

**Veränderungen der prokoagulatorischen und
fibrinolytischen Aktivität in bronchoalveolären
Lavagen bei akut inflammatorischen und chronisch
interstitiellen Lungenerkrankungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

vorgelegt von Parvin Mosavi

Kelkheim 2007

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
Leiter: Prof. Dr. Werner Seeger
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen**

Gutachter: Prof. Dr. A. Günther

Gutachter: Frau Prof. Dr. B. Kemkes Matthes

Tag der Disputation: 10.06.2008

Liste der Abkürzungen

α_2 -AP	α_2 -Antiplasmin
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolinsulfonat(6)]
AB-Komplex	Avidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AM	Alveolarmakrophagen
Alv Pneu	Alveoläre Pneumonie
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i> = akutes Lungenversagen
AS	Aminosäure
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCA	Bicinchoninsäure
Bro Pneu	Bronchopneumonie
BSA	Bovines Serum Albumin
CLSE	<i>Calf Lung Surfactant Extract</i> = Kälberlungen Surfactant Extrakt
DBAP	Diethylbarbiturat-Acetat Puffer
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
EAA	Exogen Allergische Alveolitis
FA	Fibrinolytische Aktivität
FP-A	Fibrinopeptid A
FP-B	Fibrinopeptid B
HMWK	<i>High-Molecular-Weight-Kininogen</i> = Hochmolekulares Kininogen
Int Pneu	Interstitielle Pneumonie
IPF	Idiopathische Pulmonale Fibrose
kD	Kilo-Dalton
PA	Plasminogenaktivatoren
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCA	Prokoagulatorische Aktivität
PCWP	<i>Pulmonary Capillary Wedge Pressure</i> = Pulmonalkapillärer Verschlussdruck
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
PG	Phosphatidylglycerol
PKK	Präkallikrein
PL	Phospholipid
Pneu	Pneumonie
PPQ	Phospholipid-Protein-Quotient

PTT	Partielle Thromboplastinzeit
RIA	Radio-Immunoassay
Sark	Sarkoidose
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler
t-PA	<i>Tissue-type Plasminogen Activator</i> =Gewebeplasminogenaktivator
u-PA	<i>Urokinase-type Plasminogen Activator</i> = Urokinase

Inhaltsverzeichnis

I. Vorwort.....	3
II. Einleitung.....	4
1 Gerinnungssystem	4
1.1 Faktor VII (Prokonvertin)	6
1.2 Tissue factor (Gewebsthromboplastin).....	6
1.2.1 Tissue factor abhängige Aktivierungsprozesse	7
1.2.2 Fibrin(ogen).....	7
1.2.2.1 Fibrinogenaufbau	7
1.2.2.2 Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin	8
1.2.2.3 Fibrinpolymerisation und - Matrix-Struktur	8
1.2.2.4 Fibrinabbau.....	8
2 Fibrinolyse	11
2.1 Übersicht	11
2.2 Die Komponenten der Fibrinolyse	12
2.2.1 Plasmin(ogen).....	12
2.2.2 Plasminogenaktivatoren.....	13
2.2.2.1 Urokinase (u-PA).....	13
2.2.2.2 Gewebelasminogen Aktivator (t-PA)	14
2.2.3 Inhibitoren des fibrinolytischen Systems.....	16
2.2.3.1 Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) und PAI-2	16
2.2.3.2 α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP).....	17
3 Physiologie und Pathophysiologie des alveolären Gerinnungs-Systems am Beispiel des ARDS	17
3.1 Physiologie	17
3.2 Pathophysiologie	18
3.2.1 ARDS.....	18
3.2.2 Veränderung des Gerinnungssystem bei ARDS	19
III. Fragestellung	21
IV. Materialien und Methoden	22
4 Materialien	22
4.1 Geräte	22
4.2 Substanzen.....	22
5 Methoden.....	26
5.1 Definition der Patientenkollektive.....	26
5.2 Gewinnung der bronchoalveolären Lavage.....	29
5.3 ELISA-Verfahren	29
5.3.1 Quantifizierung von u-PA, t-PA, PAI-1 und α_2 -AP mittels ELISA.....	30
5.3.1.1 Durchführung der Methode	30
5.3.1.2 Validierung	35
5.3.2 ELISA zur Quantifizierung von D-Dimer	38
5.3.3 ELISA zur Quantifizierung Fibrinopeptid A (FP-A).....	39

5.4	Bestimmung der fibrinolytischen Aktivität mittels ¹²⁵ I-Fibrin Platten Test	41
5.4.1	Durchführung des Fibrin Platten Test.....	41
5.5	Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität.....	41
5.5.1	Bestimmung der globalen prokoagulatorischen Aktivität	41
5.5.2	Bestimmung der Faktor VII-Aktivität	42
5.6	Proteinbestimmung.....	43
5.6.1	Proteinbestimmung nach Lowry.....	43
5.6.2	Durchführung des BCA-Protein Test	43
5.7	BAL-Zytologie	44
5.8	Phosphatbestimmung.....	44
5.8.1	Lipidextraktion nach Bligh und Dyer	44
5.8.2	Kolorimetrische Phosphatbestimmung	45
5.9	Statistische Auswertung	45
V.	Ergebnisse.....	46
6	Klinische Daten	46
6.1	Klinische Daten der akut inflammatorischen Lungenerkrankungen (ARDS und / oder Pneumonie)	46
6.2	Klinische Daten der chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen	48
7	Charakterisierung der prokoagulatorischen Aktivität (PCA) in der BAL...49	
7.1	Faktor VII-Aktivität und Fibrinopeptidabspaltung in der BAL	51
8	Charakterisierung der pro- und antifibrinolytischen Aktivität in der BAL.52	
8.1	Charakterisierung der gesamten fibrinolytischen Aktivität (FA)	52
8.2	Plasminogenaktivatoren	54
8.2.1	Gewebsplasminogen Aktivator (t-PA).....	54
8.2.2	Urokinase (u-PA).....	54
8.3	Plasminogen Aktivator-Inhibitor und α_2 – Antiplasmin.....	56
8.3.1	Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1)	56
8.3.2	α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP).....	57
9	Charakterisierung des intraalveolären Fibrinumsatzes	58
9.1	D-Dimer	58
VI.	Diskussion.....	60
10	Prokoagulatorische und fibrinolytische Aktivität im alveolären Kompartiment von Patienten mit akut inflammatorischen und chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen.....	60
11	Fibrinablagerung.....	64
12	Zusammenfassende Wertung aller Ergebnisse; Therapeutische Perspektiven	65
VII.	Zusammenfassung.....	66
VIII.	Summary.....	69
IX.	Literaturverzeichnis.....	71
X.	Danksagung	77
XI.	Lebenslauf.....	78

I. Vorwort

Unter physiologischen Bedingungen stehen Gerinnung und Fibrinolyse im alveolären Kompartiment miteinander in einem dynamischen Gleichgewicht, das gewährleistet, dass abgelagertes Fibrin rasch aufgelöst wird.

Eine persistierende intraalveoläre Fibrinablagerung, auch als „hyaline Membran“ bezeichnet, ist ein Kennzeichen vieler akut inflammatorischer [43] und chronisch interstitieller Lungenerkrankungen. Obwohl die präzise Rolle der alveolären Fibrinbildung gegenwärtig noch unklar ist, könnte sie als primäre Matrix der Wund-Reparatur einen nützlichen Einfluss bei der Abdichtung des zerstörten Alveolarepithels ausüben. Andererseits hat die Lungenfibrose ihren Ursprung in eben diesen hyalinen Membranen, in die Fibroblasten einwandern und die später durch ein kollagenhaltiges Stroma ersetzt werden. Somit kann die alveoläre Fibrinbildung auch einen deletären Einfluss auf die Lungenfunktion ausüben.

Veränderungen der prokoagulatorischen Aktivität konnten bislang vor allem in bronchoalveolären Lavagen (BAL) von Patienten mit ARDS [59, 58, 75] sowie tierexperimentell am Modell der akuten respiratorischen Insuffizienz (Bleomycinmodell) nachgewiesen werden [63]. Hinsichtlich der Veränderungen prokoagulatorischer bzw. fibrinolytischer Komponenten bei chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen sind bislang nur wenige Studien durchgeführt worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht die prokoagulatorische und fibrinolytische Aktivität in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von Patienten mit akut inflammatorischen und chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen zu charakterisieren und mit normalen Probanden zu vergleichen.

II. Einleitung

1 Gerinnungssystem

Die plasmatische Gerinnung ist ein wichtigster Teil der Hämostase. An deren Regulation sind insgesamt mehrere Gerinnungsfaktoren (Proteine) beteiligt. Hierbei handelt es sich zumeist um Enzyme, die im Plasma in inaktiver Form als Proenzyme zirkulieren und nach der Auslösung der Gerinnung stufenweise aktiviert werden (Gerinnungskaskade). Die wichtigsten Faktoren sind in Abbildung 1 aufgeführt.

Je nach den auslösenden Mechanismen unterscheidet man zwischen dem endogenen (intrinsischen) und exogenen (extrinsischen) plasmatischen Gerinnungssystem, die in einer gemeinsamen Endstrecke, der Thrombin-induzierten Konversion von Fibrinogen zu Fibrin, enden. Mittlerweile wird dem extrinsischen Gerinnungssystem eine übergeordnete Bedeutung beigemessen.

- **Intrinsisches System:** Durch die freigelegten Kollagenfasern bei einer Schädigung des Endothels wird der Faktor-XII aktiviert und in Faktor XII-a umgewandelt. An diesem Prozess sind weiterhin die Plasmaproteine HMWK (*High-Molecular-Weight-Kininogen*) und Präkallikrein (PKK) beteiligt. Danach erfolgt eine Umwandlung von Faktor XI zu Faktor XIa, der bei Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen wiederum eine Aktivierung des Faktors IX bewirkt. Faktor IXa bildet mit Phospholipiden, Ca^{2+} -Ionen und Faktor VIII einen Komplex, an dem die Aktivierung von Faktor X zu Xa erfolgt.
- **Extrinsisches System:** Die exogene Aktivierung des Gerinnungssystems erfolgt durch Faktor VII mit Gewebsthromboplastin (*tissue factor*) als Protein-Cofaktor. *Tissue factor*, das ubiquitär in Zellmembranen vorkommt, wird nach Verletzung an der Membranoberfläche exprimiert und aktiviert Ca^{2+} -abhängig den Faktor VII. *Tissue factor* und Faktor-VIIa bilden in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen an Phospholipidmembranen einen Komplex, an dem die Aktivierung des Faktors X erfolgt.

Faktor X wird als einziger Faktor sowohl über das exogene als auch das endogene System zum Faktor Xa aktiviert. In Gegenwart von Faktor V (Proaccelerin), Ca^{2+} und Phospholipid wird dann Prothrombin durch Faktor Xa zu Thrombin aktiviert. Thrombin spaltet am Fibrinogenmolekül die beiden Fibrinopeptide FP-A und FP-B ab. Das so entstandene Fibrinmonomer lagert sich zu Oligo- bis Polymeren aneinander und wird durch Faktor XIII kovalent quervernetzt und verfestigt.

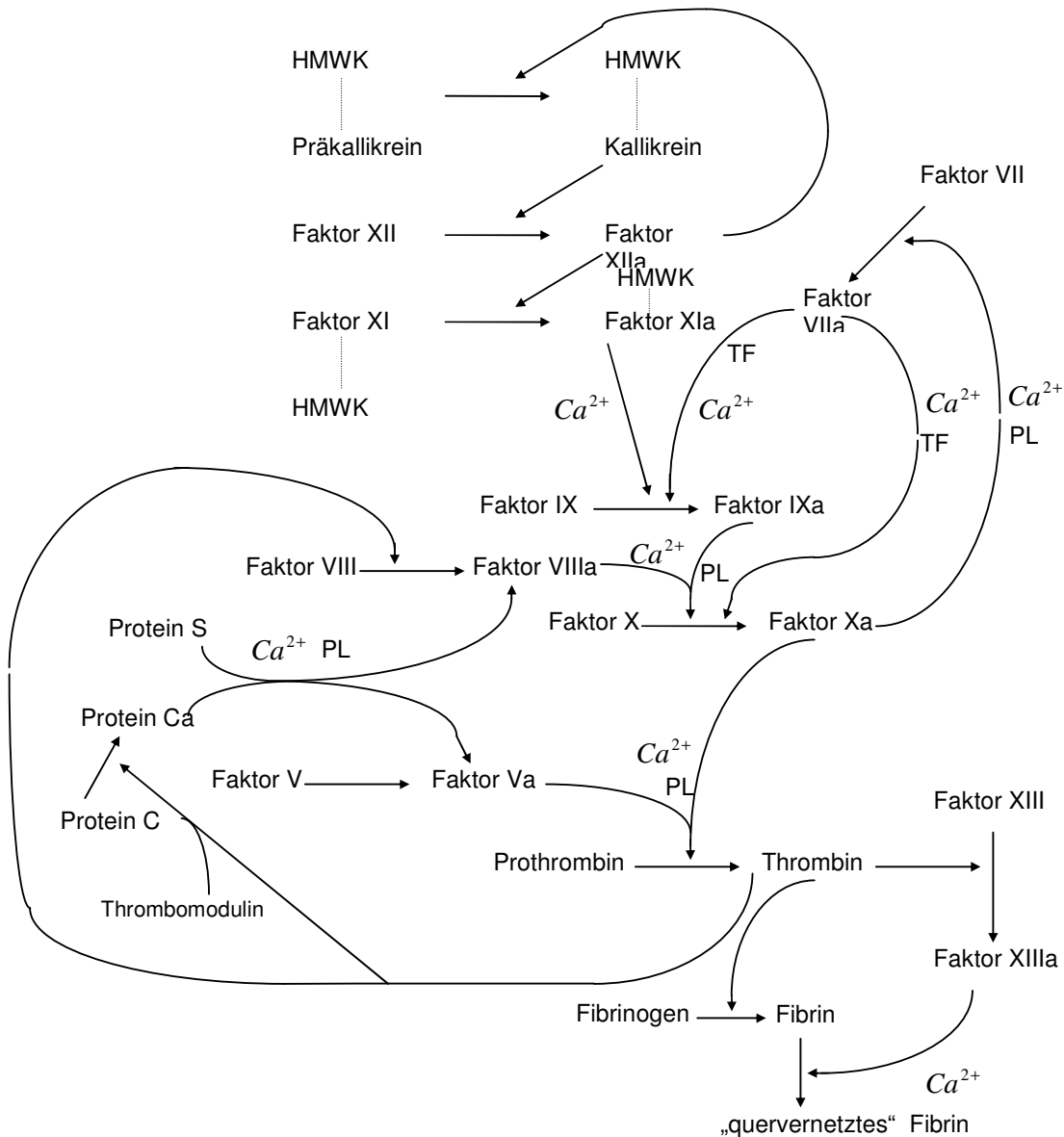


Abbildung 1. Plasmatische Gerinnung modifiziert nach Torben Halkier [70]

F I	Fibrinogen	F X	Stuart-Power-Faktor, Plasmathromboplastin
F II	Prothrombin	F XI	Plasmathromboplastin antecedent
F III	Gewebsthromboplastin, <i>tissue factor</i>	F XII	Hageman-Faktor
F V	Proaccelerin	F XIII	Fibrinstabilisierender Faktor
F VII	Proconvertin	Präkallikrein	Fletcher-Faktor
F VIII	Antihämophiler Faktor	HMWK	<i>High molecular weight kininogen</i> , Fitzgerald-Faktor
F IX	<i>Christmas</i> Faktor		

Tabelle 1. Plasmatische Gerinnungsfaktoren

Im folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Komponenten des Gerinnungssystems erläutert.

1.1 Faktor VII (Prokonvertin)

Faktor VII ist die Vorstufe (Zymogen) einer aktiven Serinprotease in Plasma, die am extrinsischen Gerinnungspfad beteiligt ist. Es ist ein einkettiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45-53 kD, das Vitamin K abhängig in der Leber gebildet wird.

Im normalen humanen Plasma ist die Konzentration von Faktor VII niedrig (etwa $0,5 \mu\text{g/ml} \cong 10 \text{ nM}$). Im Gegensatz zu anderen Gerinnungsfaktoren weist Faktor VII nur eine geringe proteolytische Aktivität auf. Faktor VII wird durch *tissue factor*, FXa, aber auch durch Kallikrein und FIXa zu Faktor VIIa aktiviert. Dies geschieht durch Spaltung der AS-Bindung zwischen Arginin 152-Isoleucin 153, wodurch aus der einkettigen enzymatisch inaktiven Vorstufe eine zweikettige, über eine Disulfidbrücke verknüpfte aktive Serinprotease entsteht, welche im folgenden Faktor X zu Faktor Xa aktiviert.

Faktor VII-Mangel wurde 1951 als Krankheit beschrieben und bis 1991 wurden etwa 150 Fälle dokumentiert.

1.2 Tissue factor (Gewebsthromboplastin)

Tissue factor (Gewebsthromboplastin; Faktor III) ist ein großer Lipoproteinkomplex. Für die volle Wirkung im exogenen System ist sowohl der Lipidanteil als auch der Glykoproteinanteil erforderlich. Der Proteinanteil (Apoprotein) des humanen Gewebsthromboplastins ist ein einkettiges Glykoprotein aus 263 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 43-53 kD [70].

Die Interaktion zwischen Phospholipidteil und Apoprotein beruht auf einer hydrophob-hydrophoben Wechselwirkung und ist unabhängig von Ca^{2+} -Ionen. Der amphiphile Charakter ist essentiell zur Verankerung in Zellmembranen. Die Wirkung von *tissue factor* ist Spezies-spezifisch, wobei der Eiweißanteil für die Spezifität verantwortlich ist. *Tissue factor* kommt ubiquitär in Zellmembranen vor und wird nach Verletzungen an der Membranoberfläche exprimiert. Gehirn, Lunge und Plazenta enthalten die größten Mengen. Substanzen mit Gewebsthromboplastinwirkung wurden auch im Harn (Urothromboplastin) gefunden und werden in normalen Monozyten, wie auch in Leukämiezellen produziert [10].

1.2.1 *Tissue factor abhängige Aktivierungsprozesse*

Die Reaktionen, an denen *tissue factor* (Gewebsthromboplastin) als Cofaktor beteiligt ist, finden auf der Zelloberfläche von Endothelien und Monozyten statt [70].

Ein *tissue factor* Molekül kann sich mit einem Molekül Faktor VII oder VIIa verbinden. Die Komplexbildung zwischen Faktor VII, VIIa und *tissue factor* ist von Ca^{2+} -Ionen abhängig. Die Anwesenheit von Phospholipiden verstärkt zwar die Bindung zwischen Faktor VII, VIIa und *tissue factor*, ist aber dafür nicht unbedingt notwendig.

Nach der Bindung von Faktor VIIa an *tissue factor* wird dessen Affinität zu Faktor X erhöht, und schließlich wird Faktor X zu Faktor Xa umgewandelt. Es konnte gezeigt werden, dass Faktor VII nicht in der Lage ist den Faktor X direkt zu aktivieren. Dies ist nur im Gegenwart vom *tissue factor* und Ca^{2+} -Ionen möglich [70].

1.2.2 *Fibrin(ogen)*

1.2.2.1 *Fibrinogenaufbau*

Fibrinogen (Faktor I) ist ein ca. 45 nm langes Glykoprotein und wird als Hauptfaktor der Plasmakoagulation betrachtet. Sein Molekulargewicht beträgt 345 kD [1]. Es wird in der Leber produziert und zirkuliert im Plasma mit einer Konzentration von 2-4 mg/ml (ca. 6-13 μ M). Fibrinogen besitzt eine trinoduläre Struktur die aus der Verknüpfung von drei Polypeptidketten resultiert. Eine A- α (610AS), B- β (461AS) und eine γ -Kette (411AS) sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Zwei solcher identischen Monomere sind an ihren N-terminalen Enden (zentrale E-Domäne) wiederum durch drei Disulfidbrücken zu einem symmetrischen Molekül verknüpft.

Für die Struktur und diverse biochemische Eigenschaften des Fibrinogenmoleküls haben Ca^{2+} -Ionen eine besondere Bedeutung. So stabilisiert Calcium das Fibrinogenmolekül vor allem in Gegenwart proteolytisch wirksamer Enzyme wie Plasmin und Trypsin. Es kann die non-kovalente Anlagerung zweier Fibrinogenmoleküle begünstigen, und es schützt das Molekül vor Hitze-Denaturierung. Das intakte Fibrinogen besitzt schließlich drei hochaffine Calcium-Bindungsstellen [47,55].

1.2.2.2 Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin

In der Endphase der Gerinnung erfolgt die Umwandlung des löslichen Fibrinogens in das unlösliche Fibringerinnsel durch Thrombin. Dabei kommt es durch die Reaktion mit Thrombin zur Abspaltung von je zwei Molekülen Fibrinopeptid A (FP-A) von der A- α -Kette und Fibrinopeptid B (FP-B) von der B- β -Kette. Die Abspaltung des FP-A erfolgt schneller als die des FP-B.

1.2.2.3 Fibrinpolymerisation und - Matrix-Struktur

Nach Freisetzung der Fibrinopeptide werden im N-terminalen Bereich (E-Domäne) des Fibrinmoleküls zwei Bindungsstellen frei, die an der Fibrinpolymerization beteiligt sind (siehe Abbildung 4).

Die Fibrinpolymerisation erfolgt durch End-zu-End und Seit-zu-Seit-Anlagerungen sowie Verzweigung der Fibrinmonomere zu einem losen Fibrinnetz.

Während polymerisiertes Fibrin nicht kovalent verbunden und somit noch instabil ist, kommt es unter der Einwirkung von Thrombin-aktiviertem Faktor XIII (Faktor XIIIa) und Calcium zu einer kovalenten Quervernetzung. Zwischen den γ -Carboxyamidgruppen von Glutamin und den ϵ -Aminogruppen von Lysin kommt es zur Ausbildung von Peptidbindungen und damit zur Stabilisierung des Fibrin [10] (siehe Abbildung 4).

1.2.2.4 Fibrinabbau

Beim Abbau von Fibrinogen und Fibrin durch Plasmin entstehen als erstes die hochmolekularen Zwischenprodukte X und Y und einige niedermolekulare Peptide. Aus der terminalen Spaltung eines nativen Fibrinogenmoleküls gehen anschließend zwei D- und ein E-Fragment hervor. Nach Polymerisation des Fibrins und Quervernetzung durch Faktor XIII werden beim Abbau höhermolekulare Spaltprodukte wie z.B. E-DD-E oder DD-E-DD-Fragmente gebildet; die F XIII- vermittelte, kovalente Quervernetzung kann durch Plasmin nicht weiter abgebaut werden. Eine physiologisch bedeutsame Eigenschaft der Fibrinogen- und Fibrin-Spaltprodukte ist ihre gerinnungshemmende Wirkung. Sie bewirken sowohl eine Hemmung der proteolytischen Aktivität von Thrombin, als auch eine Hemmung der Fibrin-Polymerisation durch Kettenabbruch.

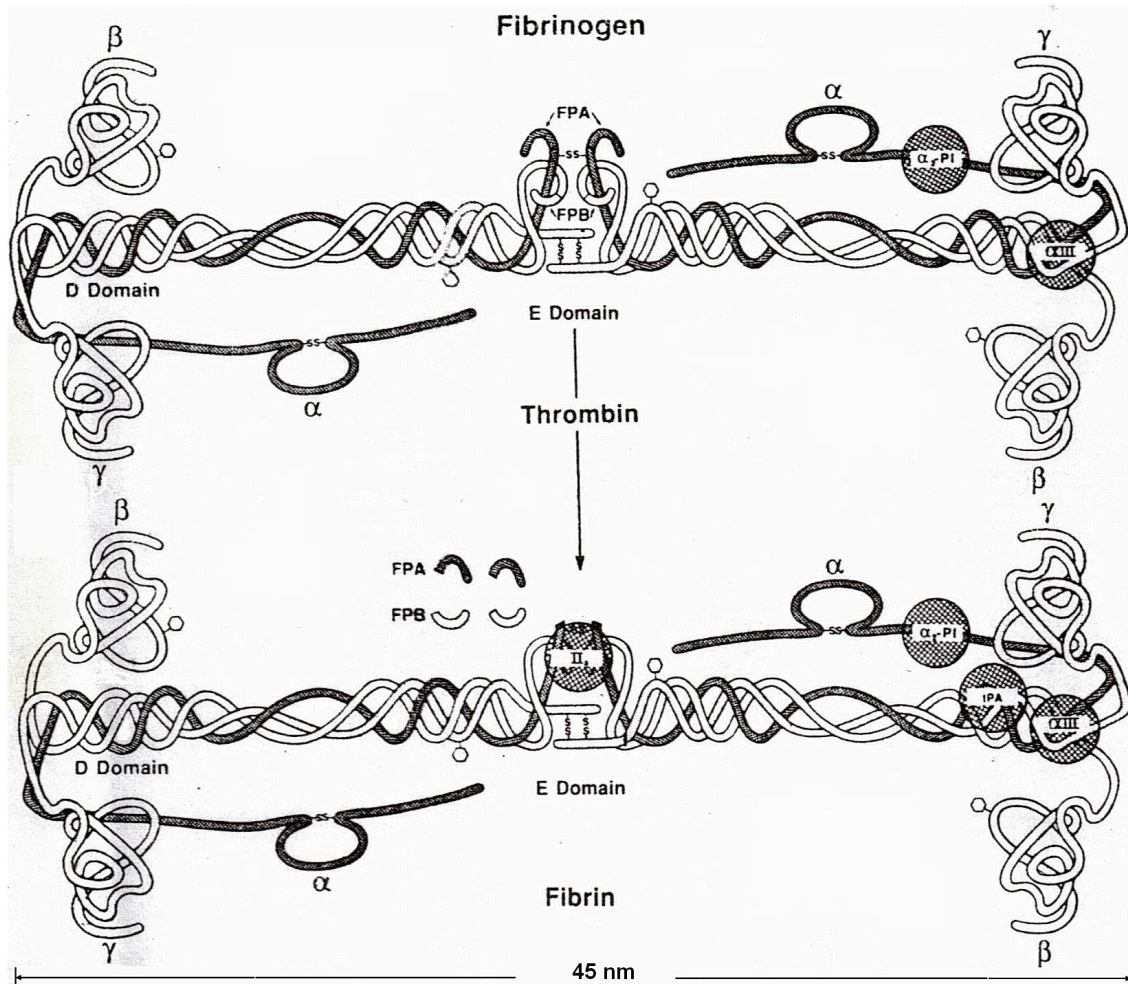


Abbildung 2. Aufbau Fibrinogenmolekül und Umwandlung in Fibrin. (A): Fibrinogen enthält drei Polypeptidketten Paare; α , β und γ , die durch Disulfidbrücken zu einem symmetrischen Dimer-Molekül verknüpft sind. Die NH₂-terminale Region enthält in der Zentralsdomäne (E-Domäne) die FP-A- und FP-B-Sequenzen, die durch Thrombin während der enzymatischen Fibrinogen-Umwandlung zu Fibrin abgespalten werden. Bindungsstellen für F IIa (Thrombin), t-PA, F XIII und α_2 -AP auf dem Fibrin- bzw. Fibrinogen-Molekül sind dargestellt (modifiziert nach Mosesson).

