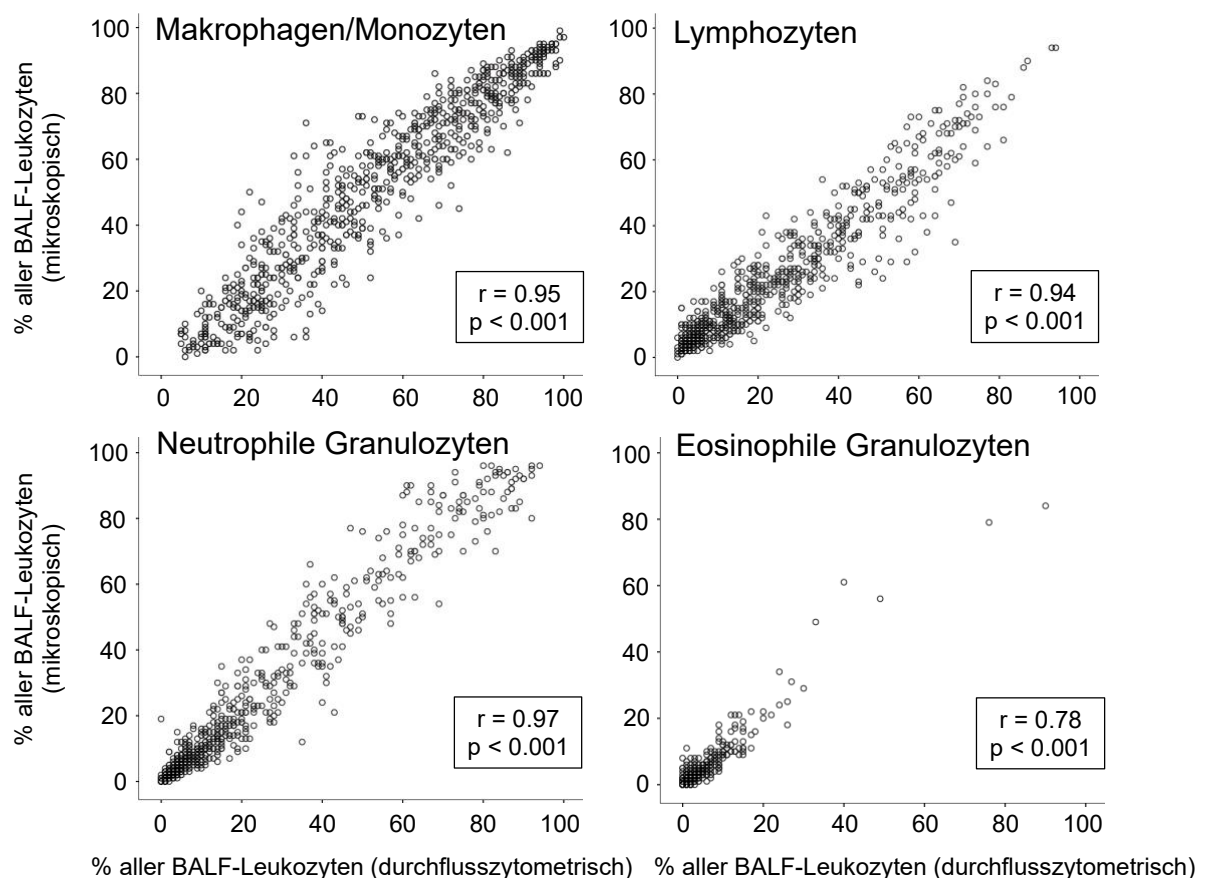
**Abbildung 11: Ausschluss von „Falschen Eosinophilen“ mittels Back-Gating**

In BALF-Proben, die eine hohe Zahl fragmentierter neutrophiler Granulozyten enthalten, können diese Zelltrümmer teilweise nicht vollständig durch das CD45-Gating von der Messung ausgeschlossen werden. Da diese fragmentierten Zellen zusätzlich ein hohes, unspezifisches CD52-Signal zeigen, imitieren sie im Gating eine Population der CD-52-positiven eosinophilen Granulozyten. Im Back-Gating können diese „Falschen eosinophilen Granulozyten“ jedoch von den „Echten Eosinophilen“ unterschieden werden. In der Darstellung in einem FSC/SSC-Dotplot zeigen die fragmentierten neutrophilen Granulozyten durch ihre geringere Größe ein schwächeres FSC-Signal. Sie können somit erkannt und separat von den „Echten Eosinophilen“ dargestellt werden.

### 3.4 Vergleich der mikroskopischen und der durchflusszytometrischen Messmethode

#### 3.4.1 Korrelationsanalyse

Um die Beziehung der Messergebnisse der beiden Verfahren zueinander darzustellen, wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Es zeigte sich eine starke Korrelation (Einteilung nach Cohen) <sup>77</sup> zwischen den mikroskopisch und den durchflusszytometrisch erhobenen Messergebnissen für Makrophagen/Monozyten, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und eosinophile Granulozyten (**s. Abb. 12**). Der Korrelationskoeffizient  $r$  war in allen Leukozyten-Subpopulationen  $\geq 0,78$ , die  $p$ -Werte waren  $< 0,001$ , wobei  $p$ -Werte  $< 0,05$  als signifikant angesehen wurden.



#### Abbildung 12: Korrelationsanalysen nach Spearman

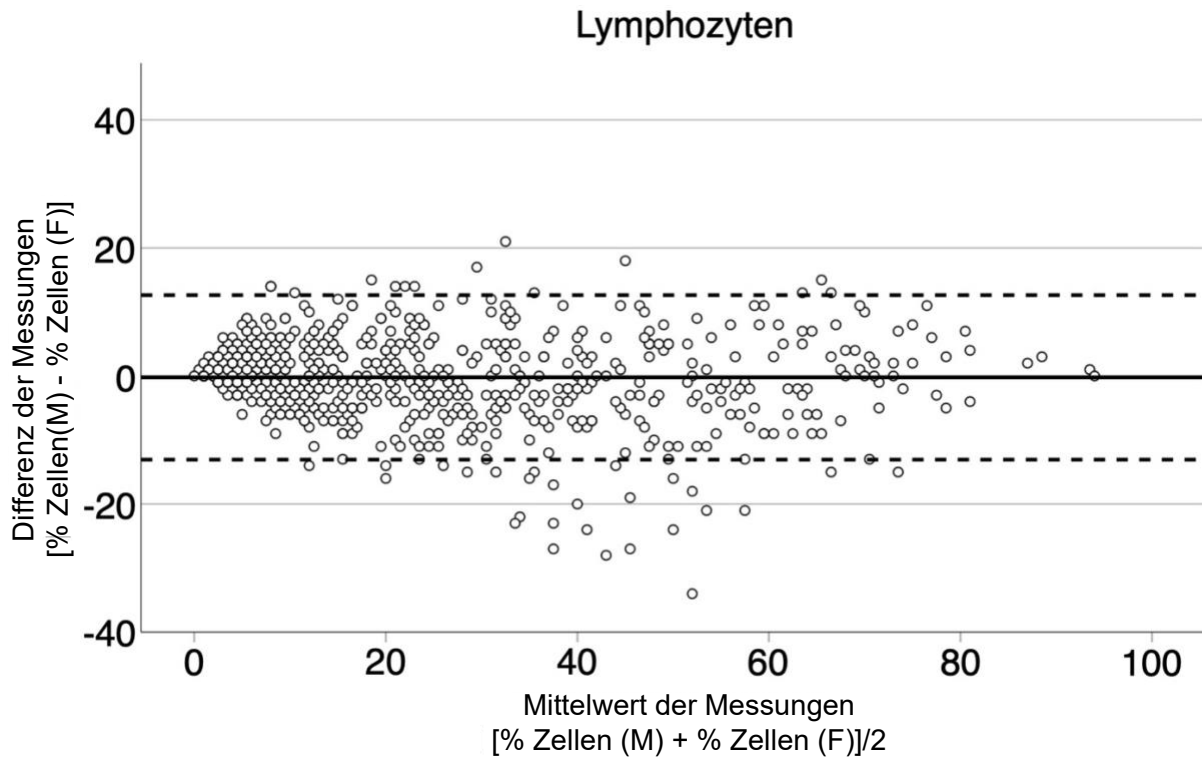
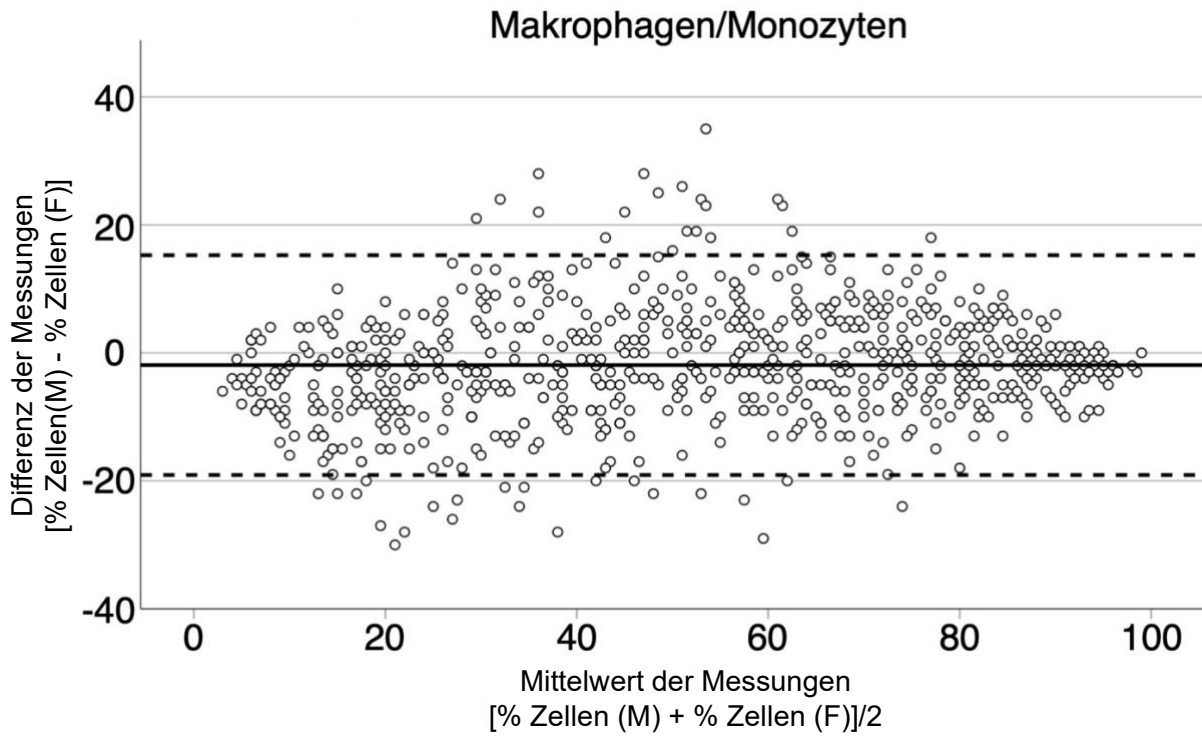
Die Messergebnisse der mikroskopisch und durchflusszytometrisch erhobenen Differentialzytologie der Leukozyten in der BALF korrelierten stark miteinander ( $r \geq 0,78$ ,  $p < 0,001$  in allen Leukozyten-Subpopulationen).



