

Die Auswirkungen von Tabakrauch auf Alveolarmakrophagen – ein In-vivo-Kurzzeitrauchmodell zur Mauslunge

The Effects of Tobacco Smoke on Alveolar Macrophages – An In Vivo Mouse Lung Model for Short-Term Smoking

Autoren

N. T. Veith¹, J. Hellberg², C. Beisswenger², M. W. Laschke³, T. Tschernig¹

Institute

¹ Institut für Anatomie, Homburg

² Innere Medizin V – Pneumologie, Allergologie, Beatmungsmedizin, Homburg

³ Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Homburg

eingereicht 11. 12. 2012
akzeptiert nach Revision
16. 1. 2013

Bibliografie

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1326222>
Online-Publikation: 11.3.2013
Pneumologie 2013; 67: 223–227
© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York
ISSN 0934-8387

Korrespondenzadresse

Nils T. Veith
Institut für Anatomie
und Zellbiologie
Kirrberger Straße
66421 Homburg/Saar
nils.veith@gmx.net

Zusammenfassung

Hintergrund: Der Einfluss von Tabakrauch auf das Phagozytoseverhalten von Alveolarmakrophagen *in vivo* wird kontrovers diskutiert. Bisherige Studien konnten diese Fragestellung nur in In-vitro-Modellen beantworten. Das vorgestellte Modell ist das erste In-vivo-Modell zu dieser Fragestellung.

Fragestellung: Verstärkt oder hemmt Tabakrauch die phagozytische Aktivität von Alveolarmakrophagen bzw. führt Tabakrauch zu einem Anstieg der Alveolarmakrophagen?

Ergebnisse: Tabakrauch führt zu einer tendenziell verstärkten Aktivität von Alveolarmakrophagen.

Methodik: Die Intravitalmikroskopie der Lunge erlaubt die Beobachtung von Alveolarmakrophagen nahe der Lungenoberfläche.

Ergebnisse: Tabakrauch führt tendenziell zu einer vermehrten Phagozytose von Partikeln durch Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten.

Schlussfolgerung: Diese Studie unterstützt Untersuchungen, die *in vitro* keine Hemmung der phagozytischen Aktivität von Alveolarmakrophagen nach Tabakrauchexposition zeigen konnten.

Einleitung

Die chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD) verläuft häufig tödlich. Als Basis für die Entstehung dieser Erkrankung wird hauptsächlich der Konsum von Zigaretten angesehen [1]. Die Prävalenz steigt ständig, sodass Studien für das Jahr 2020 die COPD als dritthäufigste Todesursache weltweit sehen [2]. Verantwortlich hierfür sind der zunehmende Zigarettenkonsum sowie die zunehmende Luftverschmutzung in den Entwicklungsländern [3].

Im Tabakrauch konnten durch bisherige Studien ca. 4800 Stoffe identifiziert werden, von denen eine Vielzahl toxische und kanzerogene Wirkun-

Abstract

Background: The effect of cigarette smoke (CS) on the phagocytosis of alveolar macrophages is discussed controversially on the basis of *in vitro* experiments. In this short report we describe the *in vivo* observations that we have performed.

Methods: For this purpose mice were exposed to CS for three consecutive days. One day later the fluorescent microspheres were administered intratracheally and the lung surface was investigated using long-distance fluorescence microscopy.

Results: We found that the numbers of neutrophils which engulfed particles was increased in the CS group as compared to controls. The overall phagocytic activity was not significantly different after CS exposure.

Conclusions: In conclusion the phagocytosis of alveolar macrophages and neutrophils after short time CS exposure was not affected. Further investigations will need to look for the effects of long-term CS exposure and the phagocytosis of living bacteria.

gen auf die Zelle hat [4,5]. Der Einfluss dieser Substanzen führt zu einer Veränderung der Entzündungsparameter im Organismus. So konnte u.a. ein Anstieg von TNF- α , IL-6, IL-8 und CRP (C-reaktives Protein) im Serumspiegel von chronischen Rauchern beobachtet werden [6]. Die Veränderungen dieser Parameter können für den Patienten langfristig fatal sein.

