

Veränderungen des alveolären antioxidativen
Status im Tiermodell und bei Patienten mit
akut inflammatorischen und chronisch
interstitiellen Krankheitsbildern

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Thomas Luboeinski
aus Siegen

Gießen 2008

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

Gutachter: Prof. Dr. A. Günther

Gutachter: Prof. Dr. H. Sauer

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. G. Alzen

Prüfungsmittglied: Prof. Dr. B. Lorenz

Tag der Disputation: 16.07.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Das alveoläre Kompartiment.....	8
1.1.1	Morphologie des alveolären Kompartiments	8
1.1.2	Der pulmonale Surfactant.....	9
1.2	Die Redoxbalance im alveolären Kompartiment	10
1.2.1	Oxidantien	10
1.2.2	Antioxidantien.....	15
1.2.3	Oxidative Abbauprodukte	20
1.2.4	Normwerte antioxidativer Substanzen im Alveolarraum.....	21
1.2.5	Pathophysiologische Konsequenzen einer gestörten Redox-Balance im alveolären Kompartiment	24
1.2.6	Therapie mit Antioxidantien	27
2	Fragestellung	29
3	Materialien und Methoden	31
3.1	Materialien	31
3.1.1	Chemikalien	31
3.1.2	Geräte	33
3.2	Methoden.....	34
3.2.1	Bronchoalveoläre Lavage	34
3.2.2	Lipidextraktion nach Bligh und Dyer.....	35
3.2.3	Colorimetrische Phosphatbestimmung zur quantitativen Bestimmung des Phospholipidgehaltes.....	35
3.2.4	Quantitative Proteinbestimmung.....	36

3.2.5	Gaschromatographische Analyse der Gesamtlipid-Fettsäuren und der Plasmalogene.....	36
3.2.6	Messung des reduzierten und oxidierten Glutathions	40
3.2.7	Quantifizierung von Retinol und α -Tocopherol.....	44
3.2.8	Quantifizierung von Ascorbinsäure und Harnsäure	46
3.2.9	Quantifizierung von Malondialdehyd.....	47
3.2.10	Quantifizierung von 8-Isoprostanen	49
3.3	Definition der Patientenkollektive	51
3.3.1	Patientenpopulation	51
3.4	Beschreibung der Tiermodelle	53
3.4.1	Bleomycin-Modell am Kaninchen	53
4	Ergebnisse	55
4.1	Validierung der Methoden.....	55
4.1.1	Validierung der Glutathion-Messung.....	55
4.1.2	Validierung der α -Tocopherol- / Retinol-Messung.....	58
4.1.3	Validierung der Ascorbinsäure- / Harnsäure-Messung	62
4.1.4	Validierung der Malondialdehyd-Messung	66
4.1.5	Validierung 8-Isoprostan-Messung	67
4.2	Messergebnisse Tiermodelle	70
4.2.1	Bleomycin-Modell.....	70
4.3	Messergebnisse Humanlavagen.....	78
4.3.1	Akut-inflammatorische Lungenerkrankungen.....	78
4.3.2	ARDS und Pneumonie: Initiale Lavage	78
4.3.3	Repetitive Lavagen ARDS und Pneumonie	87
4.3.4	Pneumocystis Jirovecii Pneumonie (PCP)	98

4.3.5	Chronisch-interstitielle Lungenerkrankungen	107
5	Diskussion	116
5.1	Messmethodik	116
5.2	Bleomycin-Modell.....	117
5.3	Humane Studien	118
5.3.1	Akut-Inflammatorische Lungenerkrankungen.....	118
5.3.2	Chronisch-interstitielle Lungenerkrankungen	120
5.4	Allgemeine Diskussion	121
6	Zusammenfassung	126
7	Summary	127
8	Abkürzungen	128
9	Literatur	130
10	Danksagung	145
11	Lebenslauf	146

1 Einleitung

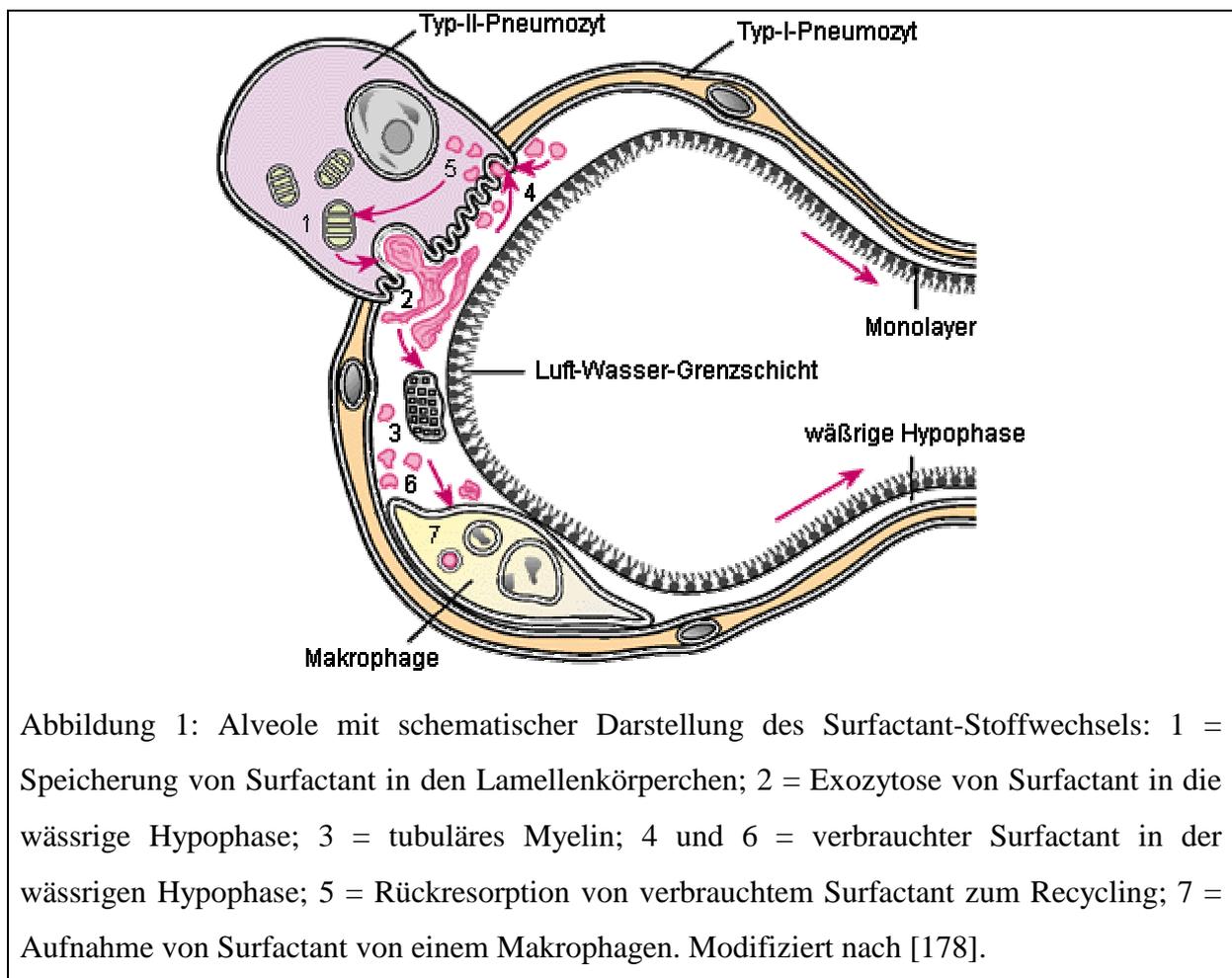
Mit einer Gesamtoberfläche von über 100 m² stellt die Lunge des Menschen das Organ mit der größten Oberfläche dar. Der größte Teil dieser Fläche findet sich im alveolären Kompartiment, also jenem Raum, der auch für die Funktion der Lunge, d.h. den Gasaustausch, verantwortlich ist. Pionierarbeiten des schwedischen Forschers Kurt von Neergard [1] im Jahre 1929 lieferten erstmals Hinweise auf einen Zusammenhang der alveolären Oberflächenspannung mit den Retraktionskräften der Lunge und der dortigen Gültigkeit des Laplace'schen Gesetzes $\Delta p = 2 \gamma / r$ [2]. Konsequenterweise wurde, allerdings erst etwa drei Jahrzehnte später, von Clements [3] und Pattle [4] der pulmonale Surfactant (eine Wortkonstruktion aus „*Surface-active-agent*“), identifiziert und charakterisiert. Dieses oberflächenaktive Lipoproteingemisch senkt die Oberflächenspannung in der Alveole vor allem während der Endexpiration, verhindert dadurch Atelektasen und ermöglicht so einen funktionierenden Gasaustausch [5].

Das alveoläre Kompartiment ist permanent Oxidantien aus der Atemluft oder aus zellulären Quellen ausgesetzt [6]. Unter physiologischen Bedingungen liegt hier ein Gleichgewicht aus Oxidantien und einer Vielzahl von Antioxidantien vor, das einen ausreichenden Schutz des Lungenepithels vor oxidativer Schädigung gewährleistet [7]. Dieses Gleichgewicht kann bei einer Reihe von pathophysiologischen Ereignissen, aber auch durch exogene Einflüsse wie einer hohen Schadstoffbelastung der Atemluft, gestört sein und unter anderem zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität, einer Hemmung der Funktion und der Homöostase des Surfactantsystems und somit zu Einschränkungen im Gasaustausch und der Compliance der Lunge führen [8].

1.1 Das alveoläre Kompartiment

1.1.1 Morphologie des alveolären Kompartiments

Die Alveolen sind von Alveolarepithel Typ-I- und Typ-II-Zellen ausgekleidet [9]. Die Epithelzellen vom Typ-I bedecken über 90 % der Oberfläche, besitzen jedoch nur geringe metabolische Aktivität. Aufgrund ihrer geringen Zelldicke weisen sie nur einen geringen Widerstand für die Diffusion zwischen Kapillare und Lungenbläschen auf. Die Typ-II-Zelle, auch Pneumozyt genannt, bedeckt zwar nur ca. 7 % der Alveolarfläche, stellt aber zahlenmäßig mit etwa 70 % die größte Fraktion aller Alveolarepithelzellen dar. Die Pneumozyten sind nicht nur Syntheseort des pulmonalen Surfactant, sie nehmen auch den Surfactant wieder auf und verwerten ihn wieder.



Neben zahlreichem endoplasmatischem Retikulum, vielen Mitochondrien, Golgi-Vesikeln und Ribosomen, die auf einen aktiven Metabolismus hinweisen, besitzen diese Zellen in ihrem Zytoplasma sogenannte Lamellarkörperchen (*lamellar bodies*). In diesen wird

Surfactant gespeichert und steht dort ständig zur Sekretion bereit. Durch Exocytose werden die Lamellarkörperchen in die Hypophase (*epithelial lining fluid*, ELF) des Alveolarraums freigesetzt und dort zu sogenannten tubulärem Myelin umgewandelt. Dieses besitzt eine dreidimensionale, gitterartige Struktur und ist der direkte Vorläufer des oberflächenaktiven Grenzflächenfilms, der die Grenze zum Gasraum bildet. Die Regulation des Surfactantpools im Alveolarraum geschieht hauptsächlich durch tiefe Inspiration (*Stretch*) [10], die die Sekretion fördert, sowie durch die beiden Kollektine SP-A und SP-D [11, 178, 183]. Der physiologische *Turnover* der Surfactantlipide beträgt etwa 10 Stunden [10].