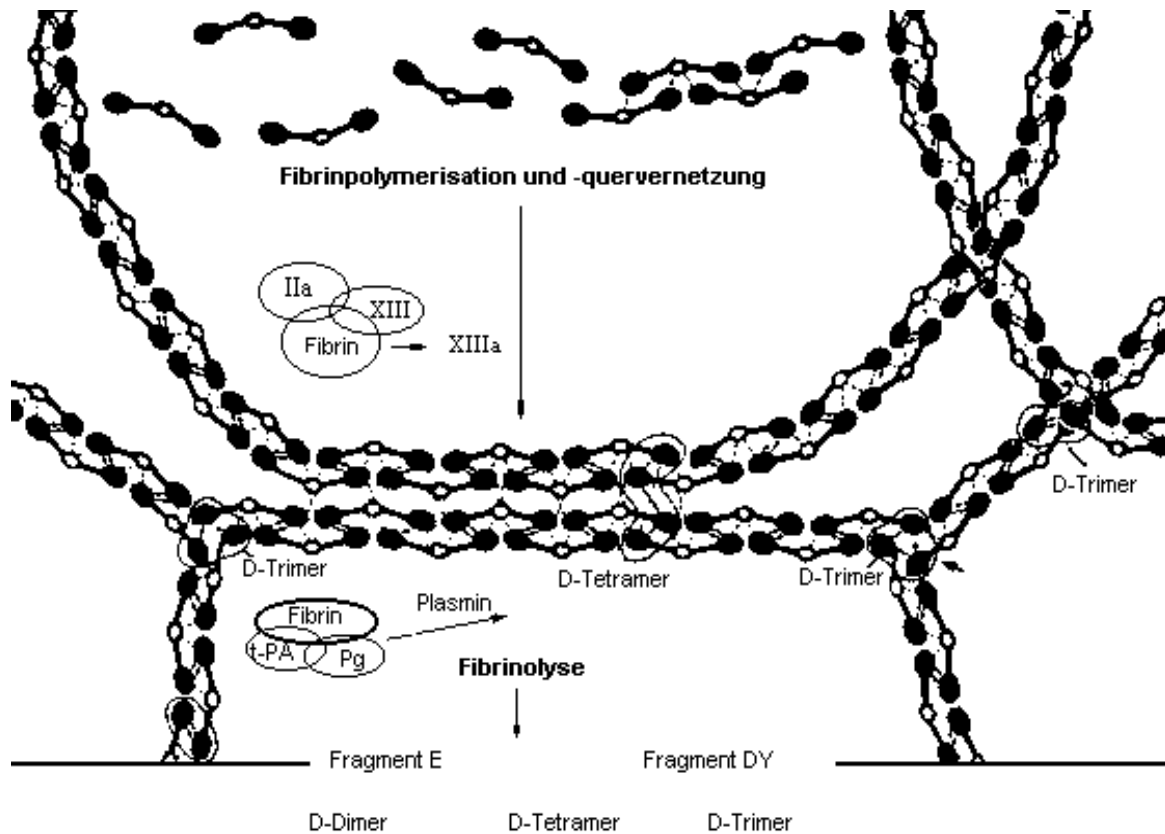


Abbildung 3. Schematisches Modell der Fibrinpolymerisation, -quervernetzung und Fibrinolyse. Fibrinogen besteht aus einer zentralen E-Domäne (o) und zwei äußeren D-Domänen (-). Nach enzymatischer Fibrinogenumwandlung zu Fibrin, bilden die Fibrinmonomere durch die nonkovalente Interaktionen zwischen E und D-Domänen (---) zweistrangige Fibrillen. Diese Fibrillen bilden gleichzeitig oder später durch nonkovalente Seit-zu-Seit Bindungen dickere Fasern und Verzweigungen (trimolekulare / tetramolekulare Verzweigungsstellen) und induzieren die Bildung einer dreidimensionalen Matrix. In Anwesenheit von Faktor XIIIa wird polymerisiertes Fibrin durch kovalente ϵ -(γ -glu)lys-Isopeptidbindungen quervernetzt und verfestigt. Die meisten Quervernetzungen werden zwischen den γ -Ketten erzeugt (γ -dimer)(\rightarrow). (Die Bindungen zwischen α -Ketten sind hier nicht dargestellt). Die tri- und tetramolekulare Vernetzungen werden durch die Quervernetzung der D-Fragmente mit den Nachbarketten gebildet. Bei der Fibrinolyse, wird Fibrin zwischen den D- und E-Domäne gespalten. Dabei entstehen DY-Fragmente, D-Dimere, D-Trimere und D-Tetramere.

2 Fibrinolyse

2.1 Übersicht

In Analogie zum Gerinnungssystem unterscheidet man im fibrinolytischen System zwischen einem endogenen und einem exogenen System. Während das endogene System über Plasmafaktoren vermittelt und u.a. durch Faktor XII und Kallikrein gestartet und katalysiert wird, wird das exogene System durch die Einwirkung der Plasminogenaktivatoren (PA) initiiert. Beide Systeme enden in der Spaltung einer Arginin-Valin-Bindung am Plasminogenmolekül, welches dadurch zu Plasmin aktiviert wird [69].

Durch die Einwirkung von Plasmin entsteht aus Glu-Plasminogen (mit Glutamin am Aminoterminus) Lys-Plasminogen und ein Aktivierungspeptid, das seinerseits wiederum die Aktivierung von Plasminogen fördert (positiver Rückkopplungs-Mechanismus). Plasmin spaltet Fibrinogen und Fibrin über die Lysinbindungsstellen an einigen wenigen Clustern in Fibrin(ogen)molekül, so dass als terminale Endprodukte die Fibrin(ogen)olyseprodukte FSE und FSD bzw. D-Dimer bei F XIII quervernetztem Fibrin entstehen.

Die zwei physiologischen Plasminogenaktivatoren sind uns als Gewebsplasminogen-Aktivator (*Tissue-type Plasminogen Activator* = t-PA) und Urokinase (*Urokinase-type Plasminogen Activator* = u-PA) bekannt. Eine Inhibition der Fibrinolyse wird hauptsächlich durch die PA-Inhibitoren (PAI-1 und PAI-2), oder durch Antiplasminen erzielt. Als Antiplasminen wirken α_2 -Antiplasmin, α_1 -Proteinase Inhibitor (α_1 -Antitrypsin), Inter- α -Trypsin-Inhibitor, Antithrombin III und α_2 -Makroglobulin. Die größte Bedeutung kommt dabei dem sehr schnell wirkenden α_2 -Antiplasmin zu.

In der Abbildung 4 sind die wichtigsten regulatorischen Mechanismen im exogenem System dargestellt [69, 70].

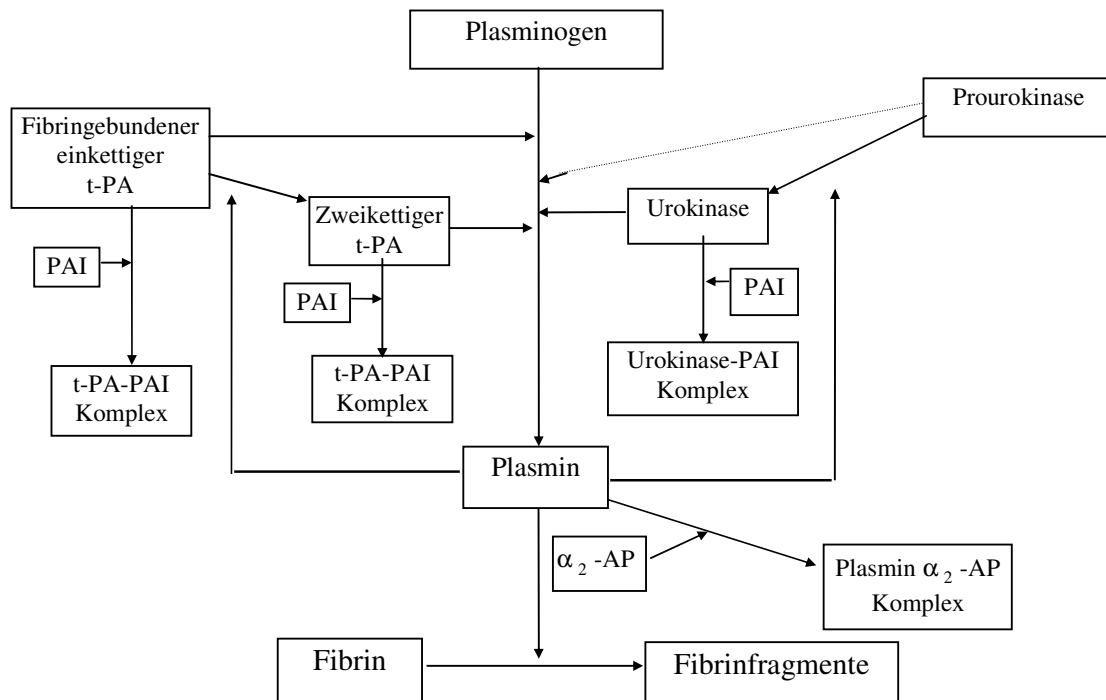


Abbildung 4. Fibrinolyse-System. α_2 -AP: α_2 -Antiplasmin, PAI: Plasminogen Aktivator Inhibitor, t-PA: Gewebe-Plasminogen Aktivator

2.2 Die Komponenten der Fibrinolyse

2.2.1 Plasmin(ogen)

Plasminogen ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 92 kD. Die Konzentration im Plasma beträgt 1,5-2 $\mu\text{mol/L}$. Das Molekül des humanen Plasminogen besteht aus 791 Aminosäuren und weist charakteristische Domänen, darunter fünf homologen Kringeldomänen auf (siehe Abbildung 5). Die N-terminale Aminosäure im nativen Molekül ist Glutaminsäure (Glu-Plasminogen). Infolge der Plasmin-vermittelten limitierten aminoterminalen Proteolyse entsteht Plasminogen mit Lysin (Lys), Valin oder Methionin als N-terminale Aminosäuren. Dieses sog. Lys-Plasminogen hat eine höhere Affinität zu Fibrin, ist leicht durch Spaltung der Arginin-Valin-Bindung zu Plasmin aktivierbar und hat eine kürzere biologische Halbwertszeit. Plasminogen wird wahrscheinlich in der Leber, den Eosinophilen des Knochenmarks und in der Niere gebildet. Die biologische Halbwertszeit von Glu-Plasminogen beträgt 2-2,5 Tage.

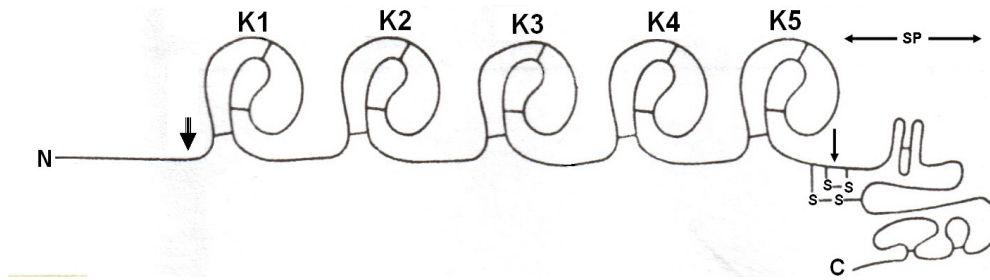


Abbildung 5. Schematische Darstellung des Plasminogens. K=Kringel, SP=Serinproteasen Domäne, → zeigt den Spaltungsort durch Plasminogenaktivatoren, ⇒ Spaltungsort durch Plasmin

Plasmin besteht aus zwei Aminosäureketten, einer schweren (H-) und einer leichten (L-) Kette, die durch Disulfidbrücken verknüpft sind. In der H-Kette befinden sich die Lysin-Bindungsstelle, über die Plasmin an Fibrin und α_2 -Antiplasmin bindet. Die L-Kette enthält das aktive Zentrum (Serinproteasen Domäne).

Plasmin ist eine Serinprotease und spaltet neben Fibrinogen Prothrombin, Faktor V, und Faktor VIII. Durch Spaltung des Plättchenmembranrezeptors verursacht Plasmin eine Veränderung der Plättchenfunktion [45]. Es aktiviert Faktor XII, Faktor VII sowie Komponenten des Komplementsystems [10].

2.2.2 Plasminogenaktivatoren

2.2.2.1 Urokinase (u-PA)

Urokinase ist einer der beiden physiologischen Plasminogenaktivatoren. Das Enzym wurde ursprünglich als zweikettiges Molekül (*two-chain u-PA*) mit einem Molekulargewicht von 50-54 kD aus dem Urin isoliert [70]. Im Plasma zirkuliert Urokinase mit einer Konzentration von 2 ng/ml in einer einkettigen Proenzym-Form, der sog. Prourokinase, auch *single-chain u-PA* genannt. Prourokinase besitzt aminoterminal eine Wachstumsfaktor Domäne, ein Kringeldomäne, und carboxyterminal die Serinproteasen Domäne (siehe Abbildung 6). Durch Plasmin- oder Kallikrein wird die Lysin-158/Isoleucin-159-Peptidbindung gespalten und das Zymogen aktiviert. Das resultierende zweikettige Molekül besteht aus einer schweren B-Kette (30 kD), welche das katalytische Zentrum beinhaltet, und einer leichten A-Kette (20 kD), die die Kringel-Domäne und Wachstumsfaktor-Domäne umfaßt, und durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

Humane Urokinase besteht aus 411 Aminosäuren. Das Gene das für humane Prourokinase kodiert, ist an q24-qter auf Chromosom 10 lokalisiert.

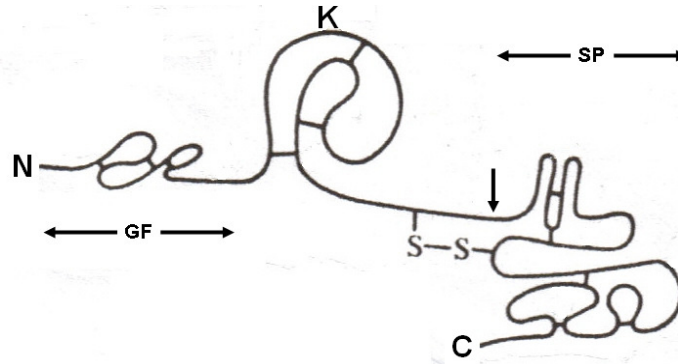


Abbildung 6. Schematische Darstellung der Prourokinase. K=Kringel, SP=Serinproteasen Domäne, GF=Wachstumsfaktor Domäne, → zeigt den Spaltungsort durch Plasmin zur Generierung der enzymatisch aktiven *two-chain* Form.

Die Bedeutung der Prourokinase für die Plasminogenaktivierung ist umstritten. Prourokinase selbst besitzt keine oder nur eine sehr geringe intrinsische Aktivität, jedoch eine signifikante spezifische Affinität zu Plasmin, welches die Umwandlung der Prourokinase zu Urokinase auf der Fibrinoberfläche vermitteln kann.

Eine besondere Rolle spielt das Urokinase/Urokinaserezeptor System in der Pathogenese maligner Erkrankungen. Durch verschiedene Tumore wird in verstärktem Umfang Urokinase synthetisiert und sezerniert. Urokinase und der Urokinaserezeptor sind essentielle Komponenten der extrazellulären Proteolyse, und üben daher einen bedeutenden Einfluss auf die Zellmigration, auch maligner Zellen aus [46].

2.2.2.2 Gewebeplasminogen Aktivator (t-PA)

Das Gewebeplasminogen Aktivator t-PA spaltet das Proenzym Plasminogen in ein aktives Enzym Plasmin [9] und ist der bedeutendste intravasale Plasminogenaktivator. Das in den Endothelzellen synthetisierte t-PA zirkuliert zu 5% in freier, aktiver Form sowie zu 95% als inaktiver Komplex an PAI-1 gebunden und besitzt eine hohe Fibrinaffinität. Die Konzentration im Plasma beträgt bei gesunden Probanden 2,4 bis 5 ng/ml (ca. 70 pM) [70], die Halbwertszeit beträgt 5 Minuten.

Das Gen zur Kodierung von t-PA liegt auf Chromosom 8 (8p12-q11.2). Einkettige t-PA hat ein Molekulargewicht von 70 kD, besteht aus 527 Aminosäuren und besitzt vier Domänen (s. Abbildung 7):

1. eine Fingerdomäne bestehend aus 47 Aminosäuren (AS 4-50). Diese Domäne ist an der hochaffinen Bindung an Fibrin und auch an Fibronectin beteiligt.
2. eine Wachstumsfaktor (*Growth Factor*) Domäne, die sich von den Aminosäuren 50-87 erstreckt und Homologie zum humanen epidermalen Wachstumsfaktor aufweist.

3. zwei Kringel Domänen von AS 87-176 und 176-262, welche einen hohen Grad an Homologie mit den fünf Kringeln des Plasmins zeigen. Die zweite Kringel Domäne ist wesentlich für die hohe Affinität des t-PA Moleküls an Fibrin verantwortlich.
4. eine Serinproteasen Domäne (AS 276-527), die das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade His-322, Asp-371 und Ser-478 enthält.

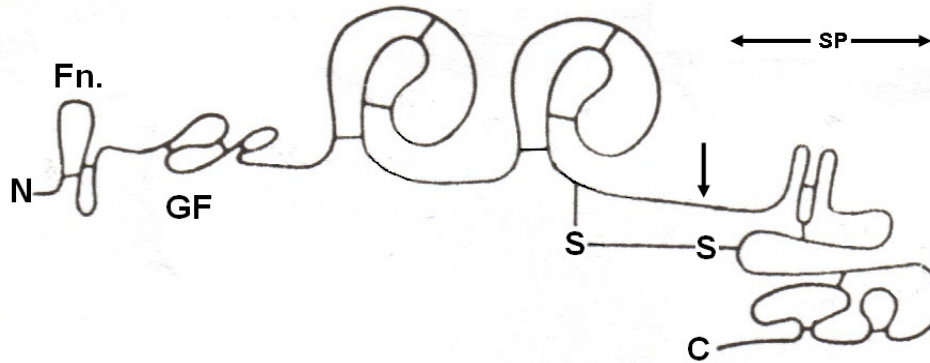


Abbildung 7. Schematische Darstellung des t-PA. Fn=Fibronectin Domäne, GF=Wachstumsfaktor Domäne, SP=Serinproteasen Domäne, K= Kringel Domäne, → zeigt die Spaltstelle durch Plasmin

Einkettiger t-PA wird durch Plasmin unter Spaltung der Arg-278-Ile-279 Peptidbindung in den zweikettigen t-PA umgewandelt. Die Fibrinspezifität des t-PA wird durch die Fibrin-Bindung der Finger- und zweiten Kringel Domäne herbeigeführt, wobei die letztgenannte über Lysin-Bindungsstellen an Fibrin bindet. An der Oberfläche von Fibrin gebundener t-PA bildet mit Plasminogen einen ternären Komplex, über den die Aktivierung des Plasminogen etwa 1000 fach schneller erfolgt als durch isolierten t-PA allein.

Ein- und zweikettiger t-PA besitzen eine annähernd gleiche Kapazität zur Plasminogenaktivierung, jedoch unterscheiden sie sich in ihre Sensibilität gegenüber einer Inaktivierung durch ihren physiologischen Inhibitor. Zweikettiger t-PA wird leichter als einkettiger t-PA durch PAI-2 inaktiviert.

2.2.3 Inhibitoren des fibrinolytischen Systems

2.2.3.1 Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) und PAI-2

Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) ist eine Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 52 kD und besteht aus 379 Aminosäuren [70]. Er gehört zur Familie der Serinproteaseninhibitoren (Serpine) und weist partielle Homologien mit Antithrombin III, PAI-2, α_2 -AP, C1-Inhibitor, und α_1 -Proteaseinhibitor auf. Das Gen für PAI-1 liegt auf Chromosom 7, Position q21.3-q22 [46].

PAI-1 wird in Endothelzellen, der glatten Muskulatur der Gefäßwand, Leberzellen, Megakaryozyten sowie Thrombozyten produziert und zirkuliert mit einer Konzentration von 30 ng/ml (0,5-1nM) im Blut, wobei drei Formen unterschieden werden:

- latenter und somit nur geringgradig aktiver PAI-1, der durch negativ geladene Phospholipide in die aktive Form überführt werden kann,
- aktiver PAI-1, der durch die Cofaktoren Vitronektin und Heparin stabilisiert wird,
- inaktiver PAI in Form von PAI-Plasminogen Aktivator-Komplexen. Dieser inaktive PAI kann nicht mehr in die aktive Form zurückgeführt werden.

Ein großer Teil des PAI-1 wird in den α -Granula der Blutplättchen gespeichert, und liegt dort zum überwiegenden Teil in der latenten Form vor. PAI-1 kann auf Stimulation aus den Plättchen freigesetzt werden und in Thromben akkumulieren. Im Rahmen von vitro Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die von Plättchen in den Thrombus freigesetzte Mengen an PAI wesentlichen Einfluss auf die Lysefähigkeit und die Ausdehnung eines Thrombus hat. Erhöhte PAI-1-Spiegel begünstigen den Umfang der Thrombose bei Myokardinfarkt und tiefer Venenthrombose [66].

Im Gegenteil zur latenten Form kann die aktive Form equimolare Komplexe mit t-PA und u-PA bilden. PAI-1 ist ein effizienter Inhibitor von t-PA und u-PA, nicht jedoch von Prourokinase.

PAI-2 wird in Plazenta und Monozyten gebildet und ist ein Marker für die Plazentafunktion. PAI-2 inhibiert u-PA und zweikettigen t-PA schneller als einkettigen t-PA. Seine physiologische Funktion in der Plazenta ist unbekannt, wahrscheinlich beugt er einer frühzeitigen Ablösung der Plazenta vor [36]. Zu den Plasminogenaktivator Inhibitoren zählen noch PAI-3 und Protease Nexin. PAI-3 inhibiert nur Urokinase.

2.2.3.2 α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP)

α_2 Antiplasmin (α_2 -AP) ist ein einkettiges Plasma-Glycoprotein aus 452 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 67 kD und wird in der Leber synthetisiert. Das α_2 -AP Gen umfasst 10 Exons und 9 Introns und ist auf Chromosom 18 (18p11.1-q11.2) lokalisiert [35].

Die Plasmakonzentration von α_2 -AP beträgt 70 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ($\cong 1\mu\text{M}$). Die biologische Halbwertszeit beträgt 3,3 Tage. α_2 -AP ist ein Serinproteaseninhibitor und kann neben Plasmin auch andere Serinproteasen inhibieren.

Das α_2 -AP-Molekül hat drei funktionelle Domänen:

- aktives Zentrum
- Plasminogenbindungs-Domäne
- „Cross-linking“-Seite zur Bindung an Fibrin.

Das aktive Zentrum des α_2 -AP geht mit den aktiven Zentren anderer Serinproteasen eine kovalente Bindung ein, die zu einem Funktionsverlust der Enzymaktivität führt.

Darüber hinaus bindet die Plasminogenbindungs-Domäne über Lysinreste an Plasminogen und Plasmin, an der Stelle an der auch Fibrin bindet, und hemmt dadurch kompetitiv das Plasmin. Die hohe Affinität der Plasminogenbindungs-Seite zu Plasmin beschleunigt die Komplexbildung zwischen Plasmin und α_2 -AP, so dass Plasmin schnell gehemmt wird.

Während der Koagulation binden ca. 20% des zirkulierenden α_2 -AP an Fibrin, und stabilisiert so den Clot gegen eine Fibrinolyse [35].

Ein angeborener Mangel an α_2 -AP verursacht eine ernsthafte Blutungsneigung, da der Hämostase Prozess sich nicht gegen die physiologische Fibrinolyse durchsetzen kann.