So führt die durch den Tabakrauch getriggerte Expression von TNF- α zu einer verstärkten Einwanderung von Monozyten in die Lunge. Dort angekommen differenzieren sich die Monozyten zu Alveolarmakrophagen [7]. Das Ergebnis ist eine fünf- bis zehnfach größere Anzahl von Makrophagen in der Lunge, in der BAL sowie im Sputum von

COPD-Patienten [8,5,9,10]. Eine erhöhte Anzahl der Alveolarmakrophagen kann nicht nur auf eine erhöhte Rekrutierung von Blutmonozyten in das Lungenparenchym zurückgeführt werden. Sondern eine entscheidende Rolle scheinen auch eine längere Überlebenszeit und eine erhöhte Proliferation von Mediatoren in der Lunge zu spielen [11].

Dieser Makrophagenzunahme und den daraus resultierenden Folgen wird eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der COPD zugeschrieben [12,11].

Zu den Hauptaufgaben der Alveolarmakrophagen zählen die Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen, radikalen Sauerstoffspezies, Elastasen sowie die Phagozytose von pathogenen Erregern [11,13]. Die durch den Zigarettenrauch in ihrer Anzahl gestiegenen Makrophagen sezernieren vermehrt Elastasen wie MMP und Cathepsine. Der Zytokinanstieg in der Lunge wiederum ist verantwortlich für eine vermehrte Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das Lungenparenchym, die ebenfalls Elastasen freisetzen [14,15]. Als Folge dieser Zellzunahme und der damit verbundenen verstärkten Freisetzung von Elastasen kann sich bei COPD-Patienten ein Lungenemphysem ausbilden.

Ein weiterer Effekt von Tabakrauch ist eine Verringerung der Interleukin-1-Freisetzung. Das Resultat ist eine verringerte Aktivität der Alveolarmakrophagen. Weniger Fremdstoffe werden dann durch die Makrophagen phagozytiert [16,17,18]. Die Folge ist eine erhöhte Rate an bakteriellen Lungeninfektionen bei Rauchern [19], die im schlimmsten Fall, durch die Hemmung des angeborenen Immunsystems, zum Tode führen können [20]. Studien zeigen, dass Raucher ein erhöhtes Risiko für Erkrankungen der Atemwege, Bronchitis, Lungenentzündung sowie der Legionärskrankheit haben [19,21,22].

Tabakrauch fördert zwar die Rekrutierung von Alveolarmakrophagen, hemmt jedoch aber auch gleichzeitig deren Phagozytose-Aktivität.

Die Änderung der Phagozytose-Aktivität von Alveolarmakrophagen sowie der Anstieg der Alveolarmakrophagen in der Lunge durch den Einfluss von Tabakrauch konnten bisher nur in In-vitro-Modellen untersucht werden. Untersucht wurden u.a. die Phagozytose von bakteriellen und viralen Erregern sowie die Aktivität der Alveolarmakrophagen mittels In-vitro-Techniken [23,24,25]. Grundlage für die meisten Modelle sind durch bronchoalveoläre Lavages (BAL) gewonnene Alveolarmakrophagen von Tieren. So nutzt Shea et al. [23] die aus BALs gewonnenen Alveolarmakrophagen von Ratten, die mit Tabakrauch exponiert wurden, zur Untersuchung der Phagozytoseaktivität. Die kolonisierten Makrophagen, die Tabakrauch ausgesetzt waren, zeigten bezüglich ihrer Phagozytose auf angebotene Bakterien vom Stamm *Staphylococcus epidermidis* eine verringerte Aktivität.