### 3.4.2 Bland-Altman-Plots

Während die Korrelationsanalyse die Beziehung der Messergebnisse zweier Messverfahren untersucht, liefert die Darstellung nach Bland und Altmann genauere Informationen bezüglich der Übereinstimmung dieser beiden Verfahren<sup>76</sup>. Hierbei wird die Differenz der Messwerte auf der Y-Achse dargestellt, wohingegen auf der X-Achse die Mittelwerte der Messwerte gezeigt werden. Die kräftige horizontale Linie entspricht dem Mittelwert der Differenzen (mittlere Differenz), von der aus der 95%-Referenzbereich über  $\pm 1,96$  Standardabweichungen definiert wird. Die gestrichelten Linien entsprechen den Grenzen dieses Intervalls und stellen somit die untere und obere Übereinstimmungsgrenze dar. Vor Beginn der Studie wurde eine maximale Abweichung von 20% von der mittleren Differenz als akzeptabel für die klinische Interpretation der Messwerte definiert. Die Bland-Altman-Plots zeigten eine mittlere Differenz aller Leukozyten-Subpopulationen von  $\leq 2\%$  (Makrophagen/Monozyten: -1,9%, Lymphozyten: -0,2%, neutrophile Granulozyten: 2,0%, eosinophile Granulozyten: 0,1%). Darüber hinaus lagen die Grenzen des 95%-Referenzbereichs aller Leukozyten-Subpopulationen innerhalb der im Vorhinein als akzeptabel definierten Abweichung von 20%: Makrophagen/Monozyten (untere Übereinstimmungsgrenze: -19%, obere Übereinstimmungsgrenze: +15%), Lymphozyten (untere Übereinstimmungsgrenze: -13%, obere Übereinstimmungsgrenze: +13%) (**s. Abb. 13**), neutrophile Granulozyten (untere Übereinstimmungsgrenze: -10%, obere Übereinstimmungsgrenze: +14%), eosinophile Granulozyten (untere Übereinstimmungsgrenze: -4%, obere Übereinstimmungsgrenze: +4%) (**s. Abb. 14**).

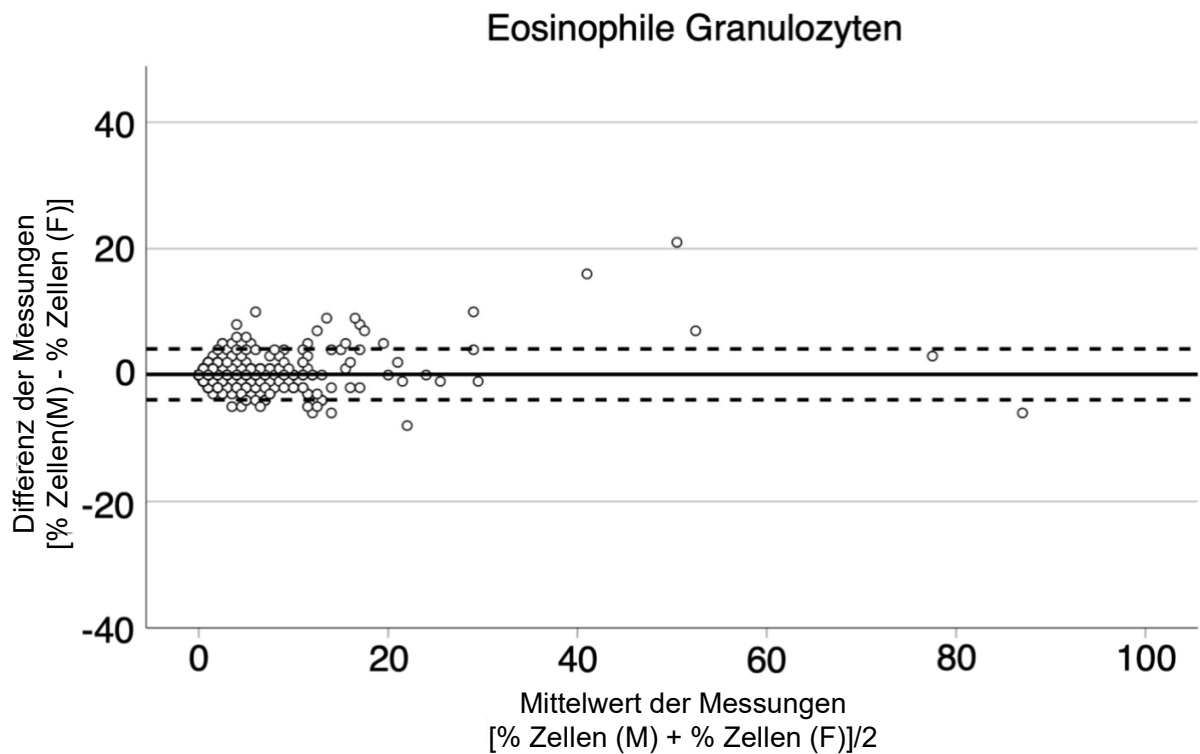
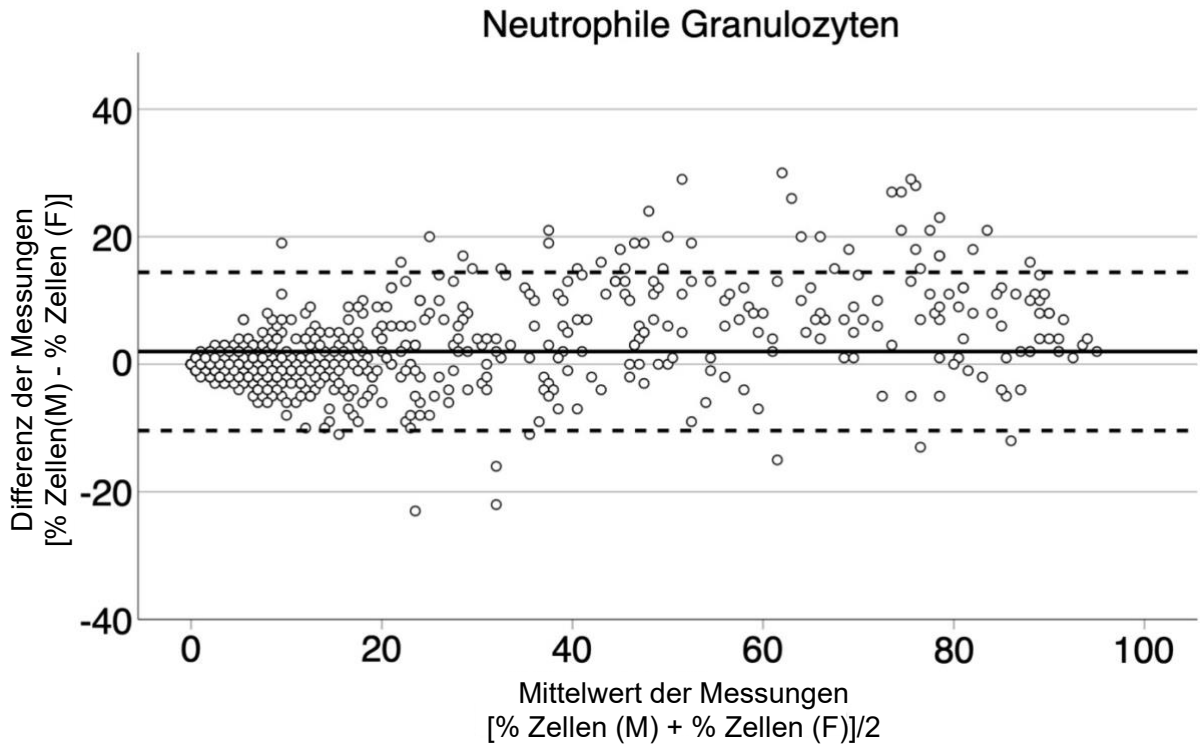
Alle BALF-Proben



**Abbildung 13: Bland-Altman-Plots aller BALF-Proben für Makrophagen/Monozyten und Lymphozyten**

Mittlere Differenz Makrophagen/Monozyten: -1,9%; mittlere Differenz Lymphozyten: -0,2%  
 Makrophagen/Monozyten untere Übereinstimmungsgrenze: -19%, obere Übereinstimmungsgrenze: +15%;  
 Lymphozyten untere Übereinstimmungsgrenze: -13%, obere Übereinstimmungsgrenze: +13%.

Alle BALF-Proben



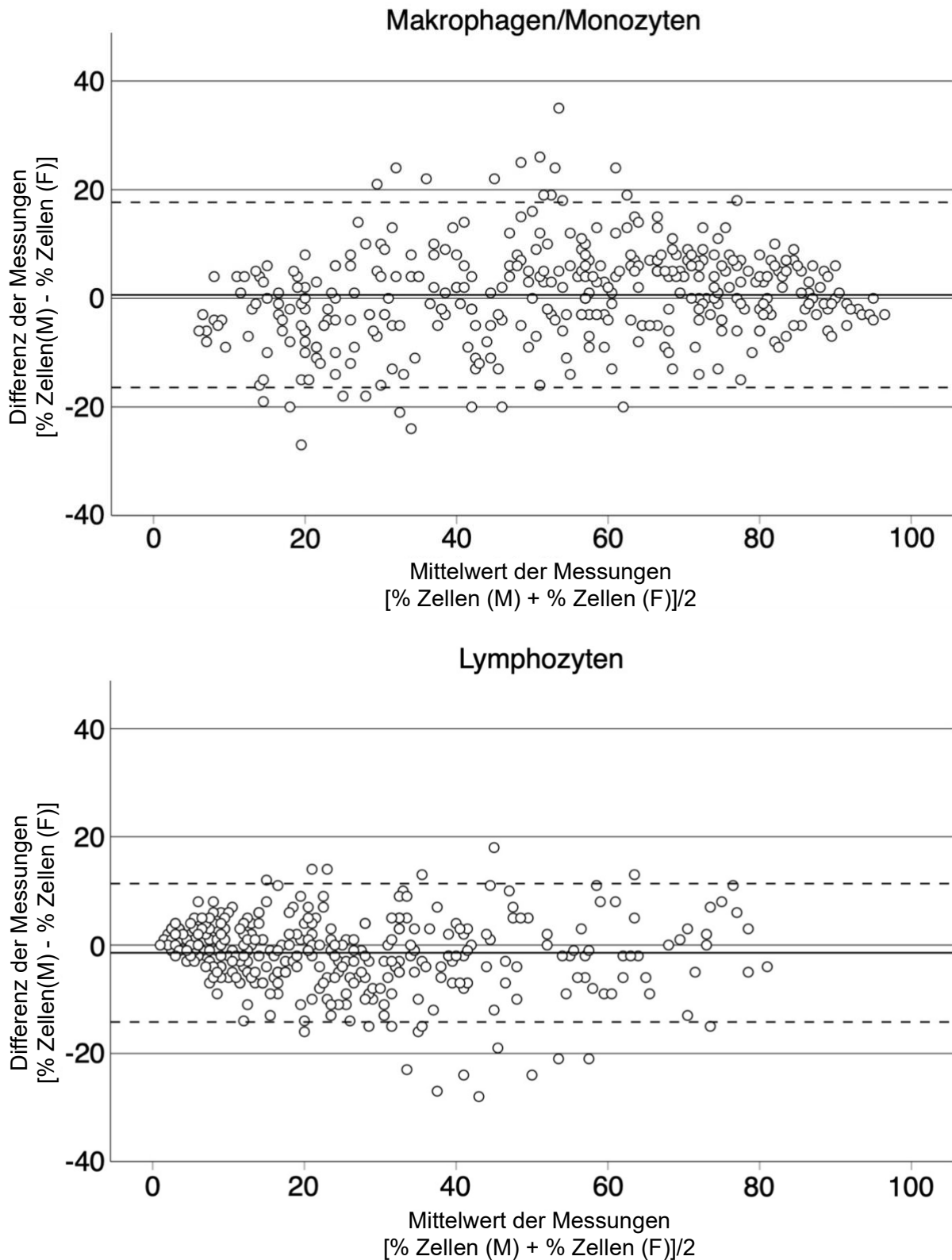
**Abbildung 14: Bland-Altman-Plots aller BALF-Proben für neutrophile und eosinophile Granulozyten**

Mittlere Differenz: neutrophile Granulozyten: 2,0%; mittlere Differenz eosinophile Granulozyten: 0,1%  
 neutrophile Granulozyten untere Übereinstimmungsgrenze: -10%; obere Übereinstimmungsgrenze: +14%;  
 eosinophile Granulozyten untere Übereinstimmungsgrenze: -4%, obere Übereinstimmungsgrenze: +4%.