3 Physiologie und Pathophysiologie des alveolären Gerinnungssystems am Beispiel des ARDS

3.1 Physiologie

Die Lunge mit dem größten Mikrozirkulationssystem filtert das gesamte Blutvolumen. Ein riesiges Kapillarnetz, dessen Volumen zwar bloß etwa 150 ml, dessen Oberfläche aber rund 140 m^2 beträgt, gewährleistet eine großflächige Kontaktaufnahme zwischen Alveolarluft und Kapillarblut über eine feinste Gewebeschranke, die aus folgenden Komponenten besteht:

1. kapilläres Endothel
2. Stützgewebe (Interstitium)
3. Alveolarepithel (aus Typ -I und -II Pneumozyten)
4. Surfactant, der als dünner Film das respiratorische Epithel auskleidet

Prinzipiell gelten auch für das alveoläre Kompartiment die gleichen biochemischen und physiologischen Aspekte wie für die intravasale Gerinnung. Die Gerinnungsaktivierung in der Alveole erfolgt fast ausschließlich *tissue factor*-abhängig über den extrinsischen Teil des Gerinnungssystems. Innerhalb der Alveolen wurde eine Thromboplastin-Expression und – Sekretion durch alveoläres Epithel und Alveolar-Makrophagen beobachtet [22, 40, 3]. Unter physiologischen Bedingungen lassen sich sowohl Plasminogen wie auch Plasminogen-Aktivatoren vom Urokinase-Typ in der bronchoalveolären Lavage nachweisen, während Fibrinogen bisher nicht gefunden wurde [76, 26, 21, 59].

3.2 Pathophysiologie

Über die Hämostase Veränderungen im alveolären Kompartiment und ihre pathophysiologischen Abläufe ist grundsätzlich wenig bekannt. Diese Veränderungen sind am besten bei Patienten mit ARDS untersucht worden.

3.2.1 ARDS

Das akute Lungenversagen des Erwachsenen (*acute respiratory distress syndrom*, ARDS) umfasst eine akute Gasaustauschstörung der Lunge, die durch verschiedene Auslöser verursacht wird und in der Regel zu einer pulmonalen Flüssigkeitseinlagerung, Störung der pulmonalen Vasomotion und Abnahme der Compliance führt. Unter den auslösenden Komponenten lassen sich primäre (Aspiration von Mageninhalt oder Süß-/Salzwasser, Inhalation toxischer Gase, u.a.) von sekundären (Sepsis, Polytrauma, Massentransfusion, DIC, Pankreatitis, Verbrennung u.a.) Lungenparanchymläsionen unterscheiden [73, 28, 27, 72]. Die Inzidenz liegt je nach definiertem Schweregrad der initialen Gasaustauschstörung zwischen 3/100000 und 75/100000, und die Angaben zur Letalität schwanken ebenfalls in Abhängigkeit vom Schweregrad des ARDS zwischen 50 und 70% [7].

Das ARDS stellt ein nonuniformes, pathophysiologisch komplexes Krankheitsgeschehen mit unterschiedlicher Ätiologie dar, das durch die Aktivierung verschiedener humoraler (Eikosanoide, Sauerstoffradikale, Proteasen, Zytokine, plättchenaktivierender Faktor, Gerinnungskaskade, Komplementsystem und Kallikrein-Kininkaskade) wie zellulärer (aktivierte Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Typ II Pneumozyten) Effektoren in einem vergleichbaren Endzustand der Gasaustauschstörung der Lunge mündet [74, 72, 27].

Die der Entwicklung des ARDS zugrunde liegenden, ausgedehnten inflammatorischen Reaktionen des mikrovaskulären, interstitiellen und alveolären Kompartimentes führen zu

- einem Anstieg der kapillär-endothelialen wie der alveolär-epithelialen Permeabilität, mit der Folge einer Exsudation proteinreicher Ödemflüssigkeit zunächst in den perivaskulären, interstitiellen, später auch in den alveolären Raum (*plasma protein leakage*),
- einem Anstieg des pulmonal vaskulären Widerstandes mit konsekutiver Maldistribution der pulmonalen Perfusion,
- einer alveolären Instabilität mit Ausbildung von Atelektasen und einer inhomogenen Verteilung der Ventilation,
- einer schweren Gasaustauschstörung, die durch Ventilations-Perfusions Verteilungsstörungen und ausgeprägtem Shuntfluß gekennzeichnet sind.

Die akute exsudative Phase des ARDS kann innerhalb von Tagen bis wenigen Wochen folgenlos ausheilen. Häufig allerdings - und durch sekundäre, repetitive nosokomiale Infektionen begünstigt - entwickelt sich auf dem Boden einer Aktivierung mesenchymaler Zellen (Fibroblasten) eine foudroyant ablaufende Lungenfibrose [27, 72]. Mit Erreichen dieses Stadiums verschlechtern sich die prognostischen Aussichten erheblich, selbst im Falle des Überlebens verbleiben die vorangegangenen schweren und irreversiblen fibrotischen Umbauten der Lungenstruktur.

3.2.2 *Veränderung des Gerinnungssystem bei ARDS*

Die Exsudation von Plasmaproteinen repräsentiert einen der ersten Schritte in der pathologischen Sequenz des ARDS. Bei einer Permeabilitätsstörung des Kapillarendothels und des Alveolarepithels treten Plasmaproteine und somit auch Fibrinogen ins Interstitium und den Alveolarraum über (*plasma protein leakage*). In bronchoalveolären Lavagen von ARDS Patienten wurde regelmäßig ein erhöhter Proteingehalt festgestellt, der zudem von der Schwere der klinischen Symptomatik abhängig war.

Intraalveolär angesammeltes Fibrinogen wird im Verlauf akut oder chronisch inflammatorischer Erkrankungen in Fibrin umgewandelt, dessen histo-morphologisches Korrelat die hyalinen Membranen darstellen [37, 38, 33, 52, 25]. In der BAL von ARDS-Patienten [29, 59, 75] wie auch in experimentellen Ansätzen der Lungenschädigung nach Bleomycin Applikation [61, 60, 63, 62] konnte ein Anstieg der prokoagulatorischen Aktivität beobachtet werden, die fast ausschließlich dem *tissue factor* zuzuordnen war. Weiterhin wurden erhöhte Antigenpiegel für PAI-1 und α_2 -AP gefunden. Im Gegensatz hierzu war die Aktivität des Plasminogen-Aktivators Urokinase deutlich erniedrigt [59,58]. Hieraus resultiert eine Verschiebung des Hämostasegleichgewichtes zugunsten der Gerinnung, was eine weitere Fibrinbildung und -ablagerung zur Folge hat.

Weiterhin wird durch das Plasma-Proteinleakage ins alveoläre Kompartiment die Funktion des Pulmonalen Surfactant inhibiert. Albumin, Hämoglobin und Fibrinogen besitzen definierte Surfactant hemmende Eigenschaften [75]. In diesem Zusammenhang erscheint der jüngst erhobene Befund einer Inkorporation lipophiler Surfactantkomponenten in ein polymerisierendes Fibringerinnsel und die damit verbundene, massive Störung der oberflächenspannungsreduzierenden Funktion des Surfactants von besonderer Bedeutung. Eine derartige Interaktion führt zu einer alveolären Instabilität mit Kollapsneigung und trägt wesentlich zur Verschlechterung der Gasaustauschfunktion bei. Die gestörte Surfactant-Funktion verstärkt wiederum als *circulus vitiosus* den Austritt von Plasmaproteinen durch den zunehmenden Unterdruck bei Verlust der Oberflächenspannungsregulation [76].

Darüber hinaus ergaben Untersuchungen über den Einfluss der Inkorporation eines Kälberlungen Surfactant-Extraktes in Fibrin auf die enzymatische Auflösung dieser Gerinnsel durch Plasmin-, Trypsin- und Elastase eine ausgeprägte Verzögerung der Proteolyse [15].

III. Fragestellung

Vor dem Hintergrund der beim ARDS in erheblichem Umfang ablaufenden alveolären Gerinnungsprozesse wurde in der vorliegenden klinischen Studie versucht, Antworten auf die Fragen nach der Regulation der alveolären prokoagulatorischen und antifibrinolytischen Aktivitäten bei verschiedenen pulmonalen Erkrankungsbildern zu finden. Untersucht wurden Patienten mit chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen (Sarkoidose, Idiopathische Pulmonale Fibrose und Exogen Allergische Alveolitis), sowie Patienten mit akut inflammatorischen Lungenerkrankungen (ARDS und Pneumonie). Gesunde Freiwillige bildeten die Kontrollgruppe.

Über das diagnostische Fenster der bronchoalveolären Lavage wurde über Aktivitätsmessungen oder immunologische Techniken (ELISA) die globale thromboplastische oder fibrinolytische Aktivität, Faktor VII, u-PA, t-PA, PAI-1 und α_2 -AP gemessen. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Wie verändern sich die prokoagulatorische Aktivität und die fibrinolytische Aktivität in der BAL von akut inflammatorischen und chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen im Vergleich zu gesunden Probanden?
- Gibt es deutliche Veränderungen der Aktivität des Faktor VII in den betreffenden Kollektiven?
- Lässt sich eine der Entwicklung der prokoagulatorische Aktivität entgegengesetzte Veränderung der globalen fibrinolytischen Aktivität in den akut inflammatorischen oder chronisch interstitiellen Kollektiven beobachten?
- Liegen den Veränderungen der fibrinolytischen Aktivität entsprechende Veränderungen der Einzelfaktoren (u-PA, t-PA, PAI-1 und α_2 -AP) zugrunde?
- Welche der oben genannten Parameter eignet sich besonders gut zur Differenzierung und Charakterisierung der Verschiebung des hämostaseologischen Gleichgewichtes?
- Können anhand der FP-A und D-Dimer Konzentrationen in der BAL Unterschiede im alveolären Fibrin Umsatz zwischen den Kontrollen und den Patientenkollektiven herausgearbeitet werden?
- Kann ein Zusammenhang zwischen den hämostaseologischen Veränderungen und dem Schweregrad sowie dem Verlauf der obengenannten Lungenerkrankungen hergestellt werden?

IV. Materialien und Methoden

4 Materialien

4.1 Geräte

Amelung, Lemgo	Kugelkoagulometer KC 40
Canberra Packard, Schwarzdorf	Cobra Auto-Gamma, Mod. B5003 (γ -Counter)
DuPont, Bad Homburg	Ultra-Zentrifuge Sorvall RC5C
Eppendorf, Hamburg	Pipetten
Hettich, Tuttlingen	Laborzentrifuge Rotanta/RP
Janke & Kunkel, Staufen	Schüttler Ika - Vibrax - Type VXR
Kalensee, Giessen	Neubauer Zählkammer
Kontron, München	Spektralphotometer Uvicon UV 860
Leitz, Wetzlar	Mikroskop Laborlux D
Mettler, Giessen	Laborwaage AJ 100
Olympus Optical Co GmbH, Hamburg	Bronchoskop (BF Type P 20 D)
SLT, Crailsheim	ELISA-Photometer 400 V. 1.1
Uniequip, Martinsried	Speedvac Univapo 150 H Vakuumentrifuge
WTW, Weilheim	Digital PH-Meter WTW PH 525

4.2 Substanzen

American Diagnostica (ADI), Pfungstadt	Polyklonaler Antikörper gegen u-PA (human, #398) Polyklonaler Antikörper gegen α 2-AP (human, #361) Human Melanoma PAI-I (human, #105) α 2-AP (human, #4030) Single chain u-PA (human, #107) Monoklonaler Antikörper gegen α 2-AP (human, #3612)
Amersham, Braunschweig	Monoklonaler Anti-Maus-Antikörper (Schaf, biotinyliert)
Baker, Gross-Gerau	125 I markiertes Fibrinogen Methanol p.a.
Behring, Marburg	tissue factor (human, Thromborel®) Urokinase (Actosolv® 600000 U, human) Fibrinogen (human)

Biopool, Umea, Schweden	Single und two chain t-PA (human)
	Polyklonaler Antikörper gegen t-PA (human)
Boehringer GmbH, Mannheim	ABTS (2,2'-Azino-di [3-ethyl-benzthiazolinsulfonat])
	Fibrinopeptid A- und D-Dimer-ELISA Kits
	Thrombin (bovin, spezifische Aktivität von 1.250 U/mg)
	Plasmin (human, spezifische Aktivität von 8 U/mg)
Dakopatts GmbH, Hamburg	Avidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex (AB-Komplex)
Merck, Darmstadt	Diethylbarbiturat-Acetat Pufferlösung (DBAP), May Grünwald Lösung (Eosin-Methylenblau-Lösung mit > 50% Methanol); Giemsa-S Lösung (Azur-Eosin-Lösung); Chloroform (Uvasol); Ammoniumheptamolybdat; Kaliumhydrogenphosphat; Perchlorsäure 70%; Salzsäure 37%; Schwefelsäure 98%; Wasserstoffperoxid 30%; Trichloressigsäure; Phosphorsäure 85%;, Natriumacetat-Trihydrat; Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat; Natriumchlorid; Calciumchlorid
Monozyme, Hoersholm, Dänemark	Biotinylierter, monoklonaler Antikörper gegen u-PA (human)
	Biotinylierter, monoklonaler Antikörper gegen t-PA (human, T-I-B)
	Biotinylierter, monoklonaler Antikörper gegen PAI-I (human, I-2-B)
	Monoklonaler Antikörper gegen PAI-I (human, I-1-005)
Nunc, Wiesbaden	Mikrotiterplatten Polysorp®, Maxisorp®
Paesel und Lorei, Frankfurt	Rinderserumalbumin (BSA) (99%)
Pierce, München	BCA Protein Test
Sevra, Heidelberg	Triton X-100
Sigma, München	Faktor VII Mangelplasma (human, spezifische Aktivität von 1U/mg Protein); Glycin; Tween 20
Wander Pharma GmbH, Nürnberg	Oxybuprocainhydrochlorid (Novesine ®)

Pufferlösungen

Die benötigte Pufferlösungen waren wie folgt zusammengesetzt:

- Beschichtungspuffer:

15 mM Na₂CO₃ 1,59 g
35 mM NaHCO₃ 2,93 g
ad 1000 ml destilliertes Wasser, pH 9,6

- Blockierungspuffer :

1%BSA in g
Verdünnungspuffer

- Substrat-Puffer (ABTS):

CH₃COONa x 3 H₂O 8,2 g
NaH₂PO₄ x H₂O 6,9 g
ad 1000 ml destilliertes Wasser, pH 4,2

- Verdünnungs- bzw. Waschpuffer:

0,5 M NaCl 29,2 g
0,02% KCl 0,2 g
0,02% KH₂PO₄ 0,2 g
6,5 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O 1,15 g
1% Triton X-100 10 ml
ad 1000 ml destilliertes Wasser, pH 7,2

- PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalz-Lösung, pH 7,4):

NaCl 8 g
Na₂HPO₄ x 12 H₂O 2,9 g
KCl 0,2 g
KH₂PO₄ 0,2 g
ad 1000 ml destilliertes Wasser, pH 7,4

- ABTS - Lösung:

<i>ABTS</i>	<i>20 mg</i>
<i>Substratpuffer</i>	<i>30 ml</i>
<i>H₂O₂</i>	<i>10 µl</i>

- AB-Komplex:

1 Tropfen A (= Avidinlösung) + 1 Tropfen B (= biotinylierte Meerrettichperoxidase-Lösung) auf 5 ml PBS (pH 7,4), 30 min bei RT inkubieren.

Von dieser Lösung 5 Tropfen auf 60 ml PBS.

5 Methoden

5.1 Definition der Patientenkollektive

Die Patienten sowie gesunde Probanden wurden in der Abteilung für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen oder der Klinik für Lungen- u. Bronchialheilkunde Elgershausen (Waldhofklinik) rekrutiert. Das Projekt wurde von der hiesigen Ethikkommission gebilligt, und in jedem Fall lag die Einwilligung der Patienten oder ihrer nächsten Verwandten vor. Insgesamt wurden 346 Patienten zwischen 15 und 75 Jahren lavagiert und mit einem Kontrollkollektiv (gesunde Probanden ohne Anzeichen einer kardialen oder pulmonalen Schädigung, $n = 35$) verglichen.

Jeder Patient wurde in eines der folgenden sieben Kollektive eingestuft (siehe Abbildung 8):

1. **Patienten mit beatmungspflichtiger Pneumonie ($n = 114$):** Patienten mit einer fortschreitenden primären Infektion der Lunge, die eine mechanische Beatmung notwendig machte. Diagnostische Kriterien waren neben Fieber, Tachykardie, Dyspnoe und typischen Auskultationsphänomenen, die charakteristischen radiologischen Veränderungen sowie der mikrobiologische Nachweis von pathogenen Keimen in der BAL. Darüber hinaus wurden die Patienten auf die Abwesenheit eines akuten oder chronischen linksseitigen Herzversagens hin ($PCWP < 16$ mmHg) untersucht.
2. **Spontanatmende Pneumonien ($n = 40$):** Pneumonie Patienten, die prinzipiell die gleichen Symptome aufwiesen wie Patienten der Gruppe 1, die jedoch aufgrund einer geringer ausgeprägter Störung des Gasaustausches nicht mechanisch beatmet wurden. Sofern nach radiologischen Kriterien zweifelsfrei zuzuordnen, konnten spontanatmende und beatmete Patienten in folgende Subgruppen unterteilt werden:
 - Bronchopneumonie (Bro Pneu; $n = 40$)
 - Alveoläre Pneumonie (Alv Pneu; $n = 61$)
 - Interstitielle Pneumonie (Int Pneu; $n = 38$)
 - bei 15 Patienten ließ sich aufgrund der radiologischen Befunde keine eindeutige Zuordnung vornehmen
3. **ARDS ohne primäre Lungeninfektion ($n = 25$):** Bei diesen Patienten ohne primäre Lungeninfektion waren folgende Kriterien erfüllt (in Einklang mit den Kriterien der American-European Consensus Conference):
 - $PaO_2 / FiO_2 < 200$ mmHg
 - röntgenographisch diffuse und bilaterale alveoläre Infiltrate

- fehlender Nachweis eines akuten oder chronischen linksseitigen Herzversagens (PCWP < 16 mmHg)

Ein im Vorfeld der Entwicklung des ARDS stattgefundenes katastrophales Ereignis wie Sepsis, Polytrauma oder Pankreatitis konnte in allen Fällen beobachtet werden. In der BAL ließen sich keine Keime oder Pilze nachweisen.

- 4. ARDS und Pneumonie (ARDS + Pneu) (n = 43):** Dieses Kollektiv beinhaltete maschinell beatmete Patienten mit einer initial diagnostizierten Pneumonie, bei denen sich innerhalb kurzer Zeit ein diffuses bilaterales Infiltrat in der gesamten Lunge ausbreitete, das somit einem typischen Röntgen-Thorax eines ARDS entsprach. Desweiteren wurden diesem Kollektiv Patienten zugeteilt, die zunächst mit der Diagnose ARDS aufgenommen wurden und bei denen sich sekundär (innerhalb 72h) eine mikrobiologisch nachgewiesene Infektion der Lunge entwickelte.
- 5. Exogen allergische Alveolitis (EAA, n=35):** Die Patienten zeigten periodisch wiederkehrende oder permanente Dyspnoe. Das inhalative Antigen wurde durch die Anamnese und den Nachweis präzipitierender Antikörper identifiziert. Durch Röntgenaufnahmen oder CT/HRCT wurden fleckige interstitielle Infiltrationen in beiden Lungen nachgewiesen. In der BAL imponierte eine Vermehrung der T8-Lymphozyten (T4/T8 Verhältnis erniedrigt).
- 6. Idiopathische pulmonale Fibrose (IPF, n=48):** Diese Patienten zeigten eine eingeschränkte Lungenfunktion in Verbindung mit einem reduzierten CO-Transfer, typische Befunde in Thorax-Röntgenbildern oder CT/HRCT, Zunahme von neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage in Kombination mit normalen oder nur schwach erhöhten relativen Lymphozytenzahlen sowie typische histologische Befunde bei der Lungenbiopsie.
- 7. Sarkoidose, (Sark, n = 48):** Die Patienten wiesen auffällige Röntgenbefunde (bilaterale hiläre Adenopathie ohne (Sarkoidose I, n=11) oder mit (Sarkoidose II, n=21) pulmonalen Infiltraten wie grobe retikulonoduläre oder milchglasartige Verschattungen sowie Infiltrate ohne hiläre Adenopathie (Sarkoidose III, n=13) auf. In der BAL fanden sich erhöhte T4-Lymphozytenzahlen (T4/T8-Verhältnis erhöht) und in der Lungenbiopsie konnten die typischen Granulome nachgewiesen werden. Einige wenige Patienten zeigten Anzeichen eines Löfgren-Syndroms (n=3), einer akuten und systemischen Erscheinungsform der Sarkoidose.

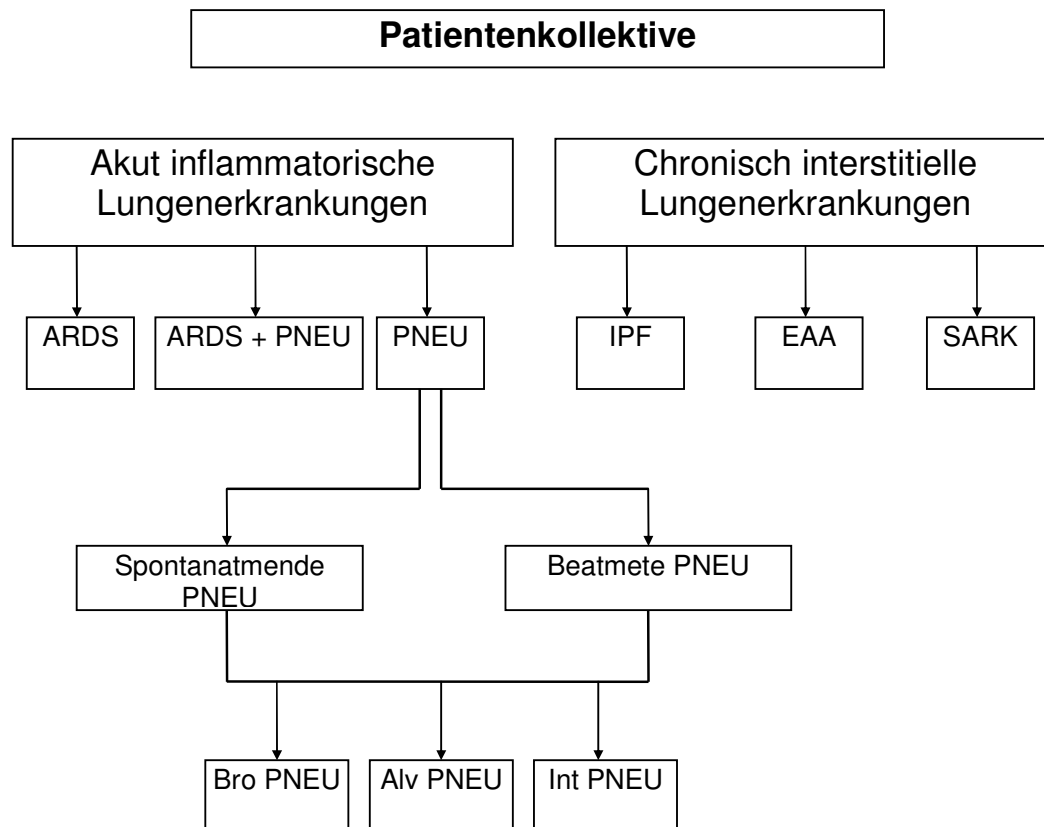


Abbildung 8. Die Unterteilung der Patienten in den Kollektiven

Zwischen den Hauptkollektiven traten keine Überschneidungen auf. Ausschlusskriterien bei allen Kollektiven waren erwiesene oder vermutete Malignome der Lunge, chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen, Schädeltrauma, Herzinfarkt oder subarachnoidale Blutungen. Das Geschlecht, Alter oder das Körpergewicht der Patienten zeigte innerhalb der Kollektive keine signifikanten Unterschiede und wurde daher nicht angegeben.

Zum Zeitpunkt der Durchführung der Studie hatten Patienten mit EAA und IPF etwa 15-40 Monate Beschwerden, begleitet mit fortgeschrittener Dyspnoe. Entsprechend war die Lungenfunktion mit und ohne Belastung beeinträchtigt. Im Vergleich hierzu hatten Patienten mit Sarkoidose eine leichtere Dyspnoe und geringere Veränderung der Lungenfunktion (siehe Tabelle 6, Ergebnisse).

Die Patienten der Kollektive 1, 3 und 4 wurden Druck oder Volumen kontrolliert beatmet. FiO_2 und der positive endexpiratorische Druck (PEEP) wurden den individuellen Verhältnissen entsprechend eingestellt. Im Vergleich zur gesunden Kontrolle konnte bei den ersten vier Patientengruppen (Beatmete PNEU, ARDS und ARDS+PNEU) mit Ausnahme der spontanatmenden Pneumoniegruppe eine (Abnahme) des PaO_2/FiO_2 -Quotienten auf Werte um oder kleiner als 200 mgHg beobachtet werden.

Die Patienten wurden mit folgenden grundsätzlichen Therapiemethoden bedarfsorientiert behandelt:

- parenterale Ernährung
- Volumensubstitution
- Antibiotika - Therapie
- Therapie mit vasoaktiven und positiv inotropen Substanzen (unter Berücksichtigung der ermittelten Hämodynamik mittels Swan-Ganz-Katheter)

Die flexible Bronchoskopie und die Lavage wurde primär für diagnostische Zwecke (z.B. für mikrobiologische Untersuchungen) durchgeführt und die überschüssige Lavageflüssigkeit wurde für die Bestimmung der in dieser Dissertation dargestellten Parameter verwendet. Die Gewinnung der BAL folgte daher keinem zeitabhängigen Protokoll und wurde nicht sequentiell durchgeführt. Demnach wurde die Mehrheit der Patienten innerhalb der ersten 4 Tage nach Intubation (= Beginn der mechanischen Beatmung) lavagiert.

5.2 Gewinnung der bronchoalveolären Lavage

Die bronchalveoläre Lavage (BAL) wurde sowohl bei spontan atmenden als auch bei mechanisch beatmeten Patienten durchgeführt. Dazu wurde ein flexibles, fiberoptisches Bronchoskop verwendet, welches unter vorheriger Oberflächenanästhesie (Novesine®) der oberen Luftwege in die Trachea und später in die Haupt- und Segmentbronchien eingeführt wurde.