McMaster et al. [24] nutzte die aus BALs gewonnenen Makrophagen von Mäusen, die in einem Medium kolonisiert wurden. In unterschiedlichen Versuchsgruppen wurden die Alveolarmakrophagen mit verschiedenen Bakterienstämmen (u.a. *Staphylococcus aureus*, *escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) inokuliert und mit einer Rauchlösung versetzt. Hier zeigte sich, dass der Einfluss des Tabakrauches zu einer verringerten Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus den Alveolarmakrophagen führte. Die Abwehr der pathogenen Erreger durch die Makrophagen war gehemmt.

In-vivo-Modelle zu dieser Thematik sind nicht bekannt.

Fragestellung Die Phagozytose von Alveolarmakrophagen kann *in vivo* mit der Intravitalmikroskopie untersucht werden. Hierzu bedient man sich fluoreszenzmarkierter Partikel, im Folgenden auch als Latex-Beads bezeichnet. Latex-Beads erreichen nach er-

folgreicher Applikation die Lungenperipherie und werden dort von Alveolarmakrophagen phagozytiert, die dadurch sichtbar für das Fluoreszenzmikroskop werden [26]. Nach der Exposition einer Maus mit Tabakrauch sollte die Frage geklärt werden, ob Tabakrauch zu einer Veränderung der Anzahl sowie der Aktivität der Alveolarmakrophagen führt.

Material und Methoden



Tiere Die Versuche wurden an 12 Wochen alten C57BL/6-Mäusen durchgeführt mit einem Gewicht zwischen 25–30 g und einem Alter von 12–16 Wochen.

Zigarettenrauchexposition Die Mäuse wurden an drei aufeinander folgenden Tagen in einer Plexiglasbox Zigarettenrauch ausgesetzt (5×20 Minuten je Tag). In die Plexiglasbox wurden 1800 ml frische Luft und 360 ml Rauch je Minute eingeleitet. In einer Berauchungseinheit von 20 Minuten wurden 5 bis 6 Zigaretten (Standard-Forschungszigaretten) verbraucht. Zwischen den Berauchungseinheiten wurden die Tiere für 30 Minuten in ihre Käfige gesetzt. Die Qualität der Luft in der Plexiglasbox wurde überprüft. Folgende Werte wurden nicht überschritten: H₂S: 3 ppm; CO: 400 ppm.

Anästhesie und Präparation Nachdem die Versuchstiere durch eine intraperitoneale Injektion von 7,5 mg Ketamin-Hydrochlorid (Parke Davis, Freiburg, Deutschland) und 2,5 mg Xylazinhydrochlorid (Bayer, Leverkusen, Deutschland) pro 100 g Körpergewicht narkotisiert wurden, wurden die Tiere auf der OP-Platte zur Immobilisierung fixiert. Zur Beatmung der Tiere erfolgte eine Intubation über eine Tracheotomie mit einem Trachealtubus d=1 mm (Hugo Sachs/Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland). Die Beatmung erfolgte mit einem Minivent (Hugo Sachs/Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) mit einer Frequenz von 150 Hüben/min, einem Hubvolumen von 200 µl und einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von 4 cm H₂O bei einer FiO₂ von 100 %. Um starke Blutungen während der Eröffnung des Brustkorbes zu vermeiden, wurden die Aa. thoracicae ligiert (Prolene 2-0, Ethicon, Livingston, Scotland). Die Eröffnung des Brustkorbes erfolgte über eine mediane Sternotomie, vom Processus xyphoideus ausgehend in Richtung Manubrium sterni. Ab dem 3. Interkostalraum erfolgte die weitere Schnittführung zur rechten Seite der Brustwand. In der mittleren Axillarlinie wurde die Thorakotomie fortgesetzt und anschließend der Thoraxdeckel abgelöst.