### 3.4.3 Subgruppenanalysen

Um den Vergleich der beiden Messverfahren weiter zu präzisieren, wurde analysiert, ob die Gesamtzellzahl der in der BALF suspendierten Leukozyten einen Einfluss auf die Übereinstimmung der Messwerte hatte. Hierfür wurde die Studienpopulation anhand der medianen Leukozytenkonzentration je ml BALF in zwei Gruppen geteilt. Der Gruppe „Niedrige BALF-Leukozytenzellzahl“ (**s. Abb. 15 - 16**) wurden Proben mit einer Leukozytenkonzentration von  $< 7,3 \times 10^4$  Zellen /ml BALF zugeordnet. Insgesamt enthielt diese Subgruppe n=372 Proben. Der Gruppe „Hohe BALF-Leukozytenzellzahl“ (**s. Abb. 17 - 18**) wurden Proben mit einer Leukozytenkonzentration von  $\geq 7,3 \times 10^4$  Zellen /ml BALF zugeordnet. Diese Subgruppe enthielt n=373 Proben. In der Subgruppe „Niedrige BALF-Leukozytenzellzahl“ betrug die mittlere Differenz aller Leukozyten-Subpopulationen  $\leq 1,4\%$  (Makrophagen/Monozyten: 0,6%, Lymphozyten: -1,4%, neutrophile Granulozyten: 0,7%, eosinophile Granulozyten: 0,04%). In der Subgruppe „Hohe BALF-Leukozytenzellzahl“ betrug die mittlere Differenz aller Leukozyten-Subpopulationen  $\leq 4,4\%$  (Makrophagen/Monozyten: -4,4%, Lymphozyten: 1%, neutrophile Granulozyten: 3,3%, eosinophile Granulozyten: 0,2%). In der Gruppe „niedrige BALF-Leukozytenzellzahl“ ergaben sich folgende Werte für die Grenzen des 95%-Referenzbereichs: Makrophagen/Monozyten (untere Übereinstimmungsgrenze: -16%, obere Übereinstimmungsgrenze: +18%), Lymphozyten (untere Übereinstimmungsgrenze: -14%, obere Übereinstimmungsgrenze: +11%), neutrophile Granulozyten: (untere Übereinstimmungsgrenze: -10%, obere Übereinstimmungsgrenze: +12%), eosinophile Granulozyten: (untere Übereinstimmungsgrenze: -4%, obere Übereinstimmungsgrenze: +4%). In der Gruppe „Hohe BALF-Leukozytenzellzahl“ ergaben sich folgende Werte für die Grenzen des 95%-Referenzbereichs: Makrophagen/Monozyten (untere Übereinstimmungsgrenze: -20%, obere Übereinstimmungsgrenze: +11%), Lymphozyten (untere Übereinstimmungsgrenze: -12%, obere Übereinstimmungsgrenze: +13%), neutrophile Granulozyten: (untere Übereinstimmungsgrenze: -10%, obere Übereinstimmungsgrenze: +16%) eosinophile Granulozyten: (untere Übereinstimmungsgrenze: -3%, obere Übereinstimmungsgrenze: +4%). Somit lagen alle Leukozytenpopulationen der beiden Subgruppen innerhalb der vor Beginn der Studie für die klinische Interpretation als akzeptabel definierten maximale Abweichung von 20% von der mittleren Differenz der Messwerte.

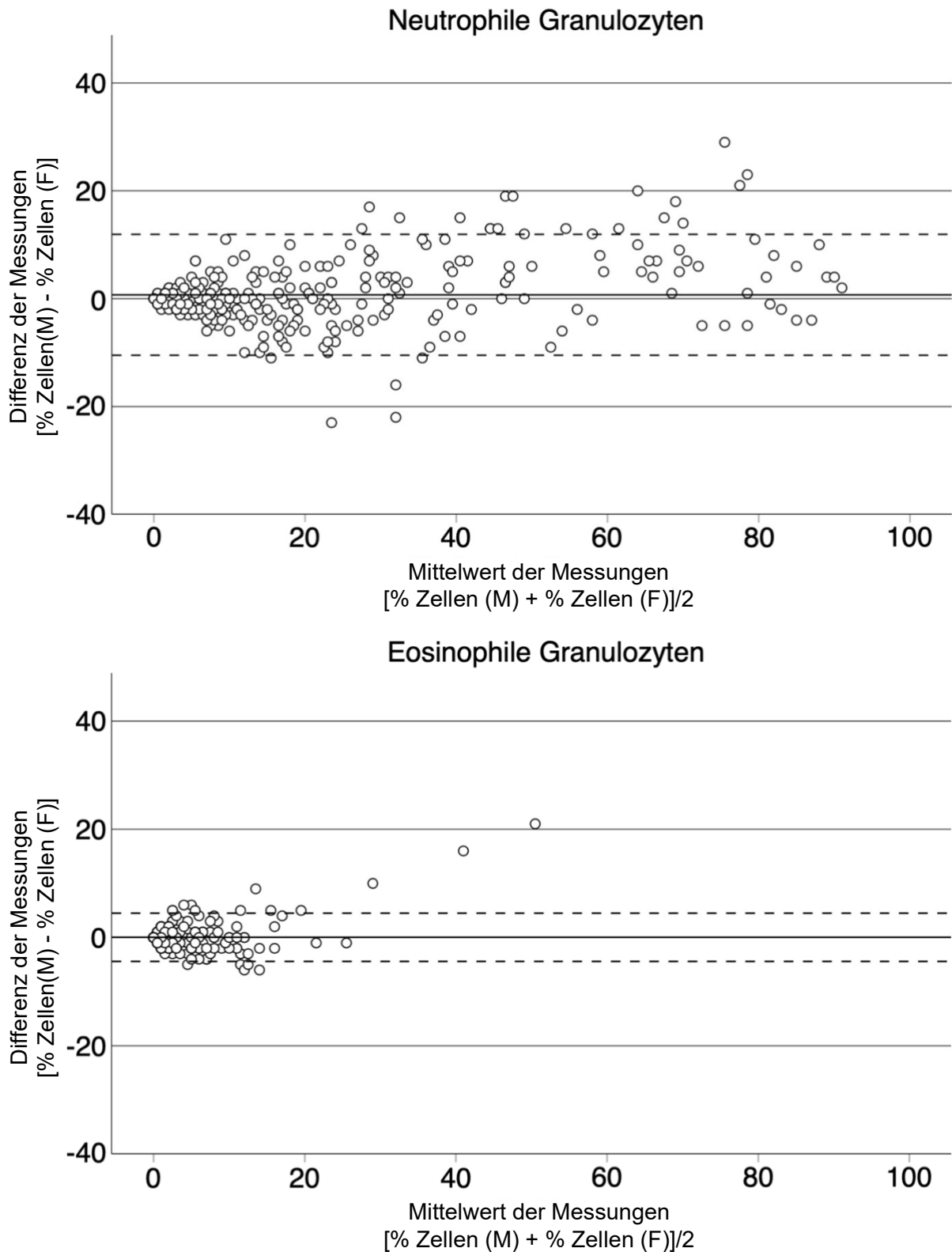
Subgruppe: „Niedrige BALF-Leukozytenzellzahl“



**Abbildung 15: Bland-Altman-Plots Subgruppe „Niedrige BALF-Leukozytenzellzahl“ für Makrophagen/Monozyten und Lymphozyten**

Mittlere Differenz: Makrophagen/Monozyten: 0,6%, mittlere Differenz Lymphozyten: -1,4%  
 Makrophagen/Monozyten untere Übereinstimmungsgrenze: -16% obere Übereinstimmungsgrenze: +18%,  
 Lymphozyten untere Übereinstimmungsgrenze: -14%, obere Übereinstimmungsgrenze: +11%.

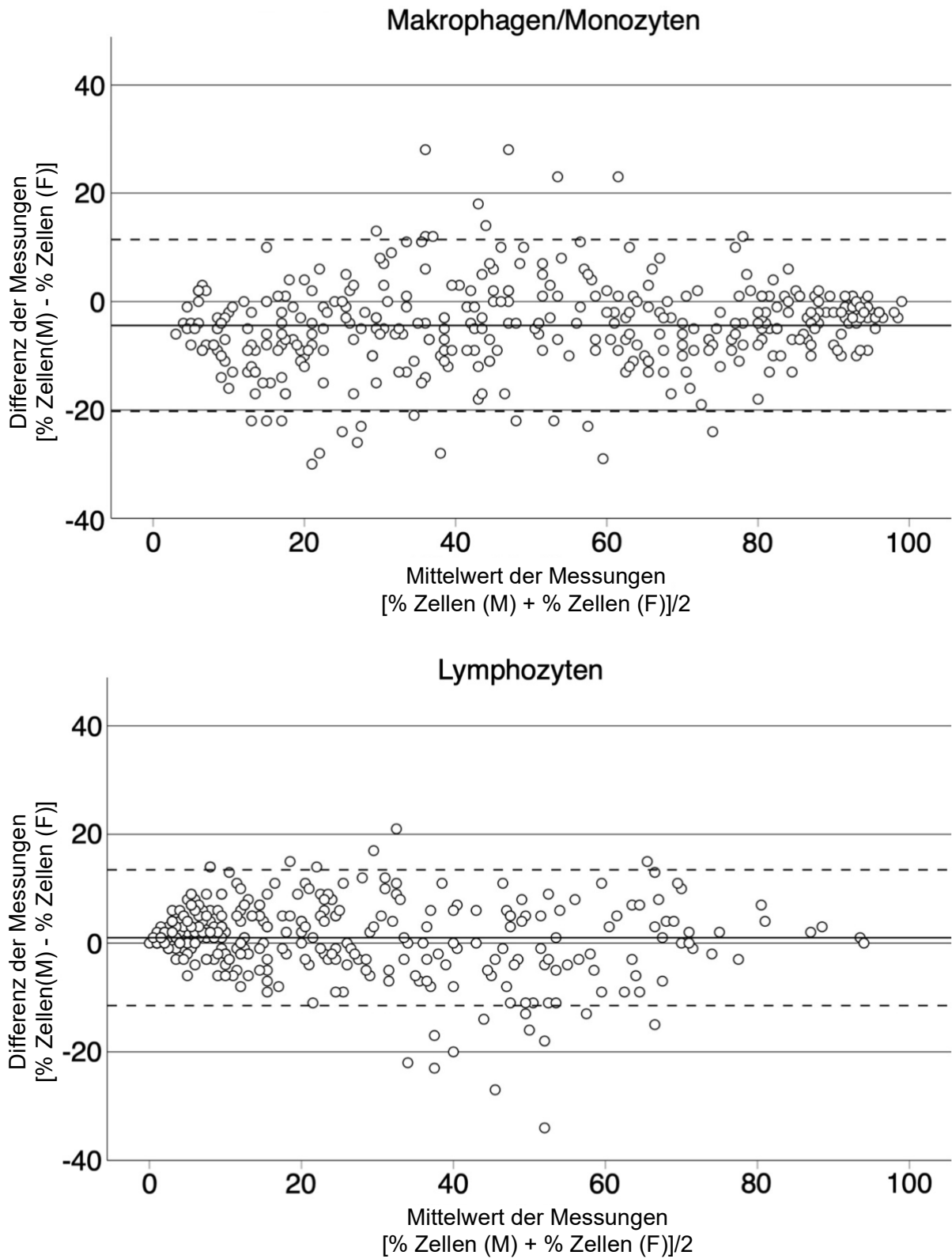
Subgruppe: „Niedrige BALF-Leukozytenzellzahl“



**Abbildung 16: Bland-Altman-Plots Subgruppe „Niedrige BALF-Leukozytenzellzahl“ für neutrophile und eosinophile Granulozyten**

Mittlere Differenz: neutrophile Granulozyten: 0,7%; mittlere Differenz eosinophile Granulozyten: 0,04%  
 neutrophile Granulozyten untere Übereinstimmungsgrenze: -10%; obere Übereinstimmungsgrenze: +12%;  
 eosinophile Granulozyten untere Übereinstimmungsgrenze: -4%, obere Übereinstimmungsgrenze: +4%.

