

**Verbesserung der biochemischen und biophysikalischen
Surfactanteigenschaften durch transbronchiale Surfactanttherapie beim ARDS**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
des Universitätsklinikums Giessen**

**vorgelegt von Jennifer Harodt
aus Lich**

Giessen 2003

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
Leiter: Prof. Dr. W. Seeger
Universitätsklinikum Giessen**

**Gutachter: Prof. Dr. Seeger
Gutachter: Prof. Dr. Lindemann**

Tag der Disputation: 07.05.2003

1. EINLEITUNG	5
1.1. DAS PULMONALE SURFACTANTSYSTEM.....	5
1.1.1. Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants	5
1.1.2. Surfactantmetabolismus	7
1.1.3. Funktionen des pulmonalen Surfactant.....	8
1.2.1. IRDS (Infant Respiratory Distress Syndrome)	11
1.2.2. ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrome).....	12
2. FRAGESTELLUNG	21
3. MATERIALIEN UND METHODEN	23
3.1. GERÄTE UND MATERIALIEN.....	23
3.2. SUBSTANZEN.....	25
3.3. METHODEN	28
3.3.1. Patientenkollektive	28
3.3.2. Therapeutische Aspekte des ARDS Kollektives.....	30
3.4. DIE BRONCHOALVEOLÄRE LAVAGE (BAL)	32
3.4.1. Entstehung und Indikationsstellung der BAL	32
3.4.2. Durchführung und Technik der BAL.....	32
3.5. SCHEMATISCHER ABLAUF DER PROBENVERARBEITUNG	34
3.6. TRANSBRONCHIALE SURFACTANTAPPLIKATION	35
3.7. BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DES SURFACTANT	35
3.7.1. Bestimmung des Phospholipidgehaltes	36
3.7.2. Bestimmung des Proteingehalts	36
3.7.3. Berechnung des Phospholipid-Protein-Quotienten (PPQ)	36
3.7.4. Analyse der Phospholipidklassen (PL-Profil)	37
3.7.5. Fettsäureprofil von Phosphatidylcholin [%]	38
3.7.6. SP-B Elisa.....	38
3.7.7. SP-A Elisa.....	39
3.8. BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG DES SURFACTANT	41
3.8.1. Probenaufbereitung	41
3.8.2. Pulsating Bubble Surfactometer.....	42
3.9. BAL-ZYTOLOGIE.....	44
3.10. STATISTIK.....	44
4. ERGEBNISSE.....	45
4.1. BASISDATEN DES ARDS KOLLEKTIVS: ZELLBILD, PROTEINGEHALT	45

Inhaltsverzeichnis

4.2. ERGEBNISSE DER BIOCHEMISCHEN UNTERSUCHUNGEN DES SURFACTANTSYSTEMS	47
4.2.1. Phospholipidgehalt (PL-Gehalt) in der BAL	47
4.2.2. Phospholipid-Protein-Quotient (PPQ) in der BAL	47
4.2.3. Phospholipid-Profil	50
4.2.4. Fettsäureprofil	51
4.2.5. Apoprotein-Gehalt in der BAL.....	52
4.2.6. Relativer Anteil der <i>large surfactant aggregates</i> (LSA)	54
4.3. ERGEBNISSE DER BIOPHYSIKALISCHEN UNTERSUCHUNGEN	56
4.3.1. Oberflächenaktivität in Abwesenheit von Plasma-Proteinen	56
4.3.2. Biophysikalische Eigenschaften in Gegenwart der BAL-Proteinen.....	59
4.4. KLINISCHE PARAMETER	62
Oxygenierungsquotient ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$).....	62
5. DISKUSSION	64
5.1. Veränderungen der Oberflächenaktivität bei ARDS Patienten	64
5.2. Biochemische Veränderungen der Surfactanteigenschaften vor Surfactanttherapie	65
5.3. Surfactantinhibition	66
5.4. Effekte einer Surfactantapplikation auf den Gasaustausch	67
5.5. Einfluß einer Surfactantapplikation auf die Surfactantzusammensetzung ..	68
5.6. Surfactantapplikation – Veränderungen der Oberflächenspannung	69
5.7. Mögliche Ursachen einer unvollständigen Normalisierung der biochemischen und biophysikalischen Surfactanteigenschaften nach Therapie	71
5.8. Perspektiven der Surfactanttherapie	72
6. ZUSAMMENFASSUNG	75
7. LITERATURVERZEICHNIS	77
8. DANKSAGUNG.....	92
9. LEBENSLAUF	93

1. EINLEITUNG

1.1. DAS PULMONALE SURFACTANTSYSTEM

Das pulmonale Surfactantsystem der Säugetiere ist von größter Bedeutung und Notwendigkeit für den physiologischen Ablauf der alveolären Ventilation und den Gasaustausch. Surfactant reduziert die alveoläre Oberflächenspannung und ermöglicht somit die Atmung bei physiologischen transpulmonalen Druckverhältnissen. Dadurch ist eine Stabilisierung der Alveolen während der Atemexkursionen, vor allem während der Endexpiration, gegeben. Surfactant wirkt einem Kollaps und somit dem Verlust von Gasaustauschfläche entgegen. Bereits im Jahre 1929 vermutete K. von NEERGARD [1] die Präsenz eines die Oberflächenspannung-reduzierenden Faktors in der Lunge. Jedoch erst in jüngerer Zeit erlangte man nicht nur Erkenntnisse über Zusammensetzung, Metabolismus, Funktion und Pathophysiologie des Surfactants, sondern auch über dessen immunregulatorischen Funktionen bei der alveolären Infektabwehr.

Für die vorliegende Arbeit sind im Besonderen die biochemischen und funktionellen Aspekte des pulmonalen Surfactantsystems von Interesse.

1.1.1. Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants

Der zellfreie Überstand der bronchoalveolären Lavage (BAL) ist das wichtigste Ausgangsmaterial einer Reihe biochemischer und biophysikalischer Untersuchungen. Auf der Grundlage standardisierter Methoden zur Isolierung des Surfactant wird sowohl die Analyse der Zusammensetzung als auch die Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften des pulmonalen Surfactant [2] ermöglicht. Hauptbestandteil des Surfactants sind zu etwa 90% Lipide (im wesentlichen Phospholipide) und zu etwa 10% Proteine, von denen wiederum die Hälfte den surfactantspezifischen Apoproteinen SP-A, SP-B, SP-C und SP-D zuzuordnen ist [2, 3, 4, 5, 6, 7].

-Lipide

Wie bereits oben genannt, bilden die Lipide mit ca. 85-90% den Hauptanteil der Surfactanttrockenmasse. Innerhalb der Lipidfraktion repräsentieren die Phospholipide mit 80-90 % die wichtigste Untergruppe. 10-20 % der Lipidfraktion sind

Einleitung

Neutralfette (vorwiegend Cholesterin). Die Surfactantphospholipide werden ausschließlich in den Typ-II-Alveolarzellen synthetisiert [8]. Auch die Phospholipide können in weitere Phospholipidklassen aufgegliedert werden. Hierbei stellt mit 70-80% das Phosphatidylcholin (PC), zusammen mit dem anteilig geringeren Phosphatidylglycerol (PG, ca. 10 %), die Hauptfraktion der Phospholipide dar. In quantitativ deutlich untergeordnetem Umfang lassen sich des weiteren Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI) und Sphingomyelin (SPH) extrahieren [3, 4, 5, 6, 7, 9].

PC ist überwiegend (~ 90%) mit gesättigten Fettsäuren substituiert. Unter diesen fällt weiterhin ein sehr hoher relativer Anteil an Palmitinsäure (~ 80%) sowie ein hoher Dipalmitoylierungsgrad (~50%) auf.

-Proteine

Die Proteinfraktion stellt ca. 10% der Surfactanttrockenmasse dar. 50% dieser Fraktion werden von den vier bekannten, spezifischen Surfactantproteinen SP-A (35 kDa), SP-B (7 kDa) , SP-C (5 kDa) und SP-D (43 kDa) repräsentiert [10, 11, 12, 13, 14]. Die restlichen 50 % stellen unspezifische Plasmaproteine dar. Bezogen auf die Phospholipide findet sich anteilig 3-4 % SP-A , jeweils 2 % SP-B und SP-C und 0,1-0,3 % SP-D in der Aufgliederung der Gesamtsurfactanttrockenmasse.

Seit einiger Zeit weiß man, daß den niedermolekularen Surfactantapoproteinen SP-B und SP-C eine entscheidende Rolle in Bezug auf die oberflächenspannungsreduzierenden Eigenschaften von Phospholipiden zukommt. Die Verstärkung dieser, die Oberflächenspannung herabsetzenden, Eigenschaft der Phospholipide konnte in mehreren experimentellen Studien nachgewiesen werden [15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]. Für SP-B vermutet man eine membranstabilisierende Wirkung, vor allem bei Filmkompression, auf der Basis elektrostatischer Wechselwirkungen (positiv geladene Regionen von SP-B mit hydrophilen polaren Kopfgruppen der negativ geladenen Phospholipide) [24, 25, 26]. SP-C fördert die Adsorptionsfähigkeit der Phospholipide und ist einem Anker gleich in den Grenzflächenfilm integriert [27, 28, 29]. SP-A hat in geringem Umfang ebenfalls adsorptionsfördernde Eigenschaften, die Hauptaufgabe dieses Apoproteins besteht möglicherweise jedoch in einer Beeinflussung der Surfactant-Homöostase [17, 18, 30, 31] sowie in immunregulatorischen Eigenschaften (siehe unten). SP-A bindet DPPC, fördert die rezeptorvermittelte Wiederaufnahme der Phospholipide in die Typ-II-Zellen und hemmt die de novo Synthese sowie die Sekretion von Surfactant aus

diesen Zellen [32, 33, 34]. Für SP-D ist keine Beeinflussung der Oberflächenaktivität, wohl aber ein massiver Einfluß auf den Surfactant Metabolismus beschrieben.

1.1.2. Surfactantmetabolismus

In der Typ-II-Zelle der Alveolen werden Phospholipide und Apoproteine nach Aufnahme der Vorstufen (insbesondere Cholin und Fettsäuren) aus der Zirkulation im endoplasmatischen Retikulum (rauhes ER) synthetisiert [35, 36, 37, 38] und gelangen anschließend vom Golgi-Apparat in Form von kleinen Vesikeln zu den zwiebelschalenförmigen Phospholipid-Bilayern, den sogenannten Lamellarkörperchen („lamellar bodies“; 100-150/ Zelle). Hier fügen sich die Phospholipide mit den dann gereiften (prozessierten) Apoproteinen endgültig zusammen [39]. Die Lamellarkörperchen stellen also die intrazelluläre Speicherform des Surfactant dar. Die Sekretion erfolgt durch Exocytose. Extrazellulär bildet sich dann das sogenannte tubuläre Myelin („tubular myelin“), wahrscheinlich durch Änderung der Kalziumkonzentration, aus. Tubuläres Myelin ist biophysikalisch hochaktiv und gilt als Präkursorfraktion des Grenzflächenfilms [40].

Surfactant aus bronchoalveolärer Lavage (BAL) kann aufgrund seiner Dichte in ultraschwere, schwere und leichte Fraktionen getrennt werden. Die ultraschweren und schweren Fraktionen (d.h. Lamellarkörperchen, tubuläres Myelin und multilamelläre Vesikel) werden in ihrer Gesamtheit auch als sogenannte „große Surfactant-Aggregate“ zusammengefaßt. Alleinig diese Fraktion besitzt die Fähigkeit die volle biophysikalische Aktivität zu entfalten [41, 42, 43]. Die leichte Fraktion des Surfactantmaterials, auch als „kleine Surfactant-Aggregate“ bezeichnet, stellt offensichtlich das Abbauprodukt des Surfactants vor Wiederaufnahme in die Typ-II-Zellen dar und besteht überwiegend aus kleinen unilamellären Vesikeln.

Die atemabhängige Reduktion der Oberflächenspannung an der alveolären Grenzfläche wird durch ca. 60-80 % des pulmonalen Sufactantpools erzielt. Der Abbau und die Wiederaufnahme des Surfactantmaterials (durch Endocytose) in die Typ-II-Zellen (\approx 70-90%) geschieht unter dem Einfluß von SP-A und SP-D. Abbau und Wiederaufnahme stehen im Gleichgewicht zur Produktion und werden auch als „balancierte Clearance“ bezeichnet [4, 6, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50]. Als weitere Eliminationswege des Surfactants steht der Abbau durch Alveolarmakrophagen (\approx 10-15%) [50] und zu einem sehr geringen Anteil der Abtransport entlang der Atemwege (\approx 2-3%) zur Verfügung [51]. Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein ständiges Gleichgewicht durch kontinuierliches Entfernen und Erneuern des

Einleitung

oberflächenaktiven Materials an der alveolären Grenzschicht. Die Vorstufe des Surfactants, das tubuläre Myelin und das Surfactantapoproteine SP-A und SP-B stellen unter gleichzeitiger Präsenz die wichtigen Faktoren in Bezug auf die oberflächenspannungsreduzierende Potenz des Surfactantsystems dar [52, 53, 54].

1.1.3. Funktionen des pulmonalen Surfactant

Das pulmonale Surfactantsystem ist wesentlich verantwortlich für einen physiologischen Ablauf der Atmung. Zusätzlich zu den oberflächenaktiven Eigenschaften sind neuerdings auch immunregulatorische Wirkungen des Surfactants bekannt geworden und diese sollen im Folgenden näher erläutert werden.

-Reduktion der Oberflächenspannung

Für den physiologischen Ablauf der Atmung benötigt der Säuger eine Absenkung der alveolären Oberflächenspannung auf Werte von annähernd 0 mN/m in endexpiratorischer Atemstellung. Nur so kann der sonst unweigerlich eintretende Alveolarkollaps verhindert und auch die Stabilität mehrerer, unterschiedlich großer und kommunizierender, Lungenbläschen gewährleistet werden. Dies wird durch ein komplexes Zusammenwirken der Phospholipide und der hydrophoben Apoproteine des Surfactants erzielt [19, 21, 22, 23, 29, 55, 56, 57]. Phospholipide weisen einen amphiphilen Charakter auf und adsorbieren an die alveoläre Luft-/Wasser-Grenzfläche mit Ausrichtung der hydrophoben Fettsäurereste zur Gasphase und der hydrophilen Kopfgruppen zur wässrigen Phase hin. Unter statischen Bedingungen erzielen Phospholipidgemische in Verbindung mit den Apoproteinen Oberflächenspannungswerte von etwa 25 mN/m (Aqua dest. etwa 70 mN/m) [13, 58]. Eine weitere Reduktion der Oberflächenspannung kann durch laterale Kompression des Oberflächenfilmes in Abhängigkeit vom Kompressionsgrad der Grenzfläche erreicht werden. In vitro können so mit natürlichem Surfactantmaterial wie auch mit synthetischen Phospholipid-Apoproteingemischen (mit SP-B und/oder SP-C) unter Kompression Oberflächenspannungswerte von annähernd 0 mN/m erreicht werden. In tierexperimentellen Studien konnten diese niedrigen Werte der Oberflächenspannung in der endexpiratorischen Atemphase als physiologische Werte beobachtet werden [59].

-Gasaustausch

Nach dem La Place'schen Gesetz ($\Delta p = 2 \times \gamma / r$), welches für Alveolen Gültigkeit besitzt, würde im Falle einer Surfactant-freien, rein wässrigen alveolären Hypophase eine Verkleinerung des Alveolenradius bei der Atmung mit einem Anstieg der Oberflächenspannung und somit einem konsekutiven Alveolenkollaps einhergehen. In Gegenwart von Surfactant erfolgt hingegen bei Expiration eine Absenkung der Oberflächenspannung und dadurch eine Stabilisierung der Alveole. Hierdurch ist auch die Koexistenz zweier unterschiedlich großer und miteinander kommunizierender Alveolen gewährleistet. Es wird evident, daß ein hocheffizienter Gasaustausch nur in Gegenwart eines funktionstüchtigen Surfactantsystems erzielt werden kann. Dies konnte in tierexperimentellen Studien durch Anhebung der alveolären Oberflächenspannung durch Applikation von oberflächenfilmzerstörenden Detergenzien [60] oder durch repetitive BAL zur Surfactantdepletion [61] sowie in klinischen Untersuchungen und Studien bei Surfactantmangel unreifer Frühgeborener (Verbesserung des Gasaustausches durch transbronchiale Applikation von Surfactant) [62, 63, 64] verifiziert werden.

-Steigerung der Compliance

Die oben formulierten Aussagen zur Absenkung der alveolären Oberflächenspannung durch Surfactant und der im La Place'schen Gesetz beschriebene Zusammenhang zwischen Radius, Oberflächenspannung und Druck verdeutlicht eine weitere wichtige Rolle des Surfactantsystems, nämlich die Steigerung der Lungendehnbarkeit bei physiologischem, transthorakalen Druckverhältnissen. Daraus folgend müßten zu Beginn der Inspiration bei einer rein wässrigen Hypophase extrem hohe Drücke zur Entfaltung der Lunge aufgewendet werden. Schon im Jahre 1929 erkannte Kurt von Neergard [1] den Stellenwert der alveolären Oberflächenspannung für die Druck-Volumen-Beziehung. In experimentellen Untersuchungen isolierte er Lungen und blähte diese wahlweise mit Luft oder unter Ausschaltung der Grenzfläche mit Kochsalzlösung. Sein damals erhobener Befund, daß nämlich die Ausschaltung der Luft/Wasser-Grenzfläche zu einer Steigerung der Dehnbarkeit führte, war der Ausgangspunkt seiner Überlegungen zur Präsenz eines oberflächenaktiven Faktors in der Lunge. Eine Surfactant-bedingte Steigerung der Compliance konnte in jüngeren tierexperimentellen [41, 65, 66, 67, 68, 69, 70] wie auch klinischen Studien beim IRDS dargestellt werden.

-Antiödematöse Wirkung

Die Erhaltung der physiologischen Druckverhältnisse der einzelnen Lungenkompartimente (vaskulär, interstitiell, alveolär) resultiert aus dem Vorhandensein von Surfactant an der alveolären Grenzschicht (Gesetz nach Starling). Ein alveolärer Surfactantmangel oder Surfactantinaktivierung hat eine erhöhte Oberflächenspannung in den Alveolen zur Folge. Dies führt konsekutiv zum Absinken des interstitiellen (perivaskulären) Druckes und begünstigt somit den Flüssigkeitsflux in das alveoläre Kompartiment und somit zur Ausbildung oder Verstärkung eines alveolären Lungenödems [60, 71, 72, 73].

-Immunregulatorische Funktion

Obwohl derzeit absolut fragmentarisch, häufen sich in jüngster Zeit Berichte über immunmodulierende Funktionen des pulmonalen Surfactantsystems. So wurde z.B. für das SP-A eine Steigerung der Phagocytose von *Staphylococcus aureus* [74] und Herpesviren [75] beschrieben. Darüberhinaus ist für SP-A und SP-D eine Funktion als Opsonin, z.B. unter anderem bei *Pneumocystis carinii* [76] dokumentiert. Die Lipidfraktion des Surfactants scheint im Gegensatz zu den hydrophilen Apoproteinen, eher eine Suppression inflammatorischer Prozesse [77] zu bewirken, die zu einer Herabsetzung von Chemotaxis, Phagozytose und TNF-Sekretion führt [78, 79, 80, 81, 82]. Interessanterweise konnte in-vitro eine direkte Zytolyse einiger Kokken-Stämme durch freie Fettsäuren des Surfactants ausgelöst werden [83].

1.2. PATHOPHYSIOLOGIE UND -BIOCHEMIE DES SURFACTANTSYSTEMS

1.2.1. IRDS (Infant Respiratory Distress Syndrome)

Das Atemnotsyndrom des Kindes (IRDS) ist wesentlich länger bekannt als das des Erwachsenen. Auslösend für die Pathogenese dieses Syndroms sind die Mekoniumaspiration, eine verzögerte Fruchtwasserelimination, Zwerchfellparese (über eine Plexuslähmung im Segment C4) oder Zwerchfellhernie sowie vor allem der Surfactantmangel infolge einer fetalen Lungenunreife (Geburt < 28. Schwangerschaftswoche) [84, 85, 86, 87, 88, 89].

Hierbei bedingt der Mangel an Surfactant über die Erhöhung der alveolären Oberflächenspannung die fehlende Entfaltung der Lunge, wie auch einen vermehrten Flüssigkeits- und auch Proteinflux in das alveoläre Kompartiment [71, 90, 91, 92]. Nachdem Plasmaproteine, vor allem Fibrinogen und Fibrin, ausgeprägte surfactantinhäbitorische Kapazität besitzen, resultiert aus diesem plasmaproteinreichen Exsudat eine weitere Schädigung des Surfactant. Die Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie, mit ihren irreversiblen fibrotischen Umbauprozessen, wird durch die intraalveoläre Fibrinbildung („hyaline Membran“-Bildung wegen Fibrinexsudation und gleichzeitigem Anstieg der thromboplastischen Aktivität) ermöglicht und sogar begünstigt. Aus dem gleichzeitigen Vorliegen von atelektatischen und überblähten Lungenarealen begründet sich ein ausgeprägter intrapulmonaler Rechts-Links-Shunt, der konsekutiv zu einem erheblichen Abfall des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes im Blut führt [84].

In der Pränataldiagnostik lässt sich aufgrund des kontinuierlichen Flüssigkeitsaustausches der Amnionhöhle mit dem alveolären Kompartiment des Feten eine Bestimmung von Surfactantkomponenten (Lecithin, Lecithin-Sphingomyelin-Quotient) in der Amnionflüssigkeit durchführen. Anhand dieses Lecithin-Sphingomyelin-Quotienten lässt sich die Lungenreife des Feten abschätzen. Um eine Steigerung der fetalen Surfactantsynthese und -sekretion zu erzielen, sind maternale intramuskuläre Glukokortikoidgaben bei drohender Frühgeburt zur Prävention eines IRDS bereits seit längerer Zeit ein etabliertes Therapieprinzip [84].

Klinische Zeichen des IRDS treten unmittelbar, bis einige Stunden postnatal, in Form von Dys- bzw. Tachypnoe, inspirationssynchronen interkostalen Hauteinziehungen und einer auskultatorischen Abschwächung des Atemgeräusches auf. Im weiteren Verlauf entwickelt sich neben einer respiratorischen

Einleitung

Globalinsuffizienz die Entgleisung des Säure-Basenhaushaltes mit kombinierter respiratorischer und metabolische Azidose. Radiologisch kommt es zu einer sogenannten „weiße Lunge“. Diese Symptomenkonstellation macht eine maschinelle Beatmung in diesem Stadium unumgänglich [84].

Im Therapieregime des IRDS ist die transbronchiale Surfactantapplikation, möglichst bei drohendem IRDS, mittlerweile die Therapie der Wahl. Hierdurch kann eine signifikante Verbesserung des Gasaustausches erzielt werden. Die Respiratortherapie mit dem Ziel einer ausreichenden Oxygenierung des Blutes und einer Atelektasenaufdehnung kann durch frühzeitige transbronchiale Sufactantapplikation häufig vermieden, bzw. weniger aggressiv betrieben werden. Durch die Surfactantapplikation verringert sich deutlich die Komplikationsrate des IRDS, die sich durch das beatmungsinduzierte Infektionsrisiko, die Pneumothoraxgefahr aufgrund der meist erforderlichen Überdruckbeatmung und der hohen Sauerstoffbeimischung zur Inspirationsluft (FiO_2) ergab. Seit der Einführung der Surfactanttherapie [62, 63, 64] beim IRDS konnten Mortalität (von ca. 50% ohne Surfactantapplikation auf ca. 25%) und Morbidität deutlich reduziert werden. Dementsprechend gilt der Therapieansatz einer exogenen Surfactantsubstitution als der „goldene Standard“ in der Behandlung des IRDS.

1.2.2. ARDS (A d u l t R e s p i r a t o r y D i s t r e s s s y n d r o m e)

-Definition, Ätiologie und Inzidenz

Das ARDS (acute respiratory distress syndrome) wurde erstmals 1967 von Ashbaugh [131] beschrieben. Es stellt eine akute Funktionsstörung des Gasaustausches der erwachsenen Säugerlunge (Kapillare-Interstitium-Alveole) dar, welche in der Regel mit pulmonaler Flüssigkeitseinlagerung, Veränderungen der pulmonalen Hämodynamik und Abnahme der Compliance assoziiert ist [93]. In der Pathogenese des ARDS sind keine speziellen Prädispositionen, jedoch eine Vielzahl von unterschiedlichen „Auslösern“ (s.u.), bei zuvor Lungengesunden bekannt [94, 95]. In den USA belaufen sich die Schätzungen über die Häufigkeit des ARDS im Jahre 1977 auf 150.000 Erkrankungen/Jahr mit einer Mortalität von 50-70% [96, 97, 98, 99, 100, 101], wobei in der 1992 durchgeführten klinischen Studie von Sloane et al.[99] eine signifikant höhere Mortalität für ältere Patienten (75% versus 37%) und septische Krankheitsbilder (60% versus 43%) mit terminalem „Multi-Organ-Versagen“ aufgezeigt wurde. Aufgrund der verschiedenen Kriterien, die bislang zur Definition

des ARDS [102] herangezogen wurden, schwanken die Angaben bezüglich der Inzidenz zwischen 3/100.000 und 75/100.000 [103].

Das klinisch-anamnestisch kennzeichnende Merkmal des ARDS stellt der akute Beginn der respiratorischen Insuffizienz auf dem Boden „katastrophaler auslösender Ereignisse“ dar. Die ein ARDS auslösenden pathogenetischen Ereignisse können zum einen über eine direkte Lungenparenchymaffektion oder durch eine sekundäre, indirekte Wirkung auf die Lunge, den Zustand einer vital-bedrohlichen respiratorischen Insuffizienz bewirken. Bei Persistenz bzw. Weiterwirken dieser pulmonal agierenden Substanzen kommt es zur Ausbildung einer sich selbst unterhaltenden inflammatorischen Erkrankung des Lungenparenchyms, die sich dann in der bekannten klinischen vital-bedrohlichen Symptomatik des ARDS mündet.

Primäre (direkte) Lungenparenchymaffektionen:

- Aspiration von Magensaft (Mendelson-Syndrom)
- Aspiration von Süß-/ Salzwasser (Ertrinken)
- Inhalation toxischer Gase (NO₂, Ozon, Rauchgase)
- Exposition gegenüber hohen Sauerstoffpartialdrücken
- chemische Agenzien
- Pneumonie (sog. „parapneumonisches ARDS“)

Sekundäre (indirekte) Lungenparenchymaffektionen:

- Sepsis
- Polytrauma
- Massentransfusionen
- prolongierter Schockzustand
- disseminierte intravasale Gerinnung (DIC)
- Pankreatitis
- Verbrennungen
- Lungenembolie
- Intoxikationen
- Schädel-Hirn-Trauma, intrakranielle Drucksteigerung (ICB, Ödeme,..)