1.1.2 Der pulmonale Surfactant

Biochemische Zusammensetzung des Surfactant

Der pulmonale Surfactant besteht zu etwa 90 % aus Phospholipiden und zu 10 % aus Proteinen [12, 13]. Die Phospholipidfraktion zeigt ein sehr charakteristisches Profil mit etwa 80 % Phosphatidylcholin (davon liegt etwa 50% in der dipalmitoylierten Form vor) und etwa 10 % Phosphatidylglycerol [14, 15]. Weitere, in Spuren beim Menschen vorkommende Phospholipidklassen sind Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin und Sphingomyelin [5].

Für den Proteinanteil des Surfactant sind primär die vier Surfactant-spezifischen Proteine von Bedeutung [16, 17]. Nach der Nomenklatur von Possmayer [18] werden sie Surfactant-Proteine- (SP-) A, -B, -C und -D genannt. Diese wiederum lassen sich je nach ihrer Wasserlöslichkeit in zwei weitere Gruppen einteilen: Die beiden eher kleinen, hydrophoben SP-B und SP-C sowie die höhermolekularen, hydrophilen SP-A und SP-D.

Funktion des Surfactant

Die Funktionen des Surfactant, soweit bisher bekannt, lassen sich in zwei Gruppen unterteilen [16], nämlich in seine biophysikalischen und seine immunologisch/immun-modulierenden Eigenschaften. Zur ersten Gruppe gehört die Prävention eines Kollapses der Alveolen und der Lunge während der Expiration durch Senkung der Oberflächenspannung, die Unterstützung der inspiratorischen Lungenöffnung sowie die Verhinderung eines Lungenödems durch Balance der hydrostatischen Filtrationskräfte. Hierbei spielen der Phospholipidanteil und die hydrophoben Surfactant-Proteine SP-B und SP-C eine herausragende Rolle [19, 20]. Außerdem werden die kleinen Luftwege stabilisiert und offen gehalten. Der Surfactant verbessert die mukoziliäre Clearance und transloziert Teilchen mit einer Größe unter 6 μm in die Hypophase des ELF, der Abtransport von Teilchen und Zelltrümmern von den Alveolen in

die größeren Luftwege wird durch Absenkung der Oberflächenspannung während der Endexpirationsphase erleichtert.

Die zweite Gruppe beschreibt die immunologisch/immun-modulierenden Eigenschaften [21, 22, 23, 24, 25]. So unterdrücken die Phospholipide die Proliferation, Immunglobulin-Produktion und Zytotoxizität von Lymphozyten. Außerdem inhibieren sie die Endotoxin-stimulierte Zytokin-Freisetzung (TNF, IL-1, IL6) von Makrophagen. SP-A und SP-D modulieren die Phagozytose, Chemotaxis und den *oxidative burst* von Makrophagen. Weiterhin opsonieren sie verschiedene Mikroorganismen zur einfacheren Phagozytose. Der Surfactant neutralisiert endogene Mediatoren wie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [26], Bakterien sowie Viren und Pilze werden durch SP-A und SP-D aggregiert, opsoniert und somit in vermehrtem Umfang phagozytiert.

1.2 Die Redoxbalance im alveolären Kompartiment

Die Lunge repräsentiert die erste physikalische Grenzfläche zwischen Umwelt und Körper. Damit ist sie, neben den endogen produzierten Noxen, ständig einer Vielzahl von Umweltgiften wie Bakterien, Viren, Allergenen und Pilzen sowie Partikeln und Gasen (Ozon, Stickstoffdioxid usw.) ausgesetzt. Die große Oberfläche der Lunge und der ständige Kontakt mit der Umwelt bedingen eine schon unter normalen Bedingungen große Schadstoffexposition. Während größere Partikel schon im Nasopharynxbereich und in den oberen Luftwegen abgefangen werden, dringen kleinere Teilchen und Moleküle bis in den Alveolarraum vor. Um die Gefahr einer Oxidation der funktionellen Bestandteile des Surfactant und der Zellen zu reduzieren, ist die alveoläre Hypophase (*epithelial lining fluid: ELF*) mit einer Vielzahl antioxidativ wirksamer Komponenten ausgestattet. Sowohl die Oxidantien als auch die Antioxidantien in biologischen Systemen sollen im folgenden kurz vorgestellt werden.

1.2.1 Oxidantien

Aerobe biologische Organismen sind von Sauerstoff abhängig. Durch ihn gewinnen sie ihre Energie. In der mitochondrialen Atmungskette findet eine Übertragung von Elektronen und Protonen statt. Sauerstoff fungiert hier als terminaler Akzeptor und wird zu Wasser reduziert. Durch diese Redoxreaktionen wird das energiereiche ATP generiert. Im Zuge dieser Elektronenübertragungen entstehen intrazellulär hochreaktive, partiell reduzierte Sauerstoffformen, die als reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species, ROS*) bezeichnet werden. Die Toxizität dieser Verbindungen wird von Organismen sogar genutzt:

Im sogenannten *respiratory burst* phagozytischer Zellen dienen die ROS der Immunabwehr. Weiterhin wird die Lunge mit einer großen Vielfalt von exogenen Oxidantien konfrontiert [27]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Quellen von Oxidantien in der Alveole.

Quellen von Oxidantien in der Alveole
Zellen des Immunsystems (aktivierte Neutrophile, Makrophagen)
Umgebung (Atemluft, O ₂ , O ₃ , NO ₂ , Tabak, Stäube, Asbest, etc.).
Endogene Oxidantien: Enzyme (Xanthin-Oxidase (XO), Xanthin-Dehydrogenase (XDH), Glucose-Oxidase, NADPH ⁻ oder NADH-Oxidoreduktasen (Cytochrom P450, NO-Synthase) sowie Arachidonsäure-metabolisierende Enzyme wie Cyclooxygenasen.
Xenobiotika (Bleomycin, Paraquat, Nitrofurantoin etc.)
Tabelle 1: Überblick der oxidativ wirksamen Komponenten in der Alveole

Radikale sind zu einer Vielzahl von Reaktionen im Organismus fähig. Sie reagieren mit Proteinen, Lipiden und der DNA. Die Reaktion von Radikalen mit Lipiden wird als Lipidperoxidation bezeichnet. Bei der Reaktion zwischen Radikalen und ungesättigten Fettsäuren laufen radikalische Kettenreaktionen ab, als Hauptprodukt entstehen Hydroperoxyradikale [28]. Diese Lipidperoxidationen verursachen strukturelle und funktionelle Veränderungen in den Lipidmembranen [29] und spielen eine Rolle bei verschiedenen degenerativen Krankheiten und bei Alterungsprozessen [30].

Radikal-Protein-Interaktionen hingegen sind verantwortlich für eine Reihe von Veränderungen wie zum Beispiel Proteinfragmentierung, *crosslinks* und Zerstörung der Tertiärstruktur, damit einhergehend einem Verlust der Funktionalität dieser Proteine [31]. Prinzipiell sind alle Aminosäuren anfällig gegen eine radikalische Modifizierung, eine herausragende Stellung nehmen allerdings die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan, die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin sowie die aliphatischen Aminosäuren Arginin, Lysin, Prolin und Histidin ein [32]. Als bedeutende Marker für Aminosäuren-Oxidation werden oft Methioninsulfoxide oder 3-Nitrotyrosine herangezogen [32], ebenso werden Proteincarbonyle als Maß für Proteinoxidation verwendet [33, 34].

Oxidativer Stress an der DNA manifestiert sich primär in Veränderungen der DNA-Basen [35, 36], wobei hier über 100 verschiedene Modifikationen bekannt sind [37]. Diese Modifikationen umfassen sowohl Purine als auch Pyridine, die quantitativ häufigste Modifikation ist die Umwandlung des Guanins. Hierbei entsteht bevorzugt 7,8-dihydro-8-oxo-Guanin (8-Hydroxyguanin, [37]). Weiterhin verursachen Radikale Schädigungen an der DNA, die DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie die Induktion von alkalilabilen Stellen, die zum Verlust der Base führen, umfassen [38].

Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$)

Durch eine Änderung der Spinrichtung eines der freien äußeren Elektronen kann Singulett-Sauerstoff entstehen. Singulett-Sauerstoff ist kein Radikal, die Restriktionen der Elektronenspins vom molekularen Sauerstoff sind allerdings aufgehoben. Damit besitzt Singulett-Sauerstoff ein stark oxidierendes Potential [39]. In biologischen Systemen können Pigmente Licht absorbieren und danach die Energie an O_2 weitergeben, welcher dadurch den höheren Energiestatus des Singulett-Sauerstoffs und somit eine höhere Reaktivität mit anderen Molekülen erreicht. Beim Rückfall in die normale Elektronenkonfiguration emittiert O_2 dann wieder ein Photon, es kommt zur Lumineszenz. Singulett-Sauerstoff spielt beispielsweise bei Porphyrie eine Rolle: In die Haut eingelagerte Pigmente können zur Singulett-Produktion führen [27]. Singulett-Sauerstoff besitzt eine Halbwertszeit von 10^{-6} Sekunden und eine Reichweite von 1-2 μm . Seine Reaktivität ist im Vergleich zum Hydroxylradikal deutlich geringer [37].

Superoxid-Radikale ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Das Superoxid-Radikal $\text{O}_2^{\cdot-}$ entsteht durch Ein-Elektronen-Transfer auf molekularen Sauerstoff, unter anderem durch Autooxidation von Hydrochinonen, Flavinen, Hämoglobin, Glutathion und anderen Thiolen sowie den Ionen von Übergangsmetallen [40]. In neutrophilen Blutzellen wird $\text{O}_2^{\cdot-}$ von dem Enzym NADPH-Oxidase generiert, welches ausschließlich extrazellulär $\text{O}_2^{\cdot-}$ freisetzt und als Teil der Immunantwort aktiviert wird. Eine andere Quelle sind physikalische Einflüsse (Gammastrahlen, u.a.). Das Radikal verhält sich wie eine schwache Base und kann durch Wasserstoffionen zur konjugaten Säure, dem Perhydroxyl HO_2^{\cdot} , protoniert werden. Durch Disproportionierung kann im folgenden Wasserstoffperoxid entstehen [41]. Diese Reaktion wird durch die Superoxiddismutase (SOD) beschleunigt.

Das Superoxid-Radikal kann sowohl reduzierend wirken, z.B. für Fe^{3+} - und Cu^{2+} -Ionen, Ferrizytochrome und Chinone, als auch als Oxidans wirken. Hierbei kommen Ascorbat und

andere Moleküle, die acidische Wasserstoff-Protonen tragen, in Frage. Als Perhydroxyl-Radikal ist es durch Entfernung des bis-allyl-Hydrogens von polyungesättigten Fettsäuren in der Lage, die Lipid-Autooxidation zu initiieren [41]. Prinzipiell ist O_2^- ein mildes Oxidans und unter physiologischen Bedingungen zum Beispiel nicht in der Lage, direkte DNA-Schäden zu induzieren [42].

Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

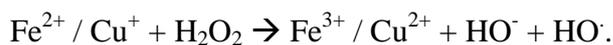
Durch Disproportionierung entsteht, wie oben erwähnt, aus Perhydroxyl-Radikalen bzw. Superoxid Wasserstoffperoxid. Diese Reaktion kann nicht nur spontan, sondern auch enzymatisch durch die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert, erfolgen. Obwohl es selbst nur mäßig reaktiv ist, besitzt es für seine oxidative Bedeutung zwei wichtige Eigenschaften [41]: Erstens ist es frei diffundabel durch biologische Membranen, zweitens ist es der Präcursor für die Bildung von potenteren Oxidantien wie Hydroxyl-Radikalen und Oxoferryl-Komplexen. Wasserstoffperoxid ist in Lösung in Abwesenheit von Übergangsmetallen relativ stabil und kann daher in Zellen größere Strecken durch Diffusion zurücklegen.

Hydroxyl-Radikale

Durch eine metallkatalysierte Reaktion (z.B. mit Fe^{3+} -Ionen) entsteht aus Wasserstoffperoxid und Superoxid-Anionen das Hydroxyl-Radikal [41] (sogenannte Haber-Weiss-Reaktion):



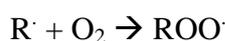
Weiterhin entsteht es bei der Fenton-Reaktion:



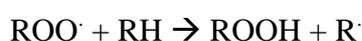
Mit einem Redoxpotential von +2,18 V ist es ein äußerst reaktives Molekül, besitzt eine außerordentlich kurze Halbwertszeit von 10^{-9} sec und ist daher für die Oxidation vieler Moleküle verantwortlich.

Peroxyl-Radikale

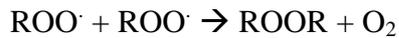
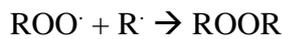
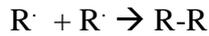
Neben den oben erwähnten Superoxid-Radikalen können durch Ein-Elektronen-Transfer auch Kohlenstoffradikale ($R\cdot$) gebildet werden. Diese wiederum können durch molekularen Sauerstoff zu Peroxyl-Radikalen reagieren [41]:



Durch ihre Fähigkeit, mit ungesättigten Fettsäuren zu reagieren, sind sie zur Lipid-Peroxidation fähig:



Die Radikale können durch Terminationsreaktion auch zu stabilen, nicht radikalischen Molekülen, umgewandelt werden:



Oxoferryl-Komplex

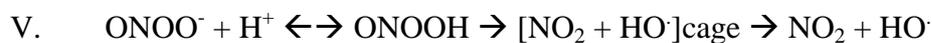
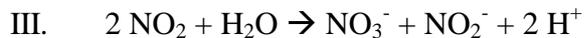
Durch Reaktion von Methämoglobin oder Metmyoglobin mit Wasserstoffperoxid kann sich der Oxoferryl-Komplex $Fe^{4+}=O$ bilden. Dieser sehr reaktive Komplex spielt eine bedeutende Rolle bei der Initiation der Lipidperoxidation, kann aber auch mit anderen Molekülen reagieren.

Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid besitzt die Funktion eines Vasodilatators und wird daher auch EDRF (*endothel derived relaxing factor*) genannt. Es besitzt eine Halbwertszeit von einer bis zehn Sekunden und kann zu verschiedenen weiteren Stickstoffverbindungen reagieren [41]:



Stickstoffdioxid und Peroxynitrit wiederum können weiter reagieren:



Einerseits besitzt Stickstoffmonoxid also die Möglichkeit, in der Funktion eines Antioxidans entsprechend Gleichung II Superoxidradikale zu binden, andererseits können mit der Zwischenstufe des Peroxynitrits Hydroxylradikale entstehen, die schädigende Wirkung haben (siehe 1.2.1.4) Außerdem ist Peroxynitrit selbst in der Lage, Tyrosinreste zu nitrosylieren und damit Proteine direkt zu schädigen. Eine Inhibierung von exogen appliziertem Surfactant in hohen Dosen wurde ebenfalls nachgewiesen [182].

Andere Oxidantien

Neben den oben erwähnten ROS gibt es eine Vielzahl weiterer oxidativ wirksamer Substanzen, denen der Organismus in der Umwelt ausgesetzt ist. Neben direkter oxidativer Schädigung können sie zum Teil auch als Promotoren für die Produktion von ROS angesehen werden.

Von Bedeutung sind vor allem [41]: halogenierte Alkane und Alkene, Dioxine, Pestizide, Phorbol-Ester, Paraquat und Diquat, Chinone, Chinolone, Übergangsmetalle und Kationen-Komplexe, Zytostatika (z.B. Bleomycin).

1.2.2 Antioxidantien

Ascorbinsäure

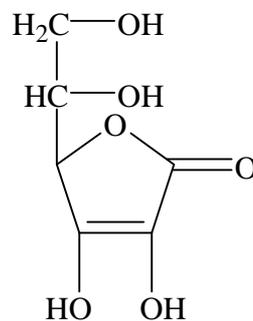


Abbildung 2: Ascorbinsäure

Vitamin C oder auch Ascorbinsäure gehört zu den wasserlöslichen Antioxidantien. Mit Ausnahme der Primaten und Meerschweinchen können alle Tierspezies Vitamin C eigenständig aus Glucose synthetisieren [40]. Besonders konzentriert kommt es in verschiedenem Gemüse (z.B. Paprika) und Obst (z.B. Zitronen) vor.

Vitamin C ist an diversen enzymatischen Reaktionen (Kollagenbiosynthese, Carnitinbiosynthese, Noradrenalinbiosynthese, u.a.) beteiligt. Fehlt Ascorbinsäure, so kommt es nach mehrmonatiger Latenzzeit zum Krankheitsbild des Skorbut, einer schweren Störung des Bindegewebstoffwechsels [43].

Außerdem besitzt es wichtige antioxidative Wirkungen: Vitamin C ist verantwortlich für die Wiederherstellung von Tocopherol und reduzierten Thiolen. Es besitzt ein stark reduzierendes Potential und fungiert daher als effektiver Radikalfänger für Hydroxylradikale, Superoxidionen und Singulett-Sauerstoff [28]. Weiterhin kann es Ferrylmyoglobin ($\text{Fe}^{+4}=\text{O}$) reduzieren und mit Triplet-Carbonylen ($^3[\text{RO}]^*$) reagieren [41].

Neben seinen antioxidativen Eigenschaften kann Ascorbinsäure aber auch prooxidativ wirken: In Anwesenheit von Fe^{+2} -Ionen können Hydroxylradikale entstehen.

Harnsäure

Harnsäure (Urat) ist bei Primaten, Vögeln und einigen Reptilien das Endprodukt des Purinstoffwechsels (Abbildung 3), andere Arten bauen Urat zu Allantoin ab [184]. Harnsäure ist in wässrigen Systemen nur mäßig löslich. Bei einer Erhöhung des Harnsäurespiegels kann so durch das Ausfallen von Uratkristallen Gicht entstehen. Dies kann sowohl bei primärer Hyperurikämie, d.h. erblichen Störungen des Purinstoffwechsels, als auch bei sekundärer Hyperurikämie, d.h. vermehrtem Anfallen von Purinen infolge von Zelluntergang und

Fehlernährung oder der Behinderung der Ausscheidung durch Niereninsuffizienz, vorkommen [40].

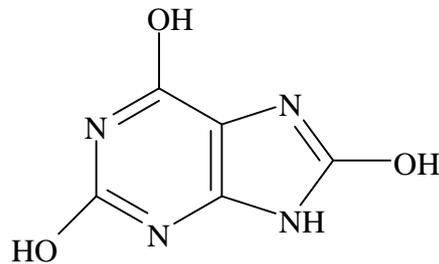


Abbildung 3: Harnsäure

Während man über einen langen Zeitraum Urat keine diskrete Rolle zuordnen konnte, weiß man heute, dass es eine funktionelle Bedeutung als Antioxidans hat [44, 45]: Es kann mit einer Vielzahl von Radikalen reagieren und dabei selber zum Radikal werden. Ascorbinsäure ist in der Lage, Urat dann zu „recyclen“, während Harnsäure selber Glutathionyl-Radikale reparieren kann [41].

Thiole

Thiole, d.h. Moleküle mit einer Sulfhydrylgruppe, sind in der Lage, Radikale unter eigener Radikalbildung zu eliminieren. Von großer Bedeutung ist hierbei das Glutathion (GSH): Es besteht aus den drei Aminosäuren Glycin, Cystein und Glutamat, die durch Peptidbindungen verknüpft sind, wobei Glutamat diese Bindung mit seiner γ -Carboxylgruppe eingeht.

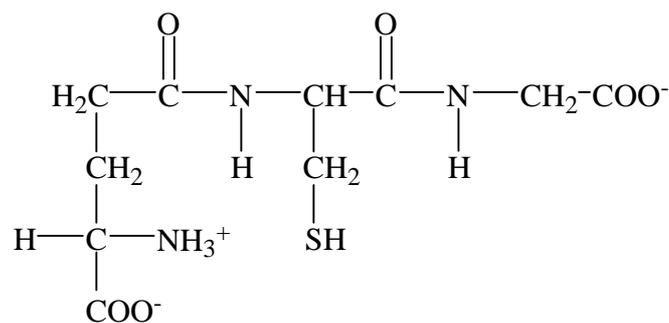


Abbildung 4: Glutathion

Glutathion kann mit Sauerstoff-, Stickstoff- und Kohlenstoffradikalen sowie dem Oxoferryl-Komplex reagieren. Während dieses Oxidationsprozesses bildet sich das Glutathion-Dimer (GSSG), das durch die Glutathion-Reduktase unter Verbrauch von NADPH wiederum regeneriert werden kann und somit erneut als Antioxidans zur Verfügung steht [41, 46]. Glutathion kommt in sehr hohen Konzentrationen in Zellen und im *epithelialen lining fluid* vor, das menschliche Plasma enthält allerdings nur Spuren ($< 2\mu\text{M}$, [28]).

Tocopherol

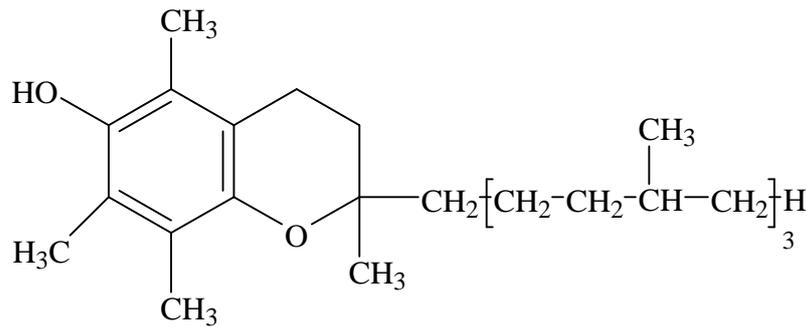


Abbildung 5: α -Tocopherol

Die ausschließlich von Pflanzen synthetisierte Gruppe der Tocopherole zeichnet sich chemisch durch einen Chromanring und eine isoprenoide Seitenkette aus [40]. Beim Menschen spielt das α -Tocopherol (Vitamin E, siehe Abbildung 5) die größte Rolle. Eine Reihe von Krankheitsbildern gehen mit erniedrigten Plasmatocopherolspiegeln einher, so z.B. bei Frühgeborenen [47], Enteropathien mit Lipidresorptionsstörungen, hämolytischen Anämien und parenteral ernährten Patienten. Als Hauptfunktion wird die antioxidative Wirkung angenommen [40].

Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften kann Vitamin E direkt an Biomembranen und in Lipoproteinen der Oxidation von Fettsäuren durch Radikale entgegenwirken [48]. Das dabei entstehende, wenig reaktive Tocopherylradikal kann durch Ascorbinsäure oder Urat wieder regeneriert werden [41].

Retinol

Retinol (Vitamin A) ist chemisch gesehen ein Alkohol, der aus vier Isopreneinheiten zusammengesetzt ist (siehe Abbildung 6) [40]. Sein Provitamin ist das β -Carotin aus der Gruppe der Carotinoide. Für den Menschen sind pflanzliche Produkte die Hauptquelle (Karotten, Spinat, u.a.). Die Funktionen umfassen neben der antioxidativen Wirkung die Photorezeption im Auge und Erhaltung der Integrität der Haut und Schleimhaut.

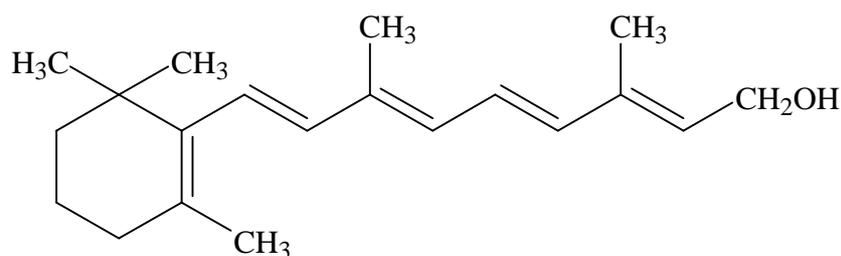


Abbildung 6: Retinol (Vitamin A)

Plasmalogene

Bei Plasmalogenen handelt es sich um Alkenyl-Acyl-Phospholipide, die in verschiedensten Zelllinien und Geweben, beim Menschen vor allem im Gehirn und im Herzen, vorkommen. Auch Makrophagen und Neutrophile besitzen einen hohen Plasmalogengehalt [49].

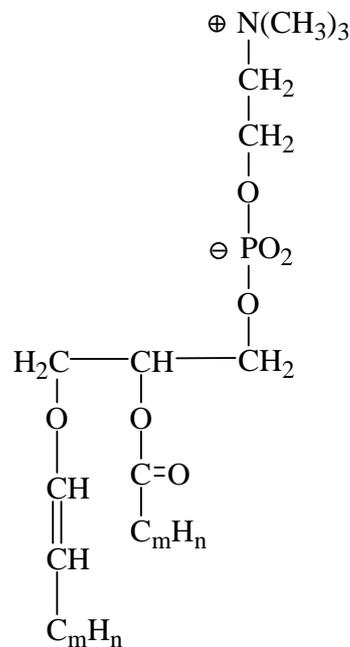


Abbildung 7: Phosphatidylcholin-Plasmalogen

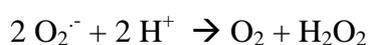
Bedingt durch ihre reaktive Vinylethergruppe sind Plasmalogene antioxidativ wirksam und in der Lage, mit aktivierten Sauerstoffspezies zu reagieren [50, 51, 52, 53, 54]. Plasmalogene zerfallen dabei zu 1-Lyso-Phospholipiden, Ameisensäure und langkettigen Aldehyden [55].

Enzymatische Systeme

Neben den oben erwähnten Radikal-Scavengern existiert noch eine "zweite antioxidative Verteidigung" [41]. Diese besteht aus einer Gruppe von Enzymen, die Schäden von Oxidantien und Radikalen abwenden, indem sie beschädigte Moleküle beseitigen oder diese reparieren. Einige Enzyme sind auch in der Lage, Oxidantien direkt zu harmloseren Verbindungen umzuwandeln. Diese sollen hier kurz vorgestellt werden:

Superoxid-Dismutase (SOD)

SOD kommt beim Menschen in zwei Formen vor: Als Mangan-SOD in den Mitochondrien und als Kupfer-Zink-SOD in allen sonstigen Kompartimenten [41, 56]. Sie besitzt die Fähigkeit, in einer Dismutationsreaktion Superoxid-Radikale umzuwandeln:



Das entstehende H_2O_2 wird durch Katalase oder Glutathion-Peroxidase weiter zu Wasser umgewandelt.

Katalase

Katalase ist in den Peroxisomen lokalisiert und ermöglicht einen weiteren Abbau des durch peroxisomale Oxidasen generierten Wasserstoffperoxids zu Wasser und Sauerstoff:



Selen-abhängige Glutathion-Peroxidase

Die Glutathion-Peroxidasen (GPx) enthalten Selen im aktiven Zentrum und sind in der Lage, die Beseitigung von organischen Peroxiden sowie Wasserstoffperoxid nach folgender Reaktion katalytisch zu beschleunigen:



Glutathion-Transferase

Die Enzymgruppe der Glutathion-S-Transferasen (GST) ist multifunktional und besitzt eine bedeutende Rolle bei der Detoxikation und Konjugation von Xenobiotika [41]. Für den Schutz vor Oxidantien ist hauptsächlich ihre Peroxidase-Fähigkeit, mit der die gleiche Reaktion wie durch die Glutathion-Peroxidase katalysiert wird, von Bedeutung:



Tyrosinase

Das kupferhaltige Enzym Tyrosinase ist in der Lage, die Umwandlung von L-Tyrosin zu L-Dopa zu katalysieren, einem Stoffwechselschritt der Melaninbiosynthese. Superoxid-Radikale beschleunigen diese Reaktion um ein Vielfaches und vergrößern somit den Schutz vor durch UV-Licht erzeugten Radikalen. Dieser Prozess hat somit in der Haut die größte Bedeutung.

Antioxidativ wirksame Proteine

Eine bedeutende Quelle von freien Radikalen ist deren Bildung durch eine Metallionen-abhängige Reaktion. Diese kann durch die Bindung der Ionen an Proteine verhindert werden [41]. Von Bedeutung sind beim Menschen vor allem Albumin mit seiner hohen Affinität zu Kupfer, sowie Lactoferrin und Transferrin, das pro Molekül zwei Eisenmoleküle binden kann und das die quantitativ größte Bedeutung in der Bindung von Eisen besitzt. Das kupferhaltige Coeruloplasmin ist in der Lage, mittels seiner Ferroxidase-Aktivität Eisen(II)-Ionen zu Eisen(III)-Ionen zu oxidieren und dessen Aufnahme in Apoferritin zu fördern.

1.2.3 Oxidative Abbauprodukte

Malondialdehyd

Bei der Peroxidation von Lipiden *in vivo* entsteht Malondialdehyd als eines der Abbauprodukte [57]. Aufgrund seiner Reaktionsfähigkeit mit Thiobarbitursäure kann Malondialdehyd mittels HPLC und Fluoreszenz-Detektion selektiv detektiert und quantifiziert werden.

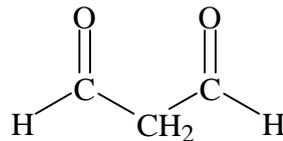


Abbildung 8: Malondialdehyd

F₂-Isoprostane

Isoprostane gehören zur Familie der Eicosanoide und werden durch die Reaktion von freien Radikalen mit der Arachidonsäure, einer ungesättigten Fettsäure, die u.a. Bestandteil von Zellmembranen ist, gebildet [58]. Die einzelnen Substanzen besitzen verschiedene biologische Aktivitäten wie etwa renale und pulmonale Vasokonstriktion und Bronchokonstriktion [59, 60]. Obwohl bis zu 64 verschiedene Isoprostane gebildet werden können, spielt aufgrund seiner chemischen Stabilität in der Analytik vor allem das 8-Isoprostan (8-epi-PG F_{2a}) eine Rolle [61, 62]. Die analytische Referenzmethode zur Messung der F₂-Isoprostane ist Gaschromatographie / Massenspektrometrie (GC/MS) [62, 63], weiterhin wurden in den letzten Jahren validierte Enzym-Immunoassays (ELISA) entwickelt [64]. Aufgrund seiner Spezifität für Lipidperoxidation und der relativ einfachen Messtechnik mittels ELISA spielt das 8-Isoprostan eine zunehmend größere Rolle als selektiver und empfindlicher Marker für oxidativen Stress in der Lunge und in anderen Geweben [65].

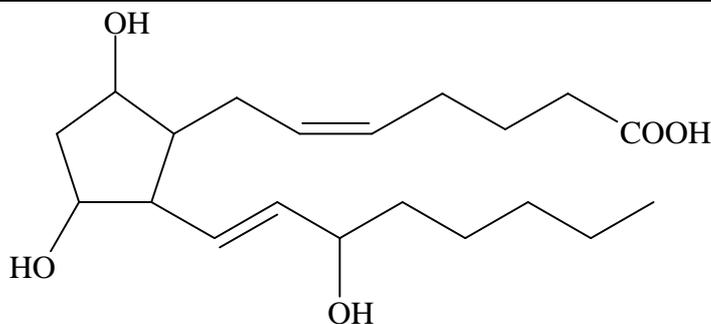


Abbildung 9: F₂-Isoprostan

1.2.4 Normwerte antioxidativer Substanzen im Alveolarraum

Der Alveolarraum wird von einer dünnen Flüssigkeitsschicht, dem *epithelialen lining fluid* (ELF) bedeckt. Die durchschnittliche Dicke dieser Schicht wurde bei Säugetieren auf 50 μm geschätzt [66]. Die absolute Menge an ELF kann bis heute nur geschätzt und nicht berechnet werden. Versuche, mit exogenen (Methylenblau, $^{99\text{mTc}}$ -DTPA) und endogenen (Albumin, Harnstoff) Markern führten nur zu unbefriedigenden Ergebnissen [67, 68]. Daher gibt es bis heute keine absoluten Normwerte für Konzentrationen antioxidativer Substanzen im ELF. Die *European Respiratory Society* hat daher empfohlen, Konzentrationsangaben auf das Volumen der BALF zu beziehen sowie Einzelheiten zur Lavagetechnik (Anzahl Aliquots, instilliertes Volumen, Recovery, Phospholipid- oder Proteinkonzentration) anzugeben [69, 70, 68]. Bisher gemessene Daten verschiedener Forschungsgruppen ergaben so auch eine große Bandbreite an Messdaten gleicher Kollektive (siehe Tabelle 2)[70].