Intravitale Multifluoreszenzmikroskopie Die Visualisierung erfolgte mit einem Zeiss Axiotech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer 100 W-Quecksilber-Lampe. Um das Bild während der Aufnahme weiterhin zu stabilisieren, wurde für einen Zeitraum von 10–20 Sekunden die Beatmung der Tiere abgeschaltet und der positive endexpiratorische Druck (PEEP) auf 5 cm H₂O eingestellt. Dies ermöglichte für einen relativ kurzen Zeitraum Bilder ohne Bewegungsartefakte. Die Versuchstiere wurden danach sofort wieder mittels Minivent (Hugo Sachs/Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) beatmet. Das inspiratorische Volumen wurde auf 200 µl eingestellt, die Atemfrequenz auf 150 Atemzüge pro min und der PEEP wieder auf 4 cm H₂O. Die mikroskopischen Bilder wurden auf einen Monitor übertragen und mittels einer CCD-Videokamera (FK6990, Pieper, Schwerte, Deutschland) aufgenommen und aufgezeichnet (Panasonic AG-7350-S-VHS, Matsushita, Tokyo, Japan). Die Auswertung der Videoaufzeichnungen erfolgte off-line an einem PC-System unter Verwendung der CapImage Software (Zeintl,

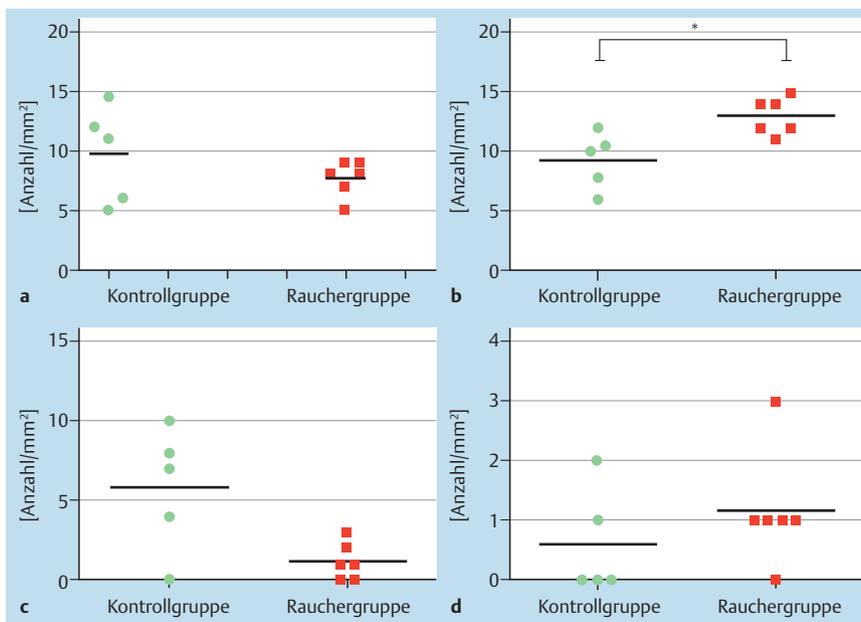


Abb. 1 a–d a zeigt die Dichte der Makrophagen, b der neutrophilen Granulozyten, c der Latex-Beads und d der Konglomerate. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ sind gekennzeichnet mit *.