Einleitung

Aufgrund der pathogenetisch unterschiedlichen Auslöser dieses Geschehens wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl an gebräuchlichen Synonyma des ARDS benutzt. Hiervon sei nur eine Auswahl der Gebräuchlichsten genannt: „septische Lunge“, „posttraumatische pulmonale Insuffizienz“, „Posttransfusionslunge“, „Schocklunge“. Aus oben aufgeführter Problematik der Heterogenität der ARDS-auslösenden Erkrankungen und der damit verbundenen unbefriedigenden Datenlage in bezug auf Inzidenz und Mortalität, beschäftigte sich die jüngste Konferenz des „American- European Consensus Committee on ARDS“ [104] mit der Problematik der einheitlichen Definition akut inflammatorischer Lungenerkrankungen. Im Vordergrund standen zum Einen die Forderung, dem akuten Beginn und Verlauf der Erkrankung begrifflich gerecht zu werden und den Terminus des ARDS in „Acute Respiratory Distress Syndrome“ abzuändern. Zum Anderen erzielte das Komitee eine Einigung bezüglich einer einheitlichen Begriffsdefinition der akut-inflammatorischen Lungenerkrankungen („acute lung injury“; ALI) und deren Übergang zum ARDS (Zitat: „Alle Patienten mit ARDS haben eine ALI, aber nicht alle Patienten mit einem ALI haben ein ARDS“). Als sensitiver Parameter zur Diskriminierung zwischen ALI und ARDS wählte man den Quotienten aus dem arteriellen Sauerstoff-Partialdruck (PaO_2) und dem Anteil der Sauerstoffbeimischung zur Inspirationsluft am Respirator (FiO_2). Die Größe des Quotienten wurde als Maßstab für die Festlegung der Diagnose einer „Acute Lung Injury“ (als Vorstufe des ARDS mit $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ mmHg, aber > 200 mmHg) oder aber eines klinisch-manifesten ARDS ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mmHg) festgelegt.

Folgende zusätzliche, definierende Bedingungen (neben dem akuten Beginn mit initialem, im Vordergrund stehendem „katastrophalem Ereignis“) zur Diagnosesicherung ALI/ARDS wurden formuliert:

- Röntgen- Thorax mit beidseitigen, ausgeprägten Infiltraten (und/ oder Zeichen einer Lungenfibrosierung („Honey-combing“) im Spät-/Endstadium des ARDS)
- pulmonaler Kapillarverschlusdruck (PcP) unter 16 mmHg zum Ausschluß eines akuten oder chronischen Linksherzversagens

Das Risiko und der Schweregrad der Ausbildung eines ARDS wird im wesentlichen durch die schädigende Potenz und die Dauer der einwirkenden Noxe

bestimmt. Eine Kombination mehrerer ätiologischer Faktoren der ARDS-Pathogenese kann die Schwere des Krankheitsbildes potenzieren und die Prognose erheblich verschlechtern. Die Sepsis zählt neben dem Polytrauma quantitativ zu den bedeutendsten Auslösern und während das Polytrauma als Auslösemechanismus zunehmend geringer wird, steigt die Frequenz septischer Krankheitsbilder als Auslöser eines ARDS. Prädisponierenden Faktoren sind bis heute nicht bekannt, obwohl bei septischer Ätiologie Patienten mit primärer oder sekundärer Immundefizienz (chronische Kortikoidtherapie, immunsuppressive Behandlung, chronisch konsumierende Grunderkrankung) ein erhöhtes Risiko des Entstehens eines ARDS aufweisen.

-Pathogenese und Pathophysiologie des ARDS

Im Gegensatz zum IRDS, welches durch einen reinen Surfactantmangel induziert ist, läßt sich beim ARDS kein einheitlicher pathogenetischer Ablauf der Krankheitsentstehung aufzeigen. Allerdings mündet trotz der Vielzahl der möglicherweise involvierten humoralen Mediatoren (Eikosanoide, Sauerstoffradikale, Proteasen, Zytokine, Plättchenaktivierender Faktor, Gerinnungs-Kaskade, Komplement-Kaskade und Kallikrein-Kinin-Kaskade) wie auch zellulären Effektoren (aktivierte Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Pneumozyten Typ II) das Geschehen in eine gemeinsame Endstrecke, die das vaskuläre, interstitielle und alveoläre Kompartiment der Lunge gleichermaßen betrifft. [94, 103, 105].

Beim ARDS finden sich charakteristische pathophysiologische Funktionsstörungen bzw -einbußen, die im Folgenden näher aufgeführt werden sollen.

-Ventilations-Perfusions-Fehlverteilung, intrapulmonaler Shunt, pulmonal-arterielle Hypertonie

Die Störung der pulmonalen Vasoregulation imponiert durch eine „unphysiologische“ Vasokonstriktion und, dadurch bedingt, eine Fehlverteilung der pulmonalen Perfusion. Zusätzlich ist zum Teil die O₂-gesteuerte, den Gasaustausch optimierende, hypoxische Vasokonstriktion (Euler-Liljestrand-Mechanismus) gestört. Aufgrund der Fehlverteilung von Ventilation und Perfusion (Mismatching) entsteht ein erheblicher pulmonaler Shuntfluß (Rechts-Links-Shunt). Prä- und postkapilläre Vasokonstriktionen bedingen eine Erhöhung des pulmonalen vaskulären Widerstandes.

-„Plasma-leakage“ und Ödembildung

Humorale und zelluläre Effektoren bewirken über die Aktivierung von Adhäsionsmolekülen an der endothelialen Oberfläche und durch Aktivierung zirkulierender Granulozyten eine Anhaftung von Granulozyten im Bereich der pulmonalen Mikrozirkulation („Rolling“ und „Sticking“). Die dann dort lokal freigesetzten Mediatoren bewirken eine Aufhebung der Schrankenfunktion. Die Kombination aus erhöhtem mikrovaskulären Druck, bedingt durch die postkapilläre Vasokonstriktion (s.o.) und gesteigerter epithelialer und endothelialer Permeabilität, führt zu einem erhöhten Flux von Flüssigkeit und Plasmaproteinen zunächst in das perivaskuläre, interstitielle, später auch in das alveoläre Kompartiment.

-Alveolärer Kollaps und Instabilität, Atelektasenbildung

ARDS-Lungen zeichnen sich in postmortem Untersuchungen dadurch aus, daß ein Großteil der Alveolen dys- bis atelektatisch imponiert und von einem proteinreichen Ödem und den sogenannten „hyalinen Membranen“ ausgekleidet ist. Diese hyalinen Membranen, letztendlich extravasal gebildetes Fibrin unter Einschluß von lipophilen Surfactantbestandteilen, Membranrümmern und Plasmakomponenten, entsteht auf dem Boden einer massiv gesteigerten thromboplastischen Aktivität des Alveolarraumes [120]; der Lunge geht somit ein erheblicher Teil ihrer Gasaustauschfläche verloren. So kommt es im Verlauf des ARDS zu einer Fehlverteilung der Ventilation, die zu den oben aufgeführten Störungen der Adaptation von Ventilation und Perfusion beiträgt [94].

-Surfactantveränderungen beim ARDS

Bislang existieren nur wenige klinische Studien zur Veränderung des Surfactantsystems beim ARDS. So konnte in vier klinischen Studien [106, 107, 108, 144] anhand von BAL-Proben neben einer Beeinträchtigung der oberflächen-spannungsreduzierenden Aktivität des Surfactants auch Veränderungen in der Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants (Phospholipid-, Apoprotein-, Fettsäureprofil) nachgewiesen werden. Hierzu zählen ein Abfall des Gesamtphospholipidgehaltes (PL), eine Erhöhung des Proteingehaltes, eine Verminderung des Phospholipid- Protein- Quotienten (PPQ), ein reduzierter Gehalt an „large surfactant aggregates“ und Veränderungen des PL-Profiles mit Reduktion des relativen Gehalts an Phosphatidylglycerol und Phosphatidylcholin und Anstieg

des relativen Gehalts an Phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin sowie einer Verminderung der Konzentration an SP-A und SP-B.

Darüber hinaus konnte in in-vitro-Ansätzen gezeigt werden, daß das Surfactantsystem unter den Prämissen des ARDS möglicherweise vielfältigen funktionellen Inaktivierungsprozessen unterliegt. Einen besonderen Stellenwert nimmt im Verlauf des ARDS die Inhibition des Surfactantmaterials durch Plasmaproteine wie Albumin, Hämoglobin und Fibrinogen [30, 89, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 121] ein. Darüber hinaus scheint die Inkorporation lipophiler Surfactantkomponenten in ein polymerisierendes Fibringerinnsel zu einer weiteren, massiven Störung der oberflächenspannungsreduzierenden Funktion des Surfactants zu führen [121]. Weitere pathogenetisch wichtige Faktoren für den Verlust der Oberflächenaktivität des Surfactants stellen die Einwirkung von Sauerstoffradikalen und aktivierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) sowie der Abbau von Surfactantkomponenten durch Proteasen (Elastase) und Phospholipasen dar [118, 119, 122, 123].

Die Störungen des pulmonalen Surfactantsystems scheinen also ursächlich an der Entstehung von Dys- und Atelektasen beteiligt zu sein. Darüber hinaus bewirkt die Erhöhung der alveolären Oberflächenspannung über die Abnahme des perivaskulären, interstitiellen Druckes und den hierdurch bedingten Anstieg des transepi-/endothelialen Flüssigkeits- und Proteinfluxes eine konsekutive, zusätzliche Störung des Surfactants.

-Stadien und Verlauf des ARDS

Nach akutem Beginn des ARDS ist der Verlauf durch verschiedene Stadien gekennzeichnet. Dem akuten Beginn mit bedrohlicher respiratorischer Insuffizienz folgt die akut exsudative Frühphase. Sie dauert einige Tage bis wenige Wochen. In dieser Phase ist eine „Restitutio ad integrum“ möglich. Der Übergang in die proliferative Spätphase des ARDS ist durch eine mesenchymale Proliferation und progrediente Fibrosierung charakterisiert. Auf dem Boden der Aktivierung von Fibroblasten entwickelt sich eine foudroyant verlaufende Lungenfibrose (häufig mit Ausbildung einer „Waben“-Lunge), deren Ursprung möglicherweise in den durch Atelektasen und fibrinöse Verklebung der Reventilation dauerhaft entzogenen Alveolarbezirken liegt [124]. Mit Eintritt in dieses Stadium sinkt die Chance einer folgenlosen Ausheilung deutlich ab. In der Regel verbleiben, im Falle eines Überlebens, ausgeprägte restriktive Ventilationsstörungen.

-Therapieregimen des ARDS

Aufgrund des komplexen pathophysiologischen Ursachenspektrums eines ARDS (primäre und sekundäre Lungenparenchymaffektionen) läßt sich kein einheitliches Therapieregime aufstellen. Kausale Therapieansätze sind bislang nicht etabliert. Allgemeines Therapieziel ist es, eine direkte Einwirkung von Noxen auf das Lungenparenchym zu unterbinden und Auslöser einer sekundären (humoral oder zellulär vermittelten) Lungenparenchymaffektion zu eliminieren [125]. Die allgemeine intensivmedizinische Basistherapie wie Applikation eines erregerspezifischen Antibiotikaregimens, parenterale/enterale Ernährung, antimykotische Prophylaxe, Ausgleich der Flüssigkeitsbilanz, ggf. Fokussanierung sowie eine optimierte Beatmungsstrategie zur Gewährleistung einer ausreichenden Oxygenierung stellen die Grundlagen der ARDS-Behandlung dar. Eine Reihe von Studien beschäftigte sich in jüngster Zeit mit antiinflammatorischen Therapiekonzepten, die kausal in das pathogenetische Geschehen eines systemisch ausgelösten ARDS eingreifen sollten. Prinzipiell existiert ein reichhaltiges theoretisch-wissenschaftliches Hintergrundwissen über das Wechselspiel der beteiligten inflammatorischen Mediatoren. Klinische Sepsisstudien, die die Gabe von Anti-LPS oder Anti-Zytokin-Immunglobulinen beinhalteten, mußten jedoch aufgrund fehlender Wirksamkeit vorzeitig abgebrochen werden. Die Gründe hierfür sind in der Komplexität der ablaufenden inflammatorischen Reaktionen und auch deren differentieller Regulierung im zeitlichen Verlauf zu suchen. Des Weiteren in der intensivmedizinischen Praxis etabliert, ohne jedoch durch klinische Studien untermauert zu sein, ist die Applikation von Heparin, um eine weitere Aktivierung/Perpetuierung der Gerinnungskaskade zu verhindern bzw. vorzubeugen.

Im Vordergrund der gegenwärtig praktizierten Therapieverfahren steht also eine symptomatische Therapie des ARDS.

Im Mittelpunkt dieser symptomatischen Therapieansätze steht die Beatmung. So werden immer wieder neue Strategien wie low-tidal-volume-Therapie, hohes PEEP-Niveau sowie die permissive Hyperkapnie diskutiert. Zielpunkt sämtlicher Strategien ist die akute Verbesserung der pulmonalen Funktionsstörung (Optimierung des Gasaustausches, Reduktion eines Shuntvolumens und Mismatches sowie Atelektasenwiedereröffnung) sowie eine Progression der Erkrankung in ein möglicherweise irreversibles Stadium der proliferativen Fibrosierung zu verhindern. Aktuelle Studien untersuchen vergleichend die Therapieoption einer non-invasiven

Beatmung (CPAP, BIPAP) versus konventioneller druck- und volumengesteuerter Beatmungsmodi bei ARDS-Patienten. Generell gilt es Volu- und Barotraumata sowie eine Hyperoxie und dadurch verbundene mögliche aggravierende Komplikationen zu vermeiden.

Ein weiterer wichtiger Faktor in der symptomatischen Therapie des ARDS ist das Flüssigkeitsregime. So kommt es beim ARDS per se durch die Permeabilitätsstörung zu einer vermehrten Flüssigkeitseinlagerung in das alveoläre Kompartiment. Da hierbei eine enge Abhängigkeit zur Höhe des kapillären Druckes besteht, ergibt sich als Therapierationale das Anstreben einer negativen Flüssigkeitsbilanz und konsekutiv damit verbesserter Gasaustauschsituation. In Praxis erfolgt dies in Form von Diuretikagabe, Hämofiltration oder Hämodialyse, jeweils unter Beachtung der Nierenfunktion.

Ein ebenfalls unabhängiger jüngerer Therapieansatz zur Behandlung eines frühen Stadiums des ARDS ist die Applikation von inhalativen Vasodilantien (NO; PGE_{1/2} [146, 147, 148]). Pathophysiologisch ist der Therapieeffekt durch eine intrapulmonal selektive Senkung des pulmonalarteriellen Druckes sowie des pulmonalvaskulären Widerstandes und somit resultierender Verbesserung der Ventilations-Perfusionsverteilung mit Abnahme des Shuntflusses und Anstieg des PaO₂ zu erklären.

Eine befriedigende Oxygenierung von ARDS-Patienten zu erzielen, stellt eine schwierige, des häufigeren auch frustrane Herausforderung an eine Therapie. Hieraus entstand die Idee der extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO). Eine Weiterentwicklung dieses Studienverfahrens stellt das IVOX-System (intravenöser Oxygenator) dar. Hierbei handelt es sich um einen intravasal (V. cava inferior) liegenden Oxygenator, der durch kontinuierliche O₂-Abgabe zu einer Oxygenierung des vorbeiströmenden Blutes und des weiteren zu einer CO₂-Elimination führt [174]. Ein Problem stellt die geringe Oberfläche des „intravasalen Gasaustauschers“ dar, so daß derzeit nur eine ca. 30%ige Verbesserung mit diesem System zu erzielen ist.

Aufgrund der hohen Mortalitätsraten einer ARDS-Erkrankung kommen auch Überlegungen zu Einfluß und Optimierung hydrostatischer Effekte (prädominant basal betonte ödematöse bzw. atelektatische Lungenbezirke) zum Tragen. Einige Zentren praktizieren so die intermittierende Bauchlagerung in Form von „kinetischen Betten“. Ob es aufgrund der Wechsellagerung zu einer signifikant verbesserten Rekrutierung minderbelüfteter Bezirke kommt, ist aufgrund fehlender Studien nicht

Einleitung

verifiziert worden, die entsprechenden Zentren berichten jedoch über positive radiologische Verlaufskontrollen.

Darüber hinaus könnte eine weitere Therapiealternative bzw. Ergänzung die transbronchiale Surfactantsubstitution darstellen [126, 127]. In Tiermodellen des ARDS gelingt durch transbronchiale Applikation ausreichender Mengen eines exogenen Surfactants eine weitreichende Wiederherstellung der Oberflächenaktivität und dementsprechend auch eine Besserung des Gasaustausches, die auf die Rekrutierung kollaptischer Lungenbezirke und – damit verbundenen – auf eine Abnahme des Shuntflusses zurückgeführt wird. Parallel hierzu konnte unter diesen Bedingungen auch eine Verbesserung der Compliance beobachtet werden. Die transbronchiale Surfactantapplikation hat in der Pädiatrie in der Behandlung des IRDS beim unreifen Frühgeborenen bereits seit Jahren den Stellenwert eines anerkannten und klinisch-praktizierten Therapiekonzeptes. Warum sollte dieser Therapieansatz nicht auch beim Erwachsenen zu einem akuten Durchbrechen des pathophysiologischen Geschehens des „akuten Atemnotsyndroms“ beitragen?

2. FRAGESTELLUNG

Trotz umfangreicher intensivmedizinischer Maßnahmen und Therapieansätze stellt das akute Atemnotsyndrom des Erwachsenen (ARDS) weiterhin ein Krankheitsgeschehen mit hoher Mortalitätsrate dar. Weitreichende Veränderungen der Surfactantzusammensetzung und -funktion sind nunmehr beschrieben. Neben den in der Vergangenheit etablierten symptomatischen und kausalen Therapieansätzen könnte die transbronchiale Surfactantapplikation einen zusätzlichen Therapiepfeiler darstellen und zu einer akuten Verbesserung der Gasaustauschsituation und somit zu einer Senkung der Mortalitätsrate führen.

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Studie biochemische und biophysikalische Untersuchungen des aus Bronchoalveolären Lavagen (BAL) gewonnenen Surfactants von Patienten mit ARDS vor und nach transbronchialer Applikation eines Kälberlungensurfactantextraktes durchgeführt.

Folgenden Fragen wurde hierbei im Detail nachgegangen:

Zeigen sich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante biochemische und biophysikalische Veränderungen des Surfactantsystems?

Kann bei den Patienten mit ARDS durch eine transbronchiale Surfactantapplikation eine Verbesserung biochemischer und biophysikalischer Surfactanteigenschaften erzielt werden?

Kann durch die Surfactantapplikation der Gasaustausch der Patienten gebessert werden?

Bewirkt eine solche transbronchiale Surfactanttherapie eine Normalisierung der lipidchemischen Zusammensetzung?

Kann auch der alveoläre Gehalt an hydrophoben Surfactantproteinen deutlich angehoben werden?

Lassen sich aus einzelnen biochemischen Veränderungen des Surfactants beim ARDS Rückschlüsse auf eine reduzierte Oberflächenaktivität ziehen?

Fragestellung

Ist bei diesen Patienten eine Proteininhibition des Surfactantsystems zu beobachten?

Wie lange halten die eventuell zu beobachtenden Verbesserungen des Surfactantsystems an?

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. GERÄTE UND MATERIALIEN

Bronchoskop (BF Type P 20 D)	Olympus Optical Co GmbH (Hamburg)
Pulsating Bubble Surfactometer	Electronetics Cooperation, Amherst (N.Y., USA)
Ultrazentrifuge	Sorvall Instruments RC5C, Du Pont (Bad Homburg)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
ELISA-Reader	SLT (Overath)
Digital Photometer 6115S	Eppendorf (Frankfurt a.M.)
Linomat Probenauftragegerät	Camag (Muttentz, Schweiz)
TLC-Scanner II	Camag (Muttentz, Schweiz)
Microtiter-Platten (Maxisorp® und Polysorp®)	Nunc (Wiesbaden)
Macrosep Konzentratoren	Filtron (Karlstein)
Silica 60 Dünnschichtplatten	Merck (Darmstadt)
Gas Chromatograph (Fractovap 2150)	Carlo Erba (Mainz)
Fettsäureesterstandards	Sigma (Deisenhofen)
Test-Combinat Harnstoff S	Boehringer (Mannheim)

Material und Methoden

Precinorm®U (Urea)
Kontrollserum

Boehringer (Mannheim)

Klinische Systeme,ACA II&III,
(BUN Harnstoff)

Du Pont de Nemours Int.SA
(Genf, Schweiz)

Mikroskop Laborlux

Leitz (Wetzlar)

Neubauer Zählkammer

Kalensee (Gießen)

3.2. SUBSTANZEN

Anti-SP-A (PE10, monoklonal von der Maus)	T. Akino (Dep. of Biochemistry, Sapporo Medical College, Sapporo, Japan) [136]
Anti-SP-B (8B5E, monoklonal von der Maus)	Y.Suzuki (Chest Disease Research Institute, Kyoto-University, Japan) [137]
SP-A (human rekombinant, 99% Reinheit)	K.P. Schäfer (Byk Gulden, Konstanz)
SP-B (human natürlich, >95% Reinheit)	aufgereinigt per LH60-Chromatographie nach Warr [138]
Bovines Serum Albumin (BSA), >99,9% Reinheit	Paesel und Lorei GmbH (Frankfurt a.M.)
Anti-Maus-IgG-Antikörper (biotinyliert, von der Ziege)	Amersham Buchler GmbH (Braunschweig)
BCA Protein Assay Reagent	Pierce (Rockford, Illinois, USA)
Meerrettich-Peroxidase markierter Avidin-Biotin-Komplex [(AB)-Komplex]	Dakopatts GmbH (Hamburg)
Tween 20 p.a.	Sigma (München)
Triton X-100 p.a.	Serva (Heidelberg)
Oxybuprocainhydrochlorid (Novesine®)	Wander Pharma GmbH (Nürnberg)
May Grünwald Lösung	Merck (Darmstadt)

Material und Methoden

(Eosin-Methylenblau-Lösung
mit > 50% Methanol)

Giensa-S Lösung
(Azur-Eosin-Lösung) Merck (Darmstadt)

ABTS p.a.
(2.2'-Azino-di-[3-ethyl-benz-
thiazolinsulfonat(6)]) Boehringer GmbH (Mannheim)

PBS (phosphat buffered saline;pH:7,4) Merck (Darmstadt)

NaCl p.a.	8g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O p.a.	2,9g
KCl p.a.	0,2g
KH ₂ PO ₄ p.a.	0,2g

ad 1000ml Aqua dest.

BSA-Puffer (pH:7,4)
PBS-Puffer angereichert mit 1%igem (wt/vol) Rinder-Albumin.

Waschpuffer (pH:7,4)
PBS-Puffer angereichert mit 0,5%igem (wt/vol) Tween 20

Substratpuffer (pH:4,2) Merck (Darmstadt)

Na-Azetat-Trihydrat p.a.	8,2g
--------------------------	------

NaH₂PO₄ x H₂O p.a. 6,9g ad 1000ml Aqua dest.

ABTS-Lösung Merck (Darmstadt)

ABTS	20mg
Substratpuffer	30ml
H ₂ O ₂ p.a.	10µl

Molybdän Blau Färbelösung

Lösung 1: 10,3 MoO₃ und 250 ml 12,5 M H₂SO₄ werden 15-30 Minuten unter Rückfluß gekocht, bis eine klargelbe Lösung entsteht.

Lösung 2: Nach Abkühlung der ersten Lösung werden 125 ml dieser Lösung mit 0,445 g Molybdat-Pulver 1 Stunde unter Rückfluß gekocht.

Nach dem Abkühlen erfolgt die Hinzugabe von Lösung 2 zum verbliebenen Volumen von Lösung 1, daraufhin Versetzen der zubereiteten Lösung mit dem doppelten Volumen Aqua dest (= 500ml) und anschließend mit konzentrierter Essigsäure bis zu einem Verhältnis Reagenz: Essigsäure von 4:1 (= 187,5ml).

Surfactantmaterial: Alveofact®

Thomae GmbH (Biberach)

Bei dem in der Studie verwendeten natürlichen Surfactantmaterial handelt es sich um 50,76 bis 60,00 mg Phospholipidfraktion aus Rinderlunge (Trockenmasse), entsprechend einem Gehalt von 66 µmol bzw. 50 mg Gesamtpospholipide, Nutralipiden sowie Anteile von SP-B und SP-C als gefriergetrocknete Substanz. Als weitere Bestandteile in der Lösungsmittelfertigspritze sind Natriumchlorid und Natriumhydrogencarbonat aufzuführen. Die Rekonstitution zur gebrauchsfertigen Lösung erfolgte unmittelbar vor Applikation durch Zuspritzen des Lösungsmittels in die Trockenampulle und unmittelbar anschließendes Schütteln der Ampulle für ca. 5 Sekunden. Anschließend wurde die Suspension 5-malig in die Spritze aufgezogen und wieder in die Injektionsampulle zurückgespritzt. Nach ca. 1-minütigem Stehen der Suspension ist diese gebrauchsfertig.

3.3. METHODEN

3.3.1. Patientenkollektive

Der Hauptteil der in die vorliegende Studie eingeschlossenen Patienten wurde auf der Intensivstation der Abteilung für Innere Medizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen rekrutiert, von der Intensivstation der Abteilung für Anästhesie der Justus-Liebig-Universität stammen zwei weitere Patienten, des weiteren ein Patient von der Universitätsklinik Essen, vier Patienten von der Universitätsklinik Berlin und ein Patient von der Universitätsklinik Freiburg. Das Studienprotokoll wurde vorab von der Giessener Ethikkommission gebilligt. In allen Fällen lag die Einwilligung der nahen Angehörigen der Patienten vor.

Insgesamt wurden 25 Patienten mit ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) im Alter von 18-70 Jahren eingeschlossen.

Kontrollgruppe

Den 25 Patienten des Studienkollektivs wurde eine Kontrollgruppe aus 20 freiwilligen, gesunden Probanden (Nichtraucher) im Alter von 20-30 Jahren gegenübergestellt, die keinerlei Anzeichen für eine kardiologische oder pneumologische Vorerkrankungen aufwiesen.

Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)

Alle Patienten dieses Kollektivs zeigten bei Studienbeginn oder wenig später das Bild einer Sepsis mit schwerer respiratorischer Insuffizienz. Beim Großteil des Patientenkollektivs kam es im weiteren Verlauf zur Ausbildung eines Multiorganversagens, welches hauptsächlich Nieren- und Leberfunktion betraf. Vor Surfactanttherapie lag der mittlere Laktatwert bei $3,2 \pm 0,6$ mmol/L.

Zur Sicherung der Diagnose wurden neben dem initialen, im Vordergrund stehenden Auslösemechanismus des ARDS folgende Zusatzbedingungen des Consensus Committee on ARDS [104] gefordert:

- Ausgeprägte, bilaterale Infiltrate über allen 4 Quadranten im Röntgenbild des Thorax
- pulmonalarterieller Verschlussdruck (PCWP) unter 18 mmHg und fehlende Zeichen des akuten oder chronischen Linksherzversagens (echokardiographisch)

- Oxygenierungsquotient ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) unter 200 mmHg (ohne Berücksichtigung des PEEP-Niveaus)

Studieneinschlusskriterien:

- ARDS nach o.g. Kriterien
- Alter zwischen 18-70 Jahren
- Murray score > 2,5
- zwingende Notwendigkeit einer Respiratortherapie

Die Einschlusskriterien mußten wenigstens für einen Zeitraum von 12 Stunden erfüllt werden.

Lung injury score (Murray)

Der Murray Score teilt die Schwere einer Lungenerkrankung (von 0 (kein Lungenschaden) bis 4 (schweres ARDS)) in drei Gruppen ein. Eine Einstufung erfolgt durch Zuordnung des entsprechenden Ausprägungsgrades von drei Kriterien. Hierzu zählen das Röntgenthoraxbild mit Anzahl der Quadrantenbeteiligung, der Hypoxämie-Score ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) und der Respiratorcompliance-Score.

Studienausschlusskriterien:

- Schwangerschaft
- akuter Myocardinfarkt
- Linksherzversagen ($\text{PCWP} > 18$ mmHg)
- Thoraxverletzung mit schwerer Lungenkontusion
- vorbestehende Lungenerkrankung (Fibrose, COLD, primäre pulmonale Hypertension, chronisch pulmonale Thrombembolien)
- Grunderkrankung mit voraussichtlich fatalem Verlauf innerhalb von 24 h
- aktuelle maligne Grunderkrankung
- Behandlung mit Immunsuppressiva und/oder Leukopenie (Leukozyten $< 1000/\mu\text{l}$)
- schweres Schädelhirntrauma und/oder hypoxischer Hirnschaden
- schwere Leberschädigung (Bilirubin > 5 mg/dl und/oder Cholinesterase < 1500 U/l)
- ARDS (Murray-Score $> 2,5$) seit mehr als 96 Stunden
- Verabreichung anderer Prüfsubstanzen zur Therapie des ARDS

3.3.2. Therapeutische Aspekte des ARDS Kollektives

Alle Patienten mußten einer invasiven Beatmungstherapie zugeführt werden. Der FiO_2 und die Beatmungsparameter einschließlich dem endexpiratorischen Druck (PEEP) wurden den individuellen Erfordernissen entsprechend gewählt. Während der Zeit der transbronchialen Surfactantapplikation sowie während der vorausgehenden sechsstündigen Baseline Periode wurden die Respiratoreinstellungen nicht verändert.

Zur Basistherapie der Patienten gehörte des weiteren die bedarfsorientierte Applikation von parenteraler Ernährung, Volumensubstitution, antibiotischer Abdeckung und der Einsatz vasoaktiver und positiv inotroper Substanzen unter Berücksichtigung der ermittelten Hämodynamik mittels Swan-Ganz-Katheter.

Bei der Mehrzahl der Patienten wurde der arterielle PaO_2 über eine Online-Messung (System von Trend; Katheter in der Arteria radialis) kontinuierlich gemessen; in allen anderen Fällen erfolgte eine diskontinuierliche PaO_2 -Bestimmung mittels arterieller Blutgasanalysen (nach Astrup).

In **Tabelle 1** sind die Basisdaten zusammengefaßt:

TABELLE 1

Ausgangsdaten (Baseline) der eingeschlossenen ARDS-Patienten

Patient	Alter/ Geschlecht	Diagnose	Murray- Score	PaO ₂ / FiO ₂ [mmHg]	Laktat [mmol/l]	Überleben	Tage bis Extubation oder Tod
1	64/M	Pneumokokken- Pneumonie; Sepsis	2,7	132	2,5	ja	14
2	28/M	Pneumonie; sept. Schock	3,3	111	2,5	ja	12
3	37/F	E.coli-Sepsis; Leberzirrhose	3,6	88	19,6	nein	5
4	33/F	sept. Schock	3,3	153	6,7	nein	14
5	18/F	Toxic Shock Synd., Sepsis	3,7	81	18,2	ja	11
6	32/F	Staphylokokken- Sepsis;	3,0	96	3,2	nein	9
7	37/M	Pneumonie; Sepsis Thrombocytop.	3,0	124	5,4	nein	21
8	20/F	sept. Schock	3,6	101	2,1	nein	21
9	18/F	Miliartuberkulose Sepsis	3,3	49	9,1	ja	20
10	35/F	Pneumonie; Sepsis	3,0	87	4,4	ja	7
11	56/M	Pneumo.-car.- Pneumonie, Sepsis	3,0	220	2,8	nein	23
12	69/M	Pneumo.-car.- Pneumonie; Sepsis	3,0	150	2,3	nein	15
13	60/M	Pneumonie; Sepsis	3,3	104	1,6	ja	24
14	29/M	Pneumonie; Sepsis	2,7	77	2,9	ja	10
15	38/M	Aspir.-Pneum. Sepsis	2,7	146	1,5	ja	24
16	42/M	Pneumonie; Sepsis	3,0	230	1,3	ja	9
17	57/M	Sepsis; Thrombocytop.	3,7	74	1,4	nein	13
18	70/M	Pneumonie, Sepsis	3,0	98	1,9	ja	21
19	41/M	ARDS, Sepsis	3,5	144	1,4	nein	4
20	41/M	Polytrauma, Sepsis	3,5	138	1,5	nein	11
21	28/F	Pneumonie, Sepsis	3,5	105	3,1	ja	15
22	50/F	Aortenklappen- Ersatz, Sepsis	3,3	89	1,3	ja	21
23	30/F	Streptokokken- Pneumonie, Sepsis	2,7	182	8,7	ja	11
24	20/M	Masernpneum. Pseudomonaspn. Sepsis	3,0	95	2,7	ja	28
25	40/M	Pneumonie, Sepsis	3,0	83	3,8	nein	19

3.4. DIE BRONCHOALVEOLÄRE LAVAGE (BAL)

3.4.1. Entstehung und Indikationsstellung der BAL

Die BAL ist ein bronhoskopisches Untersuchungsverfahren, mit dessen Hilfe auf wenig invasive Weise Zellen und flüssige Bestandteile des alveolären Kompartimentes zur weiteren Diagnostik gewonnen werden können. Im Jahre 1965 wendete Ramires [132] erstmals bei einem Patienten mit einer alveolären Proteinose dieses Verfahren mit therapeutischer Zielsetzung an.

Hunninghake et al. [133] wiesen als Erste in einer umfassenden Arbeit die Übereinstimmung des zellulären und humoralen Bildes des lavagierten Lungenareals mit dem gesamten unteren Respirationstrakt nach. Von diesem Zeitpunkt an wurde die BAL unter diagnostischem Gesichtspunkt durchgeführt, wobei im Laufe der Zeit für einige Parameter ein hoher Übereinstimmungsgrad zwischen den per BAL und den per Biopsie gewonnenen Befunden erreicht werden konnte [134]. Besonders in Hinsicht auf maligne Erkrankungen der Lunge kann die BAL allerdings die Biopsie nicht ersetzen, vielmehr ist sie als komplementäres Verfahren zu sehen. Neben der weiter bestehenden therapeutischen Indikation der BAL (Atelektasen, Alveolarproteinose) ist sie zusätzlich Bestandteil der Standarddiagnostik bei der Aktivitätsbeurteilung (Differentialzellbild, CD₄/CD₈-Population) interstitieller Lungenerkrankungen (Sarkoidose, Lungenfibrose, EAA) geworden [135, 136]. Darüber hinaus kommt der BAL ein hoher Stellenwert bei der gezielten Erregersuche in pneumonieverdächtigen Lungenarealen, sowie in der Diagnostik opportunistischer Lungenerkrankungen bei HIV-infizierten Patienten und im Nachweis einer berufsbedingten Lungenerkrankung (z.B. Asbestose) zu. Somit hat die BAL einen hohen diagnostischen Stellenwert in der differentialdiagnostischen Abklärung pneumologischer Erkrankungen [137, 138].

3.4.2. Durchführung und Technik der BAL

Bronchoskopie und BAL wurden mit einem flexiblen, fiberoptischen Bronchoskop durchgeführt, welches nach vorheriger Oberflächenanästhesie der oberen Luftwege über den Endotrachealtubus eingeführt wurde. Nach atraumatischem Positionieren der Bronchoskopspitze in dem zu lavagierenden Segment wurden 200 ml (10 x 20ml) sterile Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) instilliert. Die Kochsalzlösung wurde direkt anschließend unter milder Aspiration zurückgewonnen (Recovery 55-70%). Als Lokalisation der BAL wurde zumeist die

Lingula oder der rechte Mittellappen gewählt. Bei Patienten mit einer Pneumonie wurde der radiologisch als betroffen identifizierte Lungenabschnitt gespült. Das gewonnene Lavagematerial wurde nach Filtration zwecks Entfernung des Mukus durch eine sterile Kompresse in das, in Eis befindliche Probengefäß gegeben. Die sofort folgende Zentrifugation bei 200 xg (4°C; 10 min) diente der Sedimentation der zellulären Bestandteile der Lavage. Die Färbung und Auszählung erfolgte mittels Routinetechniken (Standardfärbung nach Papenheim; siehe 4.). Der Überstand wurde anschließend gepoolt, unter Rühren aliquotiert, in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -85°C bis zum weiteren Procedere gelagert. Dieses Vorgehen wurde bei jedem der Studienpatienten 3 Stunden vor Surfactantapplikation sowie 24 Stunden und 72 Stunden nach Surfactantgabe durchgeführt, sofern es der Zustand des Patienten zuließ. Ebenso wurde bei den gesunden Probanden des Kontrollkollektives eine BAL mit insgesamt 200 ml Kochsalzlösung durchgeführt.

3.6. TRANSBRONCHIALE SURFACTANTAPPLIKATION

Waren die dreistündlich kontrollierten Werte hinsichtlich Gasaustausch und Beatmungsparameter innerhalb der 6-stündigen Beobachtungsphase vor Surfactantgabe konstant und betrug der Murrayscore nicht länger als 96 h mehr als 2,5, so wurde die transbronchiale Surfactantapplikation durchgeführt. Hierzu wurden 300 mg/kg KG eines Kälberlungensurfactantextraktes (~ 60 mg/ml) (Alveofact®; Thomae, Biberach) bronchoskopisch in 20 Einzelfractionen in jedes Segment der rechten und linken Lunge appliziert (Gesamtmenge Surfactant im Durchschnitt: $18,9 \pm 1,0$ g in ~ 315 ml physiologischer Kochsalzlösung; NaCl 0,9%). Die Bronchoskopspitze wurde hierbei in je ein einzelnes Segment positioniert und ein Teil des Surfactants instilliert. Diese Position wurde sodann für weitere 1-2 min beibehalten, um einen Rückfluß des Surfactants in die zentralen Atemwege zu verhindern. Die Applikation erfolgte von den basalen Segmenten beginnend zu den apikalen, wobei die Seite nach jeweils 2-3 Segmenten gewechselt wurde. Bei 7 Patienten wurde eine zweite Applikation nach dieser Methodik durchgeführt, wenn der zunächst zu beobachtende Anstieg des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks in den nächsten 15 bis 18 Stunden nach erster Applikation erneut rückläufig war und die $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Werte auf unter 250 mmHg fielen. Die zweite Dosis Surfactant betrug dann 200 mg/kg KG (Gesamtmenge: $14,0 \pm 0,44$ g in ~230 ml Kochsalzlösung) und wurde 18 bis 24 Stunden nach Erstapplikation instilliert. Die Surfactantapplikationsdauer betrug jeweils (1. und 2. Surfactantapplikation) 50 ± 12 min.. Während dieser Zeit wurden, wie bereits erwähnt, die Beatmungsparameter (insbesondere PEEP und FiO_2) des jeweiligen Patienten nicht verändert.

3.7. BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DES SURFACTANT

Material und Methoden

3.7.1. Bestimmung des Phospholipidgehaltes

Aliquots der BAL-Überstände (nach 200 xg) wurden nach Bligh & Dyer [139] extrahiert. Dazu wurde die Probe mit Methanol und Chloroform im Volumenverhältnis 0,8 (Probe)/2 (MeOH)/1 (ChCl₃) gemischt, über einen Zeitraum von 30 min intermittierend geschüttelt und anschließend erneut mit je einem weiteren Volumenanteil NaCl 0,9% und Chloroform zu einem Endverhältnis von wässrig/MeOH/ChCl₃ von 1,8/2/2 versetzt. Die nun einsetzende Phasentrennung wurde durch Zentrifugation bei 2.000 xg über 10 min beschleunigt. Die untere Chloroformphase (PL, SP-B und SP-C) wurde mit Hilfe von Pasteurpipetten aufgenommen und unter Stickstoff (N₂) getrocknet. Die Bestimmung der PL-Konzentration erfolgte mit dem kolorimetrischen Verfahren nach Rouser [140]. Nach Wiederaufnahme der Probe in 220 µl Chloroform wurden zwei 100 µl-Proben in ein Reagenzglas (Schott) pipettiert und nach Zugabe von 200 µl 70%iger Perchlorsäure bei 180°C für 4 Stunden verkocht. In Analogie hierzu wurde in parallelen Ansätzen 0,2 – 10 µg Phosphatstandard (KH₂PO₄) eingesetzt. Nach Abkühlen der Proben und des Standards wurde 1 ml Ammoniummolybdatlösung (4,6 mM Ammoniumheptamolybdat) zugefügt. Die Reduktion zum Farbkomplex erfolgte durch weitere Zugabe von 20 µl 650 mM Ascorbinsäure. Die Proben und Standards wurden gut gemischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) bei 698 nm gemessen. Nach Abzug der Leerwerte wurde eine computergestützte Eichkurve erstellt (sog. "cubic spline Interpolation") und der Phosphatgehalt der Probe ermittelt. Schließlich wurde der Phospholipidgehalt der Probe unter Berücksichtigung der molaren Verhältnisse und der effektiven Verdünnung berechnet (Umrechnungsfaktor µg Phosphat auf µg Phospholipid = 23,45). Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.7.2. Bestimmung des Proteingehalts

Die Proteinbestimmung erfolgte aus Aliquots der BAL-Überstände (nach Zentrifugierung mit 200 xg) mittels eines kommerziellen Kits der Fa. Pierce, dessen Nachweisprinzip dem der Lowry-Methode [141] entspricht.

3.7.3. Berechnung des Phospholipid-Protein-Quotienten (PPQ)

Der Phospholipid-Protein-Quotient (PPQ) konnte nach vorheriger Bestimmung beider Parameter berechnet werden.

3.7.4. Analyse der Phospholipidklassen (PL-Profil)

Die Phospholipidsubfraktionierung wurde mittels Dünnschichtchromatographie („high performance thin layer chromatography“, HPTLC) durchgeführt. 30 µg des bei 48.000 xg pelletierten Materials (siehe unten) wurden entsprechend BLIGH & DYER [139] extrahiert (s.o.) und nach Wiederaufnahme in 50 µl Chloroform mit Hilfe eines Probenaufgabegerätes (Linomat IV) auf Silica 60 Dünnschichtplatten (Merck®) aufgetragen. Als Standard diente eine aus acht verschiedenen Phospholipiden (PL) bestehende PL-Mixtur, die in sieben verschiedenen Konzentrationen auf die Platte aufgetragen wurde. Diese Standardlösung enthielt:

<u>Konz.</u>	<u>µl Mix</u>	<u>µg PC</u>	<u>µg andere PL</u>	
1	5	2,08	0,417	(enthält LPC, PG, SPH, PI,
2	10	4,166	0,833	PE, PS und Cardiolipin)
3	20	8,333	1,666	
4	30	12,5	2,5	
5	50	20,833	4,166	
6	100	41,666	8,333	
7	150	62,5	12,5	

Phosphatidylcholin (PC), Lyso-Phosphatidylcholin (LPC), Phosphatidylglycerol (PG), Sphingomyelin (SPH), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS) sowie Cardiolipin

Eine Laufkammer wurde für 20 min mit dem Laufmittel (Chloroform: Methanol: Eisessig: Aqua dest. = 50: 37,5: 3,5: 2 (vol/vol)) äquilibriert. Die Trennung der PL erfolgte dann nach Einbringen der Dünnschichtplatte in die Kammer für eine Dauer von weiteren 20 min. Nach dem Trocknen der Platte folgte die Anfärbung mit Molybdän-Blau-Farbstoff, entsprechend dem Verfahren nach Gustavsson [142].

Hierzu wurde die Platte für ca. 10 sec vertikal in eine mit diesem Reagenz gefüllte Kammer getaucht und anschließend an einem dunklen Ort für ca. 15 min gelagert, bis das Färbereagenz komplett eingedrungen war. Das überschüssige Färbereagenz wurde durch Schwenken für ca. 30 sec in Aqua dest. entfernt. Anschließend wurde wieder an einem dunklen Ort für 15-20 min inkubiert. Das

Material und Methoden

Trocknen der Platte erfolgte mit einem Kaltluftfön. Die Platte wurde mit einem Camag TLC II Scanner bei 700 nm densitometriert. Mit Hilfe eines computer-gestützten Auswertungsprogramms erfolgte die Quantifizierung der einzelnen Phospholipidklassen und die Umrechnung in ihren jeweiligen relativen Gehalt. Die Varianz dieser Methode war in Abhängigkeit von dem jeweiligen PL unterschiedlich und rangierte zwischen 0,745% für PC und 7,34% für LPC.

3.7.5. Fettsäureprofil von Phosphatidylcholin [%]

Das Fettsäureprofil von Phosphatidylcholin wurde in dessen relativen Anteilen aus der BAL bestimmt. Zunächst wurde Phosphatidylcholin wie bereits oben beschrieben aus der Lipidfraktion separiert und mit Hilfe von Primulin erkennbar gemacht [177]. Anschließend folgte ein Waschvorgang mit 10 ml Chloroform/Methanol (2/1; vol/vol) von der Silica Matrix nach vorherigem Zusatz von 10 µg Pentadecanolsäure. Hieraus wurde die Aufspaltung in die entsprechenden Fettsäuremethylester durch säurekatalysierende Transmethylierung mit 2 N HCL für 12 h bei 100 °C erzielt. Die entstandenen Fettsäuremethylester wurden schließlich mittels Hexan extrahiert, unter Stickstoffdurchströmung getrocknet und für die weiteren Analysen in je 10 µg Chloroform gelöst. Die gaschromatografische Separation erfolgte bei 198°C (Carlo Erba Fractovap 2150, Mainz, Deutschland) wobei Helium als Trägergas benutzt wurde (Flußrate 1 ml/min). Die individuellen Fettsäuremethylester wurden anschließend durch Nutzung eines Flammenionisationsdetektors gemessen und durch Vergleich mit kommerziell erhältlichen Standards identifiziert.

3.7.6. SP-B Elisa

Der SP-B-Gehalt in den BAL-Proben oder von LSA-Proben wurde mit Hilfe eines speziell entwickelten ELISA-Verfahrens (nach Krämer [143]) bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot des post 200 xg-BAL-Überstandes mit Propanol (1) in einem Volumenverhältnis von 1:1 (vol/vol) verdünnt. Als Standard diente humanes SP-B, welches bereits in PBS/Propanol vorlag. Probe und Standard (0,3125 – 40 ng total) wurden zu je 100 µl in die Nöpfchen von Polysorp® Microtiterplatten aufgetragen. Nach komplettem Eintrocknen der Lösungen wurde je 100 µl Trifluoroethanol hinzugefügt, das ebenfalls passiv verdunstete. Anschließend folgte eine zweimalige Inkubation mit Diisopropylether/Buthanol (3:2; vol/vol; 100 µl; 20 min), der sich jeweils ein Waschschrift mit PBS/0,5% Tween 20 (im folgenden als Waschpuffer

bezeichnet) anschoß. Die Microtiterplatte wurde anschließend für 3 Stunden mit BSA-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert, um die freien Bindungsstellen zu sättigen und anschließend dreimal gewaschen. Diesem Schritt folgte die Zugabe eines monoklonalen Antikörpers gegen SP-B (1,5 µg/ml 8B5E in BSA-Puffer, 200 µl/Näpfchen) und eine anschließende Inkubation für 12 Stunden bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen wurde die Platte dann mit einem biotinyliertem Anti-Maus-Antikörper (1:1000 in BSA-Puffer verdünnt, 200 µl/Näpfchen) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Folgend wurde mit einem mit Meerrettich-Peroxidase markierten Avidin-Biotin-Komplex (5 Tropfen fertige Lösung ad 60 ml PBS) für 2 Stunden inkubiert. Dreimaliges Waschen schloß sich an. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte durch Färbung der Platte nach Zugabe von je 200 µl Färbereagenz (20 mg ABTS ad 30 ml Substratpuffer und 10 µl H₂O₂) bei 4°C über Nacht. Die Extinktion wurde anschließend bei 405 nm mit dem ELISA-Photometer gemessen und die SP-B-Werte über eine computergestützte Eichkurve berechnet. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.7.7. SP-A Elisa

Der Gehalt an SP-A in den BAL-Proben wurde mit Hilfe eines kompetitiven ELISA-Protokolls ermittelt. Die Beschichtung der Maxisorp® Microtiterplatten erfolgte mit rekombinantem, humanem SP-A (100 ng/ml in PBS, 200 µl/Näpfchen) durch Inkubation für 12 Stunden bei 4°C. Es folgte ein dreimaliger Waschvorgang mit Wasch-Puffer. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen mit BSA-Puffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert (200 µl/Näpfchen). Ein Volumen von 250 µl des Standards (rekombinantes SP-A, 40-2000 ng/ml) oder der Probe (beide verdünnt mit 2% Triton X-100/PBS) wurden daraufhin volumenäquivalent mit dem monoklonalen Antikörper PE10 (1:15000 in BSA-Puffer) vermischt und für eine Stunde bei 37°C vorinkubiert. Es folgte erneutes dreimaliges Waschen der Platten. Das Proben-Antikörper-Gemisch wurde nun auf die Microtiterplatte aufgetragen und ein letztes Mal für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis des gebundenen Immunglobulins und die Quantifizierung des SP-A-Gehaltes der BAL-Proben erfolgte in Analogie zu den oben (siehe 5.6.5.) erwähnten Schritten. Unter diesen Bedingungen konnte nach „Spiking“ von 23 verschiedenen Lavageflüssigkeiten eine Regressionsgerade mit einer Steigung von $1,052 \pm 0,056$

Material und Methoden

und einem r-Wert von $0,963 \pm 0,010$ erstellt werden, die die Anwendbarkeit dieses Testverfahrens für dieses Spezimen nahe legt.

3.8. BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG DES SURFACTANT

3.8.1. Probenaufbereitung

-Isolierung des Surfactant

Als Ausgangsprobe wurde der 200 xg-Überstand aus der Original-BAL verwendet. Der erste Schritt bestand aus einer Ultra-Zentrifugation bei 48.000 xg (4°C, 1 h), die der Anreicherung des Surfactant und der Isolierung großer Surfactantaggregate diente [144]. Nach Resuspension des Pellets in einem kleinen Volumen 3 mM Ca⁺⁺/0,9%iger NaCl-Lösung wurde der PL-Gehalt, wie oben angegeben, erneut ermittelt. Das Verhältnis des pelletierten PL zum zentrifugierten Gesamt-PL-Gehalt wurde als ein Maß für den relativen Gehalt der BAL an „großen Surfactantaggregaten“ angesehen und erfaßt. Unter physiologischen Bedingungen spiegeln diese Subfraktionen den oberflächenaktiven Anteil des Surfactant an der Gesamtheit aller Surfactantfraktionen (siehe unter 2.1.: Das pulmonale Surfactantsystem) wider. Die Pellets wurden nach Kenntnis des PL-Gehaltes auf eine endgültige Phospholipidkonzentration von 2 mg/ml eingestellt.

-Isolierung der Proteine

Nach Zentrifugation bei 48.000xg wurden im Schnitt $2,7\% \pm 0,43\%$ (Mittelwert \pm SEM; n = 30) der gesamten BAL-Proteine im Pellet wiedergefunden. Um den Einfluß der nicht pelletierten BAL-Proteine auf die Surfactantfunktion zu charakterisieren, wurden die im 48.000 xg-Überstand verbliebenen Proteine isoliert und konzentriert. Dazu wurde der 48.000 xg-Überstand mittels Macrosep Zentrifugal-Konzentratoren (Durchlässigkeitsgrenze 10 kDa; 2.500 xg für 3 h bei 4°C) konzentriert. Durch diesen Schritt konnten die Lavageproteine annähernd 16-fach konzentriert werden. Der Verlust von Proteinen über die Membran betrug im Mittel $13,9\% \pm 2,9\%$. Nach Gefriertrocknung und Resuspension mit 0,5 ml destilliertem Wasser wurden die verbliebenen Phospholipide mittels Bligh & Dyer-Extraktion [139] entfernt. Die dem originären PL-Protein-Verhältnis in der BAL entsprechende Menge an aufgereinigtem Protein wurde als Lyophilisat dem oben beschriebenen Surfactantpellet hinzugegeben und mit diesem durch kurze Ultraschallbehandlung (50 W, 25 kHz, 1 min) rekonstituiert.

3.8.2. Pulsating Bubble Surfactometer

Die Messung der Oberflächenaktivität sowohl der „reinen“ als auch der mit den endogenen Proteinen vermischten Surfactant-Pellets erfolgte mit Hilfe des Pulsating Bubble Surfactometer [145]. Alle Meßdaten wurden über einen Interface-Anschluß auf einem IBM-kompatiblen Rechner übertragen und computergestützt ausgewertet.