Antioxidans	BAL-Verfahren	Konzentration	Einheit	Erster Autor [Referenz]
α-Tocopherol	A	0,31 \pm 0,06	nmol \cdot mg protein ⁻¹	Slade [71]
Ascorbinsäure	A	0,87 \pm 0,45 (0,15 \pm 0,08)	μ mol \cdot l ⁻¹ (μ g \cdot ml ⁻¹)	Hatch [72]
	A	21,4 \pm 2,8	nmol \cdot mg protein ⁻¹	Slade [71]
	B	0,50 \pm 0,13	μ mol \cdot l ⁻¹	Kelly [73]
	C	0,29 \pm 0,17	μ mol \cdot l ⁻¹	Kelly [74]
Urat	A	0,87 \pm 0,05 (0,15 \pm 0,01)	μ mol \cdot l ⁻¹ (μ g \cdot ml ⁻¹)	Hatch [72]
	A	15,9 \pm 2,5	nmol \cdot mg protein ⁻¹	Slade [71]
	B	0,33 \pm 0,09	μ mol \cdot l ⁻¹	Kelly [73]
	C	0,46 \pm 0,11	μ mol \cdot l ⁻¹	Kelly [74]
GSH	D	429 \pm 4*	μ mol \cdot l ⁻¹	Cantin [75]
	A	6,7 \pm 1,8 (2,1 \pm 0,5)	μ mol \cdot l ⁻¹ (μ g \cdot ml ⁻¹)	Hatch [72]
	A	20,4 \pm 3,8	nmol \cdot mg protein ⁻¹	Kelly [73]
	B	0,5 \pm 0,2	μ mol \cdot l ⁻¹	Kelly [73]
	C	0,9 \pm 0,2	μ mol \cdot l ⁻¹	Kelly [74]

Tabelle 2: Konzentrationen von Antioxidantien in humanem BAL-Fluid (*: Konzentration im ELF). Die Mittelwerte \pm Standardabweichung sind angegeben. A: Sechs 50 ml NaCl-Aliquots instilliert, die zurückerhaltene BALF sequentiell gesammelt und die Fraktionen 2-5 für die Analyse gepoolt; B: Zwei 20 ml phosphatgepufferte NaCl-Aliquots instilliert und Lavage verworfen. Anschließend drei 60 ml-Aliquots instilliert, Recoveries gepoolt, filtriert, zentrifugiert (400 x g) und bei -70 °C gelagert; C: Vier 50 ml NaCl-Aliquots appliziert, Recoveries gepoolt, filtriert, zentrifugiert (300 x g) und bei -70 °C gelagert; D: Fünf 20 ml NaCl-Aliquots in drei separate Lungen-Segmente instilliert, Lavage gepoolt, filtriert, zentrifugiert (300 x g) und bei -70 °C gelagert. [70]

Das quantitativ häufigste niedermolekulare Antioxidans in der BALF von gesunden Erwachsenen ist das reduzierte Glutathion ($\sim 1,6\mu\text{M}$), gefolgt von Ascorbinsäure ($\sim 0,5\mu\text{M}$) und Urat ($\sim 0,7\mu\text{M}$). Die Konzentrationen der lipophilen Antioxidantien α -Tocopherol ($\sim 26\text{nM}$) und Retinol ($\sim 5\text{nM}$) liegen vergleichsweise niedrig [76]. Unter Berücksichtigung der Verdünnung des *epithelialen lining fluids* im Zuge der BAL um etwa Faktor 100-200 ergeben sich so im Vergleich zu den Konzentrationen im Blutplasma außergewöhnlich hohe Antioxidans-Konzentrationen von ca. $300\mu\text{M}$ für Glutathion und etwa $100\mu\text{M}$ für Ascorbinsäure im ELF. Tabelle 3 gibt einen Vergleich für Normwerte ausgewählter Antioxidantien im Plasma und im ELF.

Antioxidans	Plasma	ELF
Glutathion (GSH)	2 μM [28]	300 μM [76]
	1 μM [77]	429 μM [75]
Ascorbinsäure	67 μM [77]	100 μM [76]
	52 μM [78]	
Urat	195 μM [78]	100 μM [76]
	387 μM [77]	207 μM [77]
α -Tocopherol	15 – 40 μM [28]	5 μM [76]
	16 μM [77]	
Retinol	1,7 μM [79]	1 μM [76]
	1,0 μM [80]	

Tabelle 3: Normwerte ausgewählter Antioxidantien im Plasma und im ELF

1.2.5 Pathophysiologische Konsequenzen einer gestörten Redox-Balance im alveolären Kompartiment

Bei einer Reihe von Lungenerkrankungen, insbesondere bei solchen mit inflammatorischem Hintergrund, wird dem auftretenden oxidativem Stress eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese zugeordnet. Ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien ist von verschiedenen Autoren für die *acute lung injury* (ALI) beschrieben worden [46, 81, 82], weiterhin belegen Untersuchungen eine Beteiligung von oxidativem Stress bei Asthma [83, 59, 84], zystischer Fibrose [46, 85], idiopathischer pulmonaler Fibrose [86, 87] und Sarkoidose [88].

Unter akut inflammatorischen Bedingungen, z.B. bei einem durch unterschiedliche Auslöser (Pneumonie, Sepsis, Trauma, Schock, Pankreatitis) induzierten *acute lung injury* (ALI), kommt es durch Makrophagen und Neutrophile im Rahmen des sogenannten *respiratory burst* zur Produktion und Freisetzung von freien Radikalen [89, 90]. Der pulmonalen Antwort geht initial eine systemische Aktivierung voraus [81], die sich in einer Aktivierung des pulmonalen Endothels und der alveolären und interstitiellen Makrophagen, einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und einer gesteigerten Produktion von Cytokinen und Chemokinen manifestiert. Eine Rolle können dabei oxidierte Phospholipide mit biologischer Aktivität (z.B. oxidiertes 1-Palmitoyl-2-Arachidonoyl-Phosphatidylcholin, [91]) spielen, die unter anderem als Bestandteile von low density Lipoproteinen (LDL) vorliegen. Als Folge wird eine massive Transmigration von Neutrophilen durch Endothel und Epithel in das alveoläre Kompartiment beobachtet, welche eine Freisetzung einer Vielzahl cytotoxischer und proinflammatorischer Komponenten wie proteolytische Enzyme, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und RNS), Lipidmediatoren und andere proinflammatorische Cytokine verursachen. Dies alles resultiert in einer Einschränkung der Schrankenfunktion des pulmonalen Epithels und Endothels und der Entwicklung eines *acute lung injury*.

Die Überlastung der antioxidativen Schutzbarriere durch die anfallenden ROS und RNS, ausgelöst sowohl durch den *respiratory burst* als auch in einem noch ungeklärten Ausmaß durch die therapeutische Gabe von hohen Sauerstoffkonzentrationen [92], konnte unter anderem bei ARDS-Patienten durch zahlreiche Autoren anhand des Nachweises oxidativer Umwandlungs- und Degradationsprodukte nachgewiesen werden. So fanden sich beispielsweise in der BALF erhöhte Werte für Nitrotyrosin [93, 94, 95], konjugierte Diene [96], Malondialdehyd [96], oxidiertes α 1-Antitrypsin [97] und oxidiertes Glutathion [98]. Im Ausatemkondensat konnten Wasserstoffperoxid [99] und F₂-Isoprostane [100] nachgewiesen

werden. Ähnliche Befunde ergaben auch die Analysen von BALF und Ausatemkondensat bei Patienten mit Asthma [59, 83, 84] und bei Patienten mit chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen [101, 86, 88].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es bei ARDS zu einer Erhöhung der globalen antioxidativen Aktivität des BALF kommt, was die Autoren hauptsächlich auf eine Induktion antioxidativer Enzyme zurückführten [102]. Krsek-Staples et. al. [103] zeigten erhöhte Coeruloplasmin- und Transferrin-Spiegel bei BALF von ARDS-Patienten. Ebenso kam es bei Hyperoxie zur Toleranzentwicklung durch Enzyminduktion [104]. Comhair et al. [105] fanden eine erhöhte Aktivität der extrazellulären Glutathion-Peroxidase bei Asthmapatienten. Über Veränderungen der primären antioxidativen Verteidigung, den niedermolekularen Antioxidantien im Alveolarraum, ist dagegen weniger bekannt. Während früher angenommen wurde, dass es unter inflammatorischen Bedingungen zu einem Abfall der Antioxidantien kommt (z.B. Pacht [106], Buhl [107] und Bowler [108]), gibt es nun vermehrt Hinweise darauf, dass die Konzentrationen der Antioxidantien bei oxidativem Stress, z.B. bei Ozonbelastung, Zigarettenrauch oder Hyperoxie, ansteigen. Bei Ozonexposition fanden Kodavanti et al. [109] erhöhte Werte von GSH, α -Tocopherol und Harnsäure in der BALF. Bekannt sind auch veränderte Glutathion-Spiegel im ELF von Rauchern: Bei chronischen Rauchern wurde eine Erhöhung der Glutathionkonzentration gefunden [75, 110], während bei akuter Zigarettenrauch-Exposition eine Depletion des Glutathions in der BALF festgestellt wurde [110]. Eine kurzzeitige Exposition mit Dieselabgasen führte zu einer signifikanten Zunahme des Ascorbinsäuregehaltes in BALF bei humanen Kontrollen [111]. Vento et al. [112] beschreiben eine Zunahme der globalen antioxidativen Kapazität in Trachealsekreten von Sauerstoff-beatmeten Frühgeborenen sowie eine hochsignifikante Zunahme von Urat. Die antioxidative Imbalance führt zu oxidativem Schaden, der sich durch Störungen der alveolar-endothelialen Schranke (*capillary leakage*) [113, 114], verändertem Surfactant-Metabolismus [6] und –Homöostase [115] und beeinträchtigter Surfactant-Funktion mit verringerter Herabsetzung der minimalen Oberflächenspannung [116, 117] zeigt. Infolge dieser Veränderungen kommt es bei ALI- und ARDS-Patienten häufig zu Alveolarödem und Alveolarkollaps. Im Folgenden sollen diese Veränderungen näher betrachtet werden:

- Veränderungen der Surfactant-Eigenschaften

Oxidativer Stress verursacht mannigfaltige Veränderungen der Komposition des Surfactants. Unter anderem wurden erhöhte Mengen an konjugierten Dienen und Thiobarbitursäure-

reaktiven Substanzen (TBARS) nach *in vitro*-Oxidation von Surfactant gefunden, was auf Oxidation der Lipidkomponenten hinweist. Seeger et al. [117] untersuchten den Einfluss verschiedener Radikal-erzeugender Systeme auf Surfactant *in vitro* und konnten ebenfalls gestiegene Mengen an TBARS und organischen Hydroperoxiden feststellen. Hyperoxie verursachte eine Erniedrigung des Phosphatidylglycerol/Phosphatidylinositol-Verhältnisses (PG/PI-ratio) [118]. Auch der Proteinanteil des Surfactants zeigt sich anfällig gegen oxidativen Stress. So wurden nach oxidativem Stress gestiegene Werte für nitriertes SP-A gefunden [119, 120]. Von dieser Nitrierung sind vor allem in der Nähe der Kohlenhydrat-erkennenden Domäne (CRD) gelegene Tyrosinreste des SP-A betroffen. In der Tat wurde auch eine Reduzierung der Fähigkeit des SP-A, Lipide zu aggregieren und Kohlenhydrate zu erkennen, gefunden, was auf reduzierte immunmodulierende und regulatorische Fähigkeiten des SP-A nach Oxidantienexposition hinweist [119, 98, 120]. Inkubation von Surfactant mit Peroxynitrit verursachte eine Schädigung der hydrophoben Apoproteine des Surfactants [121]. Als Resultat dieser vielfältigen Änderungen in der Komposition des Surfactants wurden Einschränkungen in der biophysikalischen Funktion des Surfactants bei mehreren Autoren gefunden [116, 117, 121].