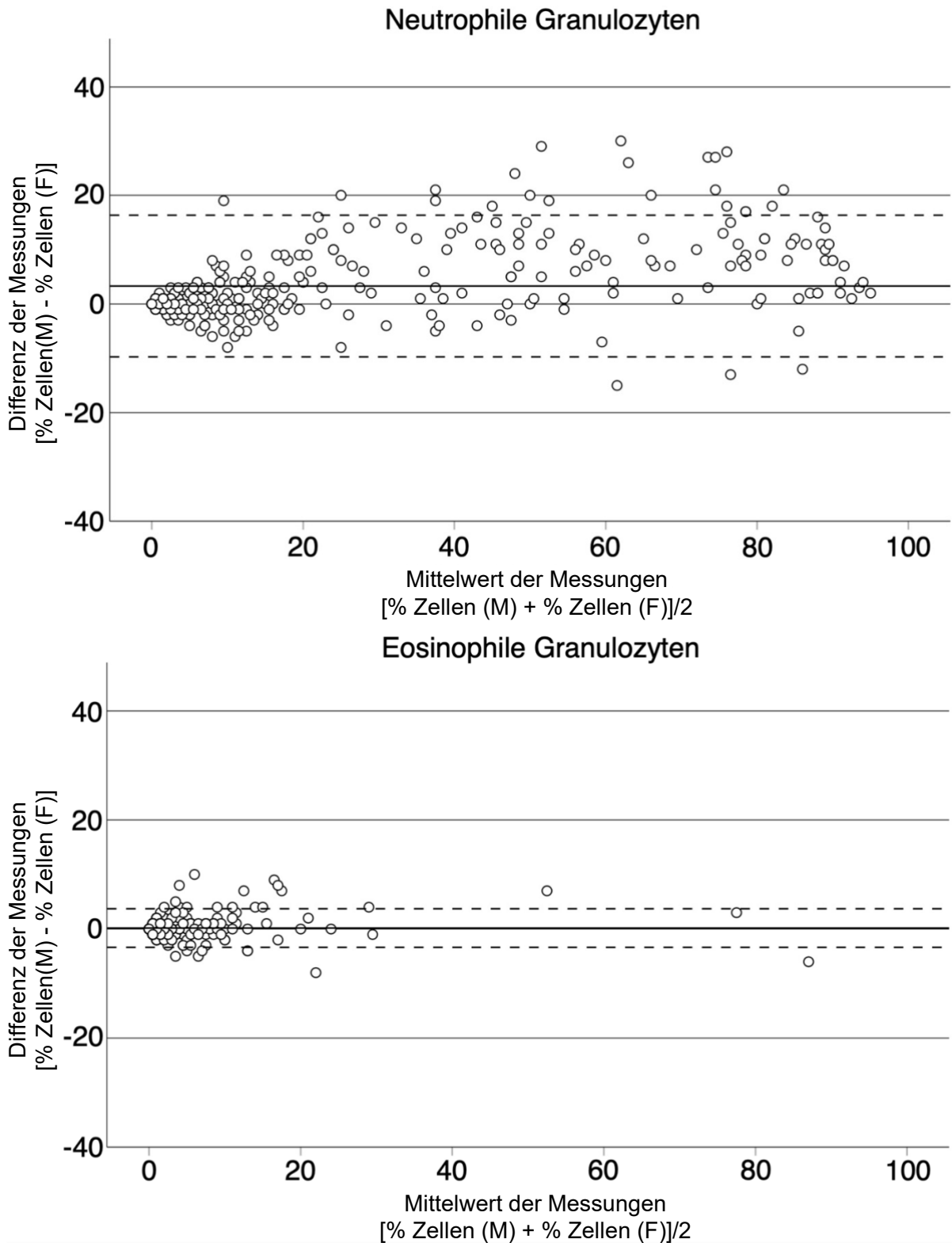
Subgruppe: „Hohe BALF-Leukozytenzellzahl“



**Abbildung 17: Bland-Altman-Plots Subgruppe „Hohe BALF-Leukozytenzellzahl“ für Makrophagen/Monozyten und Lymphozyten**

Mittlere Differenz: Makrophagen/Monozyten: -4,4%, mittlere Differenz Lymphozyten: 1%  
 Makrophagen/Monozyten untere Übereinstimmungsgrenze: -20% obere Übereinstimmungsgrenze: +11%,  
 Lymphozyten untere Übereinstimmungsgrenze: -12%, obere Übereinstimmungsgrenze: +13%.

Subgruppe: „Hohe BALF-Leukozytenzellzahl“



**Abbildung 18: Bland-Altman-Plots Subgruppe „Hohe BALF-Leukozytenzellzahl“ für neutrophile und eosinophile Granulozyten**

Mittlere Differenz: neutrophile Granulozyten: 3,3%; mittlere Differenz eosinophile Granulozyten: 0,2%  
 neutrophile Granulozyten untere Übereinstimmungsgrenze: -10%; obere Übereinstimmungsgrenze: +16%;  
 eosinophile Granulozyten untere Übereinstimmungsgrenze: -3%, obere Übereinstimmungsgrenze: +4%.



## 4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode zur durchflusszytometrischen Leukozytendifferenzierung von Makrophagen/Monozyten, Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten in der BALF an 745 BALF-Proben aus der Routinediagnostik der Klinik für Pneumologie der Universität Rostock validiert. Alle untersuchten Proben wurden von separaten Untersuchern zum einen entsprechend des aktuellen Goldstandards mikroskopisch <sup>40</sup> und zum anderen durchflusszytometrisch ausgewertet. Jeder Untersucher war hierbei den Ergebnissen der anderen Untersuchungsmethode gegenüber verblindet. Zum Vergleich der beiden Verfahren wurden die Korrelationskoeffizienten nach Spearman bestimmt und eine Analyse nach Bland-Altman durchgeführt <sup>76</sup>. Hierbei zeigte sich, dass alle Messergebnisse, unabhängig von der Zellkonzentration der Probe, innerhalb einer a priori festgelegten Abweichung lagen (es wurde eine maximale Abweichung von 20% von der mittleren Differenz der Messwerte als akzeptabel für die klinische Interpretation festgelegt). Diese Arbeit beschreibt somit erstmals eine robuste und valide Methode zur durchflusszytometrischen Leukozytendifferenzierung in der BALF. Diese Methode hat mehrere Vorteile: große Zellzahlen können in kurzer Zeit analysiert werden, es können zusätzlich Oberflächenmarker von Lymphozyten bestimmt werden und eine Differentialzytologie der BALF kann auch an Standorten durchgeführt werden, an denen keine mikroskopische Expertise verfügbar ist.

### 4.1 Diskussion der Gating-Strategie

Ziel dieser Studie war es, ein Verfahren zu validieren, welches die durchflusszytometrische Differenzierung der Leukozyten-Subpopulationen in Makrophagen/Monozyten, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und eosinophile Granulozyten in der humanen BALF ermöglicht. Um die einzelnen Leukozyten-Subpopulationen durchflusszytometrisch separat quantifizieren zu können, war es notwendig, die aufbereitete BALF mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu versetzen, die an spezifische Oberflächenantigene der Leukozyten binden. Es konnte so eine neue Methode entwickelt werden, die durch den Zusatz von vier Antikörpern zur BALF die Bestimmung der Anteile der vier Leukozyten-Subpopulationen aus einem Ansatz

heraus erlaubt. Alle Leukozyten exprimieren den Oberflächenmarker CD45 als Transmembranmolekül auf ihrer Zelloberfläche <sup>78</sup>. Mit Hilfe eines Anti-CD45-Antikörpers konnten so Leukozyten von anderen Zellpopulationen (z.B. Epithelzellen) und Zelltrümmern separiert werden. Zur weiteren Differenzierung der Gesamtleukozytenpopulation war es nötig, die Lymphozyten von der Population der Granulozyten zu trennen. Dies erfolgte über die geringe Granularität der Lymphozyten (geringes SSC-Signal) und des Fehlens des Oberflächenmarkers CD66b. Hierbei handelt es sich um ein Oberflächenprotein, auch bekannt als carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8 (CEACAM 8), welches nur von Granulozyten exprimiert wird <sup>79</sup>. Nach der Separation der Lymphozyten erfolgte die Eingrenzung der Gesamtpopulation der Granulozyten. Hierfür wurde die Abwesenheit des MHC-II-Oberflächenrezeptors HLA-DR auf Granulozyten genutzt. Auf diesem Wege konnten die HLA-DR-negativen Granulozyten von HLA-DR-positiven Leukozyten separiert werden <sup>80</sup>. Die Differenzierung der Granulozytenpopulation erfolgte anhand der Expression des Oberflächenproteins CD52. Während CD52 von neutrophilen Granulozyten nur sehr schwach oder gar nicht exprimiert wird, ist die Expression des Proteins auf der Oberfläche von eosinophilen Granulozyten stark ausgeprägt <sup>81</sup>. Durch die Markierung mit einem Anti-CD52-Antikörper konnten im Gating so neutrophile von eosinophilen Granulozyten getrennt dargestellt werden. Bei der Messung der eosinophilen Granulozyten anhand ihrer CD52-Expression ergab sich die Schwierigkeit, dass auch fragmentierte neutrophile Granulozyten ein unspezifisches CD52-Signal zeigen können. Dieses Signal kann durch eine unspezifische Bindung des Antikörpers oder Farbstoffs (APC ist ein aus Algen isoliertes Protein <sup>82</sup>) an intrazelluläre Strukturen hervorgerufen werden. Gerade BALF-Proben mit hohem Anteil an neutrophilen Granulozyten können auch einen relevanten Anteil fragmentierter Neutrophiler enthalten. Diese können dann im Gating eine Population „falscher“ eosinophiler Granulozyten bilden. Um diese „falschen“ von den „echten“ eosinophilen Granulozyten zu trennen, wurden die CD52-positiven Zellen im Back-Gating in einem FSC/SSC-Dotplot dargestellt. Die „falschen Eosinophilen“ (geringes FSC-Signal, vereinbar mit Zelltrümmern) konnten so als separate Population deutlich von den „echten Eosinophilen“ (mittleres FSC-Signal) getrennt werden. Die Population der Makrophagen/Monozyten wurde quantifiziert, indem der Anteil der gemessenen Leukozytenpopulationen (Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten) von 100% subtrahiert wurde. So konnten im Back-Gating alle vier

Leukozytenpopulationen in einem Dotplot separat dargestellt werden. Durch die Entwicklung dieser Gating-Strategie war es möglich, den Anteil der für die Auswertung der BALF klinisch bedeutsamen Leukozyten-Subpopulationen Makrophagen/Monozyten, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und eosinophile Granulozyten durchflusszytometrisch zu bestimmen.

## **4.2 Bisherige Forschung zur Durchflusszytometrie von BALF-Leukozyten**

In den vergangenen 20 Jahren wurden wiederholt Versuche einzelner Forschungsgruppen unternommen, eine durchflusszytometrische Methode zur Quantifizierung der Leukozyten-Subpopulationen in der BALF zu entwickeln. Eine valide Methode konnte auf diesem Gebiet bisher jedoch nicht etabliert werden. Die Gruppen um Barry et al. (2002) <sup>69</sup>, Hodge et al. (2004) <sup>70</sup> und Shanthikumar et al. (2020) <sup>71</sup> publizierten durchflusszytometrische Methoden zur Leukozytendifferenzierung in der BALF. Es war jedoch mit keiner der Methoden möglich, den Anteil an eosinophilen Granulozyten zu bestimmen. Zusätzlich gab es starke Einschränkungen in der Auswahl des Patientenkollektivs. So wurden in der Studie von Barry et al. 53% der untersuchten BALF-Proben bei HIV-positiven Patienten gewonnen. In die Studie von Shanthikumar et al. wurden nur Kinder im Vorschulalter mit der Diagnose zystische Fibrose eingeschlossen. Diese methodischen Limitationen schränken die Aussagekraft der Studienergebnisse und deren Übertragbarkeit auf ein breites Patientenkollektiv in der klinischen Routine ein. Die Forschungsgruppe von Tricas et al. <sup>72</sup> publizierte 2011 ein durchflusszytometrisches Analyseverfahren, welches eine Differenzierung von Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und eosinophilen Granulozyten in der BALF ermöglichen sollte. Beim Vergleich der Methode mit der mikroskopischen Differentialzytologie zeigten sich jedoch in der Bland-Altman-Analyse Abweichungen von über 100% von der mittleren Differenz. Aufgrund dieser großen Abweichung erwies sich das Verfahren für die klinische Routine als zu unpräzise und konnte sich nicht durchsetzen. Im Jahr 2019 publizierte die Gruppe um Pepedil-Tanrikulu et al. <sup>73</sup> eine weitere Methode, die aufgrund ihrer Limitationen jedoch auch keinen Eingang in die klinische Praxis fand. Zum einen erfolgte kein Vergleich der mikroskopisch und durchflusszytometrisch erhobenen Messergebnisse im Sinne einer Bland-Altman-Analyse, eine Beurteilung der Streuung

der Differenzen der Messwerte war somit nicht möglich. Zum anderen wurden keine spezifischen Antikörper zur Identifikation der eosinophilen Granulozyten genutzt. In der mikroskopischen Leukozytenanalyse wurden von Pepedil-Tanrikulu et al. zudem lediglich 100 Zellen ausgezählt, was in Anbetracht der Leitlinienempfehlung von mindestens 400 Zellen pro BALF-Probe sehr wenig erscheint<sup>40</sup>. Kritisch ist in diesem Zusammenhang zu sehen, dass schon die empfohlenen 400, als auch die in der hier vorliegenden Studie ausgezählten 500 Zellen im Vergleich zu > 100.000 durchflusszytometrisch gemessenen Leukozyten eine sehr kleine Stichprobe darstellen. Eine weitere wesentliche Einschränkung aller publizierten Studien ist die geringe Anzahl eingeschlossener BALF-Proben: in keiner der Publikationen wurden mehr als 100 Proben untersucht.