-Aufbau und Messprinzip

Das Pulsating Bubble Surfactometer ist erstmalig 1977 von G.Enhorning [145] beschrieben worden. Eine mit surfactanthaltiger Lösung gefüllte Meßzelle steht über eine Kapillare mit der Raumluft in Kontakt. Über diese Kapillare wird eine Luftblase angezogen und auf einen, durch ein Okular erkennbaren, vorgegebenen Radius (r) eingestellt. Auf der Grundlage des Gesetzes von Laplace:

$$\Delta P = 2\gamma / r$$

kann nun die an der Grenzfläche zwischen wässriger Lösung und luftgefüllter Blase bestehende Oberflächenspannung (γ ; [mN/m]) aus dem gemessenen Druck in Wassersäule und unter Berücksichtigung der vorgegebenen Blasenradien berechnet werden.

Über das im Gerät integrierte Mikroskop erfolgt eine kontinuierliche Beobachtung dieser „Modell-Alveole“ und gegebenenfalls eine Korrektur des Blasenradius.

-Messverfahren (Messung der Oberflächeneigenschaften)

Alle zu messenden Proben wurden für 30 min bei 37°C vorinkubiert und direkt vor dem Abfüllen der Meßprobe intensiv geschüttelt. Nachdem die Probenkammer des Bubble-Surfactometers mit 30 µl blasenfrei gefüllt wurde, kamen zwei verschiedene Meßverfahren zur Anwendung:

-1. Adsorptionsmessung

Nach Aufsetzen des Probengefäßes auf das Surfactometer wurde mit Hilfe eines in das Hohlraumsystem des Gerätes integrierten Servo-Motors eine Luftblase durch die Kapillare des Probengefäßes angezogen. Die Blase wurde anschließend mit Hilfe der Markierungen auf dem Okular auf den minimalen Blasenradius von 0,4 mm eingestellt. Daraufhin wurde die Blase automatisch vom Gerät mit hoher Geschwindigkeit in die Kapillare zurückgedrängt, sofort reaspiert und verblieb dann für 12 Sekunden bei dem vorgegebenen minimalen Blasenradius. Anhand der

kontinuierlichen Registrierung der Oberflächenspannungswerte kann ein zeitabhängiger Abfall der Oberflächenspannung als Folge der Adsorption der Moleküle an die Grenzfläche beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit bezieht sich der Wert für die Messung der Adsorption immer auf die Oberflächenspannung nach 12 Sekunden Adsorptionszeit ($\gamma_{ads} = \gamma_{ads} 12 \text{ sec.}$).

-2. Dynamische Messung

Direkt im Anschluß an die Adsorptionsmessung erfolgte die Untersuchung des Oberflächenspannungsverhaltens der Probelösungen unter Film-Oszillation. Mittels eines hochübersetzten Getriebes wurde hierbei die Blase durch einen Motor exakt zwischen dem vorgegebenen minimalen und maximalen Blasenradius (0,4 mm versus 0,55 mm) pulsiert. Die Blasenoberfläche wurde in einem Durchgang jeweils verdoppelt. Die Film-Oszillation wurde in der vorliegenden Untersuchung mit einer Frequenz von 20 x/min über 5 Minuten durchgeführt. Erfasst wurden die minimalen und maximalen Oberflächenspannungswerte nach 5-minütiger, kontinuierlicher Pulsation (γ_{min} und γ_{max}).

-Reinigung und Kalibrierung

Das Pulsating Bubble Surfactometer wurde vor und nach jeder Messung mit Aqua dest. gespült. Vor jeder Messung wurde ein Druckausgleich mit dem umgebenden atmosphärischen Druck durchgeführt. Die Kalibrierung des Gerätes wurde in regelmäßigen Zeitabständen unter Verwendung von Kontrolllösungen mit definierten Oberflächenspannungswerten (Aqua dest. = 70 mN/m; 20,5% Ethanol (wt/vol) = 37,5 mN/m und 40% Ethanol (wt/vol) = 29,6 mN/m) überprüft. Hierbei ergab sich ein Regressionswert zwischen Soll- und Ist-Werten von 0,99984.

3.9. BAL-ZYTOLOGIE

Die Analyse der Zellzahl sowie die Differenzierung der Zellen wurde, wie bereits im Text erwähnt, nach dem ersten Zenrifugationsschritt (200 xg; 4°C; 10 min; siehe 4.3. Schematischer Ablauf der Probenverarbeitung) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer (Tiefe: 0,1 mm; Fläche: 0,0025 mm²). Zusätzlich wurde ein Cytospin-Präparat angefertigt. Dieses Cytospin-Präparat, angefertigt mit jeweils 10⁵ Zellen in einer Zyto-Zentrifuge (500 upm) wurde entsprechend der Standardfärbung nach Papenheim, bestehend aus der sequentiellen Färbung des Präparates mit May-Grünwald-Lösung (5 min) sowie mit Giemsa-Lösung (10 min), bearbeitet. Nach einer 10-minütigen Trockenphase folgte die Zelldifferenzierung unter dem Mikroskop.

3.10. STATISTIK

Alle Parameter gelten für n = 25. Bei Abweichungen sind die entsprechenden n-Zahlen in Grafiken oder Tabellen aufgeführt. Für alle Parameter sind die Mittelwerte (Mean) ± SEM (Standardfehler) angegeben. Zur Überprüfung der Unterschiede der Werte 24 und 72 Stunden nach Therapie im Vergleich zu den baseline Werten, wurde zunächst der verteilungsunabhängige „Wilcoxon-Test“ für abhängige Stichproben angewandt. Der „T-Test“ für abhängige Stichproben wurde angewendet, um statistische Unterschiede in der Ausprägung des Phospholipid-Protein-Quotienten, des Gesamt-Phospholipidgehaltes, des Phospholipid-Profiles, des SP-A-, SP-B-, SP-C-Gehaltes (% PL) in BAL und Pellet, der minimalen und Adsorption-Oberflächenspannung, der Großen Surfactant-Aggregate und des Oxygenierungsgrades (PO₂/FiO₂) zu erfassen. Das Signifikanzniveau wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von 5 % festgesetzt und wurde wie folgt in den Graphiken und Tabellen dargestellt: * = p < 0.05, ** = p < 0.01 und *** = p < 0.001.

4. ERGEBNISSE

4.1. BASISDATEN DES ARDS KOLLEKTIVS: ZELLBILD, PROTEINGEHALT

Die Gesamtzellzahl der Bronchoalveolären Lavage sowie der relative Anteil an polymorphkernigen neutrophilen Granulocyten (PMN) zeigte sich bei den ARDS Patienten vor Surfactantgabe deutlich erhöht. Hinsichtlich des relativen Anteils an Alveolarmakrophagen (AM) in der BAL konnte eine Reduktion bis zu einem Drittel des Normwertes aufgezeigt werden. Der Proteingehalt der BAL, war als Ausdruck der erhöhten endothelialen und epithelialen Permeabilität im Vergleich zu den Kontrollen stark erhöht. Im Zeitverlauf nach der Surfactantapplikation zeigte sich hinsichtlich der Zellzahl und des Differentialzellbildes keine signifikante Veränderung (siehe Tabelle 2), jedoch war eine deutliche und nach 72 h auch signifikante Abnahme des Proteingehaltes in der BAL zu beobachten.

Ergebnisse

Tabelle 2: ZELLGEHALT, DIFFERENTIALZELLBILD UND PROTEINGEHALT IN DER BAL

	Protein [µg/ml]	Gesamtzellen in der BAL[x 10 ⁶]	AM [%]	PMN [%]	Lymphozyten [%]	Andere Zellen [%]
Kontrolle (n = 15)	73±14	12.2±2.8	85.3±3.1	3.8±1.3	10.5±2.4	0.25±0.17
ARDS -3 h (n = 25)	1764±465	25±8.6	29.4±5.6	59.7±6.2	8.4±3.2	2.0±1.1
24 h (n = 22)	1149±360	38±16	24±5.2	66.6±5.8	6.7±2.5	2.2±0.8
72 h (n = 21)	864±240**	28±7.3	28.5±4.9	62.8±6.2	7.4±2.5	1.2±0.4

Der Proteingehalt in der BAL ist in µg/ml angegeben; die Zellen (AM, PMN, Lymphozyten, andere Zellen) sind in Prozent der Gesamtzellmenge aller Alveolarzellen angegeben. Alle Daten erscheinen als Mittelwerte ± SEM. Statistische Analysen wurden vergleichend zum Zeitpunkt vor Surfactantapplikation (-3 h) für die folgenden Zeitpunkte (24 h, 72 h) durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) beträgt für den Proteingehalt in der BAL zum Zeitpunkt 72 h $p < 0.01$ (**).

AM = Alveolarmakrophagen; PMN = polymorphkernige neutrophile Granulozyten

4.2. ERGEBNISSE DER BIOCHEMISCHEN UNTERSUCHUNGEN DES SURFACTANTSYSTEMS

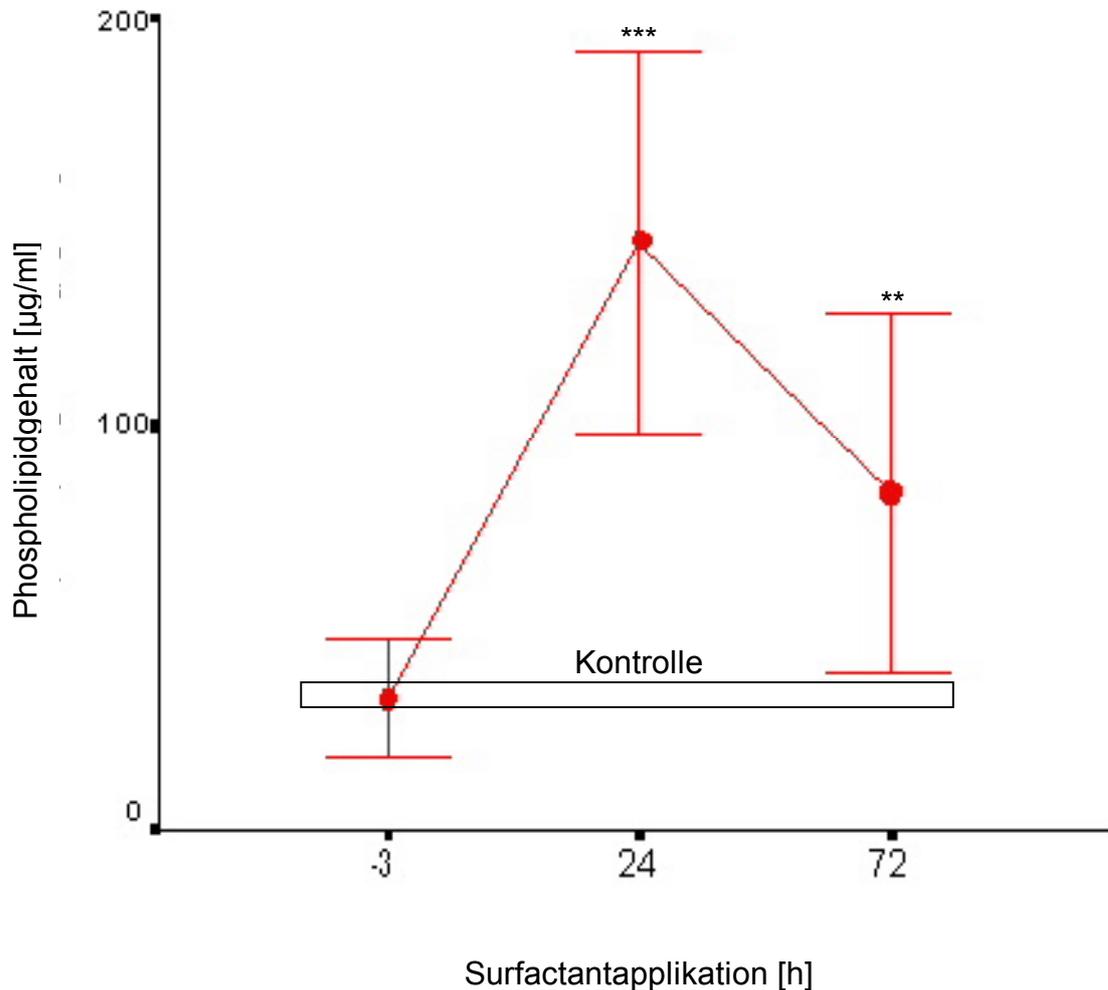
4.2.1. Phospholipidgehalt (PL-Gehalt) in der BAL

Der Phospholipidgehalt der BAL der ARDS Patienten vor Surfactant Applikation glich dem gesunder Kontrollen. 24 h und 72 h nach Surfactant Applikation war allerdings ein signifikanter Anstieg des Phospholipidgehaltes zu beobachten (Abbildung 2), mit einer etwa dreifachen Erhöhung des lavagierbaren Phospholipidgehaltes bei den Patienten 24 h nach Therapie.

4.2.2. Phospholipid-Protein-Quotient (PPQ) in der BAL

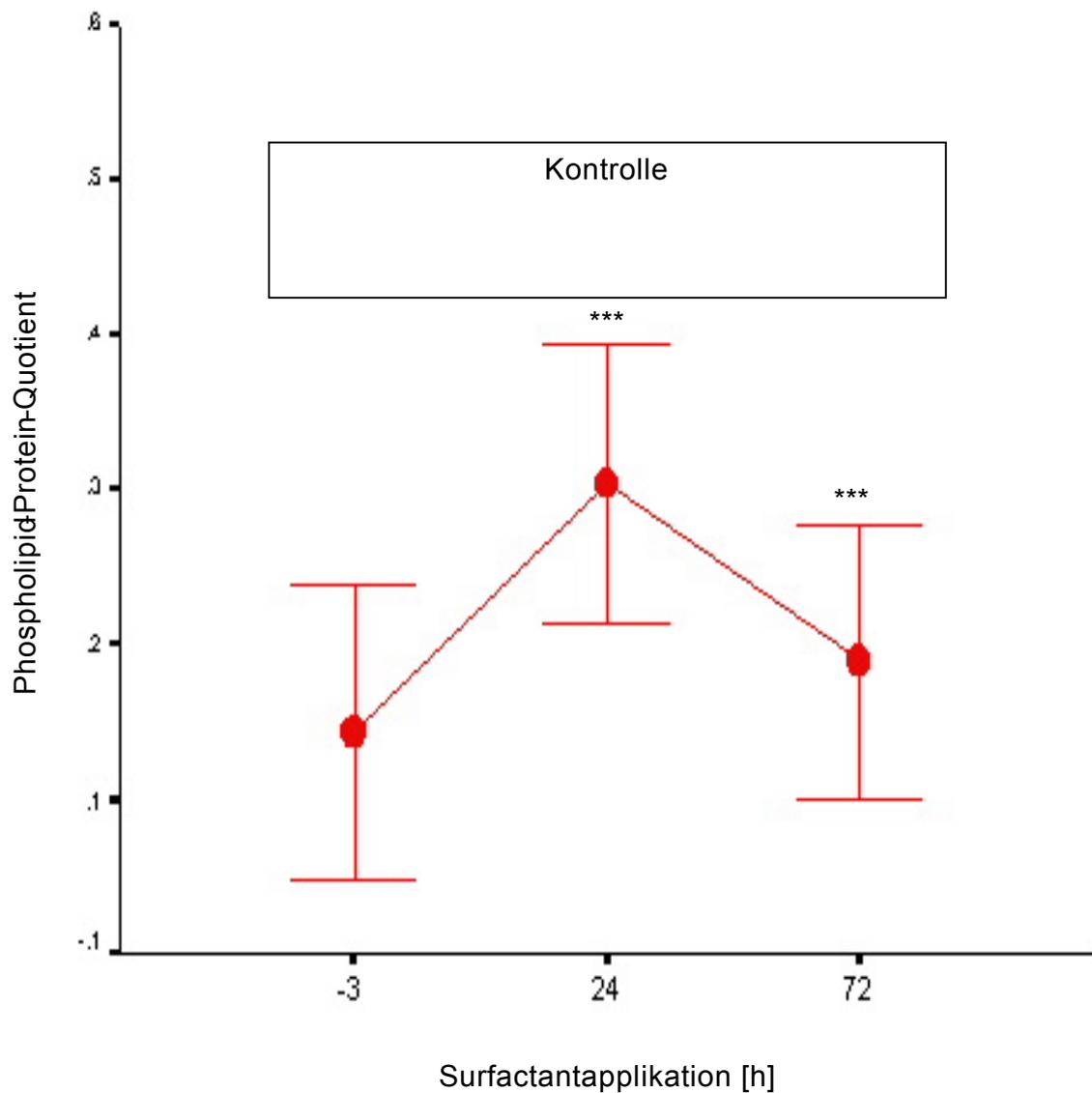
Wie angesichts der veränderten Gesamtphospholipid und Gesamtprotein-Werte zu erwarten, konnte für die ARDS Patienten vor Applikation im Vergleich zu den Kontrollen ein deutlich (~ 5fach) reduzierter Phospholipid-Protein-Quotient in der BAL ermittelt werden. Nach Surfactant Applikation stieg dieser – vor allem 24 h nach Therapie – signifikant an, erreichte aber zu keiner Zeit Normalwerte (Abbildung 3).

Abbildung 2: PHOSPHOLIPIDGEHALT IN DER BAL



Gegeben ist die Phospholipid (PL)-Konzentration der BAL vor (-3 h), 24 h und 72 h nach Therapie (Mittelwert \pm SEM). Die Ergebnisse der BAL-Zeitpunkte 24 h und 72 h wurde mit den Ergebnissen der Ausgangs-BAL -3 h verglichen, die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) beträgt für die 24 h-Werte (n = 25) $p < 0.001$ (***) und für die 72 h-Werte (n = 22) $p < 0.01$ (**). Die Gesamtphospholipidkonzentration in der BAL von lungengesunden Probanden wurde in der Grafik als Rechteck (2s-Bereich) dargestellt.

Abbildung 3: PHOSPHOLIPID-PROTEIN-QUOTIENT (PPQ) IN DER BAL



Dargestellt ist der Phospholipid-Protein-Quotient (PPQ) in der BAL vor (-3 h) sowie 24 h und 72 h nach Therapie (Mittelwert \pm SEM). Die Ergebnisse der BAL-Zeitpunkte 24 h und 72 h wurde mit den Ergebnissen der Ausgangs-BAL -3 h verglichen, die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) beträgt für die 24 h-Werte (n = 25) sowie für die 72 h-Werte (n = 22) $p < 0.001$ (***). Der PPQ in der BAL von lungengesunden Probanden erscheint in der Grafik als Rechteck (2s-Bereich).

Ergebnisse

4.2.3. Phospholipid-Profil

Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich bei den ARDS Patienten vor Surfactantapplikation ein deutlich verändertes Verteilungsmuster des Phospholipid (PL)-Profils (Tabelle 3), mit einem erheblichen Abfall des relativen Anteils an Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylglycerol (PG) und einem gleichzeitigen Anstieg des relativen Anteils an Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS) und Sphingomyelin (SPH) (Tabelle 3). Nach Surfactantapplikation war eine komplette Angleichung des Phospholipidprofils an das gesunder Kontrollen, aber auch an das Phospholipidprofil des applizierten Surfactantmaterials zu beobachten (Tabelle 3).

Tabelle 3: PHOSPHOLIPIDPROFIL

	PC [%]	PG [%]	PI [%]	PE [%]	PS [%]	SPH [%]
Kontrolle (n = 17)	83.1 ± 0.9	8.6 ± 0.6	3.2 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.3	0.8 ± 0.2
Alveofact®	82.1 ± 0.9	9.0 ± 0.8	0.5 ± 0.2	3.0 ± 0.1	0.0	1.4 ± 0.2
ARDS -3 h	72.3 ± 2.1	3.2 ± 0.6	7.6 ± 1.0	5.1 ± 0.8	1.8 ± 0.6	9.4 ± 1.2
24 h (n = 25)	85.7 ± 0.9 ***	8.1 ± 0.7 ***	1.7 ± 0.2 ***	2.0 ± 0.3 ***	0.5 ± 0.2 ***	1.9 ± 0.2 ***
72 h (n = 22)	83.5 ± 1.0 ***	6.9 ± 0.9 ***	2.7 ± 0.3 ***	2.4 ± 0.3 ***	1.2 ± 0.3	3.2 ± 0.3 ***

Die verschiedenen Phospholipid-Klassen von gesunden Kontrolle, des substituierten Surfactantmaterials (Alveofact®) und von den Patienten sind in Prozent vor (-3 h) sowie nach Therapie (24 h, 72 h) der Gesamtphospholipide (Mittelwerte ± SEM) angegeben. Statistische Analysen wurden zwischen der Ausgangs-BAL (-3 h) und den beiden post Therapie Gruppen (24 h, 72 h) durchgeführt, die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) ist wie folgt angegeben: * (p < 0.05), ** (p < 0.01) und *** (p < 0.001).

PC = Phosphatidylcholin, PG = Phosphatidylglycerol, PI = Phosphatidylinositol, PE = Phosphatidylethanolamin, PS = Phosphatidylserin, SPH = Sphingomyelin.

4.2.4. Fettsäureprofil

Auch das Fettsäureprofil von Phosphatidylcholin zeigt in der BAL im Vergleich von Lungengesunden zu ARDS Patienten vor Surfactanttherapie deutliche Veränderungen in deren relativen Anteilen auf (Tabelle 4). So konnte bei den ARDS Patienten ein deutlicher Abfall von 16:0 PC sowie ein Anstieg der ungesättigten Fettsäureanteile (18:1 und 18:2) von Phosphatidylcholin dargestellt werden. Nach Surfactanttherapie kam es zu einer annähernden „Normalisierung“ von 14:0 PC, 16:0 PC sowie 18:2 PC (Tabelle 4).

Tabelle 4: FETTSÄUREPROFIL von PHOSPHATIDYLCHOLIN

	14:0 PC [%]	16:0 PC [%]	18:0 PC [%]	18:1 PC [%]	18:2 PC [%]
Kontrolle (n = 17)	3.94 ± 0.63	72.31 ± 1.35	6.74 ± 1.02	9.66 ± 0.43	3.95 ± 0.29
Alveofact®	3.65 ± 0.08	73.45 ± 0.69	4.34 ± 0.02	15.47 ± 0.50	1.42 ± 0.07
ARDS -3 h	1.56 ± 0.73	59.92 ± 5.77	5.34 ± 3.28	19.39 ± 2.11	9.34 ± 2.29
24 h (n = 25)	3.22 ± 0.33	65.98 ± 1.01	4.35 ± 0.45	20.59 ± 0.91 *	3.01 ± 0.48
72 h (n = 22)	3.78 ± 0.28 *	67.55 ± 2.04	4.24 ± 0.53	16.71 ± 1.36	3.28 ± 0.49 **

Die jeweilige Fettsäureanteile von den gesunden Kontrollen, des substituierten Surfactantmaterials (Alveofact®) und von den Patienten sind in Prozent vor (-3 h) sowie nach Therapie (24 h, 72 h) des Gesamtfettsäureanteiles von Phosphatidylcholin (PC) in der BAL als Mittelwerte ± SEM angegeben. Fettsäurederivate < 0.5% wurden nicht berücksichtigt. Statistische Analysen wurden zwischen der Ausgangs-BAL (-3 h) und den beiden post Therapie Gruppen (24 h, 72 h) durchgeführt, die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) ist wie folgt angegeben:

* (p < 0.05), ** (p < 0.01) und *** (p < 0.001).

Ergebnisse

4.2.5. Apoprotein-Gehalt in der BAL

Tabelle 5: SURFACTANT-APOPROTEINE (SP-A, SP-B) IN DER BAL

	SP-A		
	ng/ml (BAL)	% PL (BAL)	% Proteine (BAL)
Kontrolle (n = 20)	1533 ± 175	6.2 ± 0.7	2.8 ± 0.4
ARDS -3 h	430.4 ± 66.8	5.2 ± 2.3	0.103 ± 0.028
24 h (n = 24)	322.1 ± 38.6	0.4 ± 0.06 ***	0.108 ± 0.037
72 h (n = 22)	409.4 ± 52.6	1.0 ± 0.2 ***	0.103 ± 0.017

	SP-B			
	ng/ml (BAL)	% PL (BAL)	% PL (Pellet)	% Protein (BAL)
Kontrolle (n = 20)	740 ± 85	3.0 ± 0.3	5.0 ± 1.0	1.4 ± 0.3
Alveofact®		3.8 ± 0.7		
ARDS -3 h	1072 ± 142	8.8 ± 2.5	1.0 ± 0.2	0.3 ± 0.069
24 h (n = 24)	8494 ± 1737***	7.3 ± 1.3	3.3 ± 0.6 **	1.8 ± 0.5 **
72 h (n = 22)	4474 ± 852 ***	13.1 ± 5.5 ***	2.4 ± 0.4 *	1.2 ± 0.4 **

Dargestellt ist der SP-A und SP-B-Gehalt von gesunden Kontrollen, dem exogenen Surfactantpräparat Alveofact® sowie den ARDS-Patienten vor (-3 h) und 24 h sowie 72 h nach transbronchialer Surfactanttherapie. Gegeben sind die Mittelwerte ± SEM der absoluten [ng/ml] oder relativen [in % der PL] Konzentration von SP-A und SP-B in der nativen BAL wie auch die relative Konzentration innerhalb der LSA-Fraktion (in % der PL im Pellet). Dargestellt wurde auch das Verhältnis von SP-A/SP-B zum Gesamtprotein (in % des Gesamtproteins). Statistische Analysen wurden vergleichend an der -3 h-BAL für die anderen BAL-Kollektive durchgeführt, die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) erscheint in der Tabelle wie folgt: * (p < 0.05), ** (p < 0.01) und *** (p < 0.001).

- Surfactant-Apoprotein (SP)-A

Die Konzentration an SP-A in der BAL [ng/ml] war bei den unbehandelten Patienten mit ARDS im Vergleich zur Kontrolle stark vermindert. Die absolute Konzentration dieses Apoproteins blieb auch nach Surfactant-Applikation über den Zeitraum von 72 h konstant (Tabelle 4). Aufgrund der Erhöhung des Phospholipidgehaltes in der BAL nach Surfactantapplikation ließ sich ein höchst signifikanter Abfall des SP-A/PL-Quotienten (% PL der BAL) innerhalb des 24 h und auch 72 h nach Surfactantgabe nachweisen. Als Ausdruck des ausgeprägten Plasmaprotein“leakage“ war der SP-A/Protein-Quotient (% Protein) bei den ARDS Patienten stark vermindert und blieb von der Surfactantapplikation unbeeinflusst (Tabelle 5).