- Veränderungen des Surfactant-Metabolismus

Inkubation von Typ-II-Zellen mit subletalen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid verursachte Einschränkungen in der Aktivität der mikrosomalen Fraktionen der CTP:Phosphorylcholine Cytidylyltransferase und der Cholin-Phosphotransferase [122], beides Schlüsselenzyme für die Phospholipid-Biosynthese in den Typ-II-Zellen.

Hyperoxie (100 % Sauerstoff für 64 h) bei Kaninchen verursacht eine um 60% verminderte Phosphatidylcholin-Synthese und eine Inhibition der Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase [123, 124]. Langanhaltende hyperoxische Exposition scheint dagegen eine Erhöhung der Surfactant-Phospholipide zu bewirken [6]. Guthmann et al. [125] konnten überzeugend demonstrieren, dass eine Depletion von Vitamin E zu einer Hemmung der Reacylierung von 2-Lyso-Phosphatidylcholin in alveolären Typ-II-Zellen und damit zu einer Einschränkung der DPPC-Synthese führt.

Minoo et al. [126] fanden im Tiermodell bei frühreifen Feten eine Hyperoxie-induzierte Erhöhung der mRNA des SP-B und SP-C, aber nicht des SP-A. Andere Autoren hingegen fanden Reduktionen aller Apoprotein-mRNA nach Hyperoxie [6].

- Gestörte Surfactant-Homöostase

Jain et al. [115] konnten im Tiermodell nachweisen, dass oxidativer Stress die Sekretion der Lamellarkörperchen beeinträchtigt und die Mitochondrien der Typ-II-Zellen schädigt. Parallel dazu ließ sich eine Reduktion der Phosphatidylcholin-Synthese feststellen. Supplementation mit Ascorbinsäure schwächte die beobachteten Effekte signifikant ab. Tölle et al. [127] hingegen fanden in kultivierten Typ-II-Zellen nach Hyperoxie (80% Sauerstoff) keine Veränderungen im Sekretionsverhalten.

1.2.6 Therapie mit Antioxidantien

Systemische oder transpulmonale Supplementation von exogenen Antioxidantien konnte in einer Vielzahl von sowohl tierexperimentellen und zellphysiologischen Versuchsansätzen als auch in klinischen Studien bei einer großen Bandbreite von pulmonalen Krankheitsbildern sowohl das Redox-Gleichgewicht wiederherstellen als auch klinisch-physiologisch positive Effekte erzielen [128, 129]. Neben einer direkten Gabe von Antioxidantien gewinnt zunehmend auch die molekulare Manipulation von Antioxidantien-Genen an Bedeutung [47]. In tierexperimentellen Modellen zur Lungentransplantation konnte so von einer großen Anzahl von Autoren ein protektiver Effekt durch Administration von Antioxidantien erreicht werden [130, 131]. Eine hyperoxische Lungenschädigung in Meerschweinchen konnte durch Gabe von N-Acetylcystein signifikant vermindert werden [132], ebenso die Symptome einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose in Mäusen [133]. Eine Überexpression der Superoxid-Dismutase in Mäusen mit einer Virus-induzierten akuten Lungenschädigung führte zu einer Reduktion der Lungenschädigung und zu einer Senkung von inflammatorischen Parametern [134]. *Immunotargeting* von Katalase in pulmonale Epithelzellen bewirkte ebenfalls eine Verbesserung der physiologischen Situation in einem Ratten-Modell der Lungentransplantation [135]. Auch auf Zellebene konnten eindeutige Effekte gezeigt werden. Müller et al. [136] lieferten Hinweise, dass eine Administration von N-Acetylcystein bei einem Typ-II-Zellmodell mit NO₂-Schädigung die eingeschränkte Sekretionsfähigkeit der Zellen deutlich verbessert. In anderen Schädigungsmodellen verbesserte auch die Gabe von Retinol und α -Tocopherol die Syntheseleistung der Typ-II-Zellen [137, 125]. Erste klinische Studien zur Wirksamkeit von Antioxidantien-Supplementation wurden unter anderem bei Probanden mit Ozon-induzierter Lungenschädigung [138 (randomisierte und placebokontrollierte Studie)], bei Rauchern und Patienten mit chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen [139 (randomisierte, doppelblinde und placebokontrollierte Studie)], 140

(randomisierte, doppelblinde und placebokontrollierte Studie)] sowie bei chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen, insbesondere bei der idiopathischen Lungenfibrose [144, 142 (randomisierte und placebokontrollierte Studie), 143, 179 (multizentrische, randomisierte, doppelblinde und placebokontrollierte Studie)], an begrenzten Patientenzahlen durchgeführt. Eine Reihe Studien wurde ebenso bei Patienten mit akut inflammatorischen Lungenerkrankungen wie ARDS und beatmungspflichtiger Pneumonie durchgeführt [145 (multizentrische, randomisierte, doppelblinde und placebokontrollierte Studie), 146 (multizentrische, randomisierte, doppelblinde und placebokontrollierte Studie), 147 (multizentrische, randomisierte, doppelblinde und placebokontrollierte Studie), 148 (multizentrische, randomisierte und placebokontrollierte Studie), 149 (randomisierte und doppelblinde Studie)]. Unter anderem konnten Nathens et al. [148] bei 559 Intensivpatienten nachweisen, dass eine gemeinsame Supplementation von Ascorbinsäure und Vitamin E die Wahrscheinlichkeit eines Organversagens verringert und die Verweildauer auf der Intensivstation verkürzt. Eine kombinierte Therapie mit Eicosapentaensäure und antioxidativ wirksamen Vitaminen konnte in einer anderen Studie mit ARDS-Patienten die Oxygenierung (paO_2 / FiO_2) signifikant verbessern.

Einschränkend ist allerdings anzumerken, dass im Rahmen größerer, randomisierter, Placebo-kontrollierter Studien mit Antioxidantiensupplementation bei verschiedenen Lungenerkrankungen zwar in der Regel Verbesserungen einzelner biochemischer Marker und auch einzelner klinisch relevanter Parameter feststellbar war, dass aber eine signifikante und andauernde Verbesserung des Krankheitsverlaufs – z. B. anhand der Mortalitätsrate bei ARDS – nicht erreicht werden konnte.

2 Fragestellung

Die antioxidative Abwehr der Lunge sorgt unter physiologischen Bedingungen für ein Gleichgewicht zwischen Prooxidantien und Antioxidantien. Sie schützt sowohl die Surfactant-Proteine und -Lipide als auch die den Surfactant produzierenden, alveolären Typ-II-Zellen vor Oxidation und gewährleistet hierüber einen funktionsfähigen Surfactant und einen regulären Gasaustausch und eine intakte epitheliale Schrankenfunktion.

Diese antioxidative Balance des alveolären Kompartiments kann unter pathophysiologischen Bedingungen drastischen Veränderungen unterliegen: Ein erhöhtes Vorkommen von Radikalen und anderen Oxidantien führt zu vermehrter Belastung der antioxidativen Abwehr. Ursachen dieses oxidativen Stresses können inflammatorische Prozesse sein, in deren Folge vor allem endogene Oxidantien durch Makrophagen und aktivierte Neutrophile freigesetzt werden. Aber auch Inhalation von erhöhten Sauerstoffkonzentrationen (z.B. bei therapeutischer Gabe), Ozon, nitrosen Gasen und vielen anderen Substanzen beeinflussen dieses Gleichgewicht. Zahlreiche Studien belegen ein erhöhtes Auftreten von Prooxidantien und oxidativen Zerfallsprodukten bei pulmonalen Krankheitsbildern mit inflammatorischem Hintergrund. Weit weniger untersucht und bislang von der Datenlage noch sehr uneindeutig ist die Verteilung und Regulation von Antioxidantien im alveolären Kompartiment.

Ziel dieser Dissertation war eine umfassende Charakterisierung des alveolären antioxidativen Potentials und des Ausmaßes des oxidativen Stresses unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen im Tiermodell und in ausgewählten Patientenkollektiven. Untersucht wurden sowohl Veränderungen der primären antioxidativen Abwehr (Glutathion, α -Tocopherol, Retinol, Ascorbinsäure, Harnsäure, Plasmalogene) als auch der oxidativen Degradations- und Umwandlungsprodukte (Malondialdehyd, Isoprostane, oxidiertes Glutathion). Als diagnostisches Fenster fungierten bronchoalveoläre Lavagen (BAL). Diese Probennahme geht mit einer ausgeprägten Verdünnung (ca. Faktor 100-200) des *epithelialen lining fluids* (ELF) einher. Voraussetzung war daher die Etablierung geeigneter Messmethoden, die in der Lage waren, die aufgrund der Verdünnung des ELF durch die Lavage sehr geringen Substanzkonzentrationen zu erfassen.

Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Lassen sich Unterschiede im antioxidativen Status bei akut-inflammatorischen Lungenerkrankungen wie Pneumonie und ARDS im Vergleich zu gesunden Kontrollen

erkennen? Liegen diese Veränderungen auch bei chronisch-interstitiellen Erkrankungen (Interstitielle pulmonale Fibrose, Sarkoidose, Exogen-allergische Alveolitis) vor?

- Gibt es statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen der Oxidationsmarker und Antioxidantien und den klinischen Parametern wie paO_2/FiO_2 oder Compliance?

- Verändert sich das antioxidative Potentials bei akut-inflammatorischen Erkrankungen im Zeitverlauf? Hierzu sollen sequentiell durchgeführte Lavagen untersucht werden. Wann kommt es zu Erschöpfung oder Überlastung der antioxidativen Abwehr des alveolären Kompartiments?

- Wie verändert sich die alveoläre antioxidative Verteidigung bei einer Bleomycin-induzierten pulmonalen Fibrose (Bleomycin-Modell am Kaninchen) im zeitlichen Verlauf?