### **4.3 Vorteile der durchflusszytometrischen Leukozytendifferenzierung in der BALF**

Obwohl die Mikroskopie der aktuelle Goldstandard zur differentialzytologischen Analyse der BALF ist, bietet die Durchflusszytometrie auf diesem Gebiet einige relevante Vorteile für den klinischen Einsatz. Vier dieser Vorteile sollen besonders hervorgehoben werden:

- (1) Die mikroskopische BALF-Analyse erfordert die Expertise eines erfahrenen Zytologen. Diese Expertise ist begrenzt und an vielen Standorten nicht verfügbar. Die Durchflusszytometrie hingegen ist, vor allem in der Differentialzytologie des Blutes und der Hämatologie/Onkologie, eine etablierte Methode<sup>62,63</sup>. Entsprechende Laborausstattung ist somit an vielen Standorten verfügbar und könnte eine differentialzytologische Analyse der humanen BALF auch an Standorten möglich machen, an denen mikroskopische Expertise nicht zur Verfügung steht.
- (2) Die technischen Möglichkeiten der Durchflusszytometrie erlauben die Analyse sehr hoher Leukozytenzahlen. Jede BALF-Probe enthält in der Regel mehrere Millionen Leukozyten, in der vorliegenden Studie wurden in jedem durchflusszytometrischen Untersuchungsgang mindestens 100.000 Zellen gemessen. In der mikroskopischen Differentialzytologie hingegen werden pro

Probe  $\leq 500$  Zellen ausgezählt<sup>40</sup>. Bei dieser, gemessen an der Gesamtleukozytenzahl, sehr geringen Anzahl analysierter Zellen, kann eine Verfälschung der Ergebnisse durch einen Stichprobenfehler nicht ausgeschlossen werden.

- (3) Bei der durchflusszytometrischen Analyse der BALF kann die differentialzytologische Untersuchung bei bestimmten Indikationen mit der Analyse von Oberflächenmarkern auf Lymphozyten kombiniert werden. Dieses Verfahren ist beispielsweise zur Analyse der Expression der T-Zell-Antigene CD4 und CD8 bei Patienten mit Verdacht auf Sarkoidose etabliert<sup>66</sup>.
- (4) Die durchflusszytometrische Leukozytendifferenzierung ist weniger untersucherabhängig. Dies steigert die Objektivität und Vergleichbarkeit der generierten Messdaten.

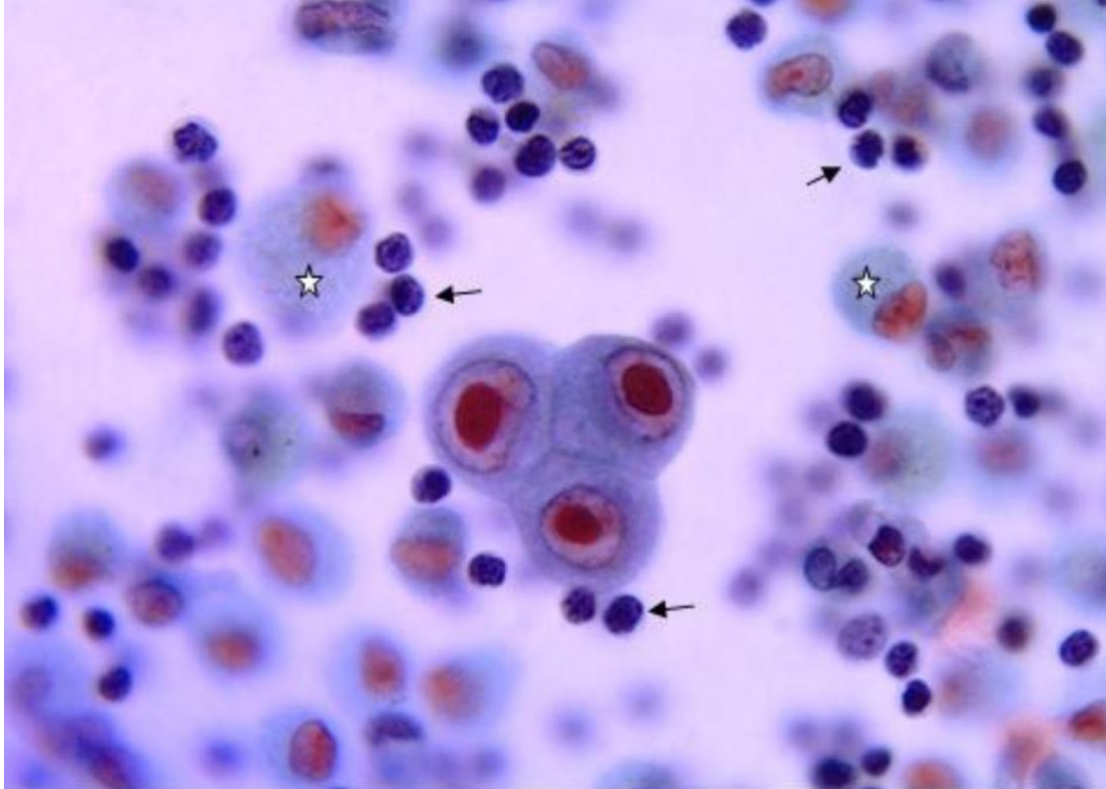
#### **4.4 Limitationen der durchflusszytometrischen Leukozytendifferenzierung in der BALF**

Trotz der vielen Vorteile des Einsatzes der Durchflusszytometrie in der Differentialzytologie der BALF-Leukozyten gibt es Limitationen dieser Methode. Im Vergleich zu der konventionellen mikroskopischen Methode sind zwei Limitationen besonders hervorzuheben:

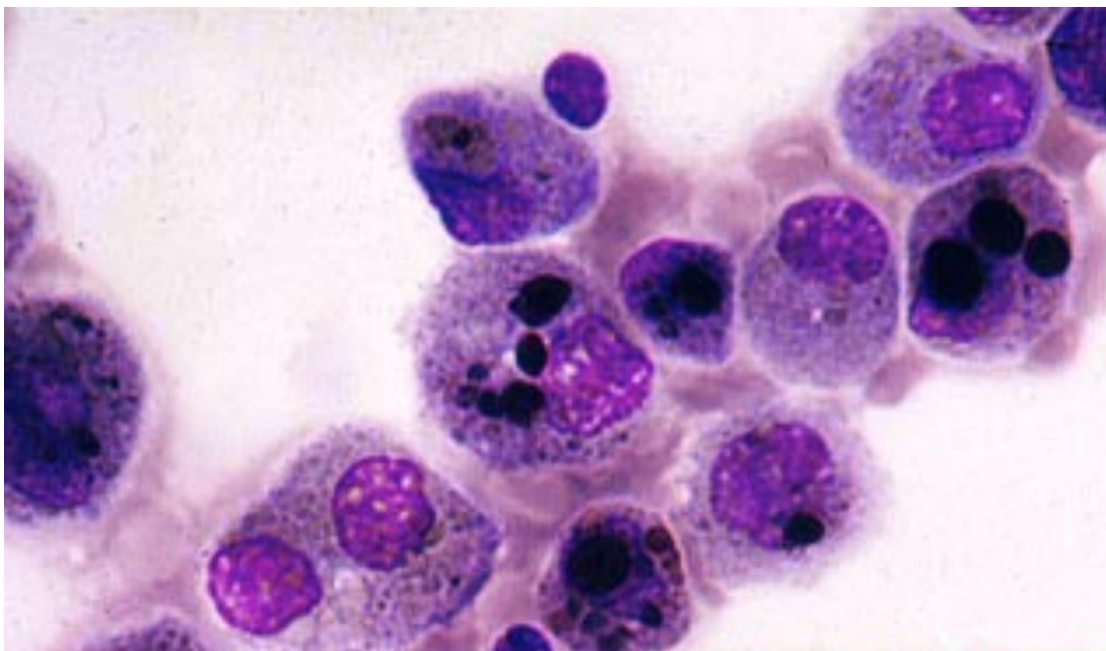
- (1) In der mikroskopischen Analyse der BALF-Zellen können neben den Leukozyten auch andere Zellen oder Fremdkörper detektiert werden. Die Kenntnis hierüber kann klinisch relevant und für die weitere Diagnostik wegweisend sein. So können beispielsweise Tumorzellen, Bakterien, Pilze, oder epitheliale Dysplasien in der mikroskopischen Analyse der BALF gesehen werden<sup>26e</sup>. Bei konkretem Tumorverdacht besteht die Möglichkeit, Spezialfärbungen zur besseren Darstellbarkeit von Tumorzellen einzusetzen<sup>27</sup>. Neben zellulären Auffälligkeiten können auch Fremdkörper in der BALF detektiert werden. Hier können beispielsweise einzelne Asbestfasern, sogenannte Asbestkörperchen, auf eine chronische Asbestexposition hinweisen<sup>27</sup>. Das Erkennen sonstiger Zellen oder Strukturen über die

Leukozyten hinaus ist in der durchflusszytometrischen Untersuchung nicht möglich und stellt somit eine Limitation des Verfahrens dar.

(2) Eine weitere Limitation der durchflusszytometrischen BALF-Analyse ist die fehlende Beurteilbarkeit der Zellmorphologie der BALF-Zellen. Während in der Durchflusszytometrie nur eine quantitative Analyse der Leukozyten-Subpopulationen möglich ist, kann im mikroskopischen Verfahren auch eine morphologische Beurteilung der BALF-Zellen erfolgen. Von besonderer Bedeutung sind hier die Makrophagen, deren morphologische Veränderungen Hinweise auf verschiedene Erkrankungen liefern können. So können beispielsweise bei alveolären Hämorrhagien phagozytierte Erythrozytenfragmente im Zytoplasma der Makrophagen sichtbar sein. Diese charakteristisch veränderten Makrophagen werden als „Herzfehlerzellen“ bezeichnet <sup>27</sup>. (**s. Abb.20**) Bei Rauchern kommt es typischerweise zu bräunlichen Pigmentdepots im Zytoplasma der Makrophagen. Auch Infektionskrankheiten können mikroskopisch sichtbare Veränderungen hervorrufen. So können bei Infektionen mit dem Cytomegalievirus (CMV) große Kerneinschlusskörperchen mit hellem Saum unterhalb der Kernmembran entstehen <sup>83</sup>. (**s. Abb.19**) Nicht nur intrazelluläre Veränderungen, sondern auch die Anordnung der einzelnen Zellen kann von diagnostischer Bedeutung sein. So ist bei der häufig mit einer Lymphozytose einhergehenden Sarkoidose typischerweise eine ringförmige Ansammlung von Lymphozyten um einen Makrophagen zu erkennen. Dieses charakteristische Zellmuster wird als Rosettenphänomen bezeichnet <sup>26f</sup>.



**Abbildung 19: Nachweis einer Cytomegalievirus-Infektion über die BALF**  
Drei Pneumozyten mit großen Kerneinschlusskörperchen mit hellem Saum, typische "Eulenaugen" Konfiguration bei Infektion mit Cytomegalievirus; Pfeile: Lymphozyten; Sternchen: Alveolarmakrophagen<sup>83</sup>.



**Abbildung 20: BALF bei alveolärer Hämorrhagie**  
In den Alveolarmakrophagen befinden sich viele phagozytierte Erythrozytenfragmente, sogenannte "Herzfehlerzellen"<sup>27</sup>.