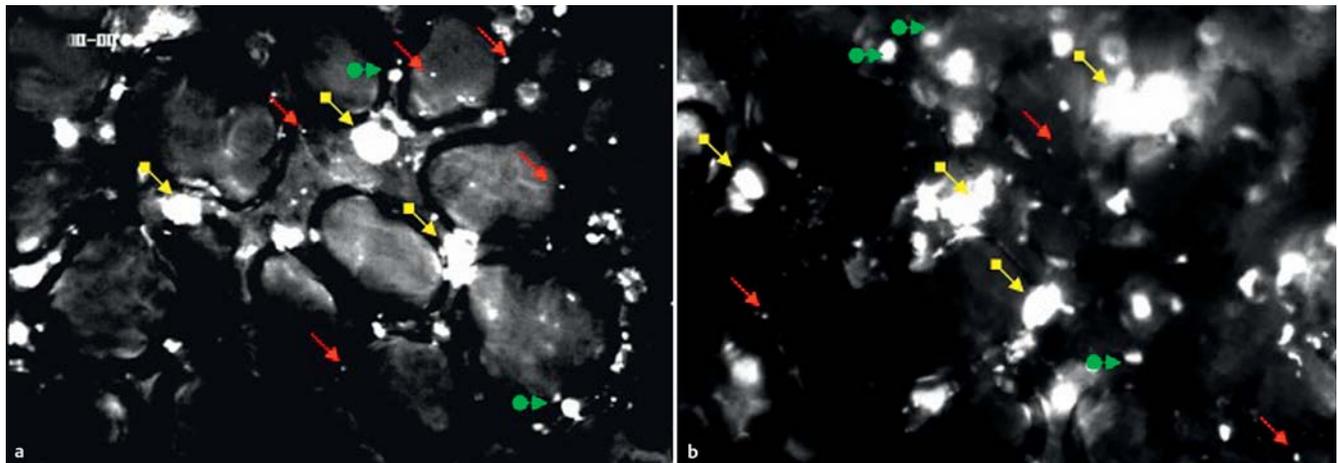


Abb. 2 a, b a zeigt eine In-vivo-Aufnahme einer Lunge aus der Kontrollgruppe (Raumluft). Die roten Pfeile zeigen Latex-Beads. Die gelben Pfeile zeigen phagozytoseaktive Makrophagen, die durch die Aufnahme fluoreszenzmarkierter Latex-Beads hell leuchten. Die grünen Pfeile zeigen neutrophile Granulozyten, die ebenfalls durch die Aufnahme von Latex-Beads hell leuchten. b zeigt eine In-vivo-Aufnahme der Lunge aus der gerauchten Gruppe. Vergleichend zu a zeigt sich eine kleinere Zahl freier Partikel. Die roten Pfeile zeigen Latex-Beads, die grünen neutrophile Granulozyten sowie die gelben Pfeile Alveolarmakrophagen, die durch Aufnahme fluoreszenzmarkierter Partikel markiert und dadurch beobachtet werden können.

Heidelberg, Deutschland) im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. Zur Darstellung von Alveolarmakrophagen und phagozytoseaktiven Zellen wurden Latex-Beads (Fluoresbrite Plain YG 1,0 Micron Microspheres, Eppelheim, Polysciences) eingesetzt. Das Exzitationsmaximum liegt bei 441 nm, die Emissionswellenlänge bei 486 nm. Eingesetzt wurden 50 μl 1 μm große Latex-Beads. Die Latex-Beads wurden über den Inspirationsschlauch des Minivent (Hugo Sachs/Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) verabreicht. Zur besseren Verteilung des Bolus wurde für einen kurzen Moment der Expirationsschenkel des Beatmungsgerätes abgeklemmt. Das Atemzugvolumen betrug für alle Tiere 200 μl und die Atemfrequenz 150 Atemzüge pro Minute. Um zwischen Makrophagen und Monozyten differenzieren zu können, erfolgte die Auswertung der Bilddaten mit der CapImage-Software (Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Zellen mit einem Durchmesser größer als $d = 10,5 \mu\text{m}$ wurden hierbei als Makrophagen definiert, Zellen kleiner als $d = 10,5 \mu\text{m}$ als neutrophile Granulozyten.

Statistik Drei bis fünf randomisiert ausgewählte Bereiche der rechten Lunge wurden quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) angegeben.

Ergebnisse

Makrophagen Die Anzahl der phagozytoseaktiven Makrophagen (Abb. 1 a und Abb. 2 a) der Kontrollgruppe wurde mit einem Mittelwert von 9,7 pro mm^2 (SD 4,1 pro mm^2 ; N=5) bestimmt. Im Vergleich zur Rauchergruppe mit einem Mittelwert von 7,6 pro mm^2 (SD 1,51 pro mm^2 ; N=6) stellte sich dabei im Mann-Whitney-U-Test kein signifikanter Unterschied heraus.