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Substanz	Lieferant	Bestell-Nummer
(±)- α -Tocopherol	Sigma, Deisenhofen	T-3251
1,1,3,3-Tetraethoxypropan	Sigma, Deisenhofen	10,838-3
All-trans-Retinol	Sigma, Deisenhofen	R-7632
All-trans-Retinol Acetat	Sigma, Deisenhofen	R-4632
Ammoniumheptamolybdat	Merck, Darmstadt	1180.0250
Aqua ad iniectabilia	Baxter, Unterschleißheim	SN-881514
Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt	1.00127.0100
BCA-Protein-Assay-Kit	Pierce, Bonn	23227
BHT	Sigma, Deisenhofen	B-1378
Chloroform (Uvasol, für HPLC)	Merck, Darmstadt	1.02447.2500
Chloroform p.a.	Merck, Darmstadt	1.02445.2500
DTNB	Sigma, Deisenhofen	D-8130
Dünnschichtplatte (Kieselgel 60, 20 x 20 cm,)	Merck, Darmstadt	1.05721.
Gase (Chlorwasserstoff 5.0; Stickstoff 4.0; Synth. Luft 4.6; Helium 4.6; Wasserstoff 5.0)	Messer-Griesheim, Krefeld	
GC-Säule CP-Sil 88, 50 m x 0,25mm	Varian-Chrompack, Darmstadt	CP7488
Glutathion oxidiert (GSSG)	Sigma, Deisenhofen	G-4501

Glutathion, reduziert (GSH)	Sigma, Deisenhofen	G-6529
Glutathion-Reduktase	Sigma, Deisenhofen	G-3664
HPLC-Säule LiChrosorb RP 18, 5 µm, 250 x 4,6 mm	Merck, Darmstadt	1,50333
Isoprostan ELISA-Kit	Cayman Chemicals, via Alexis, Grünberg	516351
Isotone Kochsalzlösung	Baxter, Unterschleißheim	SN-881504
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt	1.04873.1000
Metaphosphorsäure	Merck, Darmstadt	1.00546.0100
Methanol	Riedel-de-Haën	32213
Methanol (für HPLC)	Fluka, Buchs/Schweiz	52762
Mikrotiterplatte Polystyrol 96well	NUNC, Wiesbaden	
NADPH	Sigma, Deisenhofen	N 1630
Na ₂ -EDTA x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt	1.08418.0250
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	Merck, Darmstadt	1.06579.0500
N-Ethylmaleimid	Sigma, Deisenhofen	E-1271
n-Hexan Uvasol	Merck, Darmstadt	1.04372.0500
Novesine	Wander Pharma, Nürnberg	
Perchlorsäure	Merck, Darmstadt	1.00519.1001
Phenobarbital Ketanest	Parke-Davis, Karlsruhe	
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt	1.00573.1000
Primulin	Sigma, Deisenhofen	P-7522
Thiobarbitursäure	Sigma, Deisenhofen	T-5500
Toluol	Merck, Darmstadt	1.08325.2500
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt	810.1000

Urat	Sigma, Deisenhofen	U-0881
n-Heptan Uvasol	Merck, Darmstadt	1.04366.0500
Vorsäulen Bakerbond SPE Octadecyl 500 mg, 8 ml	J. T. Baker, Griesheim	7334-06
Vorsäulen Chromabond C 18 ec 200 mg	Macherey-Nagel, Düren	730 012
β -NADPH	Sigma, Deisenhofen	N-6505

Wenn nicht anders angegeben, hatten die verwendeten Substanzen mindestens p.a. - Qualität.

3.1.2 Geräte

Hersteller	Gerät / Material
Chrompack	Gaschromatograph CP 9000 mit Autosampler 910
Eppendorf	Tischzentrifuge 5417R
Gynkotek	Fluoreszenz- Detektor
Heraeus	Zentrifuge Varifuge 3.0R
Hewlett-Packard Agilent	Workstation Kayak 600
Hewlett-Packard Agilent	G1315 A Dioden-Array-Detektor
Hewlett-Packard Agilent	G1316 A Säulenofen
Hewlett-Packard Agilent	G1312 A HPLC-Pumpe
Hewlett-Packard Agilent	1049 A Elektrochemischer Detektor
Kratos	Spectroflow 773 Detektor
Mettler	Feinwaage AB54
Pharmacia	2249 HPLC-Pumpe
Tecan	Spectra-Fluor-Plus Elisa-Photometer
Uni-Equip	Vakuum-Zentrifuge Univapo 150 H

3.2 Methoden

3.2.1 Bronchoalveoläre Lavage

Bronchoalveoläre Lavage beim Menschen

Ein flexibles, fiberoptisches Bronchoskop (Olympus, Hamburg) wurde unter Lokalanästhesie (Novesine®) durch den Mund-Rachenraum oder den Trachealtubus eingeführt und entweder eines der beiden Lingulasegmente oder der rechte Mittellappen dargestellt. In Okklusionsstellung (*wedge position*) wurde anschließend mit zehn 20 ml Portionen steriler physiologischer Kochsalzlösung lavagiert. Nach jeder Instillation wurde die Flüssigkeit durch schnelle Aspiration wieder entfernt, bei +4 °C gepoolt und die Recovery bestimmt. Die so erhaltene Lavageflüssigkeit wurde durch sterile Gaze gefiltert und zur Abtrennung zellulärer Bestandteile bei 300 x g und +4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde unter sorgfältigem Rühren aliquotiert, mittels Flüssigstickstoff gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Teile der Lavageflüssigkeit wurden mit 0,01 % BHT als Antioxidans versetzt. Als Kontrollgruppe dienten gesunde Probanden. Bronchoskopie, Lavage und Behandlung der Lavageflüssigkeit verliefen unter identischen Bedingungen. Die Durchführung der Lavagen wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt und im gegenseitigen Einvernehmen mit den engsten Verwandten oder nach Erlangung des Einverständnisses des Probanden vollzogen. Bis auf einzelne Ausnahmen wurden alle Lavagen von ein und demselben Untersucher durchgeführt.

Bronchoalveoläre Lavage beim Kaninchen

Durch fraktionierte, intravenöse Applikation von 0,3 g Phenobarbital / Ketanest® in eine Ohrvene wurden Kaninchen beiderlei Geschlechtes bis zum Atemstillstand und konsekutivem Herz-Kreislaufstillstand narkotisiert. Dabei wurden nur solche Tiere ausgesucht, bei denen sich keine Anzeichen einer akuten bzw. chronischen Erkrankung zeigten. Über einen sofortigen Trachealschnitt wurde ein Tubus in die Trachea eingelegt. Mit einer Perfusorspritze wurde sodann die Lunge mit 3 x 50 ml steriler, +4 °C kalter, physiologischer Kochsalzlösung lavagiert. Nach Filtration der Lavageflüssigkeit durch sterile Gaze und Zellsedimentation bei 300 x g und +4 °C für 10 min wurden die Überstände aliquotiert und bis zur späteren Weiterverarbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Einem Teil der Lavageflüssigkeit wurde 0,01 % BHT als Antioxidans zugegeben.

3.2.2 Lipidextraktion nach Bligh und Dyer

Die Separation wässrig gelöster Lipide, wie sie in bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten (BALF) vorliegen, wurde mittels einer Zweiphasenextraktion mit Chloroform und Methanol nach der Methode von Bligh & Dyer [150] durchgeführt.

Die bei -80 °C aufbewahrten bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten (BALF) wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut. Anschließend erfolgte die Extraktion in gläsernen Zentrifugenröhrchen. Zu Beginn der Extraktion wurden 0,8 Volumenanteile BALF mit zwei Teilen Methanol und einem Teil Chloroform versetzt (siehe Tabelle 4). Die entstandene einphasige Lösung wurde in einem Zeitraum von 30 Minuten mehrmals kräftig geschüttelt. Im folgenden zweiten Schritt erzielte man durch die Zugabe von je einem Teil Chloroform und einem Teil 0,9%iger Kochsalz-Lösung nach mehrminütigem Schütteln die Phasentrennung. Zum Erreichen einer optimalen Phasengrenze wurde der Ansatz bei 2000 × g für 10 Minuten zentrifugiert oder über Nacht bei +4 °C stehen gelassen. Die Chloroformphase wurde mit Pasteurpipetten abgetrennt und unter dem Stickstoffstrom getrocknet.

	Probe / 0,9 % NaCl	Methanol	Chloroform
1. Schritt	0,8	2	1
30 min, Schütteln			
2. Schritt	1	-	1
2 min Schütteln, 2000 × g			
Summe Volumina	1,8	2	2

Tabelle 4: Volumenanteile bei der Lipidextraktion nach Bligh & Dyer

3.2.3 Colorimetrische Phosphatbestimmung zur quantitativen Bestimmung des Phospholipidgehaltes

Der Phospholipid-(PL)-Gehalt von BALF-Proben wurde nach der Methode von Rouser et al. [151] ermittelt. Eine Modifizierung dieses Verfahrens [49] erbrachte eine größere Sensitivität, womit die Detektionsgrenze nun bei ca. 2 µg Phospholipid (entsprechend etwa 100 ng anorganischem Phosphor) lag. Als Standard wurde in wässriger Lösung vorliegendes Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) in fünf aufsteigenden Konzentrationen von 0,2 µg – 5 µg Phosphor (M_r = 31) entsprechend 4,7 µg – 120 µg PL (M_r = 734, approximiert) verwendet.

Alle Proben lagen in organischem Medium (Chloroform/Methanol 2/1 (v/v)) vor. Proben und Standards wurden mit 200 µl 70 % Perchlorsäure versetzt und 60 min bei +200 °C in einem Thermoblock zur Freisetzung der Phosphatgruppe verkocht. Nach dem Abkühlen der Proben erfolgte die Zugabe von 1 ml 4,6 mM Ammoniumheptamolybdat und anschließend die Reduktion zum Farbkomplex durch Zugabe von 20 µl 650 mM Ascorbinsäure. Vollständige Farbentwicklung wurde durch 45 minütige Inkubation bei +60 °C erzielt. Die Messung der Proben und Standards erfolgte mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 698$ nm. Nach Abzug des Leerwertes konnten die Proben über eine lineare Regression aus den Werten der ermittelten Standards ausgewertet werden. Zur Berechnung des Phospholipidgehaltes wurde eine gemittelte relative Molekularmasse von $M = 734$ eingesetzt.

3.2.4 Quantitative Proteinbestimmung

Das Gesamtprotein wurde mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Pierce, Bonn) gemessen, basierend auf der Reaktion von Cu^+ mit Bicinchoninsäure [152].

3.2.5 Gaschromatographische Analyse der Gesamtlipid-Fettsäuren und der Plasmalogene

Als Glycerolester gebundene Phospholipid-Fettsäuren und Plasmalogene (1-O-Alkenyl-2-Acyl-Phospholipide) wurden mit 2 N HCl in Methanol in Fettsäuremethylester bzw. Dimethylacetale umgewandelt, gaschromatographisch separiert und über Flammenionisationsdetektion quantifiziert.

Probenvorbereitung bei der Fettsäureanalyse aus Gesamtlipiden

Nach der Lipidextraktion (siehe Kapitel 3.2.2) wurde zur Analyse der Fettsäureverteilung von Gesamtlipiden der Lipidextrakt direkt in gasdichte Glasgefäße mit Teflondeckel überführt, unter einem Stickstoffstrom getrocknet und mit 1 ml Methylierungsreagenz (2 N HCl/MeOH) 12 h bei +100 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Hexan und kräftigem Schütteln erfolgte die Separierung der entstandenen Fettsäuremethylester (FAME) und Dimethylacetale (DMA) mit Hilfe von Pasteurpipetten aus der Hexanphase. Anschließend wurde die Hexanphase im Stickstoffstrom getrocknet und die Fettsäuremethylester von kontaminierenden Neutrallipiden mittels Dünnschichtchromatographie getrennt. Die Proben und 50 µg eines FAME-Standards (Marker) wurden zu diesem Zweck auf eine Dünnschichtplatte (Kieselgel 60, 20 x 20 cm, Merck, Darmstadt) aufgetragen und bei +4 °C mit 100 % Toluol als mobile Phase entwickelt. 45 min später wurde die Platte mit kalter Luft (Fön) getrocknet und die FAME durch

Besprühen mit Primulin-Lösung bei 254 nm detektiert. Die entsprechenden Gelabschnitte wurden von der DC-Platte entfernt und nach Zugabe von 10 µg 15:0-FAME als interner Standard in 3 ml Glassäulen, die mit Teflonfritten bestückt waren, mit 10 x 1 ml Chloroform (Uvasol, Merck, Darmstadt) extrahiert. Die Proben wurden im Stickstoffstrom konzentriert, in 1,1 ml Glasvials überführt, im Stickstoffstrom getrocknet, in 50 µl CHCl₃ gelöst und unter Stickstoff bei -18 °C bis zur weiteren Analytik dunkel gelagert.