Die Lingula oder die Mittellappensegmente der Lunge wurden in Okklusionsstellung („*Wedge Position*“) mit 200 ml physiologischer Kochsalzlösung gespült (10 Einheiten a 20 ml), und die Lavageflüssigkeit durch schnelle Aspiration wieder entfernt. Die so erhaltene Lavage wurde bei 4°C gepoolt und die Flüssigkeitsrecovery bestimmt. Diese lag im Schnitt bei 55%. Die Lavageflüssigkeit wurde durch sterile Gaze filtriert und zur Depletion zellulärer Bestandteile bei 300 x g 10 Minuten lang zentrifugiert. In dem Sediment wurde das zelluläre Verteilungsmuster untersucht. Der Überstand wurde unter sorgfältigem Rühren aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

5.3 ELISA-Verfahren

Der ELISA (*E* nzyme Linked Immunosorbent Assay) zählt zu den Festphasenimmunotests. Hierbei werden Proteine, die entweder als Antigen (Ag) oder Antikörper (Ak) vorliegen können, durch spontane Adhäsion auf einem entsprechenden Trägermaterial (z.B. Mikrotiterplatten) immobilisiert. Im nächsten Inkubationsschritt binden komplementäre Antikörper bzw. Antigene spezifisch an die immobilisierten Reaktionspartner. Der Nachweis dieser Immunkomplexe erfolgt durch Zugabe eines Antigen- oder Antikörperenzymkonjugats und durch die nachfolgende enzymatische Umsetzung eines farblosen Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt [1].

In der vorliegenden Arbeit wurden ELISA-Verfahren zur Quantifizierung verschiedener Antigene eingesetzt. Die Bestimmung der Fibrinopeptid A (FP-A) und D-Dimer-Spiegel erfolgte mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Kits. Zur Quantifizierung von Urokinase (u-PA), Gewebefibrinolytischer Plasminogenaktivator (t-PA), Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) und α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP) kamen selbstentwickelte und validierte ELISA-Methoden zur Anwendung.

5.3.1 Quantifizierung von u-PA, t-PA, PAI-1 und α_2 -AP mittels ELISA

5.3.1.1 Durchführung der Methode

Der Nachweis und die Quantifizierung von Urokinase (u-PA), Gewebefibrinolytischer Plasminogenaktivator (t-PA), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) und α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP) erfolgte durch selbstentwickelte Sandwich ELISA nach der Methode von Reinke et al. [42], deren Protokoll nachfolgend dargestellt ist.

Als Trägermaterial für den ELISA wurden Mikrotiterplatten mit 96- Nöpfchen aus Polystyrol (Maxisorb[®], Nunc) verwendet, welche über Nacht bei 4°C mit einem entsprechenden Antikörper beschichtet wurden (100 μ l/Nöpfchen). Nach dreimaligem Waschen der Platten mit Waschpuffer (200 μ l/Nöpfchen) wurden überschüssige Bindungsstellen auf der Polystyrolmatrix durch 30 minütiges Blocken mit einer 1%igen Lösung von Rinderserumalbumin (BSA) in Verdünnungspuffer (200 μ l/Nöpfchen) abgesättigt. Darauf erfolgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (200 μ l/Nöpfchen). Im nächsten Schritt wurden die Proben sowie ein Standard in serieller Verdünnung aufgetragen (100 μ l/Nöpfchen) (siehe Abbildung 9, 10 und Tabelle 2 auf Seiten 33, 34, 35).

Nach 60 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) erfolgte ein weiterer Waschschrift. Im Falle des u-PA, t-PA und PAI-1 ELISA wurden nun antigenspezifische biotinylierte Antikörper aufgetragen (100 μ l/Nöpfchen) und 1h bei RT inkubiert.

Im Falle des α_2 -AP ELISA wurde die Platte zunächst mit einem (nicht biotinylierten) antigenspezifischen Antikörper inkubiert (100 μ l/Nöpfchen, 1h bei RT). Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Zugabe eines speziesspezifischen biotinylierten Antikörpers (100 μ l/Nöpfchen, 1h bei RT). Zur Entfernung überschüssiger Antikörper wurde die Platten dreimal gewaschen. Anschließend erfolgte eine Verstärkung der Empfindlichkeit des Tests mit Hilfe der Avidin/Biotin-Peroxidase-Technik (AB-Komplex). Dazu wurden ein Tropfen Avidinlösung und ein Tropfen biotinylierte Meerrettich-Peroxidase-Lösung in 5 ml PBS gegeben und 30 Minuten vorinkubiert. Eine Verdünnung aus 5-10 Tropfen dieser Stammlösung mit 60 ml PBS wurde angefertigt und jeweils 2h auf den Platten inkubiert (100 μ l/Nöpfchen). Anschließend wurde wieder dreimal gewaschen.

Die enzymatische Farbentwicklung wurde durch Zugabe von 2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolinsulfonat (ABTS) als Substrat eingeleitet. Dazu wurden 20 mg ABTS und 10 μ l 30% H_2O_2 in 30 ml Substratpuffer gelöst und 200 μ l dieser Lösung in die Nöpfchens pipettiert. Nach der Farbentwicklung über Nacht bei 4°C erfolgte die spektralphotometrische Auswertung bei 405nm in einem ELISA-Photometer. Die Standardkurven wurden durch Cubic-Spline-Interpolation mit Hilfe der Rechnersoftware gewonnen.

Alle Proben und Standards wurden in Form von Doppelbestimmungen analysiert. Ein auf jeder Platte mitgeführter identischer interner Standard (BAL mit bekannter Antigen-Konzentration) diente als Marker für die Reproduzierbarkeit der Analyse.

Ein detailliertes Fliessschema für die jeweiligen ELISA-Verfahren findet sich auf den Abbildungen 9 und 10 (Seiten 33 und 35).

u-PA, t-PA und PAI-1 ELISA

Beschichten der Mikrotiterplatten (Maxisorp[®], Nunc) mit Beschichtungs-AK
Verdünnungen 1: 166 bzw 1: 500 bzw 1: 250 in Beschichtungspuffer
jeweils 100µl/Näpfchen

↓ 12 h, 4°C

Mikrotiterplatte 3 x Waschen (Waschpuffer, 200µl/Näpfchen)
Blockieren überschüssiger Bindungsstellen mit 1% BSA/Waschpuffer
jeweils 200µl/Näpfchen

↓ 30 min, 20°C

3x Waschen,
Auftrag der Proben und Standardlösung (jeweils 100 µl/Näpfchen).
(Standardlösung = serielle Verdünnung des jeweiligen Ag in Verdünnungspuffer)

↓ 1 h, 20°C

3x Waschen
Inkubation mit biotinyliertem, antigenspezifischen Erst-Antikörper
Verdünnungen (1: 500 bzw 1:250) in Verdünnungspuffer
jeweils 100 µl/Näpfchen

↓ 1 h, 20°C

3x Waschen
Inkubation mit Avidin/Biotin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex (AB-Komplex)
100µl/Näpfchen

↓ 2 h, 20°C

3x Waschen
Inkubation mit 100µl/Näpfchen Substratlösung

↓ 12 h, 4°C

Spektralphotometrische Auswertung in einem ELISA-Photometer
bei 405nm

Abbildung 9: Schematische Darstellung der u-PA-, t-PA- und PAI-1- ELISA

Verwendete Antikörper/Standards, Konzentrationsbereich des ELISA

ELISA	u-PA	t-PA	PAI-1	α_2 -AP
Beschichtungsantikörper	anti-human-u-PA-IgG von der Ziege, polyklonal (ADI)	anti-human-t-PA-IgG von der Ziege, polyklonal (Biopool)	anti-human-PAI-1-IgG von der Maus, monoklonal (Monozyyme)	anti-human- α_2 -AP-IgG, polyklonal (ADI)
Konzentration/Verdünnung in Beschichtungspuffer	1:166	1:500	1:250	1:500
Ag-spezifischer Erst-Ak	biotinyliert, monoklonaler Maus Ak gegen humanes u-PA	biotinyliert, monoklonaler Maus Ak gegen humanes t-PA	Biotinyliert, monoklonaler Maus Ak gegen humanes PAI-1	monoklonaler Maus Ak gegen humanes α_2 -AP
Konzentration/Verdünnung in Verdünnungspuffer	1:500	1:250	1:500	1:1000
Zweit Ak (speziesspezifisch)	-	-	-	Biotinyliert, monoklonaler anti-Maus Ak
Konzentration/Verdünnung in Verdünnungspuffer				1:1000
Konzentrationsbereich der Standardreihe	30, 15, 7,5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 [ng/ml]	50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78 [ng/ml]	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 [ng/ml]	125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81, 3,9, 1,9 [ng/ml]

Tabelle 2. Antigen- (Standard) und Antikörperkonzentrationen für u-PA, t-PA, PAI-1 und α_2 -AP ELISA

α_2 -AP ELISA

Beschichten der Mikrotiterplatten (Maxisorp®, Nunc) mit Beschichtungs-AK
(polyklonaler Antikörper gegen humanes α_2 -AP, Verdünnung 1:500 in
Beschichtungspuffer, 100 μ l/Näpfchen)

⇓ 12 h, 4°C

Mikrotiterplatte 3 x Waschen (Waschpuffer, 200 μ l/Näpfchen)
Blockieren überschüssiger Bindungsstellen mit 1% BSA/Waschpuffer
(200 μ l/Näpfchen)

⇓ 30 min, 20°C

3x Waschen, Auftrag der Proben und Standardlösung (jeweils 100 μ l/Näpfchen).
(Standard = serielle Verdünnung von humanem α_2 -AP- in Verdünnungspuffer)

⇓ 1h, 20°C

3x Waschen, Auftrag von 100 μ l/Näpfchen einer 1:1000 Verdünnung aus
antigenspezifischem Erst-Antikörper in Verdünnungspuffer

⇓ 1h, 20°C

3x Waschen, Inkubation mit speziesspezifischem Zweitantikörper
(1:1000 Verdünnung aus monoklonalem Anti-Maus-Antikörper in
Verdünnungspuffer), 100 μ l/Näpfchen

⇓ 1h, 20°C

3x Waschen, Inkubation mit Avidin/Biotin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex (AB-
Komplex), 100 μ l/Näpfchen

⇓ 2h, 20°C

3x Waschen, Inkubation mit 100 μ l/Näpfchen Substratlösung

⇓ 12h, 4°C

Spektralphotometrische Auswertung bei 405nm

Abbildung 10: Schematische Darstellung des α_2 -AP ELISA

5.3.1.2 Validierung

Bei der Entwicklung der ELISA standen folgende Faktoren im Vordergrund:

1. Die Parameter in BAL sollten möglichst empfindlich, selektiv und in einem großen Konzentrationsbereich detektiert werden.
2. Eine Interaktion zwischen den zu bestimmenden Parametern und dem in der Matrix „BAL“ vorhandenen Komponenten sollte möglichst ausgeschlossen sein.
3. Reproduzierbarkeit der Versuche.

5.3.1.2.1 Reproduzierbarkeit und Wiederfindung der ELISA Methoden

Um die Validität und die Wiederfindung der Methoden zu überprüfen, wurden einige bronchoalveoläre Lavagen von gesunden Kontrollen sowie von Patienten mit akuten oder chronisch inflammatorischen Lungenerkrankungen mit steigenden Mengen der entsprechenden Antigene (u-PA-, t-PA-, PAI-1- und α_2 -AP- Standards) versetzt („gespikt“), vorinkubiert und dem Versuchsprotokoll unterzogen. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen zugegebenem und detektiertem Antigen und weisen somit auf eine gute Validität der Methoden hin (s. Abbildung. 11-14).

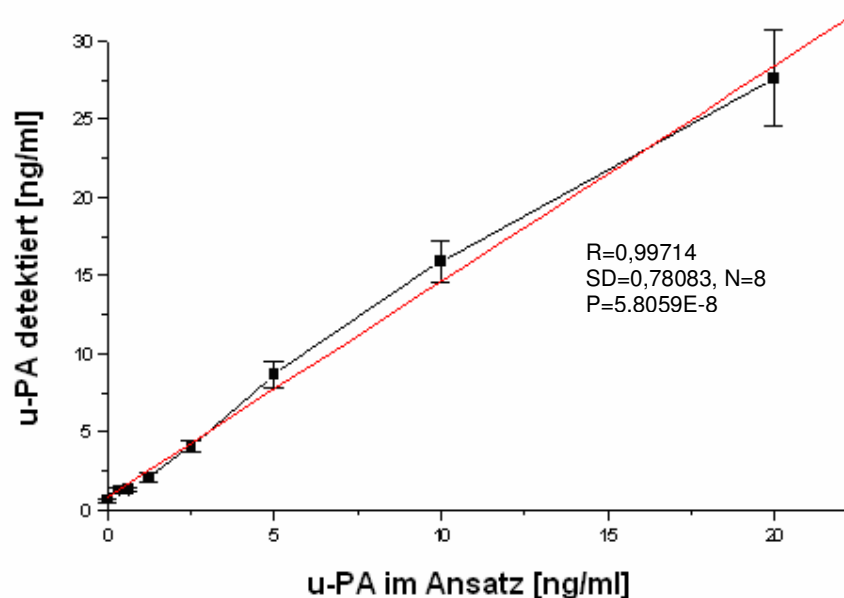


Abbildung 11. Wiederfindung des addierten humanen u-PA-Standard in bronchoalveolären Lavagen (n=8). Der u-PA-Gehalt der nativen (unbehandelten) Lavagen wurde von den tatsächlichen detektierten Werten subtrahiert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert aus 10 Versuchen \pm Standardfehler.

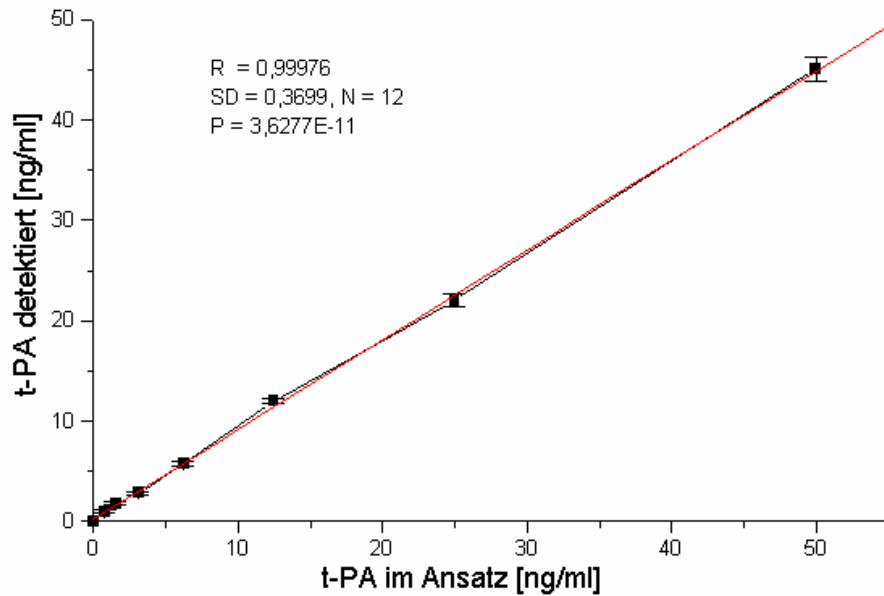


Abbildung 12. Wiederfindung von addiertem t-PA-Antigen (Standard) in humanen bronchalveolären Lavagen (n=12). Der t-PA-Gehalt der nativen (unbehandelten) Lavagen wurde von dem tatsächlich detektierten Gehalt subtrahiert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert aus 10 Versuchen \pm Standardfehler.

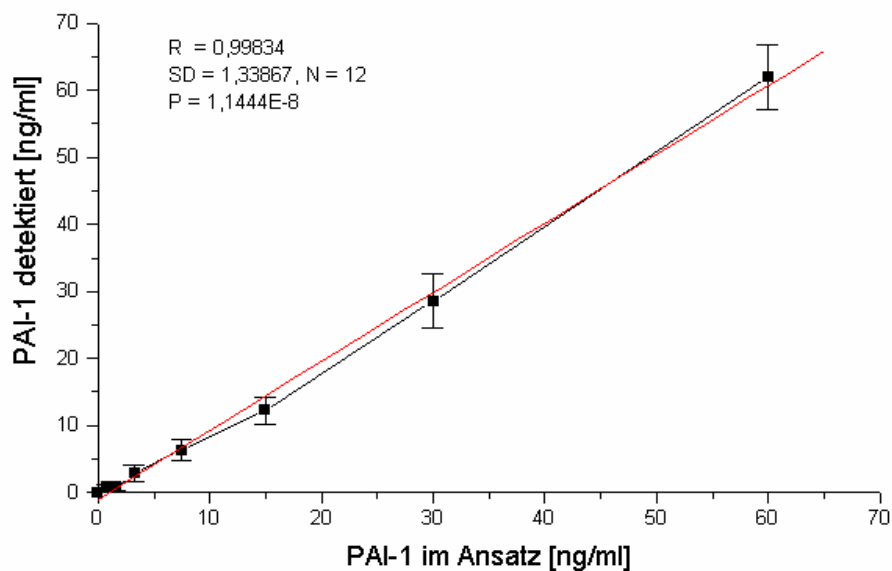


Abbildung 13. Wiederfindung von addiertem PAI-1-Antigen (Standard) in humanen bronchalveolären Lavagen (n=12). Der PAI-1-Gehalt der nativen (unbehandelten) Lavagen wurde von den tatsächlich detektierten Werten subtrahiert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert aus 10 Versuchen \pm Standardfehler.

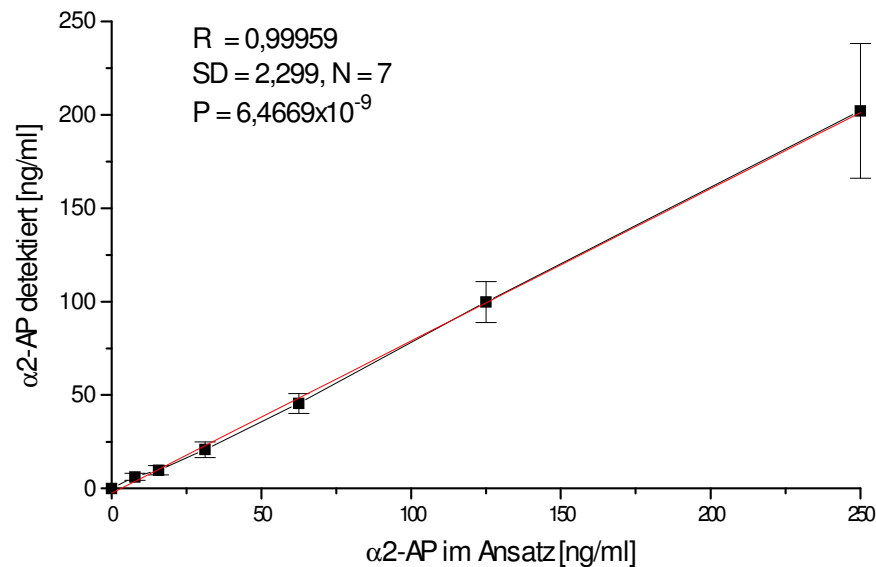


Abbildung 14. Wiederfindung von addiertem humanen α_2 -AP-Antigen in humanen bronchaloelären Lavagen (n=7). Der α_2 -AP-Gehalt der nativen (unbehandelten) Lavagen wurde von den tatsächlich detektierten Werten subtrahiert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert aus 10 Versuchen \pm Standardfehler.

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit wurde dieselbe bronchoalveoläre Lavage mit definierter Antigen-Konzentration bei verschiedenen Bestimmungen auf unterschiedlichen Mikrotiterplatten als interner Standard mitgeführt und quantifiziert. Mittelwert und Standardabweichung (MW \pm SD) sind in der Tabelle 3 dargestellt. Wie die Resultate zeigen, konnte für alle 4 ELISAs eine hohe Reproduzierbarkeit erzielt werden.

Antigene	u-PA	t-PA	PAI-1	α_2 -AP
Antigen-Konzentration der BAL (interner Standard) [ng/ml]	8	8	8	10
n	19	4	14	20
Wiederfindung [ng/ml] MW \pm SEM	8,01 \pm 0,18	7,72 \pm 0,08	8,87 \pm 0,66	10,17 \pm 0,99

Tabelle 3. Konzentration des mitgeführten internen Standards im u-PA-, t-PA-, PAI-1- und α_2 -AP-ELISA

Das Detektionslimit der gemessenen Parameter lag im unteren Nanogramm- [ng]-Bereich und erwies sich für die Qualifizierung aller Komponenten in der BAL als ausreichend.

Darüber hinaus wurde im Falle des u-PA ELISA untersucht, ob verschiedene Urokinase Formen (High-Molecular-Weight (HMW)-single-chain-u-PA, HMW-two-chain-u-PA, Low-Molecular-Weight-two-chain-u-PA) zu unterschiedlichen Analyseergebnissen führen. Hierzu wurden Versuche mit Plasmin, PAI-I und single-chain-u-PA durchgeführt, bei denen definierte Mengen humaner single-chain-u-PA (Standard) mit steigenden Mengen Plasmin oder PAI-I zugesetzt wurden (Inkubationszeit 1h, 37°C). Es konnte festgestellt werden, dass der Antikörper gleichermaßen single-chain-uPA wie two-chain-uPA als auch freie uPA und PAI-I gebundene uPA binden kann. Analog wurden im Falle des α_2 -AP ELISA Versuche mit Plasmin vorgenommen. Hier wurde eine leichte Beeinflussung der α_2 -AP-Erkennung durch Zugabe von Plasmin innerhalb eines molaren Verhältnisses von 8 M Plasmin/ α_2 -AP beobachtet.

5.3.2 ELISA zur Quantifizierung von D-Dimer

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Boehringer Mannheim) nach dem Prinzip des Sandwich-ELISA.

Die Mikrotiterplatten waren hierbei mit spezifischen Antikörpern gegen D-Dimer vorbeschichtet, welche mit Fibrinspaltprodukten (FDP), jedoch nicht mit Fibrinogen und dessen Spaltprodukten reagieren. Nach Probenzugabe und Ag-Ak-Bindung wurden in der anschließenden zweiten Immunreaktion mit Peroxidase-(POD)-markierten FDP-D Antikörpern Sandwich-Komplexe gebildet. Im nachfolgenden Waschschriff wurde das nicht gebundene POD-Ak-Konjugat entfernt. Nach Zusatz von Substrat (o-Phenylendiamin) und H_2O_2 erfolgte die Generierung eines farbigen Reaktionsproduktes, das photometrisch bestimmt wurde.

Versuchsablauf:

Der D-Dimer-Standard wurde in destiliertem Wasser gelöst und seriell verdünnt (47,6, 23,8, 11,9, 5,95, 2,98, 1,49 ng).

In die mit $F(ab)_2$ anti-D-Dimer vorbeschichteten Näpfchen der Mikrotiterplatte wurden die Proben bzw. Standardlösung (jeweils 200 μ l/Näpfchen) pipettiert und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (0,9% NaCl + 0,1% Tween[®]20, 50 ml) erfolgte der Auftrag von in Puffer-Konzentrat verdünntem, Peroxidase markiertem FDP-D Antikörper (Antikörper-POD-Konjugat). Die Substratlösung (o-Phenylendiamin + H_2O_2 , jeweils 200 μ l/Näpfchen) wurde nach Entfernung des überschüssigen Antikörper-POD-Konjugats zugegeben. Nach 3 minütigem Inkubieren wurde die Reaktion mit 1 M HCl (100 μ l/Näpfchen) abgestoppt, und weiteren 10 Minuten die Extinktion bei 492 nm gegen die Puffer-Lösung bestimmt.

5.3.3 *ELISA zur Quantifizierung Fibrinopeptid A (FP-A)*

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Boehringer Mannheim) nach dem Prinzip eines kompetitiven 2-Stufen-Enzymimmunoassays.

Nach Entfernung von Fibrin(ogen) mittels Bentonit-Suspension wurde eine konstante Menge Fibrinopeptid A-Antikörper im Überschuss mit der Probe (bzw. Standard) inkubiert. Dabei bildeten sich Antigen-Antikörper-Komplexe. Die Konzentration des verbliebenen (freien) Antikörpers ist umgekehrt proportional zum FP-A Gehalt der Probe (bzw. Standard).

Zur Bestimmung der Antikörperkonzentration wurden aliquote Mengen dieser Ansätze in Reaktionsgefäße, die mit überschüssigem FP-A beschichtet wurde, inkubiert. Dabei bildeten sich wandfixierte Antigen-Antikörper-Komplexe, die anschließend mit Peroxidase-markierten Anti-IgG-Antikörpern detektiert und quantifiziert wurden.

Die Quantifizierung der Sandwichkomplexe erfolgt durch enzymatische Reaktion der Peroxidase mit H_2O_2 /Ortho-Phenylendiamin als Substrat, anschließender photometrischer Messung der Extinktion bei 492nm und Computer gestützter Auswertung anhand von erstellten Eichkurven. Abbildung 15 stellt den Versuchsablauf dar.

FP-A ELISA

Beschichten der Mikrotiterplatte mit FP-A
200µl/Näpfchen in einer Verdünnung von
1:1600

12 h, 20°C ↻

Probenvorbereitung:
500µl Probe/Standard + 50µl FP-A-
Antikörper + 100µl
Verdünnungspuffer (Inkubation 1h 37°C),
bei 3000U/min 10 min zentrifugieren

↻

3 x Waschen mit 250 µl/Näpfchen Waschlösung (0,9% NaCl+ 0,1% Tween®20)
Auftrag des Überstand der Proben bzw. Standards auf die Mikrotiterplatte
(200 µl/Näpfchen).