Neutrophile Granulozyten Der Mittelwert der neutrophilen Granulozyten der Kontrollgruppe (Abb. 1 b) betrug 9,3 pro mm^2 (SD 2,4 pro mm^2 ; N=5). Der Mittelwert der neutrophilen Granulozyten aus der Rauchergruppe betrug 13 pro mm^2 (SD 1,5

pro mm²; N=6). Vergleichend stellte sich dabei im Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen heraus.

Latex-Beads Der Mittelwert der freien Latex-Partikel (♣ **Abb. 1 c**) der Kontrollgruppe wurde mit 5,8 pro mm² (SD 3,9 pro mm²; N=5) quantifiziert. Der Mittelwert der Latex-Beads aus der Rauchergruppe betrug 1,2 pro mm² (SD 1,12 pro mm², N=6). Es konnte kein signifikanter Unterschied bestimmt werden.

Konglomerate Der Mittelwert der Konglomerate (♣ **Abb. 1 d**) der Kontrollgruppe wurde mit 0,72 pro mm² (SD 0,81 pro mm², N=5) quantifiziert. Der Mittelwert der Konglomerate aus der Rauchergruppe betrug 1,25 pro mm² (SD 0,88 pro mm²; N=6).

Diskussion

Der Einfluss von Tabakrauch auf die Lunge kann zu erheblichen gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen. Verantwortlich hierfür scheinen die in der Literatur bereits beschriebenen Veränderungen von Entzündungsparametern durch den chronischen Einfluss von Tabakrauch auf die Lunge zu sein. So ist bekannt, dass die im Tabakrauch enthaltenen Inhaltsstoffe zu einer Schädigung des angeborenen und erworbenen Immunsystems führen [27,28]. Ein Anstieg der Alveolarmakrophagen, bedingt durch die veränderten Bedingungen, ist die Folge.

Durch reduzierte Interleukin-1-Freisetzung sind die Alveolarmakrophagen jedoch gehemmt und können weniger pathogene Erreger phagozytieren. Häufige Lungeninfektionen sind die Folge von chronischem Rauchen. Weitere Folgen können die Entstehung einer COPD und ein damit verbundenes Emphysem sein sowie eine veränderte Angiogenese [29].

Die Untersuchung dieser Vorgänge, ausgelöst durch Tabakrauch, konnten bislang nur an In-vitro-Modellen untersucht werden.

Das hier vorgestellte Kurzzeitmodell der Berauchung ist etabliert und ermöglicht durch die Kombination der ebenfalls etablierten Intravitalmikroskopie der Mauslunge die Beobachtung von Alveolarmakrophagen nahe der Lungenoberfläche [30]. Durch eingesetzte fluoreszenzmarkierte Partikel können Alveolarmakrophagen sowie neutrophile Granulozyten markiert und beobachtet werden.

Der akute Einfluss von Tabakrauch führte zu einem signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten. Dies ist vergleichbar mit bisherigen Studien [26]. Eine signifikante Veränderung der Alveolarmakrophagenzahl wurde nicht festgestellt. Weiterhin konnte im Gegensatz zur Literatur [16,17] keine Aktivitätsminderung bezüglich der Phagozytose festgestellt werden. Tendenziell führte der akute Einfluss von Tabakrauch sogar zu einer verstärkten Phagozytose. Dies zeigte eine tendenziell verringerte Anzahl freier Latex-Beads in der Rauchgruppe. Verantwortlich hierfür könnte das im Rauch enthaltene Lipopolysaccharid (LPS) sein, das zu einer Aktivierung der Phagozyten über den Toll-like-Rezeptor-4 führt. Lipopolysaccharid, u.a. Bestandteil von gramnegativen Bakterien und auch im Tabakrauch enthalten, ist ein starker inflammatorischer Reiz. Dieser Reiz aktiviert das körpereigene LPS-bindende Protein (LBP) und bildet einen Komplex mit LPS.