## 4.5 Methodologische Stärken und Schwächen der Studie

### 4.5.1 Stärken der vorliegenden Studie

Es ist in dieser Studie gelungen, durch die eingesetzten Antikörper und die entwickelte Gating-Strategie, die Leukozytenpopulationen der Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und eosinophilen Granulozyten in der BALF durchflusszytometrisch zu messen. Anschließend konnte die Population der Makrophagen/Monozyten im Backgating dargestellt und der relative Anteil an der Gesamtleukozytenzahl errechnet werden. Selbst die veränderte Markerexpression von fragmentierten neutrophilen Granulozyten, welche Eosinophile imitieren können, wurde durch das Back-Gating entdeckt und konnte so korrekt eingeordnet werden. Zudem zeichnet sich die Studie durch eine sehr breite Untersuchungspopulation aus. Die große Anzahl eingeschlossener Proben und das in Bezug auf Alter und Verdachtsdiagnosen sehr diverse Patientenkollektiv stellen ein solides Abbild klinischer BAL-Diagnostik dar. Auch in Bezug auf die Zellzahl und die Zellzusammensetzung der gewonnenen BALF-Proben zeigte sich ein breites Spektrum. Alle Untersuchungsergebnisse wurden prospektiv erhoben, wobei ein Untersucher die mikroskopische Messung und ein separater Untersucher die durchflusszytometrische Messung durchführte. Um die Objektivität zu gewährleisten, war jeder Untersucher den Ergebnissen der anderen Untersuchungsmethode gegenüber verblindet.

### 4.5.2 Schwächen der vorliegenden Studie

In dieser Studie wurden die Populationen von Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und eosinophilen Granulozyten durch die Markierung mit spezifischen Antikörpern direkt durchflusszytometrisch gemessen. Der Anteil der Makrophagen/Monozyten hingegen wurde nicht gemessen, sondern durch die Subtraktion der gemessenen Anteile von Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten von 100% errechnet. Dieses Verfahren stellt eine Limitation dar, da Makrophagen und Monozyten in einer Zellpopulation zusammengefasst und seltene Leukozyten-Subpopulationen, wie basophile Granulozyten oder dendritische Zellen, somit nicht separat erfasst wurden. Wenn die Erfassung dieser seltenen Populationen jedoch gewünscht ist, kann eine durchflusszytometrische Messung problemlos ergänzt werden <sup>84,85</sup>. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass das Gating der einzelnen



Leukozyten-Subpopulationen bedingt untersucherabhängig ist, da eine gewisse Erfahrung des Untersuchers mit dem verwendeten Programm vorausgesetzt wird. Die Studie wurde ausschließlich in der Abteilung für Pneumologie der Universitätsklinik Rostock und damit monozentrisch durchgeführt. Eine multizentrisch angelegte Studie wäre diesem Verfahren methodisch überlegen und würde die Validität der Ergebnisse weiter erhöhen. Die Analyse nach Bland-Altman erfordert vor Beginn der Untersuchung die Festlegung einer maximalen, klinisch akzeptablen Differenz zwischen den Messmethoden, um die Verfahren als gleichwertig zu akzeptieren. Diese akzeptable Abweichung wurde auf maximal 20% von der mittleren Differenz festgelegt. Da diese Festlegung auf klinischen Erfahrungswerten beruht, ist sie nicht allgemeingültig, sondern wurde basierend auf der Expertise langjähriger Fachärzte für Pneumologie der Universität Rostock getroffen. Zusätzlich ist zu diskutieren, dass die mikroskopische Differentialzytologie der Leukozyten in der BAL historisch bedingt als Goldstandard etabliert ist und auch in dieser Studie als Goldstandard definiert wurde<sup>40</sup>. Aufgrund dieser Methodik kann nicht beurteilt werden, ob die Ergebnisse der Durchflusszytometrie der mikroskopischen Leukozytendifferenzierung eventuell sogar überlegen sind.

#### **4.6 Ausblick**

Aktuell beschränkt sich der klinische Einsatz der Durchflusszytometrie in der Analyse der BALF auf die Bestimmung von Lymphozyten-Oberflächenmarkern<sup>65</sup>. Dass die Möglichkeiten der Durchflusszytometrie für den Einsatz in der klinischen Routine noch lange nicht ausgeschöpft sind, zeigt der Blick in die Hämatologie. Hier ist das Verfahren in der Differentialzytologie des Blutes<sup>63</sup> und in der Diagnostik hämatologischer Neoplasien<sup>62</sup> bereits umfassend etabliert. Auch in der BALF-Analyse bietet die Möglichkeit, große Zellzahlen in kurzer Zeit zu analysieren, viele Chancen. Zum einen gewinnt die Bestimmung spezifischer Oberflächenmarker immer mehr an Bedeutung. So gibt es aktuelle Entwicklungen, in der Sarkoidosediagnostik neben CD4/CD8 noch weitere Lymphozytenmarker zu bestimmen, die genauere Informationen zum Krankheitsstadium und der Prognose liefern<sup>86</sup>. Zum anderen kann mit dieser Studie eine valide Methode zur durchflusszytometrischen Leukozytendifferenzierung in der BALF vorgelegt werden. Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Untersuchung großer Zellzahlen in kurzer Zeit. Um die diagnostischen

Möglichkeiten noch umfassender zu nutzen, kann die Analyse von Oberflächenmarkern auf Lymphozyten problemlos in die vorliegende Methode inkorporiert werden. So könnte die durchflusszytometrische BALF-Analyse in Zukunft umfangreicher für die klinische Diagnostik genutzt werden. Zudem könnte auch an Standorten, an denen mikroskopische Expertise nicht verfügbar ist, eine Leukozytendifferenzierung der BALF ermöglicht werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Quantifizierung von Leukozyten-Subpopulationen nimmt in der klinischen BALF-Diagnostik eine zentrale Rolle ein. Von besonderer klinischer Bedeutung sind hier die Populationen der Makrophagen/Monozyten, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und eosinophilen Granulozyten. Für die Erhebung dieser Differentialzytologie stellt die Mikroskopie, trotz relevanter Limitationen, nach wie vor den Goldstandard dar. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal eine robuste Methode zur routinemäßigen Leukozytendifferenzierung in humaner BAL-Flüssigkeit mittels Durchflusszytometrie beschrieben werden. Die Methode wurde in einer prospektiven Studie validiert, in der 745 BALF-Proben zum einen mikroskopisch, zum anderen durchflusszytometrisch ausgewertet wurden. Die untersuchten Proben wurden unselektiert im Zuge der Routinediagnostik der Klinik für Pneumologie der Universitätsklinik Rostock generiert und umfassten so ein breites Spektrum an Zellzahlen und zellulären Zusammensetzungen. Die mikroskopische und die durchflusszytometrische Untersuchung wurden separat von zwei verschiedenen Untersuchern durchgeführt, wobei jeder Untersucher verblindet gegenüber der nicht von ihm durchgeführten Untersuchungsmethode war. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie korrelierten eng mit den Ergebnissen der Mikroskopie ( $r \geq 0,78$ ,  $p < 0,001$  für alle Leukozyten-Subpopulationen). Hinsichtlich der Übereinstimmung der beiden Messmethoden betrug die mittlere Differenz zwischen den Ergebnissen der beiden Messverfahren  $\leq 2\%$  für alle Leukozyten-Subpopulationen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mindestens 95% der erhobenen Werte eine maximale Abweichung von 20% von der mittleren Differenz der beiden Messverfahren zeigten. Dieses Ergebnis zeigte sich unabhängig von der Zellkonzentration der in der BALF suspendierten Leukozyten, was durch Subgruppenanalysen gezeigt werden konnte. Die durchflusszytometrische Quantifizierung von Leukozyten-Subpopulationen in der BALF hat im Vergleich zur Mikroskopie mehrere Vorteile: 1.) Es können große Zellzahlen in kurzer Zeit analysiert werden. 2.) Die Bestimmung von Oberflächenmarkern auf Lymphozyten kann in die beschriebene Methode problemlos inkorporiert werden. 3.) Eine Differenzierung der BALF-Leukozyten-Subpopulationen ist auch an Standorten durchführbar, an denen keine mikroskopische Expertise verfügbar ist.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Giddings CE, Rimmer J, Weir N. Chevalier Jackson: pioneer and protector of children. *J Laryngol Otol*. Jul 2013;127(7):638-642.
2. Feldmann H. [Diagnosis and therapy of diseases of the larynx in the history of medicine]. *Laryngorhinootologie*. Jan 2002;81(1):46-55.
3. Hirsch NP, Smith GB, Hirsch PO. Alfred Kirstein. Pioneer of direct laryngoscopy. *Anaesthesia*. Jan 1986;41(1):42-45.
4. Prowse SJ, Makura Z. Gustav Killian: beyond his dehiscence. *J Laryngol Otol*. Nov 2012;126(11):1164-1168.
5. Plinkert PK. Gustav Killian - ein Pionier der Endoskopie. *HNO*. 1998/07/01 1998;46(7):629-630.
6. Bollinger PNMCT. *Interventional Bronchoscopy*. Vol 30. Basel (Switzerland): S.Karger AG; 2000 ; S.5.
7. Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis*. Jan 1987;135(1):250-263.
8. Manley C. Bronchoscopy: Past, Present, and Future. *Current Pulmonology Reports*. 2019/12/01 2019;8(4):198-204.
9. Ikeda S, Yanai N, Ishikawa S. Flexible bronchofiberscope. *Keio J Med*. Mar 1968;17(1):1-16.
10. Ikeda S. Flexible bronchofiberscope. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. Oct 1970;79(5):916-923.
11. Reynolds HY. Use of bronchoalveolar lavage in humans--past necessity and future imperative. *Lung*. 2000;178(5):271-293.
12. Panchabhai TS, Mehta AC. Historical perspectives of bronchoscopy. Connecting the dots. *Ann Am Thorac Soc*. May 2015;12(5):631-641.
13. Wälscher J, Gompelmann D. Bronchoskopie. *Dtsch Med Wochenschr*. 2016/08/24 2016;141(17):1236-1238.
14. Wang KP, Terry PB. Transbronchial needle aspiration in the diagnosis and staging of bronchogenic carcinoma. *Am Rev Respir Dis*. Mar 1983;127(3):344-347.
15. Herth FJ, Becker HD, Eberhardt R. [Endobronchial ultrasound in bronchial carcinoma]. *Radiologe*. May 2004;44(5):457-464.
16. Gompelmann D, Eberhardt R, Herth FJF. Endobronchialer Ultraschall. *Der Radiologe*. 2010/08/01 2010;50(8):692-698.
17. Meyer KC. Bronchoalveolar Lavage as a Diagnostic Tool. *Semin Respir Crit Care Med*. 2007/11/02 2007;28(05):546-560.
18. Gee JB, Fick RB, Jr. Bronchoalveolar lavage. *Thorax*. Jan 1980;35(1):1-8.
19. Myrvik Q, Leake ES, Fariss B. Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit: a technique to procure them in a high state of purity. *J Immunol*. Feb 1961;86:128-132.
20. Keimowitz RI. IMMUNOGLOBULINS IN NORMAL HUMAN TRACHEOBRONCHIAL WASHINGS: A QUALITATIVE AND QUANTITATIVE STUDY. *J Lab Clin Med*. Jan 1964;63:54-59.
21. Finley TN, Swenson EW, Curran WS, Huber GL, Ladman AJ. Bronchopulmonary lavage in normal subjects and patients with obstructive lung disease. *Ann Intern Med*. Apr 1967;66(4):651-658.