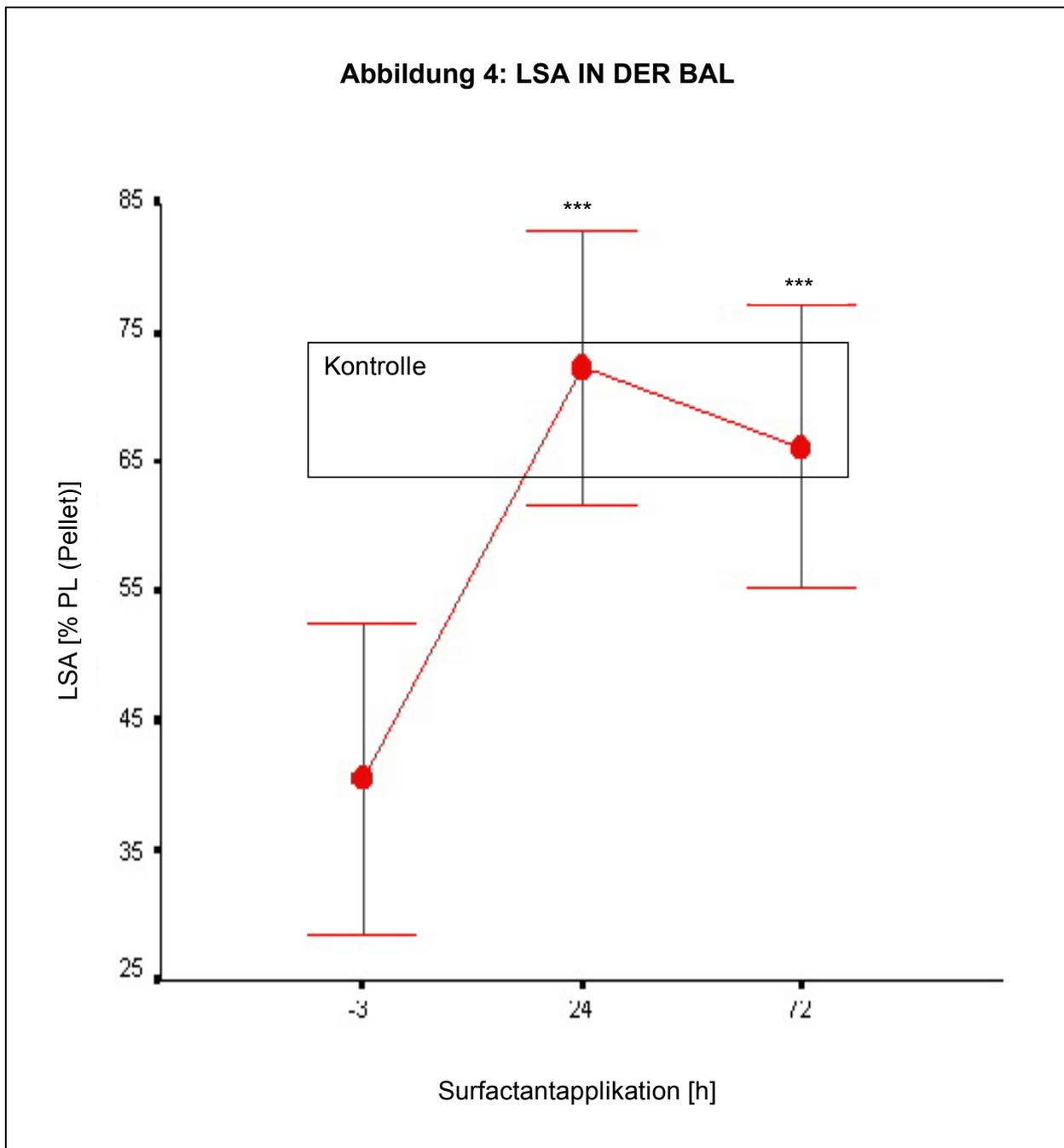
- Surfactant-Apoprotein (SP)-B

Im Vergleich zu den Kontrollen war die absolute Konzentration an SP-B in der BAL [ng/ml] bei den unbehandelten ARDS-Patienten nicht erniedrigt, auch der relative SP-B-Gehalt (bezogen auf die PL) in der BAL war eher erhöht. Innerhalb der LSA-Fraktion fand sich hingegen bei den unbehandelten ARDS-Patienten ein deutlicher Abfall der relativen Konzentration an SP-B (Tabelle 5). Auch im Verhältnis zum Gesamtprotein war der SP-B Gehalt deutlich reduziert. Nach Surfactantapplikation war zu beiden Beobachtungszeitpunkten ein signifikanter Anstieg der relativen SP-B Konzentrationen in den LSA festzustellen. Auch die absolute Konzentration in der BAL-Flüssigkeit war signifikant erhöht.

Ergebnisse

4.2.6. Relativer Anteil der *large surfactant aggregates* (LSA)

Die LSA-Fraktion konnte durch 48.000 xg Ultrazentrifugation im Pellet gewonnen werden. Im Vergleich zu Lungengesunden war der relative Anteil der LSA in der BAL vor Surfactantapplikation stark reduziert, stieg aber nach Surfactantsubstitution signifikant (24 h und 72 h post $p < 0.001$) an. Die Ergebnisse sind in der folgenden Graphik dargestellt:

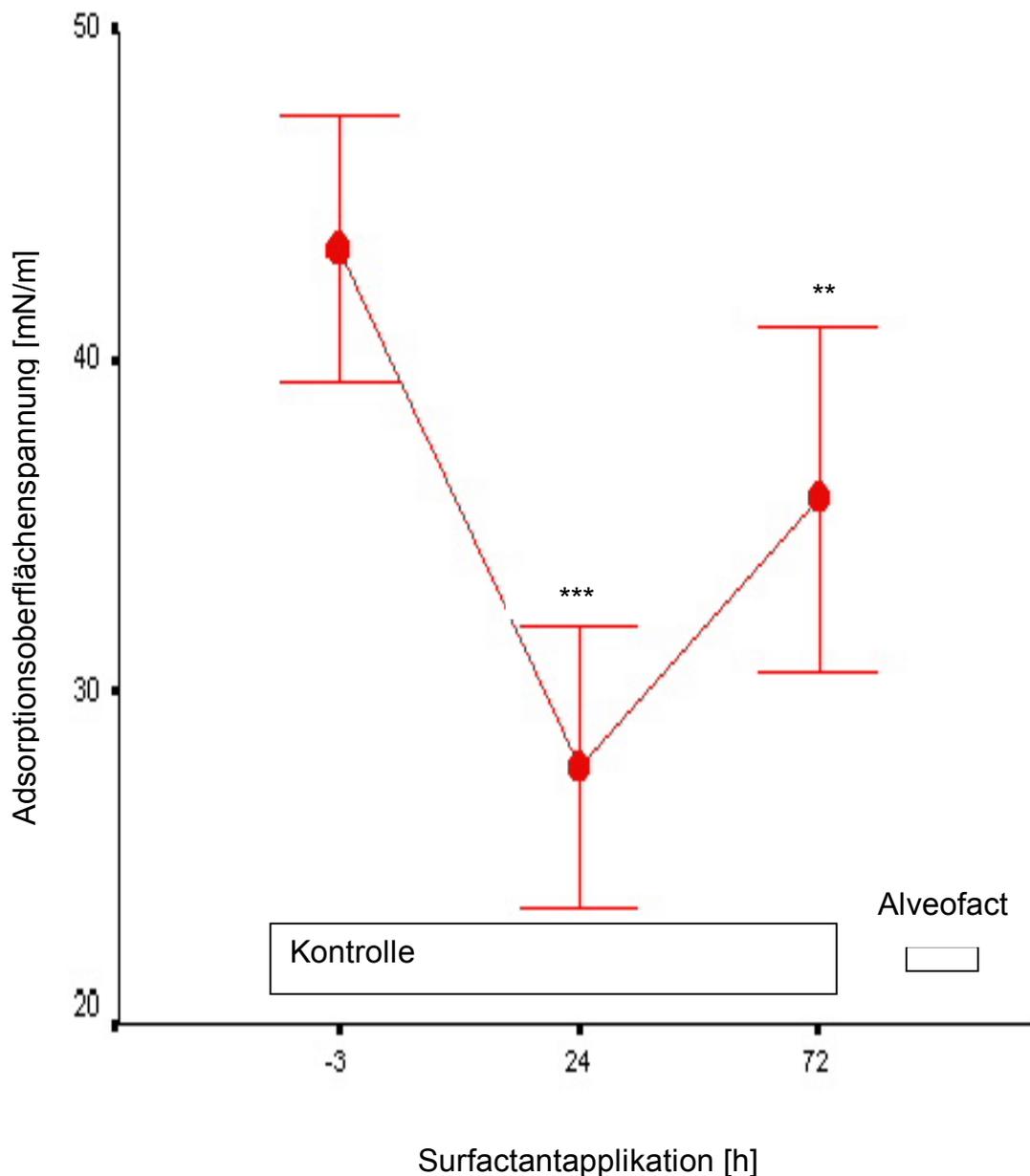


Der relative Anteil der LSA ist zu den jeweiligen BAL-Zeitpunkten (-3 h, 24 h, 72 h) als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Parameter der 24 h- und 72 h-BAL wurden mit den Ergebnissen der -3 h-BAL verglichen, die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) beträgt für die 24 h- (n = 21) und 72 h-Parameter (n = 21) $p < 0.001$ (***).

4.3. ERGEBNISSE DER BIOPHYSIKALISCHEN UNTERSUCHUNGEN

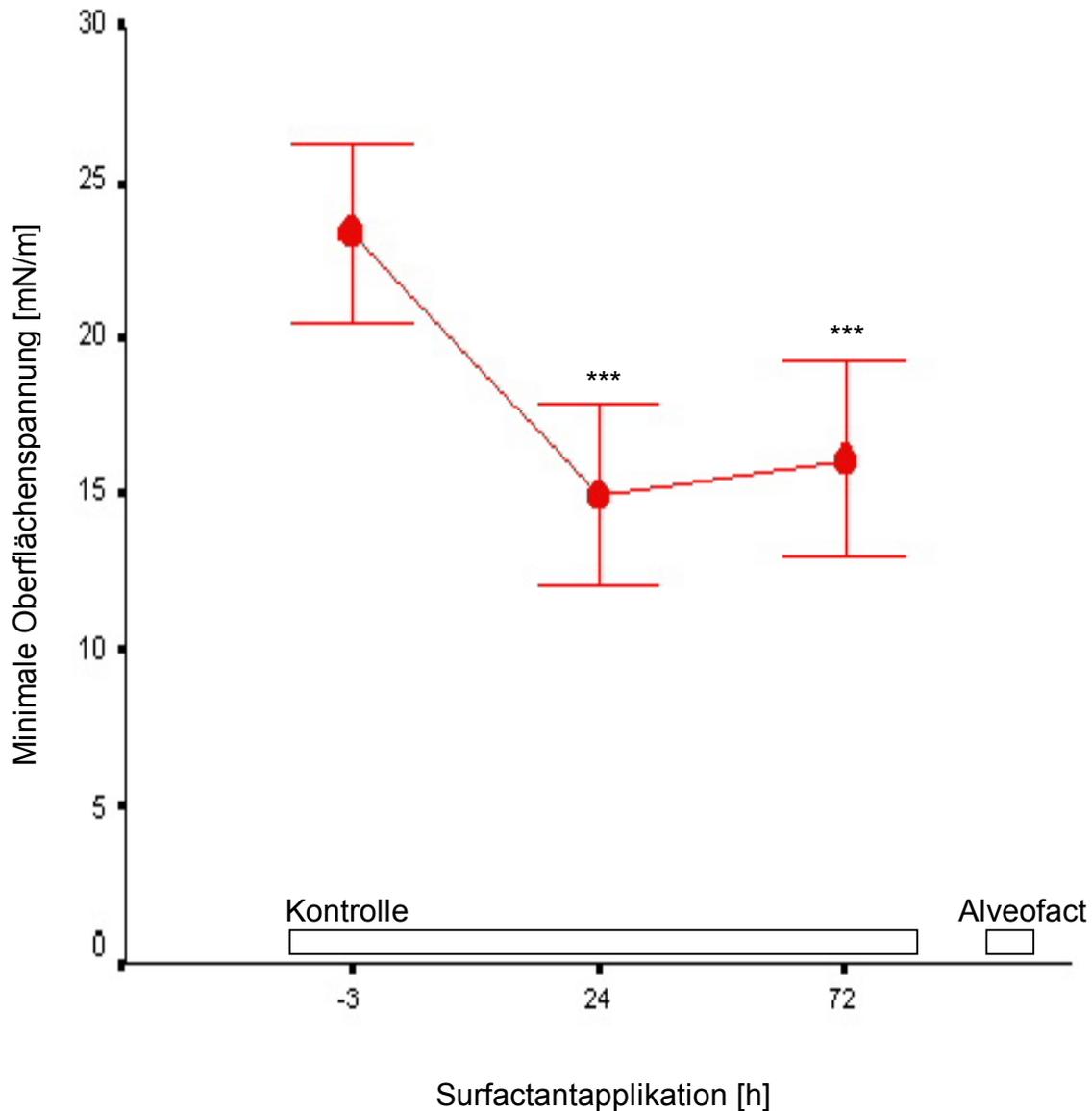
4.3.1. Oberflächenaktivität in Abwesenheit von Plasma-Proteinen

Large surfactant aggregates von Lungengesunden weisen exzellente („physiologische“) Oberflächenspannungseigenschaften auf. So betrug im hier verwendeten Pulsating Bubble Surfactometer die Oberflächenspannung nach 12 Sekunden Adsorption (γ_{ads}) etwa 22 mN/m und nach 5 Minuten Filmoszillation (γ_{min}) um 0 mN/m. Die LSA-Fraktion der ARDS-Patienten zeigte vor Surfactantapplikation (-3 h) deutlich erhöhte Oberflächenspannungswerte sowohl in der statischen (γ_{ads}) wie der dynamischen (γ_{min}) Messung. Nach transbronchialer Surfactanttherapie war eine deutliche Besserung der oberflächenspannungsreduzierenden Eigenschaften zu beobachten (Abbildung 6), wobei 24 h nach Applikation die „besten“ Oberflächenspannungswerte zu beobachten waren und 72 h post Applikation die Verbesserungen zum Teil rückläufig waren (Abbildung 6). Während die γ_{ads} -Werte 24 h nach Applikation dem Normbereich recht nahe kamen, betrug die minimale Oberflächenspannung nach 5 Minuten Filmoszillation (γ_{min}) 24 h nach Surfactantapplikation immer noch ~ 15 mN/m und unterschied sich somit deutlich von den Oberflächenspannungswerten gesunder Kontrollen und des applizierten Materials (Abbildung 6)

Abbildung 5.1: OBERFLÄCHENSpannung nach 12 sec. ADSORPTION (γ ads)

Die Oberflächenspannung (γ ads) nach 12 Sekunden Adsorption ist für die ARDS Patienten vor (-3 h) sowie 24 h (n = 24) und 72 h (n = 21) nach Surfactanttherapie als Mittelwert \pm SEM gegeben. Als Vergleich wurde der 2s-Bereich sowohl von gesunden Probanden als auch des applizierten Surfactantmaterials (Alveofact®) als Rechteck in die Grafik eingefügt. Die 24 h- und 72 h- Pellets wurden mit den Ergebnissen des -3 h-Pellets verglichen, die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) beträgt $p < 0.001$ (***) bzw. $p < 0.05$ (**).

Abbildung 5.2.: MINIMALE OBERFLÄCHENSPIGUNG (γ_{\min})

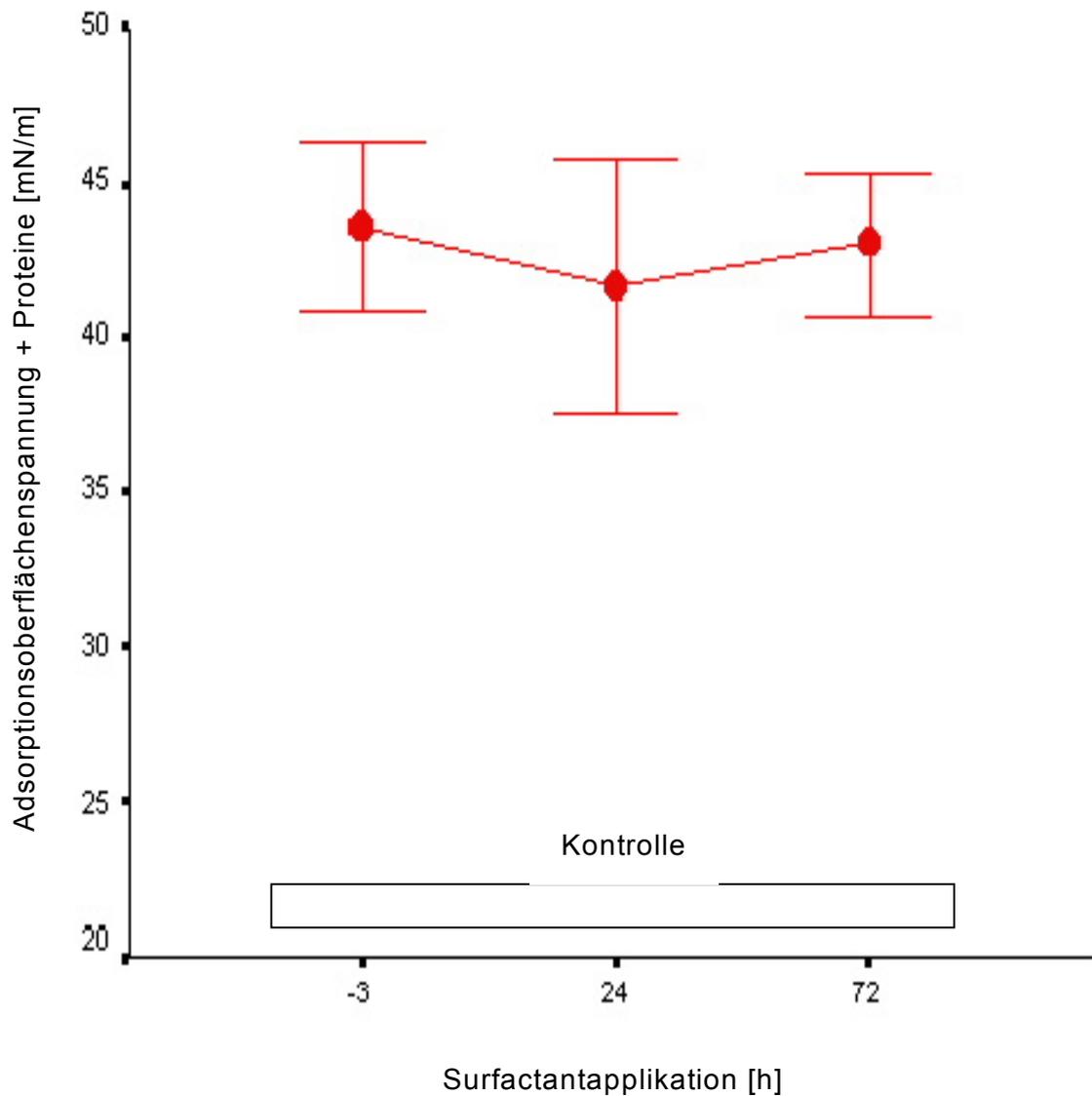


Die Oberflächenspannung (γ_{\min}) nach 5 Minuten Filmoszillation ist für das Kollektiv der ARDS Patienten vor (-3 h) sowie 24 h (n = 18) und 72 h (n = 16) nach Surfactanttherapie als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Als Vergleich wurden wiederum der 2s-Bereich von Lungengesunden sowie der des applizierten Surfactantmaterials (Alveofact®) als Rechteck in die Grafik eingefügt. Die 24 h- und 72 h- Pellets wurden mit den Ergebnissen des -3 h- Pellets verglichen, die Irrtums-wahrscheinlichkeit (p) beträgt für γ_{\min} p < 0.05. Für γ_{\min} im Vergleich zum 72 h- Pellet konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden.

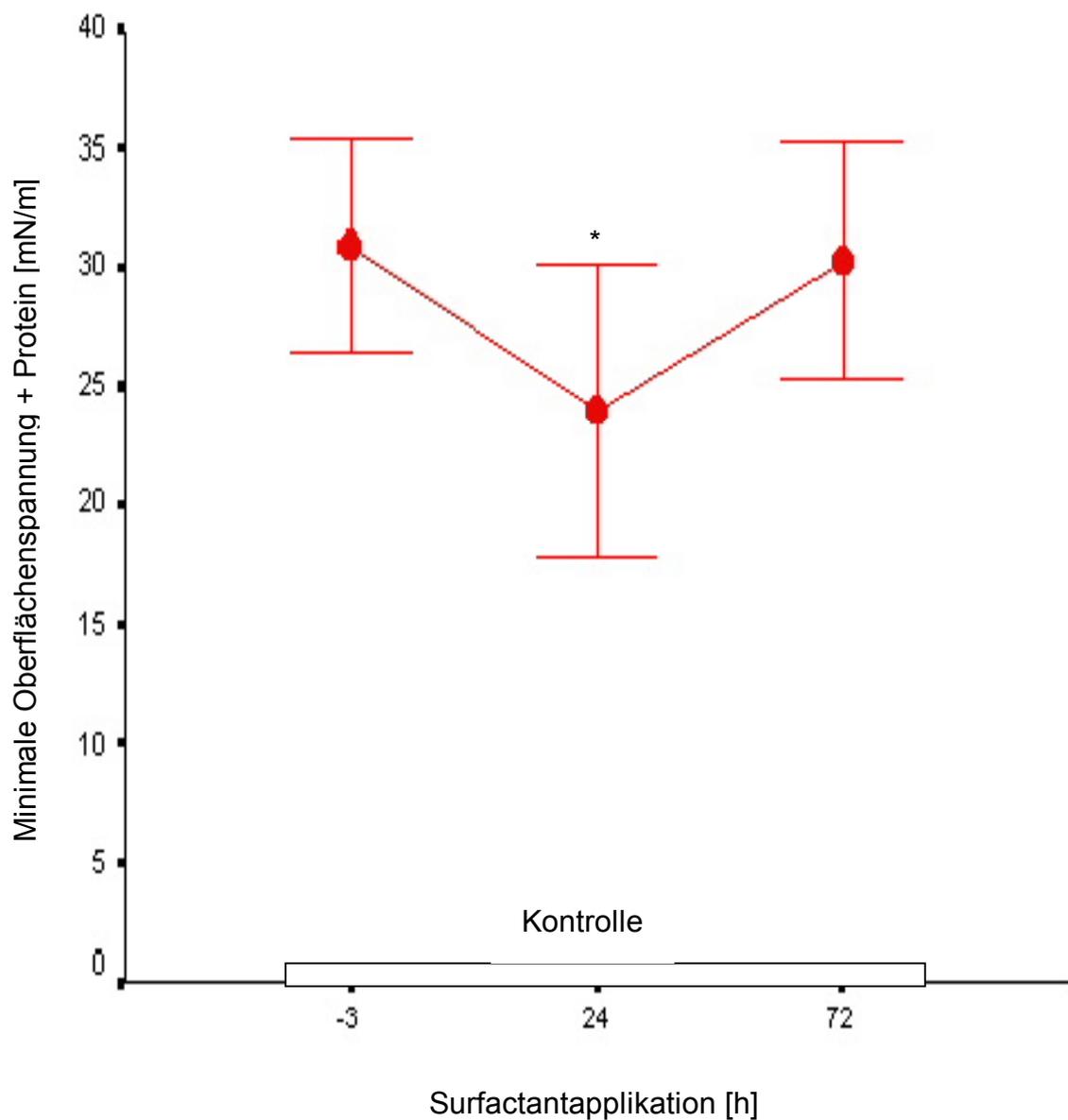
4.3.2. Biophysikalische Eigenschaften in Gegenwart der BAL-Proteinen

Nachdem im Rahmen der Isolierung der large surfactant aggregates (48000 x g Zentrifugation) die Proteinfraction der BAL mit Ausnahme der Surfactant-Apoproteine weitgehend abgetrennt wurde, wurde zur Erfassung eines möglichen Einflusses dieser BAL-Proteine auf die Surfactantfunktion eine nachträgliche Rekonstitution der LSA-Fraktion mit den Proteinen derselben BAL und im selben ursprünglichen Verhältnis durchgeführt. Eine solche Rekonstitution mit den Proteinen entsprechend dem Phospholipid-Protein-Quotienten der BAL blieb ohne Effekt auf die Oberflächenaktivität im Falle der gesunden Kontrollen, ergab aber eine deutliche Verschlechterung der Adsorptions-Oberflächenspannung (γ_{ads}) wie auch der minimalen Oberflächenspannung (γ_{min}) bei den unbehandelten ARDS Patienten. Auch bezüglich dieses Parameters konnte durch die transbronchiale Surfactanttherapie eine gewisse Verbesserung der Oberflächenspannungsverhältnisse erreicht werden, wenngleich eine Signifikanz diesbezüglich nur für den γ_{min} Wert 24 h nach Applikation zu beobachten war. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in der folgenden Graphik dargestellt, aufgrund des teilweise sehr geringen Anteils an LSA konnte diese zusätzliche Charakterisierung in vielen Fällen nicht durchgeführt werden.

Abbildung 6.1.: γ_{ads} DER LSA IN GEGENWART DER BAL-PROTEINE



Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM der γ_{ads} der LSA Fraktion in Gegenwart der BAL Proteine von den ARDS Patienten vor (- 3 h) sowie nach (24 h, 72 h) nach transbronchialer Surfactanttherapie. Die 24 h- (n = 24) und 72 h-Pellets (n = 21) wurden mit den Ergebnissen des -3 h-Pellets verglichen. Für die dargestellten Parameter konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurden in der Grafik die Werte von lungengesunden Probanden dargestellt.