Der neu entstandene Komplex erhöht die Affinität für den CD-14-Rezeptor auf Makrophagen, eine verstärkte Phagozytose ist die Folge [31].

Bisherige Untersuchungen zur Aktivität der Alveolarmakrophagen durch Einfluss von Tabakrauch erfolgten an In-vitro-Modellen.

Maity et al. [25] kolonisierte Peritonealmakrophagen und versetzte diese mit wässrigem Zigarettenrauchextrakt. Die anschließend mit *Leishmania donovani* inokulierten Makrophagen zeigten in diesem In-vitro-Modell eine Abnahme der Parasitenlast. Verantwortlich hierfür scheint eine Aktivitätserhöhung der Peritonealmakrophagen, ausgelöst durch die im Zigarettenrauchextrakt enthaltenen Substanzen, zu sein.

Harris et al. [32] hingegen nutzte Alveolarmakrophagen aus BALs. Diese wurden kolonisiert und mit Tabakrauchextrakt versetzt sowie mit Bakterien vom Stamm *Staphylococcus albus* infiziert. Zwischen der dem Tabakrauchextrakt ausgesetzten Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe, die keinem Tabakrauch ausgesetzt wurde, konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Phagozytose festgestellt werden.

Diese In-vitro-Modelle lieferten vergleichbare Ergebnisse bezüglich einer Aktivitätserhöhung der Phagozytose von Alveolarmakrophagen auf angebotene pathogene Erreger.

Eine weitere Möglichkeit, die sich häufiger Anwendung erfreut, ist die PCLS (Precision Cut Lung Slices). Diese In-vitro-Technik hat den Vorteil, dass humanes Lungengewebe zur Untersuchung zur Verfügung steht. Von Nachteil ist sicherlich die fehlende Perfusion bei diesen Modellen, sodass kein physiologischer Zustand untersucht werden kann. Nutzen findet dieses Modell bei der Untersuchung von viralen Infektionen in der humanen Lunge [33,34].

Das hier vorgestellte Kurzzeitrauchmodell ermöglicht die Untersuchung der Mauslunge bei vorhandener Perfusion. Nicht nur die Kurzzeitberauchung der Lunge, sondern auch Modelle für chronische Exposition mit Rauch, die deutlich schwieriger sind, können unter Verwendung des Modells durchgeführt werden.

Dieses Modell kann in weiteren Versuchen wichtige Hinweise zur Aktivität von Alveolarmakrophagen bei chronischer Tabakrauchexposition liefern und dadurch neue Einblicke in die pneumologische Grundlagenforschung geben.

Weiterhin könnten durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Bakterien Infektionen *in vivo* untersucht werden.

Interessenkonflikt

Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- 1 Prevot G, Plat G, Mazieres J. [COPD and lung cancer: epidemiological and biological links]. *Rev Mal Respir* 2012; 29: 545–556
- 2 Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990–2020. *Nat Med* 1998; 4: 1241–1243
- 3 Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 269–280
- 4 Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol* 2001; 14: 767–790
- 5 Smith CJ, Perfetti TA, Garg R et al. Percutaneous penetration enhancers in cigarette mainstream smoke. *Food Chem Toxicol* 2004; 42: 9–15
- 6 Gan WQ, Man SPF, Senthilselvan A et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systemic review and a metaanalysis. 2004; 59: 574–580
- 7 Blusse van Oud Albas A, Van der Linden-Schrever B, van Furth R. Origin and kinetics of pulmonary macrophages during inflammatory reaction induced by intra-alveolar administration of aerosolized heat-killed BCG. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 276–281
- 8 Mehta H, Nazzal K, Sadikot RT. Cigarette smoking and innate immunity. *Inflamm Res* 2008; 57: 497–503
- 9 Doyle I, Ratcliffe M, Walding A et al. Differential gene expression analysis in human monocyte-derived macrophages: impact of cigarette smoke on host defence. *Mol Immunol* 2010; 47: 1058–1065