22. Reynolds HY, Newball HH. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J Lab Clin Med.* Oct 1974;84(4):559-573.
23. Rossi GA. Bronchoalveolar lavage in the investigation of disorders of the lower respiratory tract. *Eur J Respir Dis.* Nov 1986;69(5):293-315.
24. Davis GS LJ, Brody AR, Graham WGB, et al. Characteristics of diffuse lung disease reflected by pulmonary lavage. *Am Rev Respir Dis.* 1975;111:933–934.
25. Reynolds HY, Fulmer JD, Kazmierowski JA, Roberts WC, Frank MM, Crystal RG. Analysis of cellular and protein content of broncho-alveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and chronic hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Invest.* Jan 1977;59(1):165-175.
26. Costabel U. *Atlas der bronchoalveolären Lavage*: Georg Thieme Verlag Stuttgart ; New York; 1994 ; a: S1; b: S.2; c: S.3; d:S.6; e: S.10; f: S.19 g: S.4; h: S.41.
27. Tötsch M, Guzman J, Theegarten D, Schmid KW, Costabel U. Bronchoalveoläre Lavage. *Der Pathologe.* 2007/09/01 2007;28(5):346-353.
28. Teschler H, Wessendorf TE. [Pulmonary alveolar proteinosis]. *Pneumologie.* Jul 2002;56(7):448-456.
29. Nakhosteen JA, Zavala DC. Die Bronchiallavage. In: Nakhosteen JA, Zavala DC, eds. *Atlas und Lehrbuch der flexiblen Bronchoskopie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1983:82-98.
30. Ramírez P, Valencia M, Torres A. Bronchoalveolar lavage to diagnose respiratory infections. *Semin Respir Crit Care Med.* Oct 2007;28(5):525-533.
31. Stover DE, Zaman MB, Hajdu SI, Lange M, Gold J, Armstrong D. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of diffuse pulmonary infiltrates in the immunosuppressed host. *Ann Intern Med.* Jul 1984;101(1):1-7.
32. Torres A, El-Ebiary M. Bronchoscopic BAL in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Chest.* Apr 2000;117(4 Suppl 2):198s-202s.
33. Ewig S, Bauer T, Hasper E, Marklein G, Kubini R, Lüderitz B. Value of routine microbial investigation in community-acquired pneumonia treated in a tertiary care center. *Respiration.* 1996;63(3):164-169.
34. Rasmussen TR, Korsgaard J, Møller JK, Sommer T, Kilian M. Quantitative culture of bronchoalveolar lavage fluid in community-acquired lower respiratory tract infections. *Respir Med.* Nov 2001;95(11):885-890.
35. Hohenthal U, Sipilä J, Vainionpää R, et al. Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in community-acquired pneumonia in a routine setting: a study on patients treated in a Finnish university hospital. *Scand J Infect Dis.* 2004;36(3):198-203.
36. Meyer KC, Raghu G. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of interstitial lung disease: is it clinically useful? *Eur Respir J.* Oct 2011;38(4):761-769.
37. Gillissen A. Über die Spülflüssigkeit der Lunge der Erkrankung auf die Spur kommen. *Pneumo News.* 2020;12(7):44-50.
38. Drent M, Mansour K, Linssen C. Bronchoalveolar Lavage in Sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2007/11/02 2007;28(05):486-495.
39. Hogeia SP, Tudorache E, Pescaru C, Marc M, Oancea C. Bronchoalveolar lavage: role in the evaluation of pulmonary interstitial disease. *Expert Rev Respir Med.* Nov 2020;14(11):1117-1130.
40. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* May 1 2012;185(9):1004-1014.

41. Cordeiro CR, Jones JC, Alfaro T, Ferreira AJ. Bronchoalveolar Lavage in Occupational Lung Diseases. *Semin Respir Crit Care Med.* 2007/11/02 2007;28(05):504-513.
42. Poletti V, Romagna M, Allen KA, Gasponi A, Spiga L. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of disseminated lung tumors. *Acta Cytol.* May-Jun 1995;39(3):472-477.
43. Bellmunt J, De Gracia J, Morales S, Orriols R, Tallada N. Cytologic diagnosis in bronchoalveolar lavage specimens. A diagnostic technique for lung neoplasmas with a peripheral location. *Chest.* Aug 1990;98(2):513-514.
44. Levy H, Horak DA, Lewis MI. The value of bronchial washings and bronchoalveolar lavage in the diagnosis of lymphangitic carcinomatosis. *Chest.* Nov 1988;94(5):1028-1030.
45. Linder J, Radio SJ, Robbins RA, Ghafouri M, Rennard SI. Bronchoalveolar lavage in the cytologic diagnosis of carcinoma of the lung. *Acta Cytol.* Nov-Dec 1987;31(6):796-801.
46. Ferrà C, Xicoy B, Castillo N, et al. Usefulness of bronchoalveolar lavage and flow cytometry in patients with hematological malignancies and respiratory failure. *Med Clin (Barc).* Apr 7 2017;148(7):297-302.
47. Domagala-Kulawik J. The relevance of bronchoalveolar lavage fluid analysis for lung cancer patients. *Expert Rev Respir Med.* Mar 2020;14(3):329-337.
48. Poletti V, Poletti G, Murer B, Saragoni L, Chilosi M. Bronchoalveolar Lavage in Malignancy. *Semin Respir Crit Care Med.* 2007/11/02 2007;28(05):534-545.
49. Daniele RP, Altose MD, Rowlands DT, Jr. Immunocompetent cells from the lower respiratory tract of normal human lungs. *J Clin Invest.* Oct 1975;56(4):986-995.
50. Rose AS, Knox KS. Bronchoalveolar Lavage as a Research Tool. *Semin Respir Crit Care Med.* 2007/11/02 2007;28(05):561-573.
51. Midulla F, Nenna R. Bronchoalveolar Lavage: Indications and Applications. In: Priftis KN, Anthracopoulos MB, Eber E, Koumbourlis AC, Wood RE, eds. *Paediatric Bronchoscopy.* Vol 38: S.Karger AG; 2010:39-40.
52. Elston WJ, Whittaker AJ, Khan LN, et al. Safety of research bronchoscopy, biopsy and bronchoalveolar lavage in asthma. *Eur Respir J.* Sep 2004;24(3):375-377.
53. Van Vyve T, Chanez P, Bousquet J, Lacoste JY, Michel FB, Godard P. Safety of bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in patients with asthma of variable severity. *Am Rev Respir Dis.* Jul 1992;146(1):116-121.
54. Julius P, Große-Thie C, Küpper M, et al. Lösliches CD14 (sCD14) 18, 42 und 162 Stunden nach segmentaler Allergenprovokation allergischer Asthmatiker. *Pneumologie.* 2005/03/03 2005;59(S 1):V23.
55. Bratke K, Lommatzsch M, Julius P, et al. Dendritic cell subsets in human bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge. *Thorax.* Feb 2007;62(2):168-175.
56. Julius P, Lommatzsch M, Kuepper M, et al. Safety of segmental allergen challenge in human allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* Mar 2008;121(3):712-717.
57. P.C. Bauer FB, M. Tötsch, D. Theegarten, J. Guzman, U. Costabel. Die bronchoalveoläre Lavage aus klinischer Sicht. *Der Pneumologe.* 2009;6:233-242.
58. Baughman RP. Technical aspects of bronchoalveolar lavage: recommendations for a standard procedure. *Semin Respir Crit Care Med.* Oct 2007;28(5):475-485.

59. Klech H, Hutter C. Side-effects and safety of BAL. *Eur Respir J*. Sep 1990;3(8):939-940, 961-939.
60. Ibrahim SF, van den Engh G. Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2007;106:19-39.
61. Giesecke C, Kaiser T. Neue Spektren in der Durchflusszytometrie. *BIOspektrum*. 2017/10/01 2017;23(6):658-661.
62. Woo J, Baumann A, Arguello V. Recent advancements of flow cytometry: new applications in hematology and oncology. *Expert Rev Mol Diagn*. Jan 2014;14(1):67-81.
63. Xing Y, Wang JZ, Pu CW, Shang K. [Clinical evaluation of leukocyte differential count in peripheral blood by five-color flow cytometry]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. Aug 13 2013;93(30):2392-2396.
64. Sysmex. Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Hämatologie. *Sysmex Xtra (xs-Serie)*. Vol 2. Norderstedt: SYSMEX DEUTSCHLAND GmbH; 2007:4.
65. Barry SM, Janossy G. Optimal gating strategies for determining bronchoalveolar lavage CD4/CD8 lymphocyte ratios by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 2004/02/01/ 2004;285(1):15-23.
66. Shen Y, Pang C, Wu Y, et al. Diagnostic Performance of Bronchoalveolar Lavage Fluid CD4/CD8 Ratio for Sarcoidosis: A Meta-analysis. *EBioMedicine*. Jun 2016;8:302-308.
67. Grewal RK, Chetty M, Abayomi EA, Tomuleasa C, Fromm JR. Use of flow cytometry in the phenotypic diagnosis of hodgkin's lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom*. Mar 2019;96(2):116-127.
68. Auerswald U, Barth J, Magnussen H. Value of CD-1-positive cells in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of pulmonary histiocytosis X. *Lung*. 1991;169(6):305-309.
69. Barry SM, Condez A, Johnson MA, Janossy G. Determination of bronchoalveolar lavage leukocyte populations by flow cytometry in patients investigated for respiratory disease. *Cytometry*. Dec 15 2002;50(6):291-297.
70. Hodge SJ, Hodge GL, Holmes M, Reynolds PN. Flow cytometric characterization of cell populations in bronchoalveolar lavage and bronchial brushings from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Cytometry B Clin Cytom*. Sep 2004;61(1):27-34.
71. Shanthikumar S, Burton M, Saffery R, Ranganathan SC, Neeland MR. Single-Cell Flow Cytometry Profiling of BAL in Children. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Aug 2020;63(2):152-159.
72. Tricas L, Echeverría A, Blanco MA, Menéndez M, Belda J. Flow cytometry counting of bronchoalveolar lavage leukocytes with a new profile of monoclonal antibodies combination. *Cytometry B Clin Cytom*. Mar 2012;82(2):61-66.
73. Pepedil-Tanrikulu F, Sen N, Buyukkurt N, Sariturk C, Kozanoglu I. A Novel Simplified Combination of Monoclonal Antibodies for Flow Cytometric Analysis of Bronchoalveolar Lavage Samples. *Clin Lab*. Sep 1 2019;65(9).
74. Klug M. *Promotion: Durchflusszytometrische Charakterisierung myeloider dendritischer Zellen in den Atemwegen von Zigaretten-Rauchern*: Medizinische Fakultät, Universität Rostock; 2009.
75. Walport KMPTM. *Janeway Immunologie*. Vol 7. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009 ; S. 954.
76. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. Feb 8 1986;1(8476):307-310.
77. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Vol 2. ed. Hillsdale, NJ: L. Erlbaum Associates; 1988.

78. Renz H, Gierten B. CD45. In: Gressner AM, Arndt T, eds. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019 ; S. 546-546.
79. Zhao L, Xu S, Fjaertoft G, Pauksen K, Håkansson L, Venge P. An enzyme-linked immunosorbent assay for human carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8, a biological marker of granulocyte activities in vivo. *J Immunol Methods*. Oct 2004;293(1-2):207-214.
80. Renz H, Gierten B. HLA-DR. In: Gressner AM, Arndt T, eds. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019 ; S. 1130-1131.
81. Elsner J, Höchstetter R, Spiekermann K, Kapp A. Surface and mRNA expression of the CD52 antigen by human eosinophils but not by neutrophils. *Blood*. Dec 15 1996;88(12):4684-4693.
82. MacColl R, Eisele LE, Menikh A. Allophycocyanin: trimers, monomers, subunits, and homodimers. *Biopolymers*. 2003;72(5):352-365.
83. Sam A GF, Ricciotti R, Knox KS, Sobonya R. CMV cytopathic effect. *Southwest Journal of Pulmonary, Critical Care & Sleep*. 2014;9(6):341-342.
84. Lommatzsch M, Bratke K, Stoll P, et al. Bronchoalveolar lavage for the diagnosis of Pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Respir Med*. Oct 2016;119:168-174.
85. Lommatzsch M, Marchewski H, Schwefel G, Stoll P, Virchow JC, Bratke K. Benralizumab strongly reduces blood basophils in severe eosinophilic asthma. *Clin Exp Allergy*. Nov 2020;50(11):1267-1269.
86. Darlington P, Kullberg S, Eklund A, Grunewald J. Lung CD4+ Vα2.3+ T-cells in sarcoidosis cohorts with Löfgren's syndrome. *Respir Res*. Feb 28 2020;21(1):61.



## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb</b>	Abbildung
<b>APC</b>	Allophycocyanin
<b>ARDS</b>	Acute Respiratory Distress Syndrome (akutes Atemnotsyndrom)
<b>BAL</b>	bronchoalveoläre Lavage
<b>BALF</b>	bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation (Differenzierungskluster)
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>COP</b>	cryptogenic organizing pneumonia (kryptogen organisierende Pneumonie)
<b>COPD</b>	chronic obstructive pulmonary disease (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
<b>EAA</b>	exogen allergische Alveolitis
<b>EBUS</b>	endobronchialer Ultraschall
<b>EGPA</b>	eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis
<b>Eos</b>	eosinophile Granulozyten
<b>FACS</b>	fluorescence activated cell sorting (fluoreszenzaktivierte Zellanalyse)
<b>FC</b>	mittels FACS-Messung erhoben
<b>FCS</b>	fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FSC</b>	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz-Virus
<b>HLA-DR</b>	Human leukocyte antigen–antigen D related
<b>HNO-Arzt</b>	Hals-Nasen-Ohren-Arzt
<b>ILD</b>	interstitial lung disease (interstitielle Lungenerkrankung)
<b>Instill. Vol.</b>	instilliertes Volumen
<b>IPF</b>	idiopathische Lungenfibrose

*Anhang*

<b>LRTI</b>	lower respiratory tract infection (Infektion der unteren Atemwege)
<b>Lym</b>	Lymphozyten
<b>MM</b>	Makrophagen/Monozyten
<b>mmHg</b>	Millimeter Quecksilbersäule
<b>MS</b>	mikroskopisch erhoben
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>Neu</b>	neutrophile Granulozyten
<b>NSIP</b>	nicht spezifische interstitielle Pneumonie
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PerCP</b>	Peridinin-Chlorophyll-Protein
<b>PLCH</b>	pulmonale Langerhanszell-Histiozytose
<b>PTT</b>	partielle Thromboplastinzeit
<b>RB-ILD</b>	respiratorische Bronchiolitis mit interstitieller Lungenerkrankung
<b>SSC</b>	side scatter (Seitwärtsstreulicht)
<b>Tab</b>	Tabelle
<b>TBNA</b>	transbronchiale Nadelaspiration

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb.1</b>	Gustav Killian: „Urvater der Bronchoskopie“ .....	2
<b>Abb.2</b>	Chevalier Jackson.....	3
<b>Abb.3</b>	Dr. Shigeto Ikeda entwickelte 1967 in Japan das erste fiber- optische Bronchoskop .....	4
<b>Abb.4</b>	Therapeutische Ganzlungenlavage .....	8
<b>Abb.5</b>	Durchführung der bronchoalveolären Lavage .....	13
<b>Abb.6</b>	Mikroskopische Ansicht verschiedener Zellmuster in der BALF...16-17	
<b>Abb.7</b>	Durchflusszytometrische Leukozytendifferenzierung in der Hämatologie .....	18
<b>Abb.8</b>	Prinzip der mikroskopischen Zellzählung.....	28
<b>Abb.9</b>	Exemplarische Darstellung der FACS-Analyse .....	31
<b>Abb.10</b>	Gating-Strategie .....	39
<b>Abb.11</b>	Ausschluss von „Falschen Eosinophilen“ mittels Back-Gating .....	41
<b>Abb.12</b>	Korrelationsanalysen nach Spearman .....	42
<b>Abb.13</b>	Bland-Altman-Plots aller BALF-Proben für Makrophagen/ Monozyten und Lymphozyten.....	44
<b>Abb.14</b>	Bland-Altman-Plots aller BALF-Proben für neutrophile und eosinophile Granulozyten .....	45
<b>Abb.15</b>	Bland-Altman-Plots Subgruppe „Niedrige BALF-Leukozyten- Zellzahl“ für Makrophagen/Monozyten und Lymphozyten.....	47
<b>Abb.16</b>	Bland-Altman-Plots Subgruppe „Niedrige BALF-Leukozyten- Zellzahl“ für neutrophile und eosinophile Granulozyten .....	48
<b>Abb.17</b>	Bland-Altman-Plots Subgruppe „Hohe BALF-Leukozyten- Zellzahl“ für Makrophagen/Monozyten und Lymphozyten.....	49
<b>Abb.18</b>	Bland-Altman-Plots Subgruppe „Hohe BALF- Leukozyten- Zellzahl“ für neutrophile und eosinophile Granulozyten .....	50
<b>Abb.19</b>	Nachweis einer Cytomegalievirus-Infektion über die BALF .....	57
<b>Abb.20</b>	BALF bei alveolärer Hämorrhagie .....	57

### 7.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1</b>	Antikörper für die durchflusszytometrische Untersuchung .....	33
<b>Tab. 2</b>	Patienten- und BALF-Charakteristika.....	36
<b>Tab. 3</b>	Verdachtsdiagnosen .....	37
<b>Tab. 4</b>	Ergebnisse der mikroskopischen und durchflusszytometrischen Messungen.....	37

## **7.4 Publikation**

Kai Bratke, **Martin Weise**, Paul Stoll, J. Christian Virchow and Marek Lommatzsch  
Flow cytometry versus microscopy to differentiate leukocytes in human  
bronchoalveolar lavage fluid.

Das Paper wurde zur Publikation eingereicht.

## 7.5 Curriculum Vitae

### PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Name: Martin Weise  
Geburtsdatum: 12.07.1997  
Geburtsort: Greifswald  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### SCHULAUSSBILDUNG

2003 – 2006 Rudolf-Tarnow-Grundschule, Wismar  
2007 – 2008 Orientierungsstufe Regionale Schule Prof. Dr. h.c. Dr. h.c.  
Hans Lembke, Poel  
2009 – 2015 Geschwister-Scholl-Gymnasium, Wismar  
2015 Allgemeine Hochschulreife

### MEDIZINISCHE AUSBILDUNG

2015 – 2016 Ausbildung zum Rettungssanitäter an der Rettungsdienst-  
schule der Feuerwehr Schwerin  
10 / 2016 Immatrikulation für das Studium der Humanmedizin an der  
Universität Rostock  
09 / 2018 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10 / 2021 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
11 / 2021 – 10 / 2022 Praktisches Jahr  
11 / 2022 Approbation als Arzt

### PRAKTISCHES JAHR

Anästhesiologie Boddenklinik Ribnitz-Damgarten  
11 / 2021 – 03 / 2022 Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin  
  
Innere Medizin Universitätsklinikum Regensburg  
03 / 2022 – 07 / 2022 Abteilung für Innere Medizin II  
- Pneumologie  
- Kardiologische Intensivstation  
  
Chirurgie Krankenhaus Bethel Berlin  
07 / 2022 – 10 / 2022 Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie  
Abteilung für Allgemeinchirurgie

### FAMULATUREN

08 / 2019 Anästhesiologische Intensivmedizin  
Bodden-Klinik Ribnitz-Damgarten

## *Anhang*

09 / 2019	Praxis für Allgemeinmedizin Dr. med. Erik Ziems, Wismar
03 / 2020	Abteilung für Kardiologie Universitätsklinik Rostock
08 / 2020	Abteilung für Anästhesiologie Bodden-Klinik Ribnitz-Damgarten
03 / 2021	Anästhesiologische Intensivmedizin Bodden-Klinik Ribnitz-Damgarten
03 / 2021	Praxis für Gynäkologie Dr. med. Jens-Uwe Weise, Warin

## **VERÖFFENTLICHUNGEN**

Lommatzsch M, Dost M, Jaishankar N, **Weise M**, Stoll P, Virchow JC, Bratke K.  
Dupilumab treatment increases transitional B cells in severe asthma.  
Allergy, The European Journal of Allergy and Clinical immunology.  
(Impact Factor 2022: 14,71)  
DOI: 10.1111/all.15703 /Vol 78, Issue 4, April 2023

## 7.6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Marek Lommatzsch, der mich bei der Erstellung dieser Arbeit in größtem Maße unterstützte und mir stets mit fördernden Anregungen zur Seite stand. Da unsere Treffen oft abends und manchmal bis in die Nacht hinein stattfanden, möchte ich mich auch herzlich bei seiner Ehefrau Mandy Lommatzsch und der Familie für die große Geduld und die damit verbundenen Einschränkungen ihres Privatlebens bedanken.

Ein großer Dank gilt des Weiteren dem Leiter des Pneumologischen Labors, Dr. rer. nat. Kai Bratke, der durch die Entwicklung der durchflusszytometrischen Methode den Grundstein für die Entstehung dieser Arbeit legte. Von seiner umfangreichen Erfahrung auf dem Gebiet durchflusszytometrischer Messungen konnte ich sehr profitieren. Frau Petra Thamm möchte ich für die Durchführung der mikroskopischen Messungen herzlich danken. In besonderem Maße möchte ich mich bei Frau Anna Junge bedanken, die mir durch ihre Tätigkeit im Pneumologischen Labor bei vielen Fragen stets geduldig zur Seite stand und mich mit viel hilfreichen Informations- und Bildmaterial versorgte.

Meinen Eltern bin ich für die uneingeschränkte Unterstützung, die ich mein ganzes Leben lang durch sie erfahren habe, zutiefst dankbar. Ihre Herzlichkeit, ihre Liebe und ihr Vertrauen in mich halfen mir sehr, den eingeschlagenen Weg zu gehen. Auch meinen Großeltern möchte ich für ihre fortwährende Unterstützung danken. Der familiäre Zusammenhalt gab mir stets das Gefühl von Geborgenheit und Rückhalt.

Bei meiner Freundin Marieke Dost möchte ich mich für ihre emotionale Unterstützung und all die herzlichen Momente bedanken, die mir auch vor großen Anstrengungen viel Kraft gaben. Darüber hinaus war mir unser fachlicher Austausch bei der Fertigstellung dieser Dissertation eine große Hilfe.



## **7.7 Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Martin Weise

Rostock, im Mai 2023

*Thesen*

Aus der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock  
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. Virchow

**Validierung einer durchflusszytometrischen Methode zur  
Leukozytendifferenzierung in der bronchoalveolären  
Lavage-Flüssigkeit des Menschen**

Eine klinisch – prospektive Studie

---

**THESEN ZUR  
DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor medicinae**

**(Dr. med.)**

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät der Universität Rostock



von

Martin Weise aus Wismar

Rostock, im Mai 2023

## 8 THESEN

- 1) Die Differenzierung der Leukozyten-Subpopulationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) ist ein wichtiges diagnostisches Instrument in der klinischen Praxis.
- 2) Der aktuelle Goldstandard ist die mikroskopische Auswertung, obwohl das Verfahren aufgrund der geringen Anzahl ausgezählter Zellen anfällig für Stichprobenfehler ist. Zusätzlich erfordert das Verfahren eine umfassende zytologische Expertise, die in vielen Kliniken nicht verfügbar ist.
- 3) Eine valide Methode zur durchflusszytometrischen Leukozytendifferenzierung in der humanen BALF existiert bislang nicht.
- 4) Ziel der vorliegenden Studie war die Validierung eines durchflusszytometrischen Verfahrens zur Leukozytendifferenzierung in der humanen BALF.
- 5) Dieses Verfahren wurde prospektiv an Routine-BALF-Proben von 745 Patienten validiert: Die BALF-Proben wurden sowohl mikroskopisch als auch durchflusszytometrisch untersucht. Die Untersucher waren für die Ergebnisse der anderen Untersuchungsmethode jeweils verblindet.
- 6) Es zeigte sich eine starke Korrelation zwischen beiden Untersuchungsverfahren in allen Leukozyten-Subpopulationen.
- 7) Zudem wichen mehr als 95% aller erhobenen Messergebnisse maximal 20% von der mittleren Differenz der Messwerte ab (diese Abweichung wurde vor Beginn der Studie als klinisch akzeptabel definiert).
- 8) Subgruppenanalysen zeigten, dass die Ergebnisse der Studie unabhängig von der Zellkonzentration in den BALF-Proben waren.
- 9) Zusammenfassend wird erstmals eine robuste und valide Methode zur durchflusszytometrischen Quantifizierung von Leukozyten-Subpopulationen in der humanen BALF beschrieben.
- 10) Diese Methode hat im Vergleich zur Mikroskopie mehrere Vorteile: Es können hohe Zellzahlen in kurzer Zeit analysiert werden, die Untersuchung kann mit der Analyse von Lymphozyten-Oberflächenmarkern verbunden werden und an Standorten eingesetzt werden, an denen keine mikroskopische Expertise vorhanden ist.