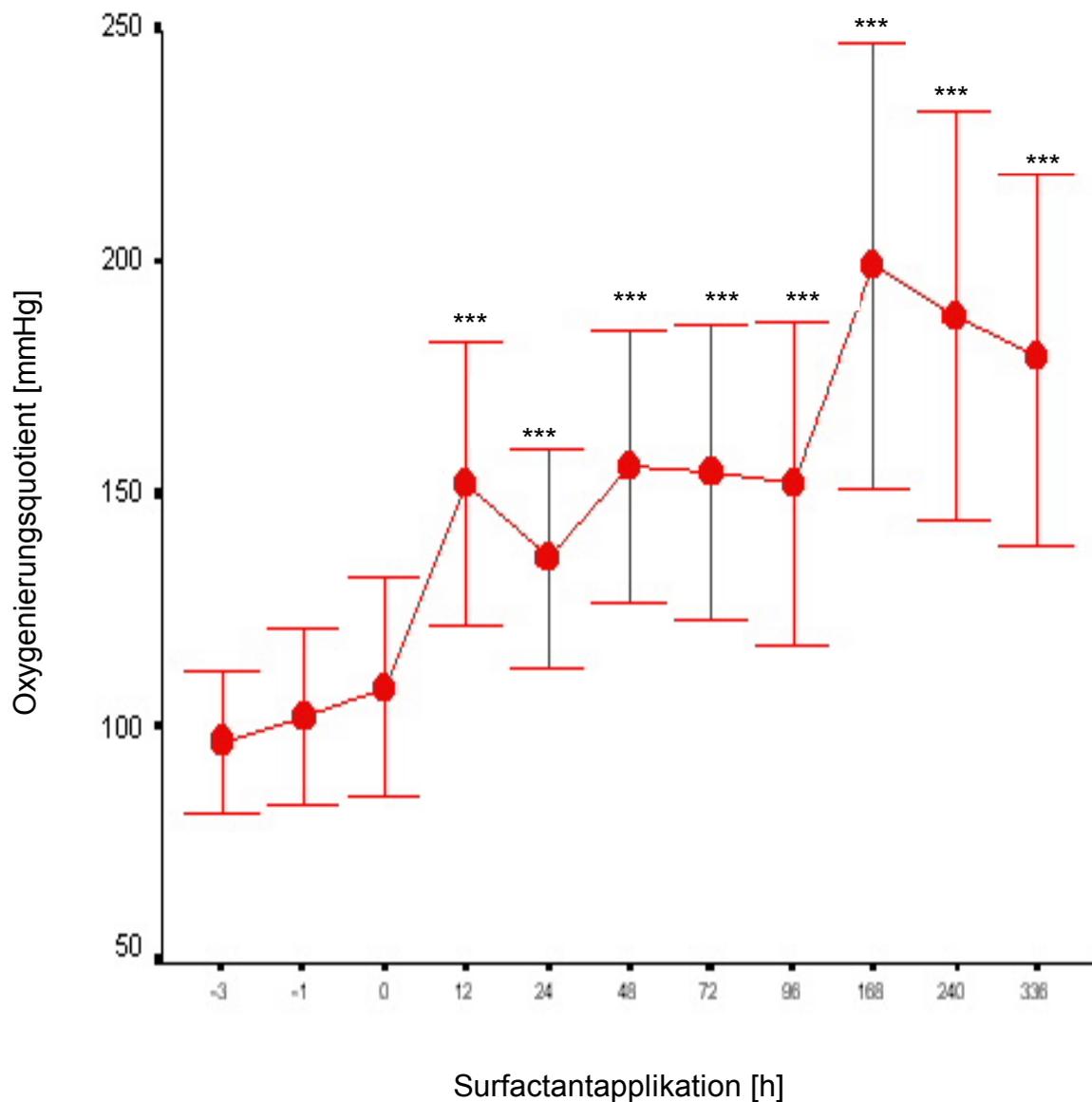
Abbildung 6.2.: γ_{\min} NACH REKONSTITUTION MIT BAL-PROTEINEN

Die minimale Oberflächenspannungen der LSA-Fraktion nach Rekonstitution mit den BAL-Proteinen ($P_{\gamma \min.}$) ist als Mittelwert angegeben. Die 24 h- ($n = 18$) und 72 h Pellets ($n = 16$) wurden mit den Ergebnissen des -3 h-Pellets verglichen, die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) betrug für $\gamma_{\min.}$ zum Zeitpunkt 24 h $p \leq 0.05$ (*). Für die anderen Parameter konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

4.4. KLINISCHE PARAMETER

Oxygenierungsquotient ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)

Der errechnete Oxygenierungsquotient aus arteriellem Sauerstoff-Partialdruck und relativem Gehalt an Sauerstoff der Inspirationsluft des Respirators ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) wurde während einer Zeitspanne von 3 h vor bis 336 h nach Surfactantapplikation gemessen. Wie in Abb. 8 ersichtlich, war nach Surfactantapplikation ein höchst signifikanter Anstieg des Oxygenierungsquotienten erkennbar. Obwohl sich im weiteren Verlauf dieser auch wieder partiell verschlechterte, waren doch alle nach Therapie ermittelten Werte signifikant besser als der Ausgangswert.

Abbildung 7: OXYGENIERUNGSQUOTIENT ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)

Gegeben ist der Mittelwert +/- SEM des Oxygenierungsquotienten der ARDS Patienten im zeitlichen Verlauf (-3 h – 336 h). Die Anzahl (n) der zugrundeliegenden Patienten beträgt bis zum Zeitpunkt 96 h: n = 25, 168 h – 240 h: n = 21 und 336 h: n = 16. Die Surfactantapplikation erfolgte zum Zeitpunkt 0 h, bei 7 Patienten wurde eine 2. Applikation nach 24 h durchgeführt. Alle Ergebnisse nach Applikation wurden mit den -3 h-Werten verglichen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) betrug $p \leq 0.001$ (***) bzw. $p < 0.01$ (**).

5. DISKUSSION

5.1. Veränderungen der Oberflächenaktivität bei ARDS Patienten

In der vorliegenden Studie konnte ein massiver Anstieg der minimalen Oberflächenspannung, wie auch Oberflächenspannung nach Adsorption bei ARDS Patienten beobachtet werden. Im Vergleich hierzu wurden in der BAL des Kontrollkollektives, aus lungengesunden nichtrauchenden Probanden bestehend, minimale Oberflächenspannungswerte (γ_{\min}) von annähernd 0 mN/m gemessen. Sämtliche Messungen erfolgten unter einer standardisierten Phospholipidkonzentration von 2 mg/ml. Dies deckt sich mit den Ergebnissen bereits publizierter Studien [59, 62, 63]. Folglich kann eine enge Korrelation der in vitro gemessenen Werte der biophysikalischen Surfactantfunktion zu der in vivo-Situation abgeleitet werden.

So wiesen die ARDS Patienten ca. 20-fach erhöhte Werte ($\gamma_{\min} \sim 20$ mN/m), in Anwesenheit der BAL-Proteinfraktion sogar $\gamma_{\min} \sim 30$ mN/m (bei der Kontrollgruppe weiterhin ~ 0 mN/m), auf. Diese Daten decken sich mit früheren Beobachtungen von Hallman et al. [106] und später auch von Pison et al. [108] und Gregory et al. [144]. Gregory et al. beschreibt in seiner Studie ein zusätzliches Kollektiv, die „at-risk-ARDS“-Patienten, deren Surfactanteigenschaften in der BAL zwar in geringerer Ausprägung, jedoch sonst denen der ARDS-Patienten sehr ähnlich sind.

Entsprechend der minimalen Oberflächenspannung verhält sich die Adsorptionsoberflächenspannung bei ARDS Patienten. Hier liegen die Werte ebenfalls in ca. 2-fach erhöhten Bereichen ($\gamma_{\text{ads}} \sim 44$ mN/m) zur Norm gesunder Probanden (um ~ 22 mN/m).

Eine Erklärung dieser Beobachtungen ist in einer drastischen Beeinträchtigung der oberflächenaktiven Eigenschaften des Surfactantsystems zu suchen. So spielen mehrere Störfaktoren, wie z.B. ein deutlich verminderter Anteil von LSA, der biophysikalisch aktiven Fraktion des oberflächenaktiven Materials, sowie eine Inhibition durch erhöhten Plasmaproteine bei ARDS Patienten eine Rolle. Auf die Inhibitionsmechanismen wird im Folgenden noch näher eingegangen werden.

5.2. Biochemische Veränderungen der Surfactanteigenschaften vor Surfactanttherapie

Vergleicht man das Phospholipid-Profil der Kontrollgruppe mit dem der ARDS Patienten, so stellt sich eine signifikante Veränderung des PL-Profiles sowie des Gesamtphospholipidgehaltes dar. In ähnlicher Weise wurde von anderen Autoren eine charakteristische Abnahme des Gesamt-PL-Gehaltes sowie der relativen Anteile von Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylglycerol (PG) im einzelnen und eine Zunahme des relativen Anteils von Sphingomyelin (SPH), Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylethanolamin (PE) für ARDS-Patienten beschrieben [106, 144, 175].

Die „großen Surfactantaggregate“ (LSA) werden durch Ultrazentrifugation (48.000 xg) gewonnen [155]. Sie stellen die biophysikalisch aktive Fraktion des oberflächenaktiven Materials dar. Bei den ARDS Patienten liegt vor Surfactanttherapie ein massiv verminderter Anteil dieser Fraktion vor. Dies deckt sich ebenfalls mit früheren Untersuchungen und könnte auf einen beschleunigten Metabolismus oder eine verminderte Synthese/ Sekretion des Surfactants hinweisen [155, 156, 167, 172].

In jüngster Zeit mehren sich Berichte, denen zufolge der metabolische Zyklus des extrazellulären Surfactantmaterials durch eine enzymatische Aktivität vermittelt wird. Eine Carboxylesterase, entsprechend als „Convertase“ bezeichnet, wurde identifiziert und kann auch in vitro die Konversion großer Surfactantaggregate unter zyklischen Oberflächenveränderungen induzieren. In wie weit dieses Enzym oder auch andere (z.B. Makrophagen Esterase) unter pathologischen Bedingungen hochreguliert werden und somit für die Inbalance der alveolären Surfactantsubtypen verantwortlich sind, bleibt gegenwärtig offen. Attraktiv erscheint ein solches Konzept natürlich vor dem Hintergrund einer möglich therapeutischen Intervention.

Da das ARDS eine akut inflammatorische Erkrankung darstellt, erwartet man einen erhöhten alveolären Proteinanteil in der BAL. Diese Vermutung ließ sich anhand der vorliegenden Studie eindrucksvoll bestätigen. Aufgrund des pathologisch erhöhten Proteingehaltes ergibt sich folglich ebenfalls ein pathologisch verschobener Phospholipid-Protein-Quotient beim ARDS und entsprechend, ein ausgeprägter Hemmeffekt auf die Oberflächenspannungsregulation.

Des weiteren zeigten sich vor Surfactantapplikation bei den rekrutierten ARDS Patienten deutliche Veränderungen des Apoprotein-Profiles, in BAL wie auch in der LSA-Fraktion. So ließen sich deutlich verminderte SP-A-Konzentrationen in der BAL aufzeigen. Dies korreliert ebenfalls mit bereits vorliegenden Studien bei ARDS [82,

Diskussion

144, 157]. Aufgrund des gleichzeitigen Absinkens des Gesamtlipidgehaltes ergab sich für den Quotienten von SP-A und dem Gesamtlipidgehalt vor Surfactantapplikation im Vergleich zu den Werten der lungengesunden Probanden kein signifikanter Unterschied. In der Baselineperiode vor Substitution wiesen die ARDS-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe in der BAL erhöhte SP-B-Werte auf [158]; ein Befund, der scheinbar im Widerspruch zu den durch Gregory et al [144] veröffentlichten augenfällig verminderten SP-B-Konzentrationen in der BAL von ARDS-Patienten steht. Im Vergleich der Studienergebnisse darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, daß in der vorliegenden Studie eine spezielle Methodik zur SP-B-Bestimmung aus dem original Lavagematerial („solid phase adsorption ELISA“ von Krämer et al [143]) angewandt wurde; während Gregory et al [144] die sogenannte „sandwich-ELISA-Technik“ aus dem ultrazentrifugierten Pellet (48.000 xg) zur Anwendung brachten. Die von uns später durchgeführten Untersuchungen des SP-B in LSA ergeben in Übereinstimmung mit Gregory et al einen reduzierten SP-B-Gehalt.

5.3. Surfactantinhibition

Wie bereits zuvor beschrieben, kommt es beim ARDS zu einer ausgeprägten pulmonalen Schrankenstörung mit erhöhter vaskulärer Permeabilität und daraus resultierendem Proteinflux in das alveoläre Kompartiment. Einige Autoren haben den Pathomechanismus der Surfactant-inhibition sowohl für synthetische als auch für natürliche Surfactantpräparate bereits beschrieben [55, 112, 114, 115, 171, 172]. Wesentlich für die Inhibition durch lösliche Plasmaproteine sind Albumin, Hämoglobin und vor allem Fibrinogen. Durch eine Lavage mit Serum oder Plasma läßt sich tierexperimentell ein ARDS ähnliches Krankheitsbild, mit einer entsprechenden Einschränkung des Gasaustausches, initiieren. Das Ausmaß einer Protein-Inhibition pulmonalen Surfactants ist aber nicht nur von der Art des Plasmaproteins, sondern auch von dem Surfactant Apoprotein-Profil abhängig. So zeigten sich im Rahmen von in vitro-Studien mittels verschiedener Surfactantpräparationen mit unterschiedlichem Apoproteinanteil eine individuelle „Resistenz“ gegenüber einer Proteininhibition und somit eine Bewahrung der funktionellen Integrität des Surfactantsystems (dokumentiert anhand vergleichender Oberflächenspannungsmessungen) [15, 30, 171]. Surfactant Apoprotein-freie Präparationen weisen demnach den höchsten, die mit beiden hydrophoben Apoproteinen supplementierten Surfactant Präparationen den geringsten Sensitivitätsgrad

gegenüber löslichen Plasmaproteinen auf. Auch die Zugabe von SP-A vermag die Protein Sensibilität weiter zu reduzieren [13].

In der vorliegenden Arbeit konnte der massive Anstieg des Proteingehalts in der BAL von ARDS Patienten im Vergleich zu den Normwerten der lungengesunden Kontrollgruppe eindrucksvoll aufgezeigt werden. Mittels der bei allen BAL Proben durchgeführten Ultrazentrifugation (48.000 xg) wurde der Großteil der BAL Proteine zwar von der oberflächenaktiven Surfactantfraktion (LSA) getrennt, die Surfactantaktivität war jedoch wie oben aufgeführt, bereits in diesem aufgereinigten Material drastisch reduziert. Neben der sicherlich hauptsächlich verantwortlichen Änderung der Zusammensetzung könnte eine Pelletierung großer Proteine bei der Ultrazentrifugation (48.000 xg) und der hieraus bedingte sekundäre Aktivitätsverlust eine Rolle spielen. Ein wesentlicher Kandidat für solche Vorgänge könnten Fibrin Oligomere sein. Der Übergang von löslichem Fibrinogen zu unlöslichem Fibrin ist mit einer Steigerung der Surfactant-inhibitorischen Potenz um mehr als 2 Zehnerpotenzen vergesellschaftet [121]. Wesentlicher Grund hierfür ist ein nahezu kompletter Einbau aller hydrophoben Surfactantkomponenten in das polymerisierende Fibringerüst. Die Hemmung der Surfactantfunktion durch Fibrin stellt den bedeutendsten Hemmmechanismus überhaupt dar. Unabhängig hiervon belegt der direkte Vergleich der Oberflächenspannungswerte vor und nach Konstitution mit den Proteinen der individuellen BAL den Zusammenhang zwischen der alveolären Protein-„last“ und den erheblichen Funktionseinbußen des Surfactantsystems, die zu der bedrohlichen Störung des Gasaustausches dieser ARDS Patienten beitragen.

Zusätzliche Mechanismen der Surfactantinhibition, wie z.B. Veränderungen der Apoproteine durch Proteasen und Sauerstoffradikale [118, 123] sowie Phospholipidspaltung [119] durch Phospholipasen sind für das ARDS im Rahmen experimenteller Studien bekannt geworden. In welchem Ausmaß diese zusätzlichen Mechanismen die Störung der funktionellen Integrität des Surfactantsystems mitbegründen bzw. aggravieren, läßt sich derzeit noch nicht ausreichend beurteilen. Im Hinblick auf die Suche nach möglichen neuen Therapiestrategien zur Behandlung des schweren ARDS, sind diese Mechanismen jedoch weiterhin Gegenstand aufwendiger Forschungsprojekte.

5.4. Effekte einer Surfactantapplikation auf den Gasaustausch

Als Maß zur Beurteilung der klinischen Effektivität der exogenen Surfactantapplikation bei Patienten im ARDS wurde bei den meisten aktuellen

Diskussion

Studien der Oxygenierungsquotient ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) herangezogen. Die anderen in der vorliegenden Studie untersuchten biochemischen und biophysikalischen Parameter fanden in anderen Studien nur teilweise bzw. gar keine Beobachtungsanwendung, so daß Vergleiche nur unvollständig und erschwert möglich sind.

In der vorliegenden Studie stellte sich vor Surfactantapplikation eine drastische, vital bedrohliche Verminderung des Oxygenierungsquotienten dar. Bereits in den ersten 24 h nach tranbronchialer Surfactantapplikation mit jeweils 300 mg/kg KG Alveofact® kam es zu einer signifikanten dramatischen Verbesserung des Oxygenierungsindex, teilweise sogar unter Verdopplung der Ausgangswerte. Diese augenfällige Verbesserung hielt bei einigen Patienten bis zu 336 h nach Applikation an. Schließlich erhielt ein Teil der ARDS Patienten, die sich in den ersten 18 –24 h nach Ersts substitution erneut drastisch verschlechterten, jetzt eine wiederholte Surfactantapplikation mit einer Dosis von 200 mg/kg KG Alveofact®. Unter dieser wiederholten Applikation erfolgte ein erneuter Anstieg des Oxygenierungsindex auf ein Vielfaches der Ausgangswerte.

In vergleichbaren Studien wie z.B. von Gregory et al. [152], Spragg et al. [153], Wiswell et al. [159] sowie einigen Kasuistiken [160, 161, 162, 163] kam es nach exogener Surfactantapplikation ebenfalls zu einer drastischen Verbesserung der Oxygenierungssituation und des Oxygenierungsindex, allerdings in der Regel weniger prominent im Vergleich zu dieser Studie. Eine mögliche Ursache hierfür ist in der unterschiedlichen Applikationsart zu suchen (intratracheale Instillation versus bronchoskopische Applikation). Im Rahmen zahlreicher experimenteller ARDS Studien am Tiermodell [164, 165, 166, 167, 168] konnte schon vor Jahren der positive Effekt einer exogenen Surfactantapplikation auf den Gasaustausch aufgezeigt werden.

5.5. Einfluß einer Surfactantapplikation auf die Surfactantzusammensetzung

Vergleicht man die Werte der einzelnen Surfactantkomponenten vor und nach transbronchialer Surfactantapplikation bleibt zu beachten, daß das verwendete Kälberlungenpräparat (Alveofact®) aus Phospholipiden, Neutrallipiden, SP-B und SP-C besteht.

Etwa 24 h nach transbronchialer Surfactantapplikation zeigt sich eine fast vollständige Normalisierung sowohl des Gesamtphospholipidgehaltes wie auch des Phospholipidprofils, vergleichbar mit den Werten der Kontrollgruppe. Differenzierter betrachtet kam es zu einem prozentualen Anstieg von PC und PG sowie zu einem

Abfall von SPH, PI, PE und PS. Die gleichen Beobachtungen der verminderten Gesamtphospholipidkonzentrationen bzw. Veränderungen des PL-Profiles in der BAL bei ARDS Patienten konnten bereits durch länger zurückliegende Studien sowohl bei ARDS-Patienten [106, 108, 144] als auch bei Patienten mit schwerer bakterieller Pneumonie [149] und „AIDS-related-pneumonia“, wie z.B. Pneumocystis-carinii-Pneumonien [150, 151] aufgezeigt werden. In vergleichbaren Studien von Gregory et al. [152, Spragg et al. [153] und Haslam et al [154] ließen sich trotz Unterschieden bezüglich der Surfactantapplikation und Durchführung einer Kontroll-BAL zu einem späteren Zeitpunkt (120 h post Surfactantapplikation versus 24 h und 72 h), die gleichen Tendenzen der Normalisierung des Gesamt-PL-Gehaltes im Vergleich zu Normwerten von Lungengesunden aufzeigen.

Des weiteren ließ sich vor Surfactantapplikation in der Gruppe der ARDS Patienten ein deutlich verminderter Anteil an großen Surfactantaggregaten (LSA), der biophysikalisch aktiven Subfraktion des alveolären Surfactantpools aufzeigen, der jedoch in den ersten 24 h nach Surfactantapplikation bereits wieder vergleichbare Werte Lungengesunder erreichte. Leider liegen keine Daten über das Verhalten großer Surfactantaggregate vor und nach exogener Surfactantapplikation in den vergleichbaren Studien von Gregory et al und Spragg et al vor. Der SP-B-Anteil innerhalb des LSA-Pools war nach Surfactantapplikation deutlich erhöht, erreichte jedoch nicht vollständig das Niveau der Kontrollgruppe. Hierbei ist jedoch der Gehalt an SP-B im verwendeten exogenen Surfactantmaterial zu beachten. Ähnlich verhält es sich bezüglich des SP-A-Gehaltes nach transbronchialer Surfactantapplikation. Hier konnten nach Therapie weiterhin nur sehr niedrige bzw. sogar niedrigere SP-A-Werte gemessen werden, zumal das verwendete Kälberlungenextrakt (Alveofact®) keinen SP-A-Anteil enthält.

Aufgrund des hohen alveolären Proteinanteils der BAL bei ARDS Patienten, zeigte sich trotz Applikation hoher Dosen des Surfactantpräparates zu den Zeitpunkten 24 h und 72 h keine Normalisierung des Phospholipid-Protein-Quotienten.

5.6. Surfactantapplikation – Veränderungen der Oberflächenspannung

Nach erfolgter transbronchialer Surfactantapplikation konnte in der nachfolgenden BAL eine signifikante Verbesserung der minimalen Oberflächenspannung (γ_{min}) von ~ 23 mN/m auf ~ 14 mN/m (24 h), bzw. ~ 22 mN/m (72 h) festgestellt werden. Eine solche Beeinflussung der alveolären Oberflächenspannung

Diskussion

war in vergleichbaren Studien [152, 153] nicht gefunden worden, aber hierfür sind möglicherweise die sehr langen Zeiträume bis zur Re-Analytik (120 h) verantwortlich. Die Tendenz zu einer Abnahme der minimalen Oberflächenspannung war jedoch auch hier erkennbar.

Zur Bestimmung der Oberflächenspannungen wurde in allen Studien das „Pulsating-Bubble-Surfactometer“ als standardisierte Meßmethode verwandt. Die Oberflächenspannung nach 12 sec Filmadsorption (γ_{ads}) zeigte post Surfactanttherapie ebenfalls eine Verbesserung von ~ 44 mN/m vor Therapie auf ~ 27 mN/m. So ist hinsichtlich der Oberflächenspannungsverhältnisse durch eine exogene transbronchiale Surfactanttherapie zwar eine Verminderung der vor Therapie drastisch erhöhten Werte zu erzielen, von einer Normalisierung im Vergleich zu Lungengesunden kann jedoch nicht gesprochen werden. Darüber hinaus ist im zeitlichen Verlauf eine erneute leichte Verschlechterung der Oberflächenspannung zu beobachten, die gegebenenfalls eine vermehrte Inhibition des applizierten Materials nahe legt.

5.7. Mögliche Ursachen einer unvollständigen Normalisierung der biochemischen und biophysikalischen Surfactanteigenschaften nach Therapie

Eine Ursache hierfür liegt in der massiven Proteinbelastung der ARDS BALs (s.o.). Dies wird augenscheinlich durch die Messung der entsprechenden Oberflächenspannungen nach Rekombination mit den individuellen BAL-Proteinen. Wie bereits vorbeschrieben, kann trotz Ultrazentrifugation bei 48.000 xg nicht sicher ausgeschlossen werden, daß zusätzlich hochmolekulare Proteine, wie z.B. Fibrinologomere mit den LSA pelletiert wurden [121] und somit zu einer funktionellen Aktivitätseinbuße der LSA-Fraktion geführt haben. Nach exogener transbronchialer Surfactantapplikation läßt sich klinisch innerhalb der folgenden 24 h bereits eine dramatische Verbesserung der Oxygenierung erzielen. Dieser Effekt hält jedoch nicht dauerhaft an. Ebenfalls zeigt sich eine signifikante Veränderungen der biochemischen Surfactantkomposition, die das Phospholipidprofil, die LSA-Fraktion sowie den SP-B-Gehalt betrifft. Sowohl die minimale Oberflächenspannung als auch die Adsorptionsoberflächenspannung zeigten nach Surfactanttherapie eine signifikante Reduktion der Ausgangswerte, jedoch keine Normalisierung. Eine Reihe von denkbaren Ursachen dieser unvollständigen Restitutio kommen hierbei in Betracht:

So kommt der Effekt der Surfactantinhibition durch Proteinbeladung [121] sowie erhöhtem Anteil an Proteasen und Phospholipasen im Rahmen des schweren inflammatorischen Geschehens, wie bereits oben beschrieben, zum Tragen. Es könnte also, trotz Anhebung des PL-Protein-Quotienten durch transbronchiale Applikation sehr großer Mengen an Surfactant, noch immer in größerem Umfang zu Inhibitionsphänomenen kommen. Dies wird ja auch durch die vorliegenden selbst erhobenen Befunde (γ min nach Rekonstitution mit BAL-Proteinen) gestützt. Im Rahmen der therapeutischen Surfactantapplikation wurde eine vielfache Menge (300 – 500 mg/kg KG) des endogenen Surfactantpools (10 – 15 mg/kg KG) bronchoskopisch instilliert. Anhand tierexperimenteller Studien konnte bei Kaninchen eine Halbwertszeit des PC von 5 – 10 h [176] sowie eine Abbaurate von 70 – 90% des exogenen Surfactantmaterials innerhalb von 24 h [51] bestimmt werden; für die Situation beim ARDS liegen keine Werte vor. Diese schon unter normalen Bedingungen recht hohe Abbaurate mag die wesentliche Erklärung dafür sein, daß substantielle Mengen des applizierten Materials bereits 24 h post Applikation nicht mehr nachweisbar sind. Diese geringe Halbwertszeit könnte auch erklären, warum Gregory et al [152] nur sehr geringe Veränderungen der biochemischen und

Diskussion

biophysikalischen Surfactantfunktionen nach Surfactantapplikation beobachten konnten. Hier erfolgte die Kontrolllavage post Therapie schließlich erst nach 120 h. Zuletzt bleibt noch festzustellen, daß der verwendete Kälberlungenextrakt zum Großteil aus Phospholipiden mit SP-B- und SP-C-Anteil besteht. Allerdings finden sich auch Neutrallipide, die zudem beim Patienten in vermehrtem Umfang nachweisbar sind. Diese haben bei Vorliegen höherer Konzentrationen ebenfalls einen inhibierenden Charakter auf die Oberflächenaktivität. Eine Normalisierung des SP-A-Gehaltes post Therapie war nicht zu erwarten, da Alveofact® kein SP-A enthält. Entsprechend kam es zu einem Abfall des relativen SP-A-Gehaltes (bezogen auf den Gesamtphospholipidgehalt).