Herstellung des Methylierungsreagenzes (2 N HCl in Methanol)

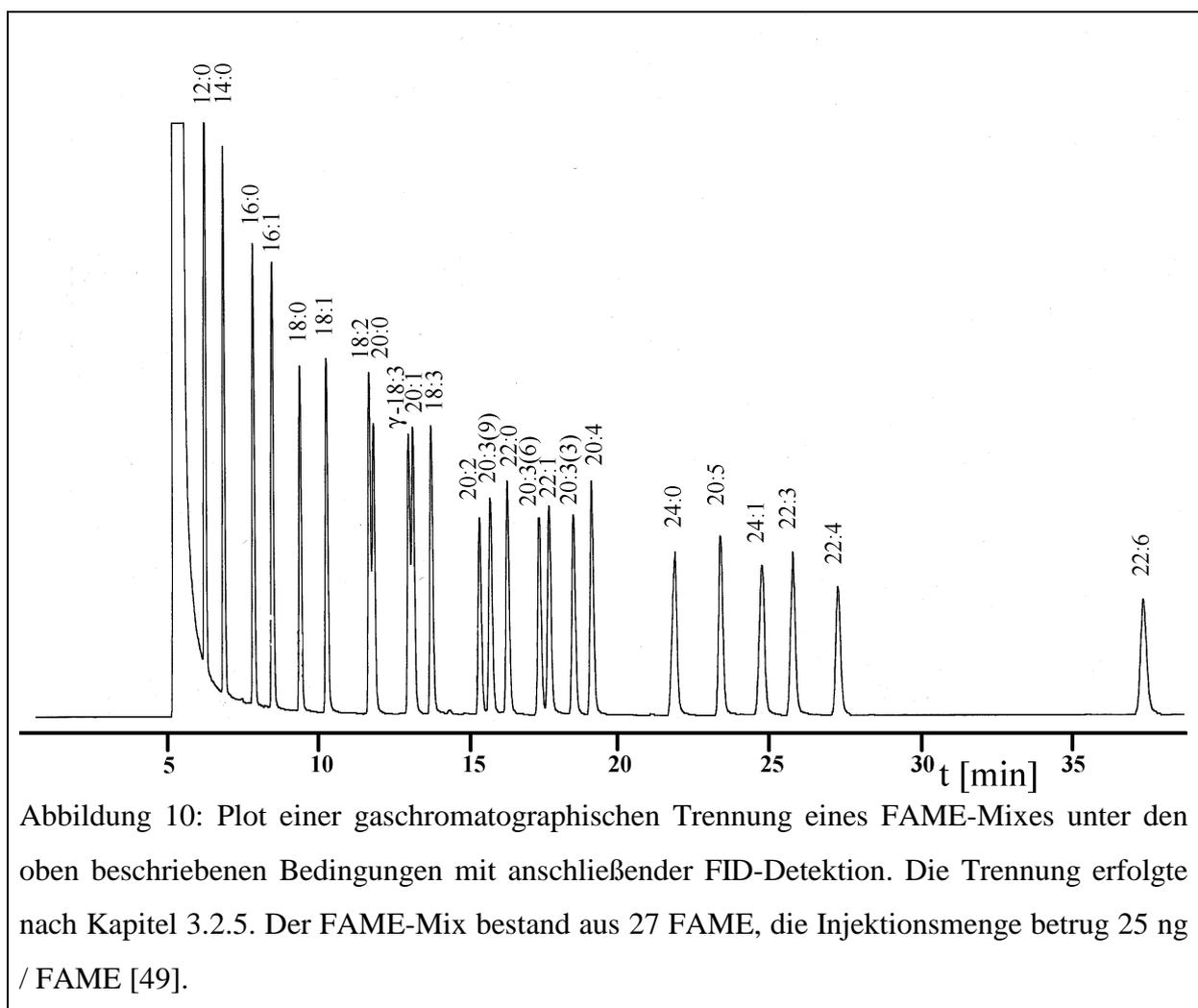
Eine Gaswaschflasche mit Glassinterfritte wurde mit 200 ml Methanol (HPLC-Grade) gefüllt und danach gewogen. Eine Gasflasche mit Chlorwasserstoffgas (Reinheitsgrad 5.0) wurde mit einem Edelstahlventil bestückt. Zwischen HCl-Flasche und Gaswaschflasche wurde eine weitere Gaswaschflasche zwischengeschaltet, um ein mögliches Rückschlagen des Methanols in die HCl-Flasche zu verhindern. Die Gefäße wurden mit säurestabilen Siliconschläuchen verbunden. Das Einleiten des Gases fand unter einem Abzug und unter Eiskühlung statt. Der eingeleitete Gasfluss musste sorgfältig kontrolliert werden. Zu starker Fluss hatte ein Verdampfen des Methanols und übermäßigen Verlust von HCl zur Folge, zu geringer Fluss verursachte ein Zurücklaufen des Methanols in die vorgeschaltete Gasflasche. Nach ca. 45 min wurde der Gasfluss unterbrochen und die Gaswaschflasche erneut gewogen. Durch Zugabe von Methanol wurde auf eine HCl-Konzentration von 2 N verdünnt. Anschließend wurde das Methylierungsreagenz auf seine Reinheit und seine Methylierungsfähigkeit getestet.

Dazu wurden 13,51 µg DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin, entsprechend 10 µg 16:0-FAME) sowie 10 µg 16:0-FAME mit dem neu hergestellten Reagenz behandelt (Verfahren siehe oben). Beide Ansätze wurden mit je 10 µg 15:0-FAME versetzt. Mittels Gaschromatographie wurde dann der Wirkungsgrad aus dem Quotienten der Integratorflächen von 16:0-FAME aus DPPC/16:0-FAME berechnet. Der ermittelte Wirkungsgrad des Reagenzes betrug $97,07 \pm 4,88$ % (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 5 Reagenzansätze). Das Reagenz ist unter Feuchtigkeitsabschluss bei +4 °C mindestens sechs Monate haltbar.

Gaschromatographische Bedingungen

Die Fettsäureanalytik wurde mit einem Chrompack CP 9000 Gaschromatographen mit Autosampler Modell 910 (Varian Chrompack, Darmstadt) durchgeführt. Als Trägergas wurde Wasserstoff verwendet. Der Gaschromatograph war mit einer Kapillarsäule (CP - Sil 88, 50 m x 0,25 mm Innendurchmesser (ID), Varian Chrompack) bestückt. Die stationäre Phase der

polaren Säule bestand aus 100 % Cyanopropylsilikon (225.000 theoretische Böden). Vor die 50 m lange Kapillarsäule wurde eine 2,5 m lange unpolare desaktivierte Vorsäule installiert. Der Trägergasfluss betrug 1 ml / min. Die Detektorgase hatten einen Flow von 300 ml / min (synthetische Luft), bzw. 30 ml / min (Wasserstoff). Die beiden Detektorgase wurden mit Aktivkohlefilter, das Trägergas mit je einem Feuchtigkeits- und Sauerstofffilter gereinigt (Varian Chrompack). Die Proben wurden je nach Konzentration mit einem Splitverhältnis von 1:5 – 1:25 aufgegeben. Die Trennung der Fettsäuren erfolgte mittels eines Temperaturgradienten und wurde täglich mit Hilfe eines FAME-Mixes, bestehend aus 27 Fettsäuremethylestern, kontrolliert (siehe Abbildung 10 und Tabelle 5). Über einen Flammenionisationsdetektor (FID) erfolgte die Detektion der zu analysierenden FAME. Die Signale wurden mit einer Integrationssoftware (Maitre Version 2.5, Varian Chrompack) ausgewertet. Die resultierenden Chromatogramme lieferten die zeitliche Abfolge von Detektorsignalen sowie Aussagen über die qualitative und quantitative Fettsäurezusammensetzung der jeweiligen Probe.



Die Auswertung der Fettsäureprofile wurde mit Microsoft EXCEL vorgenommen. Auf jeder DC-Platte wurde eine Leerkontrolle mituntersucht, da es sich nicht vermeiden ließ, dass geringe Mengen an verunreinigenden Fettsäuren eingeschleppt wurden. Die Integratorfläche des internen Standards der Proben wurde mit der der Kontrollen korreliert und in den Kontrollen aufgetretene, eingeschleppte FAME-Peaks von denen der Probe subtrahiert. Die korrigierten Fettsäuremethylester-Flächen wurden durch für jede Fettsäure separat ermittelte Responsefaktoren dividiert.

Die Abbildung 10 zeigt den Plot eines Standard-Gemisches, welches gaschromatographisch analysiert wurde. Mit einem solchen Plot wurde jeden Tag die Probenanalytik begonnen, um eine Identifikation der Fettsäuremethylester über die Retentionszeiten der Standards zu ermöglichen. Tabelle 5 gibt außerdem die exakte Bezeichnung aller eingesetzten FAME wieder.

Peak Nr.	Symbol	ω -n	Name	Trivialname
1	12:0		Dodecansäure	Laurinsäure
2	14:0		Tetradecansäure	Myristinsäure
3	15:0		Pentadecansäure	
4	16:0		Hexadecansäure	Palmitinsäure
5	16:1	7	cis-9-Hexadecensäure	Palmitoleinsäure
6	17:0		Heptadecansäure	
7	18:0		Octadecansäure	Stearinsäure
8	18:1	9	cis-9-Octadecensäure	Oleinsäure
9	18:2	6	all-cis-9,12-Octadecadiensäure	Linoleinsäure
10	γ -18:3	6	all-cis-6,9,12-Octadecatriensäure	γ -Linoleinsäure
11	20:0		Eicosansäure	Arachinsäure
12	18:3	3	all-cis-9,12,15-Octadecatriensäure	Linolensäure
13	20:1	9	cis-11-Eicosensäure	
14	20:2	6	all-cis-11,14-Eicosadiensäure	
15	20:3(9)	9	all-cis-5,8,11-Eicosatriensäure	Meadsäure
16	20:3(6)	6	all-cis-8,11,14-Eicosatriensäure	
17	22:0		Docosansäure	Behensäure
18	20:3(3)	3	all-cis-11,14,17-Eicosatriensäure	
19	20:4	6	all-cis-5,8,11,14-Eicosatetraensäure	Arachidonsäure