- 10 *Retamales I, Elliott WM, Meshi B* et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 469–473
- 11 *Barnes PJ*. Alveolar Macrophages as orchestrators of COPD. *J COPD* 2004; 1: 59–70
- 12 *Shapiro SD*. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: S29–S32
- 13 *Fadok VA, Bratton DL, Rose DM* et al. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000; 405: 85–90
- 14 *Russell RE, Thorley A, Culpitt SV* et al. Alveolar macrophages-mediated elastolysis: the role of matrix metalloproteinases, cysteine and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 283: L867–L873
- 15 *Punturieri A, Filippov S, Allen E* et al. Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J Exp Med* 2000; 192: 789–800
- 16 *Ahn C, Mulligan P, Salcido RS*. Smoking – the bane of wound healing: biomedical interventions and social influences. *Adv Skin Wound Care* 2008; 21: 227–236
- 17 *Guo S, Dipietro LA*. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010; 89: 219–229
- 18 *Piao WH, Campagnolo D, Dayao C* et al. Nicotine and inflammatory neurological disorders. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30: 715–722
- 19 *Murin S, Bilello KS*. Respiratory tract infections: another reason not to smoke. *Cleve Clin J Med* 2005; 72: 916–920
- 20 *Arcavi L, Benowitz NL*. Cigarette smoking and infection. *Arch Intern Med* 2004; 164: 2206–2216
- 21 *Linder JA, Sim I*. Antibiotic treatment of acute bronchitis in smokers: a systematic review. *J Gen Intern Med* 2002; 17: 230–234
- 22 *Straus WL, Plouffe JF, File TM* et al. Risk factors for domestic acquisition of legionnaires disease. Ohio legionnaires Disease Group. *Arch Intern Med* 1996; 156: 1685–1692
- 23 *Shea JW, Huber GL, Holmes L* et al. The effect of experimental tobacco smoke inhalation on in vitro alveolar macrophage bactericidal function. *J Lab Clin Med* 1978; 92: 270–282
- 24 *McMaster SK, Paul-Clark MJ, Walters M* et al. Cigarette smoke inhibits macrophage sensing of Gram-negative bacteria and lipopolysaccharide: relative roles of nicotine and oxidant stress. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 536–543
- 25 *Maity PC, Bhattacharjee S, Majumdar S* et al. Potentiation by cigarette smoke of macrophage function against *Leishmania donovani* infection. *Inflamm Res* 2009; 58: 22–29
- 26 *Stämpfli MR, Anderson GP*. How cigarette smoke skews response to promote infection lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 377–384
- 27 *Sopori M*. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 372–377
- 28 *Thatcher TH, Benson RP, Phipps RP* et al. High-dose but not low-dose mainstream cigarette smoke suppresses allergic airway inflammation by inhibiting T cell function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295: L412–L421
- 29 *Scott DA, Singer DL*. Suppression of overt gingival inflammation in tobacco smokers – clinical and mechanistic considerations. *Int J Dent Hyg* 2004; 2: 104–110
- 30 *Tschernig T, Veith NT, Schramm R* et al. Direct visualisation of micro-particles in the living lung. 2012: eingereicht
- 31 *Dziarski R* et al. Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *J Biol Chem* 1998; 15: 8680–8690
- 32 *Harris JO, Swenson EW, Johnson JE 3rd*. Human alveolar macrophages: comparison of phagocytic ability, glucose utilization, and ultrastructure in smokers and nonsmokers. *J Clin Invest* 1970; 49: 2086–2096
- 33 *Marquardt A, Halle S, Seckert CK* et al. Single cell detection of latent cytomegalovirus reactivation in host tissue. *J Gen Virol* 2011; 92: 1279–1291
- 34 *Bauer CM, Zavitz CC, Botelho FM* et al. Treating viral exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: insights from a mouse model of cigarette smoke and H1N1 influenza infection. *PLoS One* 2010; 5: e13251