5.8. Perspektiven der Surfactanttherapie

Die vorliegende Arbeit wurde auch unter dem Aspekt der Suche möglicher neuer Therapieaspekte zur akuten Behandlung des ARDS durchgeführt. Das Vorliegen schwerwiegender biochemischer und biophysikalischer Veränderungen des Surfactantsystems beim ARDS konnte erneut unter Beweis gestellt werden. Mittlerweile liegen eine Reihe klinischer Pilotstudien und Phase III Studien zur Surfactanttherapie des ARDS vor. Diese Studien unterscheiden sich hauptsächlich in der Art und der Dosis des zu applizierenden Surfactantmaterials sowie dem jeweiligen Modus der Applikation; so haben wir z.B. insgesamt 300 mg/kg KG in Teilfraktionen bronchoskopisch in jedes einzelne Lungensegment instilliert, wohingegen Gregory et al [152] je nach Kollektiv insgesamt 400–800 mg/kg KG eines bovinen Surfactantpräparates in repetitiven (4-8 x) Gaben endotracheal instilliert hat. Des weiteren haben Anzueto et al [169, 170] eine kontrollierte Doppelblindstudie zur Effizienz einer Surfactant-Aerosolinhalationstherapie von Exosurf®, einem Apoprotein-freien Surfactantpräparat durchgeführt, wobei bei insgesamt 112 mg/kg KG aerosolisiertem Surfactantmaterial pro Tag (gegeben über 5 aufeinanderfolgende Tagen) nur weniger als 5 mg/kg KG pro Tag des Ausgangsmaterials nachweislich in der Lunge deponiert wurde. Diese sehr niedrige Gesamtdosis des pulmonal tatsächlich deponierten Surfactantmaterials in Verbindung mit der hohen Protein-Sensitivität der Surfactant Apoprotein-freien Präparation Exosurf®, mag der Hauptgrund für den fehlenden Nachweis eines Einflusses der Surfactantapplikation auf Gasaustausch, Beatmungsdauer oder Mortalität sein. Die Ergebnisse dieser Studien, für die es also begründete Zweifel an der Richtigkeit des Studiendesigns gibt, stehen also in deutlichem Kontrast zu den

durchaus ermutigenden Pilotstudien der hier vorgelegten Studie und der Survanta® Pilotstudie von Gregory et al [152]. Obwohl nicht kontrolliert und nur an einem vergleichsweise kleinen Patientenkollektiv durchgeführt, lassen diese zwei Studien unter Verwendung eines bovinen Surfactantextraktes eine Beeinflussbarkeit von Gasaustausch und möglicherweise auch Mortalität erkennen.

Auch die jüngst propagierte „Ganzlungenlavage“ (Wiswell et al [159]) unter Verwendung eines chemisch synthetisierten SP-B-Analogons weist Mängel bzw. potentiell gefährliche Schwachstellen auf. Dieses Konzept fußt auf der Annahme durch eine Lavage mit Surfactanthaltigem Material erstens die inhibierenden Komponenten aus dem Alveolarraum entfernen zu können und zweitens eine homogene Verteilung des exogen zu applizierenden Materials gewährleisten zu können. In dieser ersten klinischen Studie an wenigen Patienten wurde allerdings deutlich, daß die langfristige Besserung des Gasaustausches kurzfristig von einer ebensolchen Verschlechterung „erkauft“ werden muß. Entsprechend kritisch muß der Einsatz eines solchen Ansatzes bei kritisch kranken beatmeten Patienten gesehen werden. In tierexperimentellen Studien konnte auch gezeigt werden, daß nach bereits 6 h der Alveolarraum erneut mit Proteinen überflutet war. Schließlich scheint auch das Argument einer Einsparung von Surfactantmaterial kein gravierendes zu sein, in dieser Studie wurde etwa die Hälfte der üblichen Dosis von 100-200 mg/kg KG verwendet.

Somit ergibt sich als Fazit, daß die exogene transbronchiale Surfactantapplikation zu einer ausgeprägten Verbesserung des Gasaustausches sowie zur Normalisierung einiger wesentlicher biochemischer und biophysikalischer Eigenschaften des Surfactantsystems bei Patienten im ARDS führen kann. Dies bedeutet zunächst einen Zeitgewinn in der akut-lebensbedrohlichen Phase der Erkrankung, die es eventuell ermöglicht, die Therapie des individuell auslösenden Ereignisses des ARDS voranzutreiben bzw. einen Übergang in ein irreversibles Stadium der Fibrosierung abzuwenden.

Allerdings bleibt die Forderung nach einer kontrollierten Studie unter Einschluß eines großen Patientenkollektives, einheitlicher Applikationsdosis des zu substituierenden Surfactantpräparates sowie dessen einheitlichen Applikationsmodus zur Überprüfung dieses Therapieansatzes bezüglich der effektiven Senkung der Mortalitätsrate beim schweren ARDS bestehen. In diesem Sinne kommt jüngsten

Diskussion

Bestrebungen, klinische Studien unter Verwendung eines auf rekombinantem SP-C basierenden Surfactants durchzuführen, eine besondere Bedeutung zu.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Für Patienten mit einem „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) ist in der Vergangenheit eine Schädigung des pulmonalen Surfactantsystems beschrieben worden. Es wurde vermutet, daß die hieraus resultierende Erhöhung der alveolären Oberflächenspannung und die damit verbundene Kollapsneigung der betroffenen Alveolen in möglicherweise erheblichem Umfang zu dem klinischen Leitsymptom der arteriellen Hypoxämie beiträgt. Vor diesem Hintergrund wurde in der hier vorgelegten Arbeit untersucht, ob bei Patienten mit schwerem ARDS infolge einer Sepsis in der Tat schwerwiegende biochemische und biophysikalische Veränderungen des Surfactantsystems auftreten und ob diese Veränderungen durch eine, im Rahmen einer klinischen Pilotstudie durchgeführten, transbronchialen Applikation eines exogenen Surfactantpräparates vom Rind (Alveofact®) beeinflussbar sind. Es wurden insgesamt 25 Patienten in die Studie eingeschlossen, die dann 300 mg/kg KG Surfactant erhielten. Im zeitlichen Verlauf wurden drei repetitive bronchoalveoläre Lavagen (BAL) durchgeführt, und zwar vor, 24 h und 72 h nach Surfactantapplikation. Als Kontrollen diente ein Kollektiv junger gesunder Probanden, bei denen ebenfalls eine Bronchoskopie mit BAL durchgeführt wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeit beruhen auf einer Reihe biochemischer (Gaschromatographie, Dünnschichtchromatographie), immunologischer (ELISA) und biophysikalischer (Pulsating Bubble Surfactometer) Meßverfahren, denen das Zell-depletierte bronchoalveoläre Lavagematerial von Patienten und Kontrollen sowie das exogene Surfactantmaterial unterzogen wurde.

Zusammenfassend ließen sich im Vergleich zur Kontrolle weitreichende biochemische und biophysikalische Veränderungen der Surfactanteigenschaften in der BAL von ARDS-Patienten vor Surfactanttherapie aufzeigen. So konnte in den bronchoalveolären Lavagen der ARDS Patienten ein drastisch verminderter Anteil an large surfactant aggregates, der normalerweise dominierenden Vorläuferstruktur des Grenzflächenfilms, des SP-A und SP-B-Gehaltes sowie ein signifikant verminderter Gesamtpospholipidgehalt mit verändertem Phospholipidprofil im Vergleich zu den Werten lungengesunder Probanden nachgewiesen werden. Im Hinblick auf das Phospholipidprofil, konnte bei den ARDS Patienten ein deutlicher Abfall der relativen Konzentration an Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylglycerol (PG) bei

Zusammenfassung

gleichzeitigem Anstieg von Phosphatidylinositol (PI) und Sphingomyelin (SPH) beobachtet werden. Darüber hinaus fand sich ein deutlicher Abfall des Palmitoylierungsgrades des PC zu Gunsten eines vermehrten Auftretens einfach oder mehrfach ungesättigter Fettsäuren. In Übereinstimmung mit diesen biochemischen Veränderungen konnte im Mittel bei den ARDS Patienten eine deutlich erhöhte minimale Oberflächenspannung (23 mN/m statt ~ 0 mN/m bei den Kontrollen) beobachtet werden, die mit einer entsprechend schweren Gasaustauschstörung einherging.

Nach bronchoskopischer Applikation von 300 – 500 mg/kg KG Alveofact® konnte eine deutliche Verbesserung des Oxygenierungsquotienten ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) beobachtet werden. So stieg der $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ von $101 \pm 5,8$ auf 232 ± 30 (168 Stunden nach Therapie). Keiner der Patienten ist an den Folgen einer unbeherrschbaren Oxygenierung verstorben, die Mortalität lag im Studienkollektiv bei 56 % und somit deutlich niedriger als in der auf der Basis des APACHE Scores prognostizierten Mortalität von 74 %. Parallel zur Besserung der Oxygenierung war nach Surfactant Applikation eine deutliche Besserung der biochemischen Zusammensetzung des lavagierbaren Surfactant Pools, mit einem signifikanten Anstieg des Gesamtphospholipidgehaltes und einer annähernden Normalisierung des Phospholipidprofils (Anstieg von PC und PG, Reduktion von PI und SPH) sowie des relativen Gehaltes an large surfactant aggregates und SP-B zu beobachten. Demgegenüber war der SP-A-Gehalt innerhalb der LSA-Fraktion weiterhin deutlich vermindert, was zwanglos durch die fehlende Verabreichung dieses Surfactant Apoproteins erklärbar ist. Trotz dieser weitreichenden Verbesserung, konnte bzgl. der biophysikalischen Aktivität allerdings nur eine partielle Besserung erzielt werden. So betrug die minimale Oberflächenspannung nach Surfactanttherapie 14 mN/m 24 h nach Applikation.

Eine transbronchiale Applikation größerer Mengen eines exogenen Surfactantpräparates ist also in der Lage, eine weitreichende Besserung der Surfactanteigenschaften im alveolären Kompartiment der Patienten zu erzielen und bewirkt parallel hierzu eine weitreichende Besserung des Gasaustausches.

In wie weit durch einen solchen Ansatz tatsächlich die immer noch erschreckend hohe Mortalität dieser Erkrankung gebessert werden kann, muß in nachfolgenden kontrollierten Studien verifiziert werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 **VON NEERGARD K.** Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Zeitschrift für gesamte experimentelle Medizin* 66: 373-394, 1929
- 2 **KING R.J.** Isolation and chemical composition of pulmonary surfactant. *Pulmonary surfactant; Elsevier Science Publishers, Amsterdam*: 1-15, 1984
- 3 **HARWOOD J.L.** Lung surfactant. *Lipid Res.* 26: 211-256, 1987
- 4 **CRYSTAL R.G., WEST J.B.** in *The Lung, Bd.3.1.10, Raven Press, Ltd New York 1991* : 247-261, 1991
- 5 **HAMM H., FABEL H., BARTSCH W.** The surfactant system of the adult lung; physiology and clinical perspectives. *J. Clin. Invest.* 70: 637-657, 1992
- 6 **HAAGSMAN H.P., VAN GOLDE L.M.** Synthesis and assembly of lung surfactant. *Am. Rev. Physiol.* 262: 446-453, 1992.
- 7 **VAN GOLDE L.M., BATENBURG J.J., ROBERTSON B.** The pulmonary surfactant system, biochemical aspects and functional significance. *Physiol. Rev.* 68: 374-455, 1988
- 8 **BATENBURG J.J.** Surfactant phospholipids: synthesis and storage. *Am. J. Physiol.* 262: L376-385, 1992
- 9 **SHELLEY S.A., BALIS J.U., PACIGA J.E., ESPINOZA C.G., RICHMAN A.V.** Biochemical composition of adult human lung surfactant. *Lung* 160: 195-206, 1982
- 10 **POSSMAYER F.** A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138: 990-998, 1988
- 11 **HAWGOOD S., CLEMENTS J.A.** Pulmonary surfactant and its apoproteins. *J. Clin. Invest.* 86: 1-6, 1990
- 12 **BEERS M.F., FISHER A.B.** Surfactant protein C: a review of its unique properties and metabolism. *Am. J. Physiol.* 263: L151-160, 1992
- 13 **POSSMAYER F.** The role of surfactant-associated proteins. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142: 749-752, 1990
- 14 **WEAVER T.E.** Surfactant proteins and SP-D. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5: 4-5, 1991

Literaturverzeichnis

- 15 **SEEGER W., THEDE C., GÜNTHER A., GRUBE C.** Surface properties and sensitivity to protein-inhibition of recombinant apoprotein C-based phospholipid-mixtures in vitro comparison to natural surfactant. *Biochem. Biophys. Acta* 1081: 45-52, 1991
- 16 **SEEGER W., GÜNTHER A., WALMRATH H.D., GRIMMINGER F., LASCH H.G.** Alveolar surfactant and respiratory distress syndrome; Patogenetic role and therapeutic prospects. *Clin. Invest.* 71: 177-190, 1993
- 17 **HAWGOOD S., BENSON B.J., SHILLING J., DAMM D., CLEMENTS J.A., WHITE R.T.** Nucleotide and aminacids sequences of pulmonary surfactant protein SP-18 and evidence for cooperation between SP-18 and SP-28-36 in surfactant lipid adsorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 66-70, 1987
- 18 **REVAK S.D., MERRITT T.A., HALLMAN M., COCHRANE C.G.** Reconstitution of surfactant activity using purified human apoprotein and phospholipids measured in vitro and in vivo. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134: 1258-1265, 1986
- 19 **SHIFFER K., HAWGOOD S., DUEZGUENES N., GOERKE J.** Interactions of the low molecular weight group of surfactant associated proteins (SP-5-18) with pulmonary surfactant lipids. *Biochemistry* 27: 2689-2695, 1988
- 20 **WARR R.G., HAWGOOD S., BUCKLEY D.I., CRISP T.M., SHILLING J., BENSON B.J., BALLARD P.L., CLEMENTS J.A., WHITE R.T.** Low molecular weight human pulmonary surfactant protein (SP-5): isolation, characterisation and cDNA and amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7915-7919, 1987
- 21 **WHITSETT J.A., OHNING B.L., ROSS G., MEUTH J., WEAVER T., HOLM B.A., SHARPIO D.L., NOTTER R.H.** Hydrophobic surfactant associated protein in whole lung surfactant and its importance for biophysical activity in lung surfactant extracts used for replacement therapy. *Pediatr. Res.* 20: 460-467, 1986
- 22 **YU S.H., POSSMAYER F.** Reconstitution of surfactant activity by using 6 kDa apoprotein associated with pulmonary surfactant. *Biochem. J.* 236: 85-89, 1986
- 23 **YU S.H., POSSMAYER F.** Comparative studies on the biophysical activities of the low molecular-weight hydrophobic proteins purified from bovine pulmonary surfactant. *Biochem. Biophys. Acta* 961: 337-350, 1988
- 24 **BAATZ J.E., ELLEDGE B., WHITSETT J.A.** Surfactant protein SP-B induces ordering at the surface of model membrane bilayers. *Biochemistry* 29: 6714-6720, 1990
- 25 **COCHRANE C.G., REVAK S.D.** Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationship. *Science* 254: 566-568, 1991

- 26 YU S.H., POSSMAYER F.** Effect of pulmonary surfactant protein B (SP-B) and calcium on phospholipid adsorption and squeeze-out of phosphatidylglycerol from binary phospholipids monolayers containing dipalmitoylphosphatidylcholin. *Biochem. Biophys. Acta* 1126: 26-34, 1992
- 27 PASTRANA B., MAUTONE A.J., MENDELSON R.** Fourier transform infrared studies of secondary structure and orientation of pulmonary surfactant SP-C and its effect on the dynamic surface properties of phospholipids. *Biochem. J.* 30: 10058-10064, 1991
- 28 TAKAHASHI A., WARING A.J., AMIRKHANIAN J., FAN B., TAEUSCH H.W.** Structure function relationship of bovine pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C. *Biochem. Biophys. Acta* 1044: 43-49, 1990
- 29 YU S.H., POSSMAYER F.** Role of bovine pulmonary surfactant-associated proteins in the surface-active property of phospholipids mixtures. *Biochem. Biophys. Acta* 1046: 233-241, 1990
- 30 COCKSHUTT A.M., WEITZ J., POSSMAYER F.** Pulmonary surfactant associated protein A enhances the surface activity of lipid extract surfactant and reverses inhibition by blood proteins in vitro. *Biochemistry* 29: 8424-8429, 1990
- 31 ROSS G.F., NOTTER R.H., MEUTH J., WHITSETT J.A.** Phospholipid binding and biophysical activity of pulmonary surfactant-associated protein (SAP)-35 and its non-collagenous COOH-terminal domains. *J. Biol. Chem.* 261: 14283-14291, 1986
- 32 KUROKI Y., AKINO T.** Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specially binds dipalmitoylphosphatidylcholin. *J. Biol. Chem.* 266: 3068-3073, 1991
- 33 RICE W.R., ROSS G.F., SINGLETON F.M., DINGLE S., WHITSETT J.A.** Surfactant-associated protein inhibits phospholipid secretion from type-II-cells. *J. Appl. Physiol.* 63(2): 692-698, 1987
- 34 RYAN R.M., MORRIS R.E., RICE W.R., CIRAOLO G., WHITSETT J.A.** Binding and uptake of pulmonary surfactant protein A (SP-A) by pulmonary type-II-cells. *J. Histochem. Cytochem.* 37: 429-440, 1989
- 35 CHEVALIER G., COLLET A.J.** In vivo incorporation of coline-3H, leucine-3H and galactose-3H in alveolar type-II-pneumocytes in relation to surfactant synthesis: A quantitative radiographic study in mouse by electron microscopy. *Anat. Rec.* 174: 298-310, 1972
- 36 ROONEY S.A., PAGE-ROBERTS B.A., MOTOYAMA E.K.** Role of lamellar inclusions in surfactant production: studies on phospholipid composition and biosynthesis in rat and rabbit lung subcellular fractions. *J. Lipid Res.* 16: 418-425, 1975
- 37 HALLMAN M., GLUCK L.** Phosphatidylglycerol in lung surfactant. II. Subcellular distribution and mechanism of biosynthesis in vitro. *Biochem. Biophys. Acta* 409: 172-191, 1975

Literaturverzeichnis

- 38 MASSARO G.D., MASSARO D.** Granular pneumocytes. Electron microscopic radioautographic evidence of intracellular protein transport. *Am. Rev. Respir. Dis.* 105: 927-931, 1972
- 39 WRIGHT J.R., CLEMENTS J.A.** Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: 426-444, 1987
- 40 HAWGOOD S.** Pulmonary surfactant apoproteins: a review of protein and genomic structure. *Am. J. Physiol.* 257: L13-22, 1989
- 41 LEWIS J.F., IKEGAMI M., JOBE A.H.** Metabolism exogenously administered in the acutely injured lungs of adult rabbits. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147: 19-23, 1992
- 42 HIGUCHI R., LEWIS J., IKEGAMI M.** In vitro conversion of surfactant subtypes is altered in alveolar surfactant isolated from injured lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145: 1416-1420, 1992
- 43 IKEGAMI M., JOBE A., YAMADA T., PRIESTLY A., RUFFINI L., RIDER E., SEIDNER S.** Surfactant metabolism in surfactant-treated preterm ventilated lambs. *J. Appl. Physiol.* 67(1): 429-437, 1989
- 44 YOUNG S.L., WRIGHT R.J., CLEMENTS J.A.** Cellular uptake and processing of surfactant lipids and apoprotein SP-A by rat lung. *J. Appl. Physiol.* 66: 1336-1342, 1989
- 45 GRIESE M., GOBRAN L.I., ROONEY S.A.** Surfactant lipid uptake and secretion in type II cells in response to lectins and secretagogues. *Am. J. Physiol.* 261: L434-442, 1991
- 46 BATES S.R., BEERS M.F., FISHER A.B.** Binding and uptake of surfactant protein B by alveolar type II cells. *Am. J. Physiol.* 263: L333-341, 1992
- 47 BRESLIN J.S., WEAVER T.E.** Binding, uptake and localisation of surfactant protein B in isolated rat alveolar type II cells. *Am. J. Physiol.* 262: L699-707, 1992
- 48 BARITUSSIO A., PETTENAZZO A., BENEVENTO M., ALBERTI A., GAMBA P.** Surfactant protein C is recycled from the alveoli to the lamellar bodies. *Am. J. Physiol.* 263: L607-611, 1992
- 49 RICE W.R., SARIN V.K., FOX J.L., BAATZ J., WERT S., WHITSETT J.A.** Surfactant peptides stimulate uptake of phosphatidylcholine by isolated cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1006: 237-245, 1989
- 50 RIDER E.D., IKEGAMI M., JOBE A.** Localisation of alveolar surfactant clearance in rabbit lung cells. *Am. J. Physiol.* 263: L201-209, 1992
- 51 PETTENAZZO A., JOBE A., HUMME J., SEIDNER S., IKEGAMI M.** Clearance of phosphatidylcholine via the upper airways in rabbits. *J. Appl. Physiol.* 65(5): 2151-2155, 1988

- 52 FROH D., BALLARD P.L., WILLIAMS M.C., GONZALES J., GOERKE J., ODOM M.W., GONZALES I.W.** Lamellar bodies of cultured human fetal lungs: content of surfactant protein A (SP-A), surface film formation and structural transformation in vitro. *Biochem. Biophys. Acta* 1052: 78-89, 1990
- 53 SUZUKI Y., FUJITA Y., KOGISHI K.** Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140: 75-81, 1989
- 54 WILLIAMS M.C., HAWGOOD S., HAMILTON R.L.** Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B and SP-C. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5: 41-50, 1991
- 55 VENKITARAMAN A.R., BAATZ J.E., WHITSETT J.A., HALL S.B., NOTTER R.H.** Biophysical inhibition of synthetic phospholipid-lung surfactant apoprotein admixtures by plasma proteins. *Chem. Phys. Lipids* 57: 49-57, 1991
- 56 NOTTER R.H., SHARPIO D.L., OHNING B., WHITSETT J.A.** Biophysical activity of synthetic phospholipids combined with purified lung surfactant 6000 dalton apoprotein. *Chem. Phys. Lipids* 44: 1-17, 1987
- 57 REVAK S.D., MERRITT T.A., DEGRYSE E., STEFANI L., COURTNEY M., HALLMAN M., COCHRANE C.G.** Use of human surfactant low molecular weight apoproteins in the reconstitution of surfactant biologic activity. *J. Clin. Invest.* 81: 826-833, 1988
- 58 POSSMAYER F.** Biophysical activity of pulmonary surfactant; in: *Fetal and Neonatal Physiology (Polin R.A. und Fox W.W., Hrsg.), Bd.90, Sanders W.B., Philadelphia 1991: 459-962, 1991*
- 59 SCHÜRCH S., BACHOFEN H., GOERKE J., POSSMAYER F.** A captive bubble method reproduces the in situ behavior of lung surfactant monolayers. *J. Appl. Physiol.* 67: 2389-2396, 1989
- 60 NIEMAN G.F., BREDENBERG C.E.** High surface tension pulmonary edema induced by detergent aerosol. *J. Appl. Physiol.* 58: 129-136, 1985
- 61 LACHMANN B., ROBERTSON B., VOGEL J.** In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 24: 231-236, 1980
- 62 MERRITT T.A., HALLMAN M., BLOOM B.T., BERRY C., BENIRSCHKE K., SAHN D., KEY T., EDWARDS D., JARVENPAA A.L., POHJAVOURI M., KANKAANPAA K., KUNNAS M., PAATERO H., RAPOLA J., JAASKELAINEN J.** Prophylactic treatment of very preterm infants with human surfactant. *New Engl. J. Med.* 315: 785-790, 1986
- 63 COLLABORATIVE EUROPEAN MULTICENTER STUDY GROUP** Surfactant replacement therapy for severe neonatal respiratory distress syndrome; an international randomized clinical trial. *Pediatrics* 82: 683-691, 1988
- 64 HENNES H.M., LEE M.B., RIMM A.A., SHARPIO D.L.** Surfactant replacement therapy in respiratory distress syndrome. *Am. J. Dis. Child* 145: 102-104, 1991

Literaturverzeichnis

- 65 ZELTER M., ESCUDIES B.J., HOEFFEL J.M., MURRAY J.F.** Effects of aerosolized artificial surfactant on repeated oleic acid injury in sheep. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 1014-1019, 1990
- 66 LAMM W.J.E., ALBERT R.K.** Surfactant-replacement improves lung recoil in rabbit lungs after acid aspiration. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142: 1279-1283, 1990
- 67 LEWIS J.F., IKEGAMI M., HIGUSHI R., JOBE A., ABSOLOM D.** Nebulized vs. instilled exogenous surfactant in an adult lung injury model. *J. Appl. Physiol.* 71(4): 1270-1276, 1991
- 68 VAN DAAL G.J., BOS J.A.H., EIJKING E.P., GOMMERS D., HANNAPPEL E., LACHMANN B.** Surfactant-replacement therapy improves pulmonary mechanics in end-stage Influenza A-pneumonia in mice. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145: 859-863, 1992
- 69 COUSER R.J., FERRARA T.B., EBERT J., HOEKSTRA R.E., FANGMAN J.J.** Effects of exogenous surfactant therapy on dynamic compliance during mechanical breathing in preterm infants with hyaline membrane disease. *J. Pediatr.* 116: 119-124, 1990
- 70 DAVIS J.M., VENEES-MEEHAN K., NOTTER R.H., BHUTANI V.K., KENDIG J.W., SHARPIO D.L.** Changes in pulmonary mechanics after the administration of surfactant to infants with respiratory distress syndrome. *New Engl. J. Med.* 319: 476-479, 1988
- 71 BREDENBERG C.E., PASKANIK A.M., NIEMAN G.F.** High surface tension pulmonary edema. *J. Surg. Res.* 34(6): 513-523, 1983
- 72 NIEMAN G.F., GOYETTE D., PASKANIK A.M., BREDENBERG C.E.** Surfactant displacement by plasma lavage results in pulmonary edema. *Surgery* 107: 677-683, 1990
- 73 KANEKO T., SASO T., KATSUYA H., MIYAUCHI Y.** Surfactant therapy for pulmonary edema due to intratracheally injected bile acid. *Crit. Care Med.* 18: 77-83, 1990
- 74 VAN IWAARDEN J.F., WELMERS B., VERHOEF J., HAAGSMAN H.P., VAN GOLDE L.M.G.** Pulmonary surfactant protein A (SP-A) enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2: 91-98, 1990
- 75 VAN IWAARDEN J.F., VAN STRIJP J.A., EBSKAMP M.J., WELMERS A.C., VERHOEF J., VAN GOLDE L.M.G.** Surfactant protein A is opsonin in phagocytosis of the herpes simplex virus type 1 by rat alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* 261: L204-209, 1991
- 76 ZIMMERMANN P.E., VOELKER D.R., MC CORMACK F.X., PAULSRUD J.R., MARTIN W.J.^{2nd}** 120 kD surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* is a ligand for surfactant protein A. *J. Clin. Invest.* 89: 143-149, 1992
- 77 REYNOLDS H.Y.** Pulmonary host defense - state of the art. *Chest* 95: 223S-230S, 1989