↓ 1 h, 20°C

3 x Waschen mit 250 µl/Näpfchen Waschlösung (0,9% NaCl+0,1%Tween®20)
Zugabe von Antikörper-POD-Konjugat

↓ 1 h, 20°C

3 x Waschen, Zugabe von 200 µl/Näpfchen Substrat (Ortho-Phenylendiamin)

↓

Zugabe von 100µl/Näpfchen Salzsäure (1 mol/l)

↓ 10 min, 20°C

Messung der Extinktion 492 nm

Abbildung 15: Schematische Darstellung des FP-A ELISA

5.4 Bestimmung der fibrinolytischen Aktivität mittels ^{125}I -Fibrin Platten Test

Zur Charakterisierung der Gesamtfibrinolytischen Kapazität der BAL-Proben wurde der ^{125}I -Fibrin Platten Test eingesetzt [220]. Bei diesem Verfahren wurde auf Maxisorp[®] Microtiterplatten (Nunc) radioaktiv markiertes ^{125}I -Fibrinogen mittels Thrombin zur Gerinnung gebracht. Nach Bildung des Gerinnsels (Inkubationszeit 1,5h bei 37°C) wurden die Proben (BAL) bzw. Kontrollen ($\text{NaCl}/\text{Ca}^{2+}$) zugegeben. Im Anschluss an die Inkubation (72h bei RT) wurde der Überstand aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatten abpipettiert, in Proben-Röhrchen überführt und im γ -Counter gemessen. Die in den Überstand freigesetzte Radioaktivität ist proportional der Menge an ^{125}I Fibrin-Spaltprodukten und somit ein Maß für die fibrinolytische Aktivität.

5.4.1 Durchführung des Fibrin Platten Test

Fibrinogen (5mg/ml in 0,9% $\text{NaCl}/3\text{mM Ca}^{2+}$) wurde mit radioaktiv (^{125}I) markiertem Fibrinogen (0,2 nCi/ml) versetzt und in einem Volumen von 30 μl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Thrombin (0,02 U/ml in 0,9% $\text{NaCl}/3\text{mM Ca}^{2+}$) wurde in einem Volumen von 20 μl zugesetzt und die Platten nach kurzem Schütteln für 1,5h bei 37°C inkubiert. Nach erfolgter Gerinnselbildung und Konsolidierung des Gerinnsels durch 10 minütige Zentrifugation bei 400xg wurden die BAL-Proben bzw. $\text{NaCl}/\text{Ca}^{2+}$ -Lösung als Leerwert in einem Volumen von 100 μl zugegeben. Nach 72 h wurden 75 μl des Überstandes abpipettiert und in einem γ -Counter gemessen. Zur Ermittlung der fibrinolytischen Aktivität wurde die nicht enzymatische Freisetzung (Kontrollen mit $\text{NaCl}/\text{Ca}^{2+}$) vom Messwert der Proben abgezogen und zur ursprünglich eingesetzten Aktivität (30 μl ^{125}I Fibrinogenlösung pro Nöpfchen) ins Verhältnis gesetzt.

Ein auf jeder Platte mitgeführter interner Standard (BAL mit bekannter fibrinolytischer Aktivität) diente als Marker für die Reproduzierbarkeit des Versuches.

5.5 Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität

5.5.1 Bestimmung der globalen prokoagulatorischen Aktivität

Die Prokoagulatorische Aktivität wurde anhand der Rekalzifizierungszeit mit einem Kugelkoagulometer bestimmt, bei dem der Gerinnungseintritt dadurch ermittelt wurde, dass die Lage einer Stahlkugel, die sich in einem schräg gelagerten und um seine Längsachse drehenden Röhrchen befand, beim Einsetzen der Gerinnung verändert wurde und einen Impuls auslöste (siehe Abbildung 16).

Zunächst wurden die BAL Proben mit Diethylbarbiturat-Acetat Puffer (DBAP) auf einen Phospholipidgehalt von 10 µg/ml eingestellt (Phospholipidgehaltsbestimmung siehe 5.8). 40 µl der vorbereiteten BAL-Probe wurde mit 80µl Plasmapool (gewonnen aus 15 gesunden Probanden) und 80µl DBAP versetzt, in das Messröhrchen des Koagulometers pipettiert und in Rotation versetzt. Nach 3 minütigem Vorlauf bei 37°C wurde das Zählwerk auf 0 gestellt und zeitgleich die Gerinnung unter Zugabe von 80µl Calciumchlorid (0,025M) eingeleitet. Bei erfolgter Gerinnung blieben Antrieb und Zählwerk stehen, und die benötigte Zeit (Rekalzifizierungszeit) wurde abgelesen. Die ermittelte Rekalzifizierungszeit wurde an Hand einer Standardkurve in Units prokoagulatorische Aktivität umgerechnet.

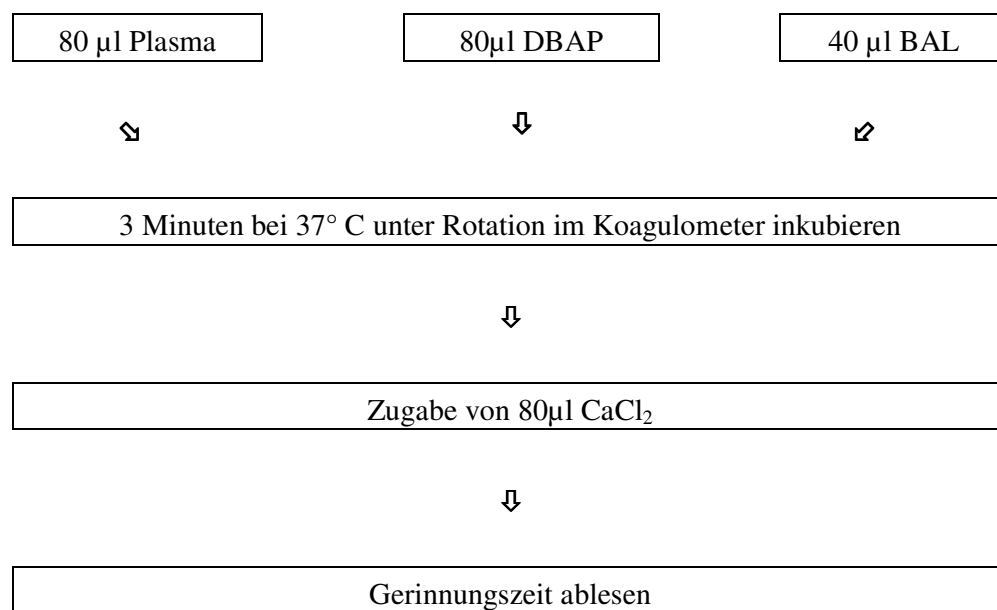


Abbildung 16. Versuchsablauf zur Bestimmung der Rekalzifizierungszeit

5.5.2 Bestimmung der Faktor VII-Aktivität

Die Faktor VII-Aktivität der BAL-Proben wurde ebenfalls mit Hilfe des Rekalzifizierung-Test unter Verwendung von Faktor VII Mangelplasma bestimmt (siehe Abb 17).

50 µl Faktor VII Mangelplasma wurden mit 50 µl BAL-Probe oder eines F VII Aktivitätsstandards eine Minute bei 37°C inkubiert. Die Gerinnung wurde durch Zugabe von 100 µl Thromborel S (Gewealthromboplastin und Calcium) eingeleitet. Die gemessene Zeit bis zur Gerinnung wurde anhand einer Standardkurve Computergestützt in Aktivität (Units) umgerechnet.

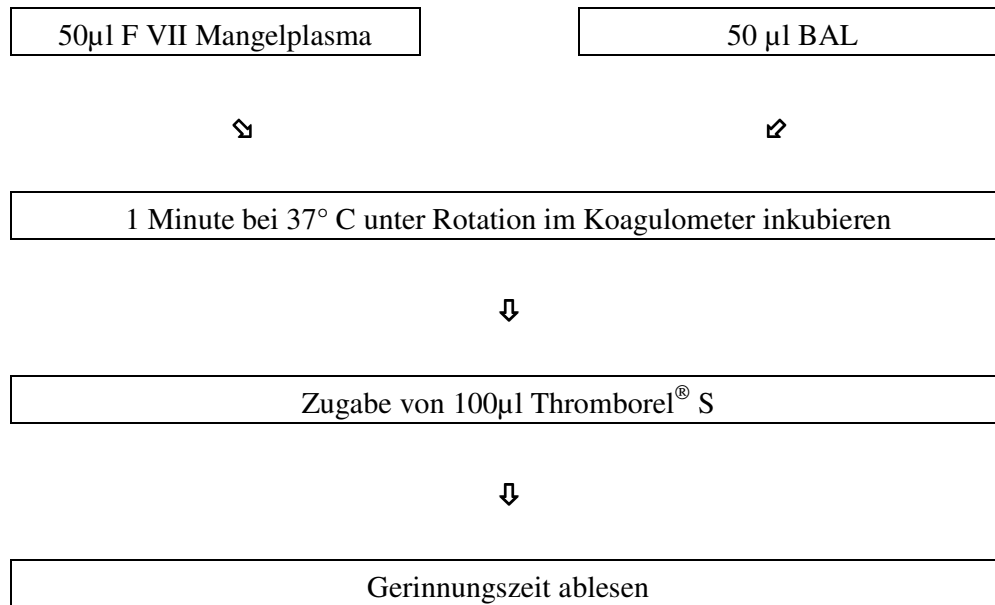


Abbildung 17: Versuchsablauf zur Bestimmung der Faktor VII-Aktivität

5.6 Proteinbestimmung

5.6.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bicinchoninsäure-Methode (BCA) [48, 30] wurde mit Hilfe eines kommerziellen Kits (BCA-Protein-Assay, Pierce) durchgeführt.

In der Probe enthaltenes Protein reduziert in alkalischem Medium Cu^{2+} zu Cu^+ (Biuret-Reaktion), welches - analog der üblichen Proteinbestimmung nach Lowry [48, 12] - zu einem Farbkomplex gebunden wird. Hierbei bilden zwei Moleküle Bicinchoninsäure mit einem Cu^+ -Ion in alkalischem Medium einen violetten wasserlöslichen Chelatkomplex, der ein Absorptionsmaximum von 562 nm aufweist.

5.6.2 Durchführung des BCA-Protein Test

Die Nachweisreaktion wurde auf Polystyrol-Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) durchgeführt. Als Referenzprotein wurde Rinderserumalbumin (BSA) in einem Konzentrationsbereich von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 1,5 mg/ml verwendet. Die Standards wurden in denselben Puffern wie die Proben gelöst. Mehrere Leerbestimmungen wurden mitgeführt. Nach dem Pipettieren der Standards und Proben (Volumen 50 μl) erfolgte die Zugabe von 200 μl des BCA-Reagenzes (bestehend aus einer Lösung von Natriumcarbonat, - bicarbonat und - tartrat und BCA-Detektionsreagenz in 0,2 N NaOH zuzüglich 0,08% Cu_2SO_4).

Nach 30 sec Schütteln und 30 min Inkubation bei 37°C wurde die Mikrotiterplatte bei 550 nm mit einem ELISA-Photometer gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der photometereigenen Software durch polynome Regression.

5.7 *BAL-Zytologie*

Die Analyse der Zellzahl, wie auch die Differenzierung der Zellen in der BAL wurde nach der Zentrifugation (300 x g, 4°C, 10 min; siehe 2.2.3: Gewinnung der bronchoalveolären Lavage) durchgeführt. Zunächst wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt (Tiefe: 0,1 mm; Fläche: 0,0025 mm²). Zusätzlich wurde ein Cytospin-Präparat in einer Zyto-Zentrifuge (500 upm) mit einer definierten Zellzahl von 10⁵ Zellen angefertigt. Anschließend erfolgte eine Standard-Färbung nach Papenheim, bestehend aus der sequentiellen Färbung des Präparats mit May-Grünwald Lösung (5 min) sowie mit Giemsa-Lösung (10 min). Nach der 10-minütigen Trocknungsphase folgte die Zelldifferenzierung unter dem Mikroskop.

5.8 *Phosphatbestimmung*

5.8.1 *Lipidextraktion nach Bligh und Dyer*

Zur Isolierung der Lipide in der BAL wurde die Extraktion nach Bligh und Dyer angewandt. Die bei -80°C gelagerten bronchoalveolären Lavagen (BAL) wurden zunächst bei Zimmertemperatur aufgetaut und anschließend in Zentrifugenröhrchen oder Schütteltrichtern aus Glas der Extraktion unterzogen.

0,8 Volumenanteile BAL wurden mit zwei Teilen Methanol und einem Teil Chloroform versetzt. Die resultierende einphasische Lösung wurde innerhalb 30 min mehrere Male kräftig geschüttelt. Im zweiten Schritt der Extraktion erfolgte die Zugabe von jeweils einem Teil Chloroform und 0,9%ige NaCl-Lösung und nach kräftigem zweiminütigem Schütteln die Phasentrennung. Zur Ausbildung einer korrekten Phasengrenze wurde der Ansatz bei 2000 x g 10 Minuten zentrifugiert. Die Chloroformphase wurde mit Pasteurpipetten separiert und im Stickstoffstrom getrocknet (siehe Tabelle 4).

	Probe/0,9 % NaCl	CH₃OH	CHCl₃
1. Schritt	0,8	2	1
30 min, schütteln			
2. Schritt	1	./.	1
2 min schütteln, 10 min 2000xg			
Summe Volumina	1,8	2	2

Tabelle 4: Schema der Lipidextraktion nach Bligh und Dyer

5.8.2 Kolorimetrische Phosphatbestimmung

Eine kolorimetrische Phosphatbestimmung in Anlehnung an das Verfahren nach Rouser et al [53, 13, 14, 11] wurde zur Messung des Gesamtphospholipidgehaltes benutzt.

Als Standard diente anorganisches Kaliumdihydrogenphosphat (0,2-5 µg Phosphor / Ansatz entsprechend 4.7-12 µg PL). Die Proben (Phospholipide in organischer Lösung oder getrocknet) und die Standards (anorganisches Phosphat in Wasser) wurden in Reagenzgläsern mit 200 µl Perchlorsäure (70%) versetzt und zur Freisetzung der Phosphatgruppe bei 180°C im Thermoblock für 60 min verkocht. Nach dem Abkühlen wurde 1 ml 4,6 mM Ammoniumheptamolybdat-Lösung und 20 µl 650 mM Ascorbinsäure zugegeben. Während der anschließenden Inkubation (1h bei 60°C im Trockenschrank) erfolgt die Reduktion zum Farbkomplex.

Die Proben wurden bei $\lambda = 698 \text{ nm}$ photometrisch gemessen (Kontron, Spektralphotometer Uvicon UV 860). Als Leerwert bzw. Referenz diente Wasser. Nach Abzug des Leerwertes erfolgte die Auswertung über eine Regressionsgerade aus den Werten der eingesetzten Standards. Als mittlere relative Molekularmasse wurde für Phospholipide $M_r = 734$ benutzt.

5.9 Statistische Auswertung

Daten aus dem Bereich der Methoden-Entwicklung (2.2.8.) sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (Mean \pm SD), alle Ergebnisse aus der Analyse klinischer Proben als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt (Mean \pm SEM).

Die statistische Analyse auf Unterschiede zwischen den Hauptkollektivgruppen (ARDS, ARDS und Pneumonie, Pneumonie, Exogen allergische Alveollitis, Sarkoidose, idiopathische pulmonale Fibrose) sowie den Pneumonie-Untergruppen (bronchoalveoläre, alveoläre, interstitielle) und der Kontrollen (Normalpatienten) erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms SPSS (SPSS inc. Vers. 6.0).

Dazu wurde zunächst für jeden einzelnen Parameter per Kruskal-Wallis-H-Test die prinzipiellen Signifikanzunterschiede innerhalb aller Kollektive ermittelt (einfaktorielle Rangvarianzanalyse), gefolgt von der Durchführung eines non-parametrischen Testes für jeweils zwei Kollektive (Mann-Whitney-U-Test). Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Dargestellt sind die Signifikanzniveaus im Text jeweils mit * = ($p < 0,05$), ** = ($p < 0,01$), *** = ($p < 0,001$).

V. Ergebnisse

6 Klinische Daten

6.1 *Klinische Daten der akut inflammatorischen Lungenerkrankungen (ARDS und / oder Pneumonie)*

Gasaustausch (paO_2/FiO_2)

Außer den spontan atmenden PNEU-Patienten mussten alle anderen Patienten (ARDS, ARDS+PNEU und beatmete PNEU) mechanisch beatmet werden. FiO_2 und der endexpiratorische positive Druck (PEEP) wurden den individuellen Verhältnissen entsprechend eingestellt, wobei zwischen den genannten Kollektiven keine wesentlichen Unterschiede des Quotienten aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck und dem prozentualen Anteil des Sauerstoffs in der Inspirationsluft (paO_2/FiO_2) beobachtet wurde (siehe Tabelle 5).

Zellbild der BAL

Alle Patienten zeigten einen Anstieg (acht- bis achtzehnfach der Normalwerte) des relativen Anteils an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen) in der BAL. Der relative Gehalt an Neutrophilen war in der Reihenfolge ARDS > ARDS+ PNEU > beatmete PNEU > spontan atmende PNEU im Vergleich zur Kontrolle hoch signifikant ($p < 0.001$) erhöht.

Mit 94,4% stellten die Makrophagen den größten Anteil der Zellen in der BAL der Kontrollgruppe. Dieser relative Makrophagen Anteil war bei spontan atmenden PNEU < beatmete PNEU \approx ARDS+PNEU < ARDS deutlich reduziert ($p < 0,001$). Dagegen wies die Lymphozytenzahl bei diesen Patientengruppen keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle auf. Zusammengefasst wurde eine starke Zunahme des relativen Gehaltes an Neutrophilen bei verminderter relativer Anzahl der Makrophagen beobachtet.

Proteingehalt der BAL

Die Analyse des gesamten Proteingehaltes der BAL (siehe Tabelle 5) ergab bei allen Patienten mit akut inflammatorischen Lungenerkrankungen eine hochsignifikante Erhöhung im Vergleich zum Kontrollkollektiv ($p < 0,001$). Eine mehr als zehnfache Zunahme der Proteinkonzentration konnte bei ARDS Patienten und eine etwa fünffache Erhöhung bei spontan atmenden Patienten mit Pneumonie beobachtet werden.

Partielle Thromboplastinzeit

Die partielle Thromboplastinzeit (PTT) als Globaltest des intrinsischen plasmatischen Systems wurde im Plasma der Patienten am Tag der Durchführung der BAL gemessen. Aufgrund der bei diesen Patienten durchgeführten *low-dose* Heparinisierung wurde eine leichte Verlängerung des PTT beobachtet. Diese lag aber noch unterhalb der Schwellenwerte einer therapeutische Heparinisierung.

	Kontrolle (n=35)	ARDS (n=25)	ARDS+ PNEU (n=43)	beatmete PNEU (n=114)	spontan at. PNEU (n=40)
paO ₂ /FiO ₂ (mmHG)	-	181±17	177±15	192±11	217±36
Neutrophile in der BAL (%)	2,5±0,4	46,5±6,4 ***	31,7±5,3 ***	34,9±2,2 ***	19,7±4,0 ***
Alveolar- macrophagen in der BAL (%)	93,1±0,8	50,74±6,4 ***	59,0±5,0 ***	58,8±27,4 ***	68,3±3,9 ***
Lymphozyten in der BAL (%)	5,4±0,8	3,9±0,8	8,4±2,5	5,9±0,7	9,7±2,2
Proteingehalt der BAL (µg/ml)	69,2±8	920±263 ***	518,3±85 ***	432,4±68 ***	339,7±71 ***
PTT (Sek.)	28,4±3,5	34,6±4,1	46,9±3,5	45,6±2	37,3±2,4

Tabelle 5. Klinische Daten und BAL-Parameter bei akut inflammatorischen Lungenerkrankungen. Die Zellen (Alveolarmakrophagen, Neutrophilen, Lymphozyten) sind in Prozent der totalen Zellmenge (Gesamtzellmenge) aller lavagierbaren Zellen gemessen. Der Proteingehalt der BAL ist in µg/ml angegeben. Die PTT=Partielle Thromboplastinzeit ist in Sekunden angegeben und wurde im Plasma der Patienten am Tag der Durchführung der BAL gemessen. Spontan at. PNEU= spontan atmende Pneumonie. Alle Daten sind als Mittelwerte (Mean) ± Standardfehler (SEM) dargestellt. * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001.

6.2 Klinische Daten der chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen

Schweregrad der Krankheit

Als Indikator für das subjektive Beschwerdebild diente der Dyspnoe Score, während die Ergebnisse der Lungenfunktion der objektiven Beurteilung dienten. Die Patienten aller Gruppen empfanden im Schnitt Dyspnoe ersten Grades, bei einer Unterteilung in fünf Schweregrade. Die paO_2 -Werte aller Kollektive unterschieden sich nicht wesentlich voneinander und lagen im Schnitt leicht unterhalb des Normbereiches.

Die expiratorische Sekundenkapazität (FEV) und die forcierte Vitalkapazität (FVC) waren im Vergleich zur Kontrolle um etwa 30% reduziert, allerdings wiesen Patienten mit SARK eine weniger stark ausgeprägte Einschränkung der Lungenfunktion auf (siehe Tabelle 6, Seite 47).

Zellbild der BAL

Der prozentuelle Anteil der Neutrophilen in der BAL war $26,5 \pm 4,3$ % (IPF), $17,5 \pm 4,0$ % (EAA) und $5,4 \pm 1,1$ % (SARK) erhöht (Kontrolle: $2,7 \pm 0,5$ %), wobei erwartungsgemäß die höchsten Neutrophilenwerte bei IPF gefunden wurden. Die Lymphozyten waren bei allen Kollektiven signifikant erhöht und erreichten bei der EAA die höchsten Werte. Hinsichtlich des relativen Anteils an Alveolarmakrophagen (AM) in der BAL konnte in sämtlichen chronisch interstitiellen Kollektiven eine Reduktion um ein Drittel bis zur Hälfte des Kontrollwertes aufgezeigt werden, wobei die EAA-Patienten die niedrigsten Werte aufwiesen. Wie zu erwarten war, konnte bei IPF eine vorwiegend neutrophile Alveolitis beobachtet werden, während bei der SARK und EAA eine prädominant lymphozytäre Reaktion vorlag. SARK und EAA Patienten unterschieden sich zudem signifikant durch ihren CD4/CD8 Quotient.

Proteingehalt der BAL

Die Analyse des gesamten Proteingehaltes der BAL (siehe Tabelle 6, Seite 47) ergab bei allen Patienten mit chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen eine hochsignifikante Erhöhung des Proteingehaltes im Vergleich zum Kontrollkollektiv ($P < 0,001$). Eine mehr als dreifache Zunahme der Proteinkonzentration konnte bei den EAA- und IPF-Kollektiven und eine annähernd dreifache Erhöhung beim SARK-Kollektiv beobachtet werden.

Mean ± SE	Kontrolle (n=35)	EAA (n=35)	IPF (n=41)	SARK (n=48)
Dyspnoe	0	1,26±0,2	1,71±0,2	1,0±0,2
pO ₂ [% der Norm]	102±3,1	86,9±5,4	85,3±11,7	90,3±2,2
FEV [% der Norm]	104±5,8	70,0±3,1	67,7±3,8	78,0±3,2
FVC [% der Norm]	103±2,3	66,8±3,1	66,0±3,1	81,5±2,4
Proteingehalt	76,8±9,4	262±30***	248±27***	214±21***
AM [%]	93,1±0,8	49,9±3,9***	56,7±4,1***	69,1±2,8***
Lymphozyten [%]	5,4±0,8	32,1±4,2***	14,7±2,7*	24,8±2,5***
Neutrophile [%]	2,5±0,4	17,5±4,0***	26,5±4,3***	5,4±1,1

Tabelle 6: Klinische Daten und BAL-Parameter der chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen. Dyspnoe: dieser Wert bezieht sich auf den subjektiven Grad der Dyspnoe. FEV=Expiratorische Sekunden Kapazität, FVC=Forcierte Vital Kapazität. pO₂ = pO₂ im kapillären Astrup, alle Angaben in % der Norm. Die Zellen (AM=Alveolarmakrophagen, Neutrophile und Lymphozyten) sind in Prozent der totalen Zellmenge (Gesamtzellmenge) aller lavagierbaren Zellen angegeben. Alle Daten erscheinen als Mittelwerte (Mean) ± Standardfehler (SEM). * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001.

7 Charakterisierung der prokoagulatorischen Aktivität (PCA) in der BAL

Die PCA in der BAL von Patienten wurde anhand der Rekalzifizierungszeit gemessen und mit der Kontrollgruppe verglichen (siehe Abbildung 18). Eine signifikante Zunahme der PCA um etwa 2-3 Zehnerpotenzen wurde in der BAL aller Patienten mit akut inflammatorischen Lungenerkrankungen beobachtet (p<0,001), wobei für Patienten mit ARDS und oder PNEU die höchsten Werte beobachtet wurden (PCA beatmete PNEU > ARDS ≈ ARDS+PNEU > spontan atmende PNEU) und die PCA von Patienten mit IPF, EAA oder SARK im Vergleich hierzu etwa 5-10 fach niedriger lag. Innerhalb der Pneumoniepatienten zeigten die Patienten mit alveolärer Pneumonie eine höhere PCA in der BAL im Vergleich zu den Bronchopneumonien oder interstitiellen Pneumonien (siehe Abbildung 18). Die niedrigsten PCA-Werte zeigten Patienten mit Bronchopneumonie.

Bei dem chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen war die PCA in der BAL um mindestens einen Faktor zehn höher als bei dem Kontrollkollektiv (p < 0,001). Diesbezüglich wiesen die IPF-Patienten höhere PCA-Werte als SARK- und EAA-Patienten auf (IPF > SARK > EAA; siehe Abbildung 18).