- 78 ALLEN J.N., HERZYK D.J., WEWERS M.D.** Surfactant suppresses interleukin-1 β and tumor-necrosis-factor α release by human alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145: A875, 1992
- 79 SPEER C.P., GOETZE B., CURSTEDT T., ROBERTSON B.** Phagocytic functions and tumor necrosis factor secretion of human monocytes exposed to natural porcine surfactant (Curosurf®). *Pediatr. Res.* 30: 69-74, 1991
- 80 THOMASSEN M.J., MEEKER D.P., ANTAL J.M., CONNORS M.J., WIEDEMANN H.P.** Synthetic surfactant (Exosurf®) inhibits exotoxin-stimulated cytokine secretion by human alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7: 257-260, 1992
- 81 HAYAKAWA H., MYRVIK Q.N., ST. CLAIR R.W.** Pulmonary surfactant inhibits priming of rabbit alveolar macrophages. Evidence that surfactant suppresses the oxidative burst of alveolar macrophage in infant rabbits. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140: 1390-1397, 1989
- 82 ZELIGS B.J., NERCURKAR L.S., BELLANTI J.A.** Chemotactic and candidacial responses of rabbit alveolar macrophages during postnatal development and the modulating roles of surfactant in these responses. *Inf. Immun.* 44: 379-385, 1984
- 83 COONROD J.D.** Role of surfactant free fatty acids in antimicrobial defences. *Europ. J. Respir. Dis. (Supplementum)* 153: 209-214, 1987
- 84 NIESSEN K.H.** (Hrsg.) in: *Pediatric (2. Auflage)*, New York: Edition Medizin, VCH. 74-79, 1989
- 85 AVERY M.E., MURRAY J.F.** Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am. J. Dis. Child* 97: 517-523, 1959
- 86 ADAMS F.H., TOWERS B., OSHER A., IKEGAMI M., FUJIWARA T., NOZAKI M.** Effect of tracheal instillation of natural surfactant in premature lambs, Clinical and Autopsy Findings. *Pediatr. Res.* 12: 841-848, 1978
- 87 REYNOLDS E.O.R., ROBERTSON N.R.C., WIGGELSWORTH J.S.** Hyaline membrane disease, respiratory distress and surfactant deficiency. *Pediatrics* 42: 158-168, 1968
- 88 IKEGAMI M., JACOBS H., JOBE A.** Surfactant function in respiratory distress syndrome. *J. Pediatr.* 102: 443-447, 1983
- 89 IKEGAMI M., AGATA Y., ELKADY T., HALLMAN M., BERRY D., JOBE A.** Comparison of four surfactants: in vitro surface properties and response of preterm lambs to treatment at birth. *Pediatrics* 79: 38-46, 1987
- 90 ALBERT R.K., LAKSHIMINARAYAN S., HILDEBRANDT J.** Increased surface tension favours pulmonary edema formation in anaesthetized dogs'lungs. *J. Clin. Invest.* 63: 1015, 1979

Literaturverzeichnis

- 91** **JOBE A., IKEGAMI M., JACOBS H., JONES S., CONWAY D.** Permeability of premature lamb lungs to protein and the effect of surfactant on that permeability. *J. Appl. Physiol* 55(1): 169-176, 1983
- 92** **JEFFERIES A.L., COATES G., O'BRODOVICH H.** Pulmonary epithelial permeability in hyaline-membrane disease. *New Engl. J. Med.* 311: 1075-1080, 1984
- 93** **HEDENSTIERNA GÖRAN** Mechanics of the respiratory system in ARDS. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 35: Supplementum 95: 29-34, 1991
- 94** **SEEGER W.** Akutes Lungenversagen - ARDS. *Manuale pneumologicum* (Hrsg. D. Nolte), Bd. 1-11, Dustril Verlag Dr. Karl Feistle, München: 1-45, 1992
- 95** **SEEGER W.** ARDS. *Pneumologie* 50, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York: 615-617, 1996
- 96** **MURRAY J.F.** Mechanisms of acute respiratory failure. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115: 1071-1078, 1977
- 97** **SEIDENFELD J.J., POHL D.F., BELL R.C., HARRIS G.D., JOHANSON W.G.** Incidence, site and outcome of infections in patients with the acute respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134: 12-16, 1986
- 98** **WEBSTER N.R., COHEN A.T., NUNN J.F.** Adult Respiratory Distress Syndrome - How many cases in the UK? *Anaesthesia* 43: 923-926, 1988
- 99** **VILLAR J., SLUTZKY A.S.** The incidence of the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140: 814-816, 1989
- 100** **SLOANE P.J., GEE M.H., GOTTLIEB J.E., ALBERTINE K.H., PETERS S.P., BURNS J.R., MACIEDO G., FISH J.E.** A multicenter registry of patients with the acute respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146: 419-426, 1992
- 101** **FRIKKER M.J., LYNCH K., PONTOPPIDAN H., WISON R.S., RIE M.A., ZAPOL W.M.** The adult respiratory distress syndrome: aetiology, progression and survival. In: *Adult Respiratory Distress Syndrome*. Artigas A., Lemaire F., Suter P.M., Zapol W.M. (Eds.) London: Churchill Livingstone: 3-11, 1992
- 102** **MURRAY J.F., MATTHAY M.A., LUCE J.M., FLICK M.R.** An Expanded Definition of the Adult Respiratory Distress Syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138: 720-723, 1988
- 103** **SEEGER W.,** Behandlung des ARDS - Gesicherte Konzepte und therapeutische Perspektiven. *Intensivmedizin* 29: 201-218, 1992

- 104 BERNARD G.R., ARTIGAS A., BRIGHAM K.L., CARLET J., FALKE K., HUDSON L., LAMY M., LEGALL J.R., MORRIS A., SPRAGG R., „the consensus committee 1994“** The American-European Consensus Conference on ARDS. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149: 818-824, 1994
- 105 WIENER-KRONISCH J.P., GROPPER M.A., MATTHAY M.A.** The adult respiratory distress syndrome: Definition and prognosis, pathogenesis and treatment. *Brit. J. Anaest.* 65: 460-467, 1990
- 106 HALLMANN M., SPRAGG J., HARRELL H., MOSER M., GLUCK L.** Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. Study of bronchoalveolar lavage phospholipids, surface activity, phospholipase activity and plasma myoinositol. *J. Clin. Invest.* 70: 673-683, 1982
- 107 HALLMANN M.** Lung surfactant in respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol. Scand. (Supplementum 95)* 35: 15-21, 1991
- 108 PISON U., SEEGER W., BUCHHORN R., JOKA T., BRAND M., OBERTAKE U., NEUHOF H., SCHMITT-NEUERBURG K.P.** Surfactant abnormalities in patients with respiratory failure after multiple trauma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140: 1033-1039, 1989
- 109 BALIS J.U., SHELLEY S.A., MC CUE M.J., RAPPAPORT E.S.** Mechanisms of damage to the lung surfactant system. Ultrastructure and quantitation of normal and in vitro inactivated lung surfactant. *Exp. Mol. Pathol.* 14: 243-262, 1971
- 110 KOBAYASHI T., NITTA K., GANZUKA M., INUI S., GROSSMANN G., ROBERTSON B.** Inactivation of exogenous surfactant by pulmonary edema fluid. *Pediatr. Res.* 29: 353-356, 1991
- 111 FUCHIMUKAI T., FUJIWARA T., TAKAHASHIN A., ENHORNING G.** Artificial pulmonary surfactant inhibited by proteins. *J. Appl. Physiol.* 62(2): 429-437, 1987
- 112 HOLM B.A., NOTTER R.H., FINKELSTEIN J.N.** Surface property changes from interactions of albumin with natural lung surfactant and extracted lung lipids. *Chem. Phys. Lipids* 38: 287-298, 1985
- 113 HOLM B.A., NOTTER R.H.** Effects of hemoglobin and cell membrane lipids on pulmonary surfactant activity. *J. Appl. Physiol.* 63(4): 1434-1442, 1987
- 114 HOLM B.A., VENKITARAMAN A.R., ENHORNING G., NOTTER R.H.** Biophysical inhibition of synthetic lung surfactant. *Chem. Phys. Lipids* 52: 243-250, 1990
- 115 SEEGER W., STOEHR G., WOLF H.R., NEUHOF H.** Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrinogen monomer. *J. Appl. Physiol.* 58(2): 326-338, 1985
- 116 O'BRODOVICH H.M., WEITZ J.I., POSSMAYER F.** Effects of fibrinogen degradation products and lung ground substance on surfactant function. *Biol. Neon.* 57: 325-333, 1990

Literaturverzeichnis

- 117 RÜFER R., STOLZ C.** Inaktivierung von alveolären Oberflächenfilmen durch Erniedrigung der Oberflächenspannung der Hypophase. *Pflüglers Archiv* 307: 89-103, 1969
- 118 PISON U., TAM E.K., CAUGHEY G.H., HAWGOOD S.** Proteolytic inactivation of dog lung surfactant-associated proteins by neutrophil elastase. *Biochem. Biophys. Acta* 992: 251-257, 1989
- 119 HOLM B.A., KEICHER L., LIU M.Y., SOKOLOWSKI J., ENHORNING G.** Inhibition of pulmonary surfactant functions by phospholipases. *J. Appl. Physiol.* 71(1): 317-321, 1991
- 120 IDELL S., KOENIG K.M., FAIR D.S., MARTIN T.R., Mc LARTY J., MAUNDER R.J.** Serial abnormalities of fibrin turnover in involving adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Physiol.* 261: L240-248, 1991
- 121 SEEGER W., ELSNER A., GÜNTER A., KRÄMER H.-J., KALINOWSKI H.O.** Lung Surfactant Phospholipids Associate with Polymerizing Fibrin: Loss of Surface Activity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9: 213-220, 1993
- 122 RYAN S.F., GASSIBI Y., LIAU D.F.** Effects of activated polymorphonuclear leucocytes upon pulmonary surfactant in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 4: 33-41, 1991
- 123 SEEGER W., LEPPER H., WOLF H.R., NEUHOF H.** Alteration of alveolar surfactant function after exposure to oxidative stress and to oxygenated and native arachidonic acid in vitro. *Biochem. Biophys. Acta* 835: 58-67, 1985
- 124 BURKHARDT A.** Alveolitis and collapse in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140: 513-524, 1989
- 125 SEEGER W., WALMRATH D., GRIMMINGER F.** Neue supportive Therapieverfahren bei akutem Lungenversagen. *Internist* 36: 1139-1149, 1995
- 126 GREGORY T.J., GADEK J.E., WEILAND J.E., HYERS T.M., CRIM C., HUDSON L.D., STEINBERG K.P., MAUNDER R.A., SPRAGG R.G., SMITH R.M., TIERNEY D.F., GIPE B., LONGMORE W.J., MOXLEY M.A.** Survanta® supplementation in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS). Abstract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149: A567, 1994
- 127 WALMRATH H.D., GÜNTHER A., GHOFrani H.A., SCHERMULY R., SCHNEIDER T., GRIMMINGER F., SEEGER W.** Bronchoskopische surfactant administration in patients with severe Adult Respiratory Distress Syndrome and sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154: 57-62, 1996
- 128 HONDA Y., TAKAHASHI H., SHIJUBO N., KUROKI Y., AKINO T.** Surfactant Apoprotein-A concentration in bronchoalveolar lavage fluids of patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Chest* 103: 496-499, 1993
- 129 FUJITA Y., KOGISHI K., SUZUKI Y.** Pulmonary damage induced in mice by a monoclonal antibody to proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Exp. Lung Res.* 14: 247-260, 1988

- 130 WARR R.G., HAWGOOD S., BUCKLEY D.I., CRISP T.M., SHILLING J., BENSON B.J., BALLARD P.L., CLEMENTS J.A., WHITE R.T.** Low molecular weight human pulmonary surfactant protein (SP-A) isolation, characterisation and cDNA and amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7915-7919, 1987
- 131 ASHBAUGH D.G., BIGELOW D.B., PETTY T.L., LEVINE B.E.** Acute Respiratory Distress in Adults. *Lancet II*: 319-323, 1967
- 132 RAMIRES R.J., KIEFFER jr. R.F., BALL jr. W.C.** Bronchopulmonary lavage in man. *Am. J. Int. Med.* 63: 819-824, 1965
- 133 HUNNINGHAKE G.W., GADEK J.F., KAWANANN O., FERRANS V.J., CRYSTAL R.G.** Inflammatory and immune process in the human lung in health and disease: Evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am. J. Pathol.* 97: 149-152, 1979
- 134 NAKHOSTEEN J.A., ZAVALA D.C.** *Atlas und Lehrbuch der flexiblen Bronchoskopie: Springer Berlin-Heidelberg-New York*, 1983
- 135 HUNNINGHAKE G.W., GADEK J.E.** Comparison of the alveolitis of sarkoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 103: 496-499, 1993
- 136 HUNNINGHAKE G.W., CRYSTAL R.G.** Pulmonary sarkoidosis. *New Engl. J. Med.* 305: 429-431, 1981
- 137 JOKA T., OBERTACKE U., PISON U., NENDECK F., KEINECKE K.O.** Die bronchoalveoläre Lavage als Diagnostikum in der Intensivtherapie: *Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York (Hrsg.); Anästhesie und Notfallmedizin* 20: 79-83, 1990
- 138 COSTABEL U., TESCHLER H., GUZMANN J., KROEGEL C.** Bronchoalveoläre Lavage: Zwischenbilanz nach zehn Jahren klinischer Anwendung. *Med. Klinik* 85: 376-387, 1990
- 139 BLIGH E.G., DYER W.J.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem.* 37: 911-917, 1959
- 140 ROUSER G., FLEISCHER S., YAMAMOTO A.** Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5: 494-496, 1969
- 141 LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951
- 142 GUSTAVSSON L.** Densitometric quantification of individual phospholipids. *J. Chromat.* 395: 255-266, 1986

Literaturverzeichnis

- 143 KRÄMER H.J., SCHMIDT R., GÜNTHER A., BECKER G., SUZUKI Y., SEEGER W.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique for quantification of Surfactant-protein B (SP-B) in bronchoalveolar lavage fluid. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152: 1540-1544, 1995
- 144 GREGORY T.J., LONGMORE W.J., MOXLEY M.A., WHITSETT J.A., REED C.R., FOWLER A.A., HUDSON L.D., MAUNDER R.J., CRIN C., HYERS T.M.** Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J. Clin. Invest.* 88: 1976-1981, 1991
- 145 ENHORNING G.** Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. *J. Appl. Physiol.* 43: 198-203, 1977
- 146 WALMRATH D., SCHERMULLY R., SCHNEIDER T., OLSCHESKI H., GRIMMINGER F., SEEGER W.** Direct comparison of inhaled nitric oxide and aerosolized prostacyclin in ARDS. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153: 991-996, 1996
- 147 WALMRATH D., SCHNEIDER T., PILCH J., GRIMMINGER F., SEEGER W.** Aerosolized prostacyclin reduces pulmonary artery pressure and improves gas exchange in the adult respiratory distress syndrome (ARDS) *Lancet* 342: 961-962, 1993
- 148 WALMRATH D., SCHNEIDER T., PILCH J., GRIMMINGER F., SEEGER W.** Aerosolized prostacyclin in patients with severe pneumonia in the absence and presence of fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151: 724-730, 1995.
- 149 BAUGHMAN R. P., STERNBERG R.I., HULL W., BUCHSBAUM J.A., WHITSETT J.** Decreased surfactant protein A in patients with bacterial pneumonia. *Am. Rev. Respir.* 147: 653-657; 1993
- 150 HOFFMAN A.G.D., LAWRENCE M.G., OGNIBENE F.P., SUFFREDINI A.F., LIPSCHIK G.Y., KOVACS J.A., MASUR H., SHELHAMER J.H.** Reduction of pulmonary surfactant in patients with human immunodeficiency virus infection and pneumocystis carinii pneumonia. *Chest* 102: 1730-1738; 1992
- 151 ESCAMILLA R., PREVOST M.C., CARIVEN C., HERMANT C., KREMPF M., CHAP H.** Bronchoalveolar lavage phospholipid abnormalities in HIV-infected patients. *Eur. Respir. J.* 6: 1301-1307; 1993
- 152 GREGORY T.J., STEINBERG K.P., SPRAGG R., GADEK J.E., HYERS T.M., LONGMORE W.J., MOXLEY A., CAI G.-Z., HITE R.D., SMITH R.M., HUDSON L. D., CRIN C., NEWTON P., MITCHELL B.R., GOLD A.J.** Bovine Surfactant Therapy for Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155: 1309-1315; 1997
- 153 SPRAGG R.G., GILLIARD N., RICHMAN P., SMITH R.M., HITE R.D., PAPPERT D., ROBERTSON B., CURSTEDT T., STRAYER D.** Acute Effects of a Single Dose of Porcine Surfactant on Patients With the Adult Respiratory Distress Syndrome. *CHEST* 105: 195-202; 1994

- 154 HASLAM P.L., HUGHES D.A., MAC NAUGHTON P.D., BAKER C.S., EVANS T.W.** Surfactant replacement therapy in late-stage adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 343: 1009-1011; 1994
- 155 LEWIS J. F., IKEGAMI M., JOBE A.** Altered surfactant function and metabolism in rabbits with acute lung injury. *J. Appl. Physiol.* 69: 2303-2310; 1990
- 156 VELDHUIZEN R.A. W., HEARN S.A., LEWIS J.F., POSSMAYER F.** Surface-area cycling of different surfactant preparations: SP-A und SP-B are essential for large-aggregate integrity. *Biochem. J.* 300: 519-524; 1993
- 157 PISON U., OBERTACKE U., SEEGER W., HAWGOOD S.** Surfactant protein A (SP-A) is decreased in acute parenchymal lung injury associated with polytrauma. *Eur. J. Clin. Invest.* 22: 712-718; 1992
- 158 LEWIS J. F. und JOBE A.** Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147: 218-233; 1993
- 159 WISWELL T.E., SMITH R.M., KATZ L.B., MASTROIANNI L., WONG D.Y., WILLMS D., HEARD S., WILSON M., HITE D., ANZUETO A., COCHRANE C. G.** Bronchopulmonary Segmental Lavage With Surfaxin™ (KL₄ Surfactant) For Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999
- 160 HEIKINHEIMO M., HYNYNEN M., RAUTIAINEN P., ANDERSSON S., HALLMAN M., KUKKONEN S.** Successful Treatment of ARDS With Two Doses of Synthetic Surfactant. *CHEST* 105: 1263-1264; 1994
- 161 STUBBIG K., SCHMIDT H., BÖHRER H., HUSTER Th., BACH A., MOTSCH J.** Surfactantapplikation bei akutem Lungenversagen. *Anaesthesist* 41: 555-558; 1992
- 162 DO CAMPO J.L., TURCHETTOE., BERTRANOU E.G., HAGER A.A., DE PAOLI T.** Natural surfactant aerosolisation in adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 344: A413; 1994
- 163 JOKA Th., OBERTACKE U.** Neue medikamentöse Behandlung im ARDS: Effekt einer intrabronchialen xenogenen Surfactantapplikation. *Zeitschrift für Herz-, Thorax-, Gefäßchirurgie* 3 (Suppl. 1): 21-24; 1989
- 164 EIJKING E.P., VAN DAAL G.J., TENBRINCK R., SLUITERS J.F., HANNAPEL E., ERDMANN W., LACHMANN B.** Improvement of pulmonary gas exchange after surfactant replacement in rats with pneumocystis carinii pneumonia. *Intensive Care Med.* 17: 475-478; 1991
- 165 EIJKING E.P., GOMMERS D., SO K.L., VERGEER M., LACHMANN B.** Surfactant treatment of respiratory failure induced by hydrochloric acid aspiration in rats. *Anaesthesiology* 78: 1145-1151; 1993

Literaturverzeichnis

- 166 LEWIS J., IKEGAMI M., HIGUCHI R., JOBE A., ABSOLOM D.** Nebulized vs. instilled exogenous surfactant in an adult lung injury model. *J. Appl. Physiol.* 71 (4): 1270-1276; 1991
- 167 ROBERTSON B.** Surfactant inactivation and surfactant replacement in experimental models of ARDS. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 35 (Suppl. 95): 22-28; 1991
- 168 BAHLMANN H., SUN B., NILSSON G., CURSTEDT T., ROBERTSON B.** Aerosolized surfactant in lung-lavaged adult rats: factors influencing the therapeutic response. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 44 (5): 612-622; 2000
- 169 ANZUETO A., BAUGHMAN R., GUNTUPALLI K.K., WEG J.G., WIEDEMANN H.P., RAVENTOS A.A., LEMAIRE F., LONG W., ZACCARDELLI D.S., PATTISHALL E.N.** Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *New England J. Med.* 334: 1417-1421; 1996
- 170 WEG J.G., BALK R.A., THARRATT R.S., JENKINSON S.G., SHAH J.B., ZACCARDELLI D., HORTON J., PATTISHALL E.N.** Safety and potential efficacy of an aerosolized surfactant in human sepsis-induced adult respiratory distress syndrome. *J.A.M.A.* 272: 1433-1438; 1994
- 171 SEEGER W., GÜNTHER A., THEDE C.** Differential sensitivity to fibrinogen inhibition of SP-C vs. SP-B-based surfactants. *Am. J. Physiol.* 261 (5): L286-291; 1992
- 172 HOLM B.A., ENHORNING G., NOTTER R.H.** A biophysical mechanism by which plasma proteins inhibit lung surfactant activity. *Chem. Phys. Lipids* 49: 49-55; 1988
- 173 ZAPOL W.M., SNIDER M.T., HILL J.D., FALLAT R.J., BARTLETT R.H., EDMUNDS L.H., MORRIS A.H., PEIRCE E.C.C.I.I., THOMAS A.N., PROCTOR H.J., DRINKER P.A. PRATT P.C., BAGNIEWSKI A., MILLER R.G.** Extracorporeal membrane oxygenation in severe acute respiratory failure. *J.A.M.A.* 242: 2193-2196; 1979
- 174 MORRIS A.H., WALLACE C.J., MENLOVE R.L., CLEMMER T.P., ORME J.F., WEAVER L.K., DEAN N.C., THOMAS F., EAST T.D., PACE N.L., SUCHYTA M.R., BECK E., BOMBINO M., SITTIG D.F., BÖHM S., HOFFMANN B., BECKS H., BUTLER S., PEARL J., RASMUSSEN B.** Randomized Clinical Trial of Pressure-controlled Inverse Ratio Ventilation and Extracorporeal CO₂ Removal for Adult Respiratory Distress Syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149: 295-305; 1994
- 175 GÜNTHER A., SIEBERT C., SCHMIDT R., ZIEGLER S., GRIMMINGER F., YABUT M., TEMMESFELD B., WALMRATH D., MORR H., SEEGER W.** Surfactant Alteration in Severe Pneumonia, Acute Respiratory Distress Syndrome, and Cardiogenic Lung Edema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153: 176-184; 1996

176 BARITUSSIO A.G., MAGOON M.W., GOERKE J., CLEMENTS J.A. Precursor-product relationship between rabbit type II cell lamellar bodies and alveolar surface-active material. Surfactant turnover time. *Biochim. Biophys. Acta* 666: 382-393;1981

177 WRIGHT R. S. A reagent for the non-destructive location of steroids and some other lipophilic materials on silica gel thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr.* 59: 220-221; 1971

8. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. W. Seeger für die Überlassung des Themas danken.

Seine erfolgreiche und sensible Integrierung von hochqualifizierter Forschung und Wissenschaft in die klinische Praxis waren für mich stets vorbildlich und bewundernswert.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. H. D. Walmrath, der mich in der praktischen Ausführung der Arbeit sowie meiner klinischen Ausbildung stets unterstützt hat sowie Herrn PD Dr. A. Günther für seine engagierte wissenschaftliche Betreuung.

Des weiteren möchte ich Frau Sabine Heinemann für die Unterstützung in der labortechnischen Datenauswertung sowie Herrn Dr. T. Schmehl für die Unterstützung in der statistischen Auswertung danken.

Zuletzt danke ich ganz herzlich dem gesamten Pflegepersonal der Intensivstation der Medizinischen Klinik II der Universitätsklinik Giessen, das mir in der praktischen Durchführung der Probengewinnung sowie im Umgang mit kritisch kranken Patienten stets behilflich war.

9. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Harodt
 Vorname: Jennifer
 Geburtsdatum: 14.03.1973
 Geburtsort: Lich
 Adresse: Oberhof 30
 35440 Linden
 Familienstand: ledig
 Konfession: evangelisch

Schulbildung

08.`78 - 07.`83 Degerfeldschule Butzbach (Grundschule mit 2-jähriger
 Eingangsstufe)
 08.`83 - 06.`92 Weidig-Gymnasium Butzbach
 03.06.`92 Abschluß mit Allgemeiner Hochschulreife (Durchschnittsnote
 1,2)

Hochschulstudium

WS `92/93 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-
 Universität Gießen
 31.08.`94 Ärztliche Vorprüfung
 29.08.`95 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 01.04.`98 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 27.04.`99 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Ärztin im Praktikum

01.06.`99 – 30.11.`00 Med. Klinik II der Inneren Abteilung der Universitätsklinik
 Giessen (Chefarzt: Prof. Dr. med. W. Seeger)

Assistenzärztin

01.12.`00 – 30.04.`02 Med. Klinik II der Inneren Abteilung der Universitätsklinik
 Giessen (Chefarzt: Prof. Dr. med. W. Seeger)
 01.05.`02 – 31.11.`02 Abteilung für Chirurgie, Asklepios Klinik Lich (Chefarzt
 Prof. Dr. P Hild)
 01.11.02`- Allgemeinarztpraxis Debus-Tiller, Wieseck