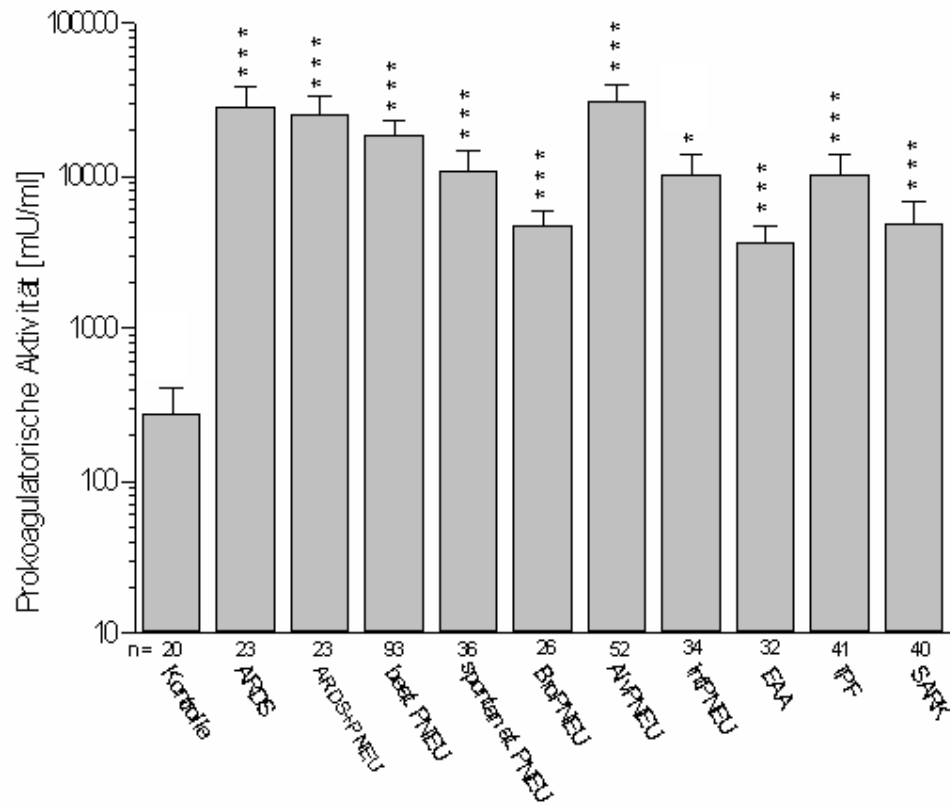


Abbildung 18. Logarithmische Darstellung der Prokoagulatorischen Aktivität (PCA) in der BAL. Die Anzahl (n) der Bestimmung pro Kollektiv ist auf der X-Achse angegeben. *** = $p < 0,001$

	TF [% von PCA]
Kontrolle (n=35)	99,9±0,2
ARDS (n=25)	95,9±4,3
ARDS + PNEU (n=43)	99,8±0,6
beatmete PNEU (n=114)	98,4±2,2
spontan atmende PNEU (n=40)	98,5±4,6
EAA (n=35)	99,7±0,8
IPF (n=41)	98,8±1,7
SARK (n=48)	99,9±0,2

Tabelle 7: Tissue factor- vermittelte Erhöhung der PCA in der BAL. Die *tissue factor* Aktivität ist in Prozent der totalen prokoagulatorischen Aktivität angegeben. Alle Daten erscheinen als Mittelwerte (Mean) ± Standardfehler (SEM).

7.1 Faktor VII-Aktivität und Fibrinopeptidabspaltung in der BAL

Faktor VII

Unter Anwendung vom Faktor VII-Mangelplasma im Rekalzifizierungstest konnte die Aktivität des Faktor VII in den BAL-Proben gemessen werden. Entsprechend der PCA wurde bei allen Patienten eine hohe Faktor VII-Aktivität in der BAL im Vergleich zum Kontrollkollektiv festgestellt. Ein Vergleich zwischen den beiden Hauptgruppen ergab höhere Werte für die akut inflammatorischen Lungenerkrankungen (Tabelle 7 auf Seite 49). Bei allen Kollektiven dieser Hauptgruppe war die Faktor VII-Aktivität signifikant angestiegen. ARDS-Patienten zeigten mit einer siebenfachen Erhöhung im Vergleich zum Ausgangswert die höchste Aktivität an Faktor VII. Hingegen war bei spontan atmenden Patienten mit PNEU die geringste Erhöhung der Faktor VII-Aktivität zu beobachten (siehe Tabelle 8).

Innerhalb der chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen war ebenfalls eine Erhöhung der Faktor VII-Aktivität in der BAL im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Allerdings waren diese Veränderungen nur bei der IPF signifikant ($p < 0,05$, siehe Tabelle 8). Die Veränderungen des Faktor VII bei der IPF waren denen der spontan atmenden Pneumonie Patienten vergleichbar.

Fibrinopeptid A (FP-A)

Das Fibrinopeptid A (FP-A) wurde mittels eines kommerziellen ELISA in der BAL quantifiziert. Die FPA-Konzentration der BAL war bei allen Patientengruppen im Vergleich zum Kontrollkollektiv erhöht, sie ist in Tabelle 8 (Seite 51) dargestellt. Der Anstieg der FP-A-Spiegel bei den akut inflammatorischen Lungenerkrankungen war mit Faktor 4 etwa doppelt so groß wie bei den chronisch interstitiellen Erkrankungsbildern, bei denen die FP-A Werte etwa verdoppelt waren. Nennenswerte Unterschiede waren zwischen den Untergruppen in dieser Beziehung nicht vorhanden.

	F VII [mU/ml]	FP-A [ng/ml]	FA [%]
Kontrolle (n=35)	18,9±9	1,6±3,5	25,1±2,9
ARDS (n=25)	140,7±36 **	6,3±1,6 *	11,32±2,4
ARDS + PNEU (n=43)	135±47 **	5,1±1,5 *	9,4±2,0
beatmete PNEU (n=114)	87,8±13 **	6,6±1,2 **	16,42±1,3
spontanatmende PNEU (n=40)	52,3±11 *	5,9±1,3 **	18,29±2,0
EAA (n=35)	37,9±8,4	3,4±0,72	25,1±2,4
IPF (n=41)	48,9±13,1 *	3,3±0,73	22,5±2,0
SARK (n=48)	30,0±4,7	3,1±0,67	24,5±2,2

Tabelle 8: Faktor VII, Fibrinopeptid-A und fibrinolytische Aktivität in der BAL. Die FVII-Aktivität ist in [mU/ml] angegeben. Die fibrinolytische Aktivität (FA) zeigt die prozentuale Freisetzung des markierten Fibrins im Fibrin Platen Test. Die Konzentration des Fibrinopeptid-A (FP-A) ist in ng/ml und die fibrinolytische Aktivität (FA) in Prozent angegeben. Alle Daten erscheinen als Mittelwerte (Mean) ± Standardfehler (SEM).

** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$.

8 Charakterisierung der pro- und antifibrinolytischen Aktivität in der BAL

8.1 Charakterisierung der gesamten fibrinolytischen Aktivität (FA)

Zur Bestimmung der fibrinolytischen Aktivität (FA) der BAL wurde die Fibrin Platten Methode angewendet. Innerhalb der Patienten mit chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen konnte keine bedeutende Veränderung der gesamten fibrinolytischen Aktivität im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv registriert werden (siehe Tabelle 8, Seite 50). Lediglich bei der IPF fand sich ein geringgradiger Abfall. Hingegen wurde bei den Patienten mit ARDS und ARDS+PNEU eine massive Reduktion der FA im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden (um Faktor 3). Bei den spontan atmenden PNEU- und den beatmeten PNEU-Patienten war die FA um etwa 30% reduziert. Bezüglich der Pneumonie-Subgruppen zeigten Patienten mit Brochopneumonien keine signifikante Depression der FA, wohl aber solche mit alveolärer oder interstitieller Pneumonie. Mit Ausnahme der Bronchopneumonie waren die Veränderungen bei allen Kollektiven im Vergleich zum Kontrollkollektiv signifikant.

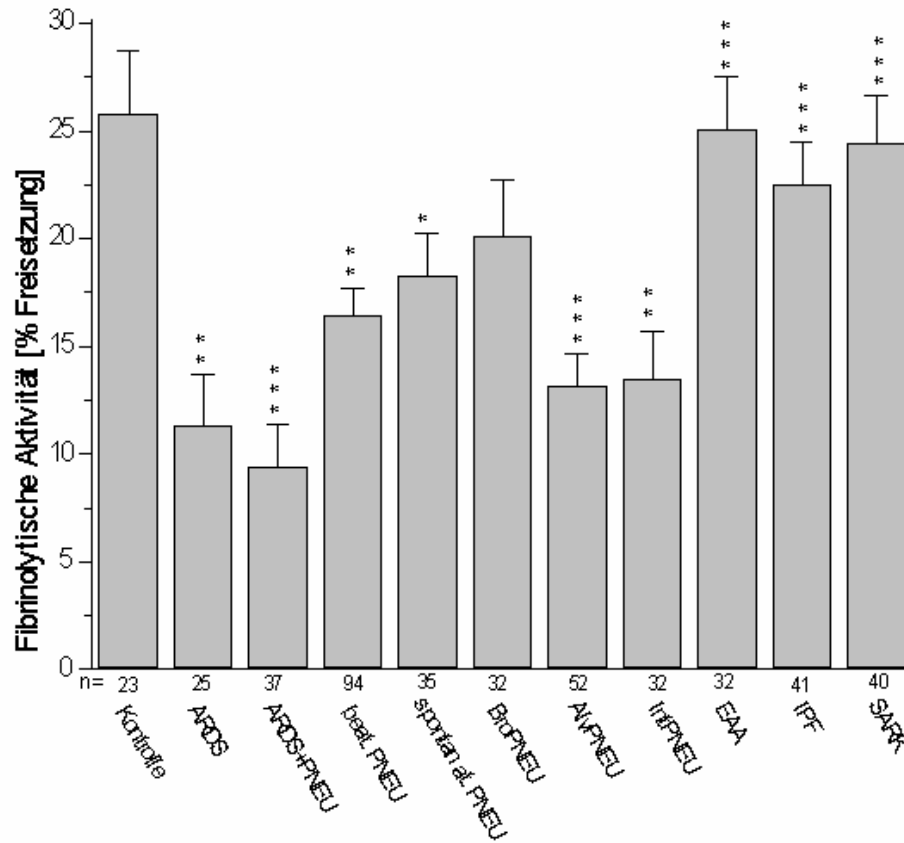


Abbildung 19. Fibrinolytische Aktivität (FA) in der BAL. Die Anzahl (n) der Bestimmung pro Kollektiv sind auf der X-Achse angegeben. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

8.2 Plasminogenaktivatoren

8.2.1 Gewebsplasminogen Aktivator (t-PA)

Mit Hilfe der selbstentwickelten ELISA wurden die Gewebsplasminogen Aktivator (t-PA-) Konzentration der BAL-Proben bestimmt. Es fand sich in keiner der untersuchten Kollektive eine signifikante Veränderung im Vergleich zum Kontrollwert. Allenfalls war ein geringgradiger Abfall der t-PA Konzentration bei den chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen mit Ausnahme der EAA zu beobachten. Bei der EAA, wie auch bei den akut inflammatorischen Kollektiven wurde eine leichte Zunahme des t-PA-Antigens in deren BAL im Vergleich zum Kontrollkollektiv festgestellt (siehe Tabelle 9, Seite 52).

	t-PA [pg/ml]
Kontrolle (n=35)	578±86
ARDS (n=25)	626±79
ARDS + PNEU (n=43)	784±124
beatmete PNEU (n=114)	713±88
spontanatmende PNEU (n=40)	731±151
EAA (n=35)	844±152
IPF (n=41)	463±80
SARK (n=48)	353±98

Tabelle 9: t-PA Konzentration in der BAL. Die Konzentrationen des Gewebsplasminogen-Aktivators (t-PA) sind in pg/ml angegeben. Alle Daten erscheinen als Mittelwerte (Mean) ± Standardfehler (SEM).

8.2.2 Urokinase (u-PA)

Die Urokinase wurde mittels eines selbstentwickelten ELISA in der BAL quantifiziert. Es konnte bei allen untersuchten Kollektiven eine signifikante Reduktion des u-PA Spiegels um die Hälfte im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (siehe Abbildung 20). Bei den chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen war der u-PA Spiegel am niedrigsten bei der EAA gefolgt von IPF und SARK. Innerhalb der akut inflammatorischen Lungenerkrankungen wurden bei beatmeten PNEU-Patienten die niedrigsten u-PA Spiegel ermittelt (Schwere der Veränderung: beatmete PNEU > ARDS+PNEU > ARDS > spontan atmende PNEU Patienten). Innerhalb der PNEU Subgruppen waren keine wesentlichen Unterschiede feststellbar (s. Abbildung 20).

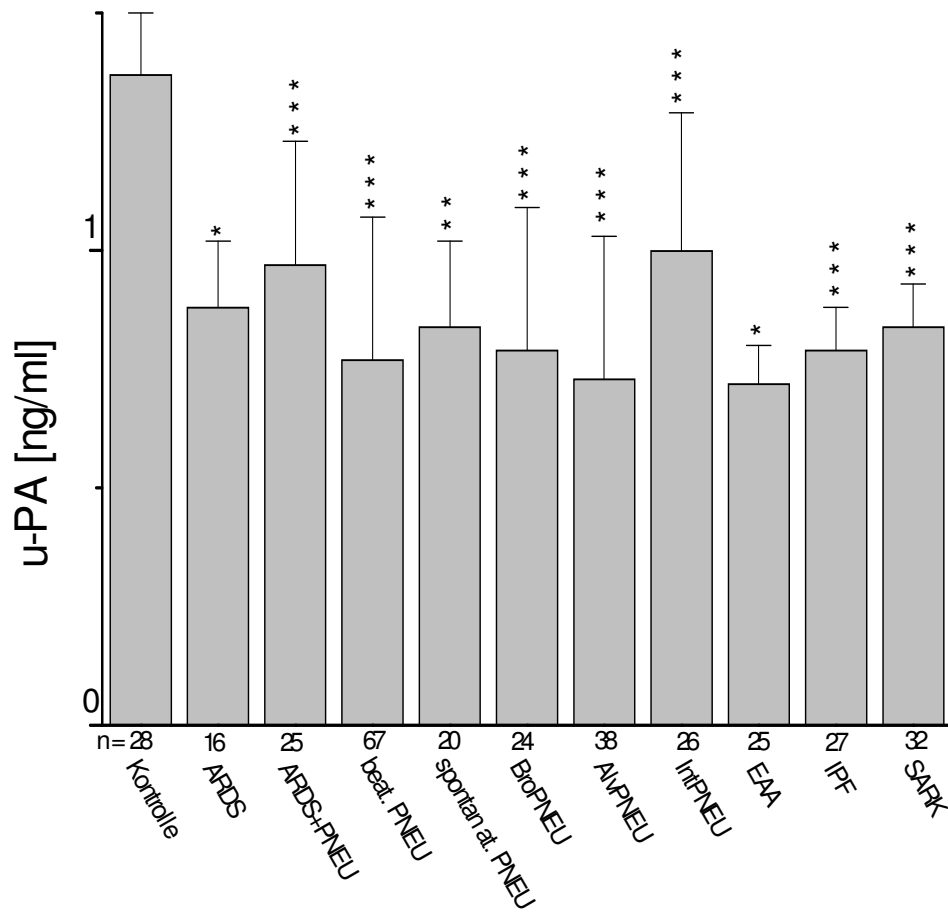


Abbildung 20. Urokinase (u-PA) Konzentration in der BAL. Die Anzahl (n) der Bestimmung pro Kollektiv sind auf der X-Achse angegeben. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

8.3 Plasminogen Aktivator-Inhibitor und α_2 -Antiplasmin

8.3.1 Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1)

Zur Quantifizierung des Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) in den BAL-Proben wurden selbstentwickelte ELISA-Verfahren angewendet. Es wurden deutliche Unterschiede bezüglich der Regulation von PAI-1 zwischen chronisch interstitiellen und akut inflammatorischen Lungenerkrankungen ermittelt. Eine geringe, jedoch signifikante, Reduktion des PAI-1 Spiegels fand sich bei der SARK und der EAA, nicht jedoch bei der IPF, deren PAI-1 Konzentration den Werten des Normalkollektives entsprach. Dagegen wurde für das PAI-1 eine fast zehnfache Zunahme bei ARD und ARDS+PNEU und ein fünffacher Anstieg bei beatmeten Pneumonie Patienten festgestellt. Spontan atmende Pneumonie Patienten zeigten PAI-1 Spiegel, die denen des Kontrollkollektives entsprachen (siehe Abbildung 21).

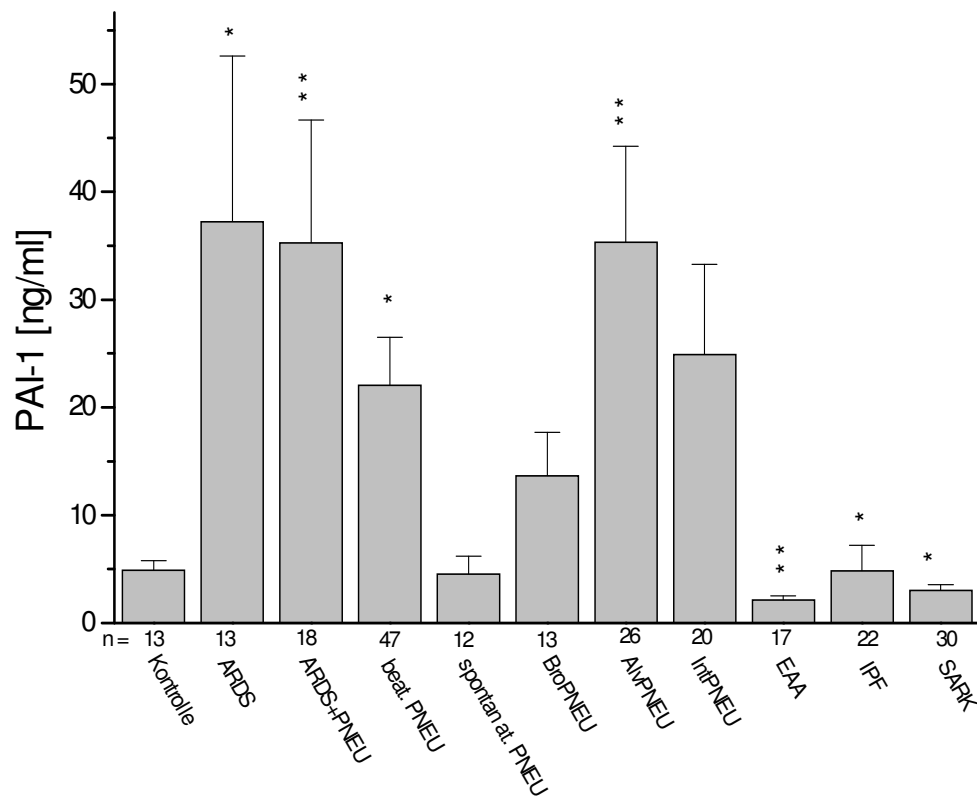


Abbildung 21. Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) Konzentration in der BAL. Die Anzahl (n) der Bestimmung pro Kollektiv sind auf der X-Achse angegeben. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

8.3.2 α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP)

Die α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP)-Messung wurde ebenfalls mit Hilfe eines selbstentwickelten ELISA durchgeführt. Im Vergleich zum Kontrollkollektiv war der α_2 -AP Spiegel der BAL von allen Patienten außer den spontan atmenden Pneumonie Patienten, um annähernd eine Zehnerpotenz angestiegen. Diese Werte waren statistisch hochsignifikant (siehe Abbildung 22).

Es konnte auch kein relevanter Unterschied zwischen den Kollektiven festgestellt werden.

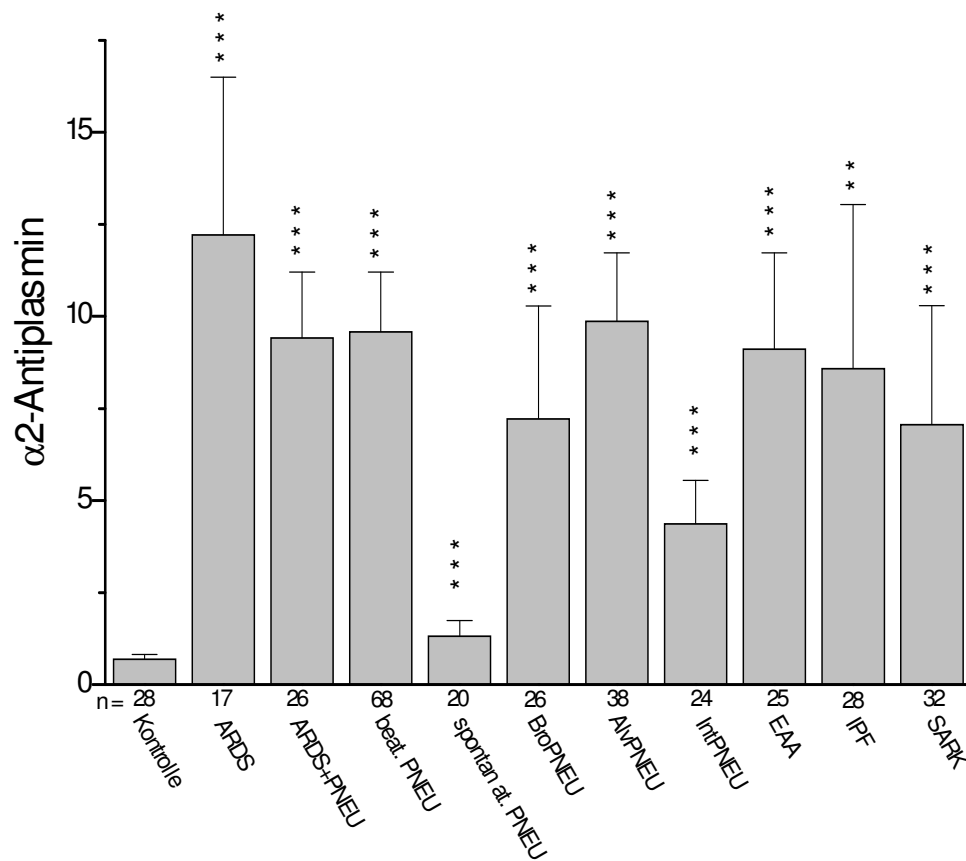


Abbildung 22. α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP) Konzentration in der BAL. Die Anzahl (n) der Bestimmung pro Kollektiv sind auf der X-Achse angegeben. * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001.

9 Charakterisierung des intraalveolären Fibrinumsatzes

9.1 D-Dimer

Als ein Indikator für den alveolären Umsatz an Fibrin (Fibrinbildung und Fibrinolyse) wurde das D-Dimer in der BAL mittels eines kommerziellen ELISA quantifiziert. Wie erwartet, kam es zu einem signifikanten Anstieg des D-Dimer-Spiegels im gesamten Patientengut im Vergleich mit gesunden Probanden. Allerdings war die D-Dimer Konzentration wesentlich höher in der BAL von akut inflammatorischen im Vergleich zu chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen (siehe Abbildung 23). Zwischen den IPF-, SARK- und EAA-Patienten konnte kein bedeutender Unterschied nachgewiesen werden. Der D-Dimer-Spiegel war in der BAL dieser Patienten etwa fünffach so hoch wie bei der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 23). Die Unterschiede waren hochsignifikant.

Bei den akut inflammatorischen Lungenerkrankungen wurden dramatisch erhöhte D-Dimer Spiegel in der BAL im Vergleich zur Kontrolle ermittelt ($p < 0,001$, bei spontan atmenden PNEU ($p < 0,01$), die im Schnitt um zwei Zehnerpotenzen erhöht waren. Bei ARDS und ARDS+PNEU waren die höchsten D-Dimer Konzentrationen nachweisbar ($>$ Faktor 100). Etwas niedriger lagen die Werte bei beatmeten PNEU-Patienten. Der D-Dimer-Spiegel bei spontan atmenden PNEU-Patienten zeigten eine niedrigere, mit den chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen vergleichbare Konzentration.

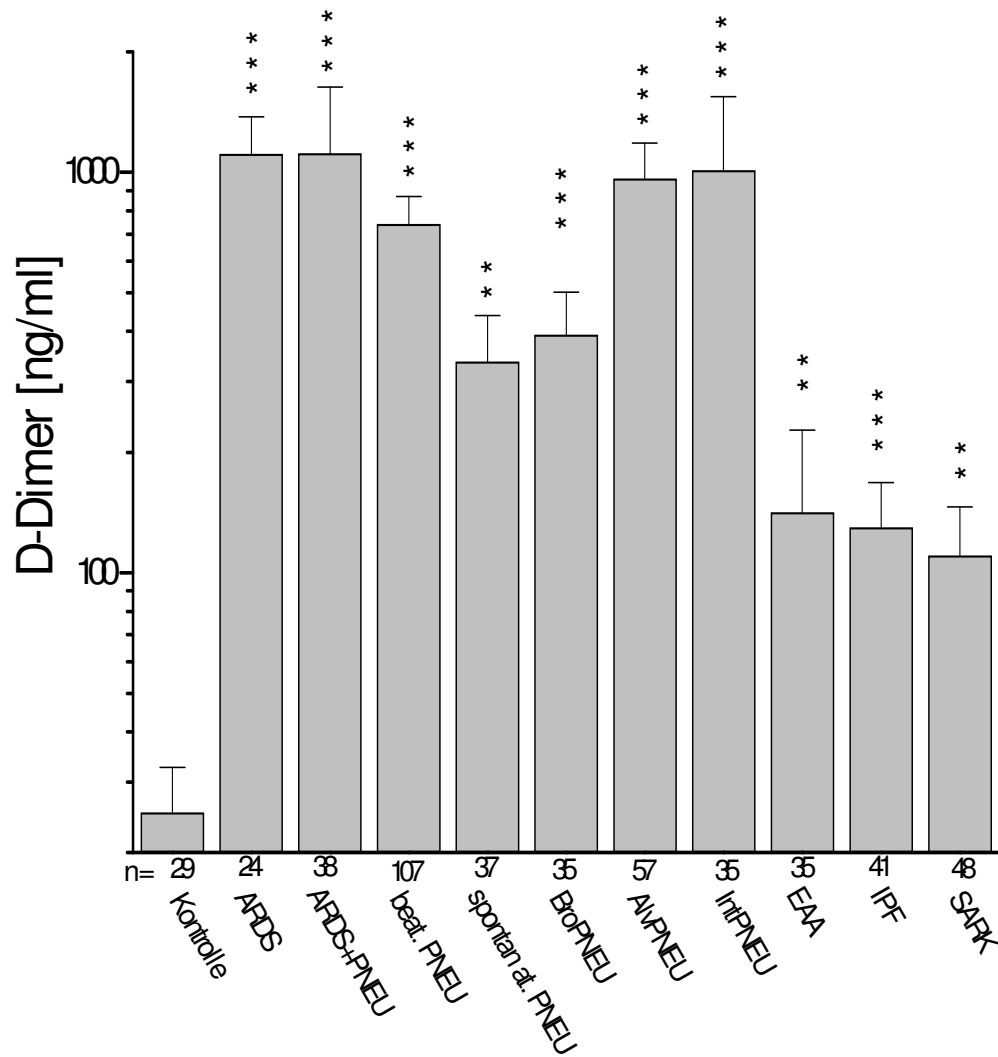


Abbildung 23. D-Dimer Konzentration in der BAL. Die Anzahl (n) der Bestimmung pro Kollektiv sind auf der X-Achse angegeben. * = ($p < 0,05$). ** = ($p < 0,01$), oder *** = ($p < 0,001$).

VI. Diskussion

10 Prokoagulatorische und fibrinolytische Aktivität im alveolären Kompartiment von Patienten mit akut inflammatorischen und chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen

Die vorliegende Arbeit zielte auf die Charakterisierung der alveolären Hämostase-Veränderungen bei akut inflammatorischen (ARDS, ARDS+Pneumonie, spontanatmende sowie beatmete Pneumonie) und chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen [Sarkoidose (SARK), idiopathisch pulmonale Fibrose (IPF) und exogen allergische Alveolitis (EAA)]. In der bronchoalveolären Lavage von insgesamt 346 Patienten wurden die prokoagulatorische Aktivität (Rekalzifizierungs-Assays; *tissue factor*-, F VII-Aktivität), die fibrinolytische Aktivität (Fibrin Plate Assay; Freisetzung von ^{125}J -markiertem Fibrin nach Inkubation mit BAL-Aliquots), die Fibrin(ogen)spaltprodukte Fibrinopeptid (FP)-A und D-Dimer (mittels kommerzieller ELISA-Verfahren), die Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA sowie Plasminogen-Aktivator-Inhibitor I (PAI-I) und α_2 -Antiplasmin (alle mittels selbst entwickelter ELISA) ermittelt.

Bei Patienten mit ARDS oder Pneumonie war eine Verschiebung des Hämostasegleichgewichtes zu Gunsten einer gesteigerten Gerinnungsneigung und der Begünstigung von Fibrinablagerung im alveolären Kompartiment zu beobachten. Es kam zu einem drastischen Anstieg der Expression von essentiellen Komponenten des extrinsischen Teils der Gerinnungskaskade. Eine Zunahme des Faktor VII und eine Erhöhung des Gewebsthromboplastin (*tissue factor*, TF) (unter Berücksichtigung der vorherigen Arbeiten [54, 19] ließ sich für die Zunahme der prokoagulatorischen Aktivität (PCA) in der BAL verantwortlich machen. Parallel hierzu kam es zu einem Abfall der fibrinolytischen Kapazität insbesondere bei den akut inflammatorischen Lungenerkrankungen. Ein gesteigertes "*plasma protein leakage*" in Verbindung mit der Erhöhung der PCA und der Depression der gesamten fibrinolytischen Aktivität dient als mögliche Erklärung für eine übermäßige Fibrinablagerung und einen gesteigerten Fibrinumsatz in der Alveole, die durch den ausgeprägten Anstieg der Fibrinabbauprodukte D-Dimer und FP-A in der BAL gekennzeichnet sind.

In den Kollektiven der akut inflammatorischen Gruppe gab es zwischen ARDS, ARDS+PNEU und beatmeten PNEU Patienten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der FVII Aktivität. Bezüglich des fibrinolytischen Systems zeigten Patienten mit ARDS oder ARDS+PNEU im Vergleich zu Lungengesunden eine deutlich erniedrigte fibrinolytische Aktivität und ebenfalls deutlich erhöhte PAI-1- und α_2 -AP-Konzentrationen. Bei spontan atmenden Patienten mit PNEU konnte zwar ebenfalls eine statistisch signifikante Zunahme der Faktor VII- Aktivität nachgewiesen werden, die BAL Konzentrationen von PAI-1- und

α_2 -AP entsprachen allerdings den Kontrollen und unterschieden sich entsprechend deutlich von den beatmeten Patienten. Ähnlich verhielt es sich mit dem PAI-1/u-PA Quotienten, einem Maß für die gesamtfibrinolytische Kapazität. Im Vergleich zur Kontrolle war dieser bei ARDS+PNEU-Patienten mehr als 10-fach, bei ARDS- bzw. beatmeten PNEU-Patienten etwa 6-fach erhöht, blieb bei spontanatmenden PNEU-Patienten jedoch unverändert.

In der Gruppe der chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen konnten für das IPF-Kollektiv deutlich höhere PCA und entsprechende Faktor VIIa- -Aktivitäten (analog der Gruppe mit spontanatmender PNEU) dokumentiert werden. Antifibrinolytische Aktivität wurde hier hauptsächlich durch Anstieg des α_2 -AP-Spiegels verursacht. Die gesamtfibrinolytische Aktivität war hier nicht signifikant verändert, wobei bei diesen Patienten alternative proteolytische Mechanismen wie z.B. Elastase die fibrinolytische Aktivität normalisieren könnten [[57, 59]. Auffallend war, daß der PAI-1-Spiegel in allen Kollektiven dieser Gruppe niedriger war als im Kontrollkollektiv. Die Antigenspiegel des Gewebeplasminogenaktivators (*tissue-type plasminogen activator*, t-PA) waren in der BAL bei allen Patientengruppen nicht signifikant verändert. Eine Beteiligung an den Veränderungen des Hämostasegleichgewichtes im alveolären Kompartiment erscheint daher unwahrscheinlich.

Die Analyse des Gesamtproteingehaltes in der BAL von Patienten mit akut inflammatorischen Lungenerkrankungen lieferte eine hochsignifikante Erhöhung im Vergleich zum Kontrollkollektiv ($p < 0.001$). Bei ARDS Patienten erreichte die Proteinkonzentration etwa das 20-fache des Kontrollwertes. Bei den chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen kam es ebenfalls zu einem hochsignifikanten Anstieg ($p < 0.001$) des Proteingehaltes in der BAL. Diese Ergebnisse zeigen eine erhöhte Permeabilität der vaskulär-endothelialen und der alveolär-epithelialen Barriere und somit eine Exsudation von Plasmaprotein in den Alveolarraum. Weitere Anzeichen für eine gesteigerte Plasmaprotein-Exsudation sind die erhöhten D-Dimer-Spiegel in der BAL von allen untersuchten Patienten, sowie die erhöhten Fibrinopeptid A (FP-A) Spiegel bei Patienten mit akut inflammatorischen Lungenerkrankungen, die auf einen gesteigerten Fibrinumsatz hinweisen. Wenngleich gezeigt werden konnte, dass das Lungenepithel unter inflammatorischen Bedingungen in der Lage ist selbst Fibrinogen zu produzieren, kann man davon ausgehen, dass ein Großteil des Substrates der Gerinnung aus dem Plasma stammt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit früheren Studien und konnten somit unsere Erkenntnisse bezüglich der Bedeutung des Gerinnungssystems bei akut inflammatorischen und chronisch-interstitiellen Lungenerkrankungen erweitern. Vorausgehende Studien bei ARDS Patienten (bedingt durch mehrfacher Traumata, Sepsis und Pankreatitis) zeigten einen TF- und Faktor VII-vermittelten Anstieg der prokoagulatorischen Aktivität [59, 58, 75], sowie einen Abfall der fibrinolytischen Aktivität bei gleichzeitiger Zunahme der antifibrinolytischen Aktivität [59, 58]. Insbesondere zeigte

sich eine Erhöhung des PAI-1, vor allem in der akuten Phase des ARDS [32]. Bertozzi et al. berichtete über eine Abnahme der u-PA-Aktivität und Zunahme des PAI-1-Spiegels in der BAL von ARDS Patienten [50]. Eine Zunahme der PAI-1- und PAI-2-Konzentrationen wurde in der BAL auch bei Patienten mit *Pneumocystis carinii* (HIV-positiv) und bei Patienten mit bakterieller Pneumonie (HIV-negativ) registriert [8]. Ebenso war bei solchen Patienten eine Erhöhung der PCA sowie ein Anstieg des Gewebsthromboplastin-Inhibitors (TFPI) Zu beobachten [51]. Bezüglich der t-PA-Daten konnten Idell et al. [58] ebenfalls keine signifikante Veränderung in der BAL von ARDS Patienten feststellen.

Bezüglich der Verschiebung des hämostaseologischen Gleichgewichtes bei chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen existieren bislang nur wenige Studien. Hasday et al. [26] beschrieb anhand der Untersuchung von 17 Sarkoidose-Patienten einen signifikanten Anstieg der PCA bei gleichzeitigem Abfall der uPA-Spiegel im Vergleich mit 12 gesunden Probanden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Nakstad [2] und Kotani et al [32] bei Sarkoidose- und IPF- Patienten.

Im Gegensatz dazu wurde bislang in keiner Studie die Verschiebung des alveolären Hämostasegleichgewichts und die Charakterisierung der α_2 -AP- und PAI-1-Spiegel bei IPF Patienten beschrieben. Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals Gerinnungsparameter bei Patienten mit ARDS+PNEU (ARDS begleitet von bakterieller Pneumonie) erfaßt.

Wie genau spiegeln die von uns gefundene Erhöhung der prokoagulatorischen Aktivität und Abfall der fibrinolytischen Aktivität in der BAL den genauen Zustand der Hämostase und der Fibrin-Clearance wieder?

Wie aus vorherigen Studien zu entnehmen ist, sind Epithelzellen und Alveolarmakrophagen zur Herstellung und Sezernierung von Faktoren des extrinsischen Gerinnungssystems [41, 39, 40, 23, 68], wie auch pro- und antifibrinolytischer Komponenten fähig [24, 67, 34]. Gewebsthromboplastin (TF) wird in Zellmembranvesikel von alveolären Epithelien und Makrophagen integriert. Als membranständiges Protein reagiert Gewebsthromboplastin somit nur auf der Zelloberfläche [68], während u-PA und PAI-1 durch Epithelien und Makrophagen aktiv in den Alveolarraum freigesetzt werden [24, 67, 34]. Übereinstimmend mit diesen Befunden wurde ein PCA-Anstieg in den Zellen von Sarkoidose und IPF Patienten (gewonnen durch BAL) beobachtet [40, 32]. Daher könnte bei den vorliegenden Messungen in der zellfreien BAL die Höhe der PCA unterschätzt worden sein. Andererseits kann tissue factor durch „membrane shedding“ unter akut inflammatorischen Bedingungen an die Umgebung abgegeben werden, und somit zur Erhöhung der prokoagulatorischen Aktivität in der BAL beitragen.

Neben der in den Alveolarraum sezernierten Urokinase trägt möglicherweise auch zellulär gebundene Urokinase zur fibrinolytischen Aktivität im Alveolarraum bei. Durch Bindung von Urokinase an seinen Zelloberflächenrezeptor (uPAR, CD87) wird die Plasminogenaktivierung mannigfach beschleunigt und eine perizelluläre Lyse vermittelt. uPAR wird auf Fibroblasten- [56], Makrophagen- [21] und Epithelzelloberflächen [67] exprimiert. Simon et al. [68a] konnten zeigen dass kultivierte Typ II-Zellen in der Lage waren ein Gerinnsel zu lysieren, während dies durch den zellfreien Überstand nicht erreicht wurde. Durch die Verwendung zellfreier BAL wurden somit in der vorliegenden Arbeit mit Sicherheit nicht alle Komponenten die zur gesamtprokoagulatorischen bzw. gesamt-fibrinolytischen Aktivität beitragen erfaßt.

Die Studien von McGee et al und Chapman et al zeigten, daß die Alveolarmakrophagen und Epithelzellen an der Regulation des Hämostasegleichgewichtes in der gesunden und kranken Lunge beteiligt sind. In vitro Studien konnten zeigen dass sowohl Alveolarmakrophagen wie auch Epithelzellen zur Regulation des Hämostasegleichgewichts unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen befähigt sind. Die Stimulation von Lungenepithelzellen mit PMA führte zum Anstieg der TF-m-RNA [68]. Nach Stimulation von Alveolarmakrophagen mit LPS wurde eine Zunahme der Faktor X Aktivität beobachtet [40]. Typ II Pneumocyten produzieren und sezernieren u-PA, was durch Tumornekrosefaktor (TNF) bzw. LPS Stimulation wesentlich gesteigert werden konnte. Weiterhin sind Epithelzellen in der Lage unter entzündlichen Bedingungen vermehrt PAI-1 zu produzieren [67]. Daneben konnte auch gezeigt werden, daß Lungenfibroblasten an der Regulation der u-PA-, t-PA-, PAI-1-Spiegel und somit der prokoagulatorischen Aktivität im Alveolarraum beteiligt sind. Zuletzt berichtete Olman et al in einer aktuellen Arbeit mit tierexperimentellen Modell nach Provozieren einer akuten Lungenentzündung über Hämostaseveränderungen. PAI-1, u-PA und TF mRNA wurden in der induzierten Fibroblasten und Makrophagen-ähnliche Zellen gefunden [56, 49].

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass die Komponenten des Gerinnungs- und Fibrinolysesystems als ein Indikator für den Schweregrad der Krankheit und den Verlauf inflammatorischer Prozesse angesehen werden können. Dieser Annahme entsprechend zeigten die Patienten in den akut inflammatorischen Kollektiven mit ARDS, beatmeter Pneumonie oder der Kombination von PNEU und ARDS die am stärksten ausgeprägte Störung des Hämostasegleichgewichtes mit der stärksten Zunahme der prokoagulatorischen Aktivität und einer fast kompletten Suppression der fibrinolytischen Aktivität gegenüber spontanatmender PNEU bzw. gegenüber chronisch interstitiellen Kollektiven.

Im folgenden Abschnitt werden die Konsequenzen einer veränderten alveolären Hämostase behandelt.

11 Fibrinablagerung

Alveoläre Fibrinablagerung, sog. „hyaline Membranen“, sind das histomorphologische Kennzeichen chronisch interstitieller als auch akut inflammatorischer Lungenerkrankungen. Die in dieser Arbeit gefundenen Veränderungen des hämostaseologischen Gleichgewichts fördern die Polymerisation von Fibrinogen, nach dessen Einstrom ins alveoläre Kompartiment und stellen somit die treibende Kraft für die erhöhte Fibrinbildung dar. In Übereinstimmung mit diesen Überlegungen war der D-Dimer Spiegel in der Lavageflüssigkeit aller Patienten um ein (chronisch interstitielle Lungenerkrankungen) bis zwei (ARDS oder Pneumonie) Zehnerpotenzen erhöht.

Die präzise Rolle der alveolären Fibrinablagerung in der Pathogenese pulmonaler Erkrankungen ist noch nicht vollständig geklärt. Einerseits ist die Fibrinbildung erwünscht und nützlich, indem es als Primärmatrix für den Wundheilungsprozess fungiert und so den Reparationsprozess des Alveolarepithels nach einer Schädigung fördert. Andererseits kann alveolär gebildetes Fibrin einerseits durch Inaktivierung des Surfactantsystems maßgeblich zum Verlust der Gasaustauschfunktion beitragen, sowie andererseits vor allem bei einer dauerhaften Fibrinbildung bzw. Fibrinablagerung fibroproliferative Prozesse in der Alveole fördern. So konnte gezeigt werden, daß eine Polymerisation von Fibrinogen zu Fibrin einen weitreichenden Funktionsverlust des pulmonalen Surfactant bewirkt [71]. Durch Inkorporation von hydrophoben Surfactantbestandteilen (Phospholipide, Surfactant Proteine-B und -C) in die Fibrinmatrix entsteht ein hochspezialisiertes Gerinnsel, das sich im Vergleich zu nicht Surfactant-haltigen Gerinnseln durch eine verminderte Steifheit, eine verminderte hydraulische Konduktivität, eine geringere Lateralverzweigung bei Ausbildung dickerer Fibrinbündel, einen erhöhten mittleren Porendurchmesser und eine verminderte Sensibilität gegenüber fibrinolytischen Verdau auszeichnet [16, 15]. Unabhängig von den Störungen der Surfactantfunktion durch eine veränderte Zusammensetzung und durch Plasmaproteininhibition vor allem bei akut-inflammatorischen [65, 18] aber auch chronisch-interstitiellen Lungenerkrankungen [17] muß diesem Mechanismus der Surfactantinaktivierung eine hoher Stellenwert bei der Entstehung von Gasaustauschstörungen und Complianceverlust beigemessen werden. Durch selektive intraalveoläre Generierung von Fibrin, hervorgerufen durch konsekutive Applikation von Fibrinogen und Thrombin am Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge, konnte die Bedeutung von alveolären Fibrinablagerungen für die Gasaustauschfunktion *in vivo* belegt werden [64]. Weiterhin fördert eine an der Basalmembran verankerte, mit Fibronectin angereicherte primäre Fibrinmatrix die Einsprossung von Fibroblasten und deren Aktivierung und stellt den zentralen Ausgangspunkt für die Bildung von Reparationsgewebe dar [31]. Daneben stellen Fibrinopeptide, Thrombin und höhermolekulare Fibrin(ogen) Spaltprodukte potente Fibroblastenmitogene dar. Auf diese Weise kann eine gesteigerte Gerinnung im alveolären

Kompartiment mit alveolärer Fibrinbildung die Entwicklung einer Fibrose induzieren bzw. begünstigen. Entsprechend dem von Burkhardt [5] vertretenen Konzept der *collapse induration* bei inflammatorischen Lungenerkrankungen stellen jene Alveolen den Ausgangspunkt des fibrotischen Umbaus dar, die durch Surfactantinaktivierung kollabiert und durch Fibrinvernetzung dem Gasaustausch dauerhaft entzogen worden sind. Kommt es zu einer zeitgerechten Auflösung alveolären Fibrin kann eine normale Alveolarstruktur wieder hergestellt werden. Kommt die Fibrin-Clearance jedoch verspätet zustande, entweder aufgrund eines persistierenden oder sich darauf sattelnden inflammatorischen Prozesses, muß mit Entstehung der pulmonalen Fibrose gerechnet werden.

12 Zusammenfassende Wertung aller Ergebnisse; Therapeutische Perspektiven

Alveoläres Fibrin spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von sowohl akut inflammatorischen als auch chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen. Die Analyse des alveolären Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systems ist deshalb relevant, um die Rolle alveolären Fibrins in der Pathogenese dieser Krankheiten zu charakterisieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit anderen Studien und belegen eine ausgesprochene Verschiebung des hämostaseologischen Gleichgewichts im Alveolarraum sowohl bei Patienten mit akut inflammatorischen als auch chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen. Diese Untersuchungen haben ergeben, daß die Zunahme der prokoagulatorischen Aktivität *tissue factor/FVII* vermittelt sind, also aus einer Aktivierung des extrinsischen Gerinnungspfad resultieren, und der Abfall der fibrinolytischen Kapazität auf verminderte Urokinase Konzentration bei gleichzeitigem Anstieg der α_2 -AP- und PAI-1-Konzentrationen zurückzuführen ist. Beide Prozesse, gesteigerte Gerinnung und Inhibition der Fibrinolyse, begünstigen die Bildung alveolären Fibrins und verhindern dessen zeitgerechte Auflösung.

Da die Interaktion von Fibrin mit pulmonalen Surfactants massiv den Gasaustausch beeinträchtigt und möglicherweise eine Schlüsselrolle bei der Entstehung fibroproliferativer Umbauprozesse einnimmt, ist eine rechtzeitige Clearance des alveolär deponierten Fibrins als mögliches Therapieziel anzusehen. Durch eine fibrinolytische bzw. antikoagulatorische Therapie könnte somit neben dem Akuteffekt auf die Gasaustauschfunktion auch begünstigend Einfluss auf die Entwicklung fibrosierender Lungenerkrankungen genommen werden. Am Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose am Kaninchen konnte die potentielle Wirksamkeit von aerosolisiertem Heparin bzw. Urokinase aufgezeigt werden [59]. Um das Konzept einer transbronchialen Applikation von Fibrinolytika/Antikoagulantien bei Patienten mit persistierender Fibrinablagerung zu realisieren, sind jedoch noch weitere Studien zum Verständnis der intraalveolären Fibrin-Clearance und der Induktion fibrotischer Umbauvorgänge erforderlich.

VII. Zusammenfassung

Alveoläre Fibrinablagerungen sind ein Kennzeichen sowohl chronisch interstitieller als auch akut inflammatorischer Lungenerkrankungen. Eine Veränderung des Hämostasegleichgewichtes zugunsten einer gesteigerten Gerinnung wurde von vielen Autoren für die Bildung und Persistenz von Fibrin im alveolären Kompartiment zugrunde gelegt.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Dissertation die prokoagulatorische Aktivität und die pro- sowie antifibrinolytische Aktivität der bronchoalveolären Lavage (BAL) von Patienten mit akut inflammatorischen aber auch chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen charakterisiert und mit Lungengesunden Probanden verglichen. Das Patientengut beinhaltete Patienten mit den Diagnosen ARDS, schwere beatmungspflichtige Pneumonie (PNEU), beatmete Patienten mit ARDS und Pneumonie (ARDS+PNEU), beatmete Pneumonie, und spontan atmende Pneumonie Patienten in der akut inflammatorischen Gruppe, sowie Patienten mit Sarkoidose, idiopathisch pulmonaler Fibrose (IPF) und exogen allergischer Alveolitis in der Gruppe der chronisch intersitiellen Lungenerkrankungen.

Das methodische Spektrum der vorliegenden Arbeit umfasste immunologische, klinisch-chemische sowie proteinchemische Verfahren. Mittels Rekalzifizierungszeit wurden die gesamtprokoagulatorische Aktivität, sowie -unter Verwendung von FVII-Mangelplasma bzw. inhibierender *tissue factor* Antikörper- die *tissue factor* bzw. FVII Aktivität bestimmt. Die Bestimmung von Fibrinopeptid-A und D-Dimer erfolgte mittels kommerziell erhältlicher ELISAs. Zur Bestimmung der fibrinolytischen Aktivität wurde der Fibrin Platten Test (Fibrin Plate Assay; Freisetzung von ^{125}J -markiertem Fibrin nach Inkubation mit BAL-Aliquots) angewendet. Pro- und antifibrinolytische Faktoren (Plasminogenaktivatoren Urokinase [u-PA] und t-PA, α_2 -Antiplasmin [α_2 -A], Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 [PAI-1]) wurden mittels selbst etablierter und evaluierter ELISA-Verfahren bestimmt.

In allen Patientengruppen kam es zu einer hochsignifikanten Erhöhung der prokoagulatorischen Aktivität ($p < 0.001$), die in der akut inflammatorischen Gruppe am ausgeprägtesten war. Die *tissue factor* Aktivität war in allen Patientengruppen hochsignifikant erhöht. In allen Patienten Kollektiven war eine erhöhte Faktor VII Aktivität zu beobachten, signifikant bei ARDS, ARDS+PNEU, beatmete PNEU ($p < 0,01$) und nicht beatmete PNEU sowie IPF ($p < 0.05$). Die FP-A Spiegel waren unter akut inflammatorischen Bedingungen ebenfalls signifikant erhöht ($p < 0.05$ für ARDS und ARDS+PNEU, $p < 0.01$ für beatmete und spontan atmende PNEU Patienten). Bei Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen waren die FP-A Spiegel im Vergleich zur Kontrolle etwa doppelt so hoch, erreichten jedoch keine statistische Signifikanz.

Während die Patienten aller akut inflammatorischen Kollektive eine signifikante Reduktion der fibrinolytischen Aktivität zeigten (ARDS+PNEU > ARDS bzw. beatmete PNEU > spontan atmende PNEU), war diese in der Gruppe der chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen nur bei IPF-Patienten zu verzeichnen.

Unter den Plasminogen-Aktivatoren wurde ein deutlicher Abfall der Urokinase in den Gruppen IPF, SARK, ARDS+PNEU und beatmete PNEU sowie ein mäßiger Abfall in den Gruppen spontan atmende PNEU, ARDS und EAA beobachtet. Dagegen fanden sich bei keiner der untersuchten Patientenkollektive signifikante Veränderungen des Gehaltes an t-PA. Bei den antifibrinolytischen Faktoren wurde eine ausgeprägte Erhöhung des α_2 -AP-Spiegels in allen Patientengruppen ($p < 0.001$ außer bei IPF ; $p < 0.01$) gemessen. Ein erheblicher Anstieg des PAI-1-Spiegels wurde ebenfalls bei ARDS-, ARDS+PNEU- und beatmeten PNEU-Patienten beobachtet. Im Gegensatz dazu war PAI-1 bei der chronisch interstitiellen Gruppe geringfügig vermindert.

Trotz einer z.T. erheblichen Beeinträchtigung der fibrinolytischen Aktivität wurden markant erhöhte D-Dimer Spiegel in allen Patientengruppen, vorallem aber bei Patienten mit ARDS oder ARDS+PNEU, gefunden, was einen erhöhten Fibrin Umsatz in diesen Gruppen nahegelegt. Bei Patienten mit IPF korrelierte interessanterweise der D-Dimer Gehalt invers mit der pulmonalen Compliance.

Um den möglicherweise pathophysiologisch relevanten Einfluss eines Plasmaprotein-Leakage an Hämostaseveränderungen und Fibrinablagerung genauer charakterisieren zu können, wurden bei allen Kollektiven der Gesamt-Proteingehalt gemessen. Alle Patienten der akut inflammatorischen Kollektiven zeigten einen um Faktor vier bis zehn hochsignifikant erhöhten Proteingehalt in der BAL (ARDS > ARDS+PNEU > beatmete PNEU > spontan atmende PNEU). Bei den chronisch interstitiellen Kollektiven kam es ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme des Proteingehaltes, etwa 2-fach erhöht bei SARK, etwa 3-fach erhöht bei IPF und EAA).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine ausgesprochene Verschiebung des hämostaseologischen Gleichgewichts bei allen akut inflammatorischen Lungenerkrankungen zugunsten einer massiv gesteigerten Gerinnung bei gleichzeitiger Suppression der fibrinolytischen Kapazität. In der Konsequenz war ein erheblich erhöhter alveolärer Umsatz an Fibrin zu beobachten. In etwas abgeschwächtem Umfang war dieses Spektrum an Gerinnungsveränderungen auch bei Patienten mit idiopatischer pulmonaler Fibrose, Sarkoidose und Exogen allergischer Alveolitis nachweisbar. Vor dem Hintergrund der Surfactant-inhibitorischen Kapazität alveolär gebildeten Fibrins und der möglichen Induktion fibrotischer Umbauprozesse durch Komponenten des Gerinnungssystems unterstreichen diese Ergebnisse somit die pathophysiologische Bedeutung des alveolären Gerinnungssystem im Rahmen akut inflammatorischer oder chronisch interstitieller Lungenerkrankungen.

Die hier gezeigten alveolären Gerinnungsveränderungen in der Pathogenese fibrosierender Lungenerkrankungen bilden die Grundlage möglicher antikoagulatorischer bzw. fibrinolytischer Therapieansätze. Für eine Realisierung solcher Therapien sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig.

VIII. Summary

Intraalveolar fibrin deposition is a hallmark of both acute inflammatory and chronic interstitial lung disease. Changes in the alveolar hemostatic balance in favour of an increased procoagulatory and antifibrinolytic activity has been observed by many authors and contribute to the formation and persistence of fibrin in the alveolar compartment.

Against this background, the procoagulant activity and the fibrinolytic capacities in bronchoalveolar lavage fluids (BAL) of patients with acute inflammatory and chronic interstitial lung disease were characterized in this thesis in comparison with healthy controls. The study included patients with the diagnoses acute respiratory distress syndrome (ARDS), severe pneumonia (PNEU), patients with ARDS and pneumonia (ARDS+PNEU), pneumonia demanding mechanical ventilation (PNEU-vent), spontaneously breathing patients with pneumonia (PNEU-spon) in the acute inflammatory group, and patients with sarcoidosis (SARC), idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and hypersensitivity pneumonitis (HP) in the group of interstitial lung diseases.

The methodological spectrum of this work comprised immunological, clinical-chemical and biochemical procedures. Measuring the recalcification time was used to determine the total procoagulant activity and –employing FVII-deficient plasma or tissue factor inhibiting antibodies- to determine FVII and tissue factor activity, respectively. The determination of fibrinogen and D-dimer was performed with commercially available ELISAs. For determination of the fibrinolytic activity, the fibrin plate assay (release of ¹²⁵I-labeled fibrin after incubation with BAL-aliquots) was used. Pro and antifibrinolytic factors (urokinase-type plasminogen activator [u-PA] and tissue-type plasminogen activator [t-PA], α_2 -antiplasmin [α_2 -AP], plasminogen activator inhibitor-1 [PAI-1]) were established and validated during fulfillment of this thesis.

In all patient groups a significantly enhanced procoagulant activity ($p < 0.001$) was found that was most prominent in the acute inflammatory group. Increase in tissue factor activity was significant throughout all groups and in all patients populations an increased factor VII activity could be observed being significantly elevated in ARDS, ARDS+PNEU, PNEU-vent ($p < 0.01$) and PNEU-spon and IPF ($p < 0.05$). Similarly, the FP-A levels were significantly increased in patients with acute inflammatory lung ($p < 0.05$ for ARDS and ARDS+PNEU, $p < 0.01$ for patients with PNEU-vent and PNEU-spon). In patients with interstitial lung diseases, FP-A levels were almost doubled in comparison to controls but did not reach statistical significance.

While all patients with acute inflammatory disease showed a significant reduction of the fibrinolytic activity (ARDS+PNEU > ARDS or PNEU-vent > PNEU-spon), this was only true

for patients with IPF in the group of chronic interstitial lung disease. Among the plasminogen activators a significant drop in u-PA was encountered in the groups IPF, SARK, ARDS + PNEU and PNEU-vent, and a moderate drop in the groups spontaneously breathing PNEU, ARDS and HP. On the other hand, in none of the patients populations studied changes in t-PA level were found. Among the antifibrinolytic factors a pronounced increase in the α_2 -antiplasmin-levels in all patient groups ($p < 0,001$ except for IPF, $p < 0.01$) was encountered. A significant increase in PAI-1 levels was also found for ARDS and ARDS + PNEU and PNEU-vent patients. In contrast, patients with chronic interstitial lung disease showed slightly reduced PAI-1 levels.

Despite of a pronounced impairment of fibrinolytic activity markedly elevated D-dimer levels were studied in all patient groups, especially in patients with ARDS and ARDS+PNEU, indicating an increased fibrin turnover in these patients. Interestingly, in IPF patients the D-dimer content was inversely correlated with the pulmonary compliance.

To evaluate the potentially relevant contribution of plasma protein leakage to changes in regulation of alveolar hemostasis we measured the total protein content in lavage samples. All patients in the acute inflammatory population showed BALF protein levels that were elevated by a factor of four to ten (ARDS > ARDS+PNEU > PNEU-vent > PNEU-pon). In the chronic interstitial groups there was also a significant increase in protein content, with a ~ 2-fold increase in SARC, and a ~ 3-fold increase in IPF and EAA.

The results of this work showed a pronounced shift in the alveolar hemostatic balance for all acute inflammatory lung diseases in favour of a massively increased procoagulatory activity and depressed fibrinolytic capacity. As a consequence fibrin turnover in the alveolar compartment was increased. A similar pattern of changes, but to a lesser extent, were observed in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis. Against the background of surfactant-inhibitory capacity alveolar fibrin and the possible induction of fibrotic remodelling processes through hemostatic components, these results further support the pathophysiological significance of the alveolar hemostatic balance under acute inflammatory and chronic interstitial interstitial lung disease.

The changes in alveolar hemostatic regulation shown herein may warrant the development of new therapeutic approaches such as anticoagulant or fibrinolytic treatment regimens. However, further investigations are needed until these approaches can be realized.

IX. Literaturverzeichnis

1. A. Voller, D. E. Bidwell, A. Bartlett: The enzyme-linked immunoassay (ELISA). A Guide with abstracts of microplate applications. Borough House; Dynatech Europe (1979)
2. B. Nakstad, T. Lyberg, O. H. Skjonsberg, N. Boye: Local activation of the coagulation and fibrinolysis systems in lung disease: *Thrombosis Research*. 1990: 827-38
3. B. Nakstad, N. P. Boye, T. Lyberg: Procoagulant activities in human alveolar macrophages; *EUROPEAN JOURNAL OF RESPIRATORY DISEASES* (1987): 459 -71
4. Bjoern Wiman und Anders Hamsten: The Fibrinolytic Enzyme System and its Role in the Etiology of Thromboembolic Disease; *Thrombosis and Hemostasis* (1990) Nr. 16: 207-216
5. Burkhardt A.: Alveolitis and collapse in the pathogenesis of pulmonary fibrosis; *Am Rev Respir Dis*. 1989 Aug; 140(2): 513-24
6. C. V. Dang, W. R. Bell, M. Shuman: The normal and morbid biology of fibrinogen; *THE AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE* 87(1989): 567-576
7. D. Walmrath, F. Grimminger, N. Suttrop, W. Seeger: Perspektiven in der Behandlung des Akuten Respiratorischen Distress-Syndrom (ARDS); *DIE MEDIZINISCHE WELT* 46 (1995): 414-421
8. De Benedetti, E. L. Nicod, G. Reber, C. Vifian and P. de Moerloose: Procoagulant and fibrinolytic activities in bronchoalveolar fluid of HIV-negative patient: *New England Journal of Medicine*. 1992: 411-17
9. E. Baatz, B. Elledge und J. A. Whitsett: Surfactant protein SP-B induces ordering at the surface of model membrane bilayers – *Biochemistry* (1990) Nr. 29: 6714-2
10. F. Krueck: *Pathophysiologie*. Urban & Schwarzenberg
11. G. Hallermayer, W. Neupert: Lipid composition of mitochondrial outer and inner membranes of *Neurospora crassa* Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 355 (1974): 279-288
12. G. L. Peterson: Review of the folin phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall *Anal. Biochem.* 100 (1979): 201-220
13. G. R. Bartlett: Phosphorus assay in column chromatography *J. Biol. Chem.* 234 (1959): 466-468
14. G. Rouser, S. Fleischer; A. Yamamoto: Two-dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots *Lipids* 5 (1970): 494-496

15. Günther A, Kalinowski M, Elssner A, Seeger W: Clot-embedded natural surfactant: kinetics of fibrinolysis and surface activity; *Am J Physiol*. 1994 Nov; 267(5Pt 1): L618-24
16. Günther A, Kalinowski M, Rosseau S, Seeger W: Surfactant incorporation markedly mechanical properties of a fibrin clot. *Am J Respir Cell Mol Boil*. 1995 Dec; 13(6): 713-8
17. Günther A, Schmidt R, Nix F, Yabut-Perez M, Guth C, Rosseau S, Siebert C, Grimminger F, Morr H, Velcovsky HG, Seeger W: Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis; *Eur Respir J*. 1999 Sep; 14(3):565-73
18. Günther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, Temmesfeld B, Walmrath D, Morr H, Seeger W: Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema; *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Jan; 153(1): 176-84
19. H. A. Chapman, C. L. Allen, L. Stone: Abnormalities in pathway of fibrin turnover among patients with interstitial lung disease; *American Review of Respiratory Diseases*; 1986: 437-43
20. H. A. Chapman, M. Stahl, C. L. Allen, R. Yee: D. S. Fair: Regulation of the procoagulant activity within the bronchoalveolar compartment of normal human lung; *AMERICAN REVIEW OF RESPIRATORY DISEASE* 137 (1988): 1417-25
21. H. A. Chapman, P. Bertozzi, L. Z. Sailor, A. R. Nusrat: Alveolar macrophage urokinase receptors localize enzyme activity to the cell surface; *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* 259 (1990): L432-8
22. H. A. Chapman; J. J. Reilly; L. Kobzik: Role of plasminogen activator in degradation of extracellular matrix protein by live human alveolar macrophages; *AMERICAN REVIEW OF RESPIRATORY DISEASES* 137 (1988): 412-9
23. H. A. Chapman, C. L. Allen and O. L. Stone: Human alveolar macrophages synthesize factor VII in vitro. Possible role in interstitial lung disease; *Journal of Clinical Investigation*. 1985: 2030-37
24. H. A. Chapman, X. Yang, L. Z. Sailor and D. J. Sugarbaker: Developmental expression of plasminogen activator inhibitor type I by human alveolar macrophages; *Journal of Immunology* (1990): 3398-3405
25. H. Spencer: *Pathology of the lung*. Philadelphia: W. B. Sanders (1977)
26. J. D. Hasday, P. R. Bachwich, J. P. Lynch, R. G. Sitrin: Procoagulant and plasminogen activator activities of bronchoalveolar fluid in patients with pulmonary sarcoidosis; *Experimental Lung Research*. 1988: 261-88

27. J. P. Wiener-Kronish, M. A. Gropper, M. A. Matthay: The adult respiratory distress syndrome: Definition and prognosis, pathogenesis and treatment; *BRITISH JOURNAL OF ANAESTHESIA* 65 (1990): 107-29
28. J. Villar, A. S. Slutsky: The incidence of the adult respiratory distress syndrome; *AMERICAN REVIEW OF RESPIRATORY DISEASES* 140 (1989): 814-16
29. Jansson, L. Loven, L. Rammer, S., Lennquist: Pulmonary trapping of platelets and fibrin after musculoskeletal trauma: an experimental model. *JOURNAL OF TRAUMA* 25 (1985): 288-98
30. K. Wiechelmann, R. Braun, J. Fitzpatrick: Investigation of the Bicinchoninic Acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation; *Anal. Biochem.* 175 (1988): 231-237
31. K.M. Yamanda, Adhesive reconition sequence: *The Journal of Biological Chemistry.* 1991: 12809-12
32. Kotani I., A. Sato, H. Hayakaya, T. Urano. Y. Takada, A. Takada: Increased procoagulant and antifibrinolytic activities in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis; *THROMBOSIS RESEARCH* (1995):493-504
33. L. K. Jackson: Idiopathic pulmonary fibrosis; *CLINICAL CHEST MEDICINE* 3 (1982): 579-92
34. Lance A. Parton, D. Harburton and Halter E. Lang: Plasminogen activator inhibitor typ I production by rat type II pneumocytes in culture; *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 1992: 133-39
35. Laszlo Lorand; Kenneth G. Mann: *Proteolytic enzymes in coagulation, fibrinolysis, and complement activation.* INC.: ACADEMIC PRESS (1993)
36. Lecander I, and Astedt B: Isolation of a new specific plasminogen activator inhibitor from pregnancy plasma - *British Journal of Haematology* (1986) Nr. 62: 221-228
37. M. Bachofen, E. F. Weibel: Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome; *CLINICAL CHEST MEDICINE* 3 (1982): 35-56
38. M. Hallman, P. Maasilta, L. Kivisaari, K. Mattson: Changes in surfactant in bronchoalveolar lavage fluid after hemithorax irradiation in patients with mesothelioma; *AMERICAN REVIEW OF RESPIRATORY DISEASE* 141 (1990): 998-1005
39. M. P. McGee, H. Rothberger: Assembly of the prothrombin activator complex on rabbit alveolar macrophage high-affinity factor Xa receptors: *J. Exp. Med.* 1986: 1902-14
40. M. P. McGee, H. Rothberger: Initiation of the extrinsic pathway of coagulation by human and rabbit alveolar macrophages: a kinetic study: *Blood.* 1989: 1583-90

41. M. P. McGee, H. Rothberger: Tissue factor in bronchoalveolar lavage fluids. Evidence for an alveolar macrophage source: *American Review of Respiratory Disease*. 1985: 331-6
42. M. Reinke; M. Piller; K. Brune: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay of thromboxane b2 using a monoclonal antibody; *Prostaglandins* 37 (1989): 577-586
43. Mark E. J.: Alveolar disease. In: *Lung biopsy interpretation*. Baltimore: Williams and Wilkins. Co. (edition 1084): 103-112
44. Markart, Ruppert C, Quanz K, Ermert L, grimminger F, Seeger W: Prevention of bleomycin-induced lung fibrosis by aerosolization of heparin or urokinase in rabbits; *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Dec 1; 168 (11): 1358-65
45. Marschall S. Runge, Thomas Quertermous, Edgar Haber: Plasminogen activators; *CIRCULATION* 79 (1989): 217-225
46. Michael Mayer: Biochemical and biological Aspects of the plasminogen activation system; *CLINICAL BIOCHEMISTRY* 23 (1990) Nr. 23: 197-211
47. Michael W. Mosesson: Fibrin polymerization and its regulatory role in hemostasis
48. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* 193 (1951): 265-275
49. Olman, M. A., N. Mackman, C. L. Gladson, K. M. Moser and D. J. Loskutoff: Change in procoagulant and fibrinolytic gene expression during bleomycin-induced lung injury in the mouse; *Journal of Clinical Investigation*. 1995: 1621-30
50. P. Bertozzi, B. Astedt, L. Zenzius, K. Lynch, F. LeMaire, H. Zapol: Depressed bronchoalveolar urokinase activity in patients with adult respiratory distress syndrome: *New England Journal of Medicine*. 1990: 890-7
51. P. de Moerloose, E. De Benedetti, L. Nicod, C. Vifian: Procoagulant activity in bronchoalveolar fluids: no relationship with tissue factor pathway inhibitor activity; *Thrombosis Research*. 1992: 507-518
52. P. Pratt: *The lung structure, function, and disease*; Baltimore: Williams and Wilkins (1977)
53. R. Wintersteiger, G. Wenninger-Weinzierl: Neues, empfindliches Verfahren zur dünn-schicht-chromatographischen Analyse von Substanzen mit alkoholischer Hydroxylgruppe durch Reaktion mit Naphthylisocyanat; *Fresenius Z. Anal. Chem.* 309 (1981): 201-208
54. R.G. Sitrin, M.J. Ansfield, H. B. Kaltreider: The effect of pulmonary surface-active material on the generation and expression of murine B- and T-lymphocyte; *Experimental Lung Research*. 1985: 85-97

-
55. S. Aota, T. Nagai, K. Olden, S. K. Akiyama und K. M. Yamanda: Fibronectin and integrins in cell adhesion and migration; *Biochemical Society Transactions* (1991) Nr. 19: 830-5
 56. S. Idell, C. Zwieb, J. Boggaram, D. Holiday, A. R. Johnson, G. Raghu: Mechanisms of fibrin formation and lysis by human lung fibroblasts: influence of TGF- β and TNF; *American Journal of Physiology* 263 (1992): L487-L494
 57. S. Idell, J. G. Garcia, K. Gonzalez, J. McLarty, D. S. Fair: Fibrinopeptide A reactive peptides and procoagulant activity in bronchoalveolar lavage: relationship to rheumatoid lung; *Journal of Rheumatology*. 1989: 592-98
 58. S. Idell, K. B. Koenig, D. S. Fair, T. R. Martin, J. McLarty, R. J. Maunder: Serial abnormalities of fibrin turnover in evolving adult respiratory distress syndrome; *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* 261 (1991): L240-8
 59. S. Idell, K. K. James, E.G. Levin, B. S. Schwarz, N. Manchanda, R. J. Maunder: Local abnormalities in coagulation and fibrinolytic pathways predispose to alveolar fibrin deposition in the adult respiratory distress syndrome; *Journal of Clinical Investigation*. 1989: 695-705
 60. S. Idell, B. T. Peterson, K. K. Gonzalez, L. D. Gray, R. Bach, J. McLarty, D. S. Fair: Local abnormalities of coagulation and fibrinolysis and alveolar fibrin deposition in sheep with oleic acid-induced lung injury; *AMERICAN REVIEW OF RESPIRATORY DISEASE* 138 (1988): 1282-94
 61. S. Idell, J. Peters, K. K. James, D. S. Fair, J. J. Coalson: Local abnormalities of coagulation and fibrinolytic pathways that promote alveolar fibrin deposition in the lungs of baboons with diffuse alveolar damage. *JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* 84 (1989): 181-93
 62. S. Idell, K. Gonzalez, H. Bradford, C. K. MacArthur, A. M. Fein, R. J. Maunder, J. G.; Garcia, D. E. Griffith, J. Weiland, T. R. Martin: Procoagulant activity in bronchoalveolar lavage in the adult respiratory distress syndrome. Contribution of tissue factor associated with factor VII. *AMERICAN REVIEW OF RESPIRATORY DISEASE* 136 (1987): 1466-74
 63. S. Idell, K. K. James, C. Gillies, D. S. Fair, R. S. Thrall: Abnormalities of pathways of fibrin turnover in lung lavage of rats with oleic acid and bleomycin-induced lung injury support alveolar fibrin deposition. *AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY* 135 (1989): 387-99
 64. Schermuly RT, Gunther A, Ermert m, Ermert L, Chofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Walmarath D: Conebulization of surfactant and urokinase restores gas exchange in perfused lungs with alveolar fibrin formation; *Am J physiol Lung Cell Mol Physiol*; 2001 Apr; 280(4): L792-800
 65. Schmidt R, Meier U, Yabut-Perez M, Walmarath D, Grimminger F, Seeger W: Alteration of fatty acid profiles in different pulmonary surfactant phospholipids in acute respiratory distress syndrome and severe pneumonia; *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jan; 163(1): 95-100

-
66. Sprengers E. D, Kluft C.: Plasminogen activator inhibitors BLOOD 69 (1993): 381-387
 67. T. J. Gross, R. H. Simon, C. J. Kelly and R. G. Sitrin: Rat alveolar epithelial cells concomitantly express plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase; American Journal of Physiology. 1991: 286-95
 68. T. J. Gross, R. H. Simone: Tissue factor procoagulant expression by rat alveolar epithelial cells; American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 1990: 397-403
 - 68a. T. J. Gross, R. H. Simon, J. A. Edwards and R. G. Sitrin: Fibrin degradation by rat pulmonary alveolar epithelial cells; AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY (1992):482-488
 69. Takada A., T. Urano, Y. Takada: The regulation of the activation of the Fibrinolysis system 431-436
 70. Troben Halkier: Mechanisms in blood coagulation fibrinolysis and the complement system; Cambridge University Press (1991): 35-49, 80-102, 131-146
 71. W. Seeger, Elssner A, Günther A, Kramer HJ, Kalinowski HO: Lung surfactant phospholipids associate with polymerizing fibrin: Loss of surface activity; Am J Respir Cell Mol Biol. 1993 Aug; 9(2): 213-20
 72. W. Seeger: Behandlung des ARDS - Gesicherte Konzepte und therapeutische Perspektiven; INTENSIVMEDIZIN 29 (1992): 201-18
 73. W. Seeger, H.- G. Lasch: Septic Lung; REVIEWS OF INFECTIOUS DISEASES 9 (1987): 570-79
 74. W. Seeger, D. Walmrath, F. Grimminger: Eicosanoide und akute respiratorische Insuffizienz - Neue therapeutische Konzepte?. In J. Schüttler; H. Schwilden; P. M. Lauven (Eds.) "Klinische Pharmakologie and rationelle Arzneimitteltherapie" Georg Thieme Verlag Stuttgart (1992)
 75. W. Seeger, J. Hübel, K. Klapettek, U. Pison, U. Obertacke, T. Joka, L. Rok: Procoagulant activity in bronchoalveolar lavage of severely traumatized patients - relation to the development of acute respiratory distress; THROMBOSIS RESEARCH (1991): 45-52
 76. W. Seeger, H. Neuhof: Alveoläre Surfactant-Funktion und Gerinnung HÄMOSTASEOLOGIE (1985): 108-115

X. Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Seeger für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Überlassung des Themas und die Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Andreas Günther danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit und für seine Unterstützung bei allen im Verlauf der Arbeit auftretenden Problemen. Ich bewundere ihn für seine Energie und Optimismus.

Bei Herrn Dr. Clemens Ruppert möchte ich mich sehr herzlich für seine Hilfsbereitschaft, Geduld, Gelassenheit und für die zahlreichen Tipps und Anregungen danken.

Dankbar anerkennen möchte ich Frau Sabine Heinemann für die Unterstützung bei der Bewältigung labortechnischer Aufgaben.

Der gesamte Arbeitsgruppe „Respiratorische Insuffizienz“ möchte ich für die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Mutter, die in mir das Interesse an wissenschaftlichen Arbeiten erweckt hat.

XI. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name : Mosavi
 Vorname : Parvin
 Anschrift : Karolinger Straße 28
 65779 Kelkheim
 Tel. 06195/7257761
 eMail:p.mosavi@marandy.net
 Geburtsdatum : 02.04.1962
 Geburtsort : Iran - Maschhad
 Familienstand /Kinder : Verheiratet/ zwei Kinder
 Staatsangehörigkeit : Deutsch

Schulbildung

09.68 - 06-73	Grundschule in Maschhad
09.73 - 06.76	Orientierungsschule in Maschhad
09.76 - 06.80	Oberschule/ Abitur

Ausbildung

06.82 - 07.84	Vorbereitung für die Aufnahmeprüfung an der iranischen Universität.
07.84 - 07.85	Studium im Fachbereich Anglistik an der Freien Universität Iran.
08.85 - 01.86	Ausreise nach Deutschland und Vorbereitung für die Aufnahme - Prüfung des Studienkollegs
01.86 - 01.87	Studienkolleg mit Abschluß
04.87 - 10.93	Studium der Humanmedizin an der JLU-Giessen

AiP

01.01.94 – 30. 06. 95	Im Fach Chirurgie im Friedrich-Zimmer Krankenhaus Herborn
-----------------------	---

Wissenschaftliche Arbeit

01.05.95 – 30.09. 97	Doktorarbeit in der klinischen Forschergruppe Respiratorische Insuffizienz“ bei Herrn Prof. Dr. Seeger Leiter der Medizinischen Klinik II, Gießen
----------------------	---

Ass.Ärztin

01.05.96 - 31.03. 97	Im Fach Orthopädie in der Rhenanus-Klinik Bad Sooden-Allendorf
17.12.97 - 15.12.99	Im Fach Orthopädie in der Heinrich-Mann-Klinik Bad Liebenstein
01.09.00 - 30.11.00	Im Fach Orthopädie in der Kaiserberg-Klinik Bad Nauheim
01.01.01 - 01.05.07	Im Fachbereich Innere Medizin in der Helios Klinik Idstein
01.05.07 - heute	Im Allgemeinarztpraxis Dr. Doll, Eppstein

Mutterschutz/	07.07.99 – 18.10.99
Erziehungsurlaub	27.11.99 – 12.05.00
	08.06.03 – 22.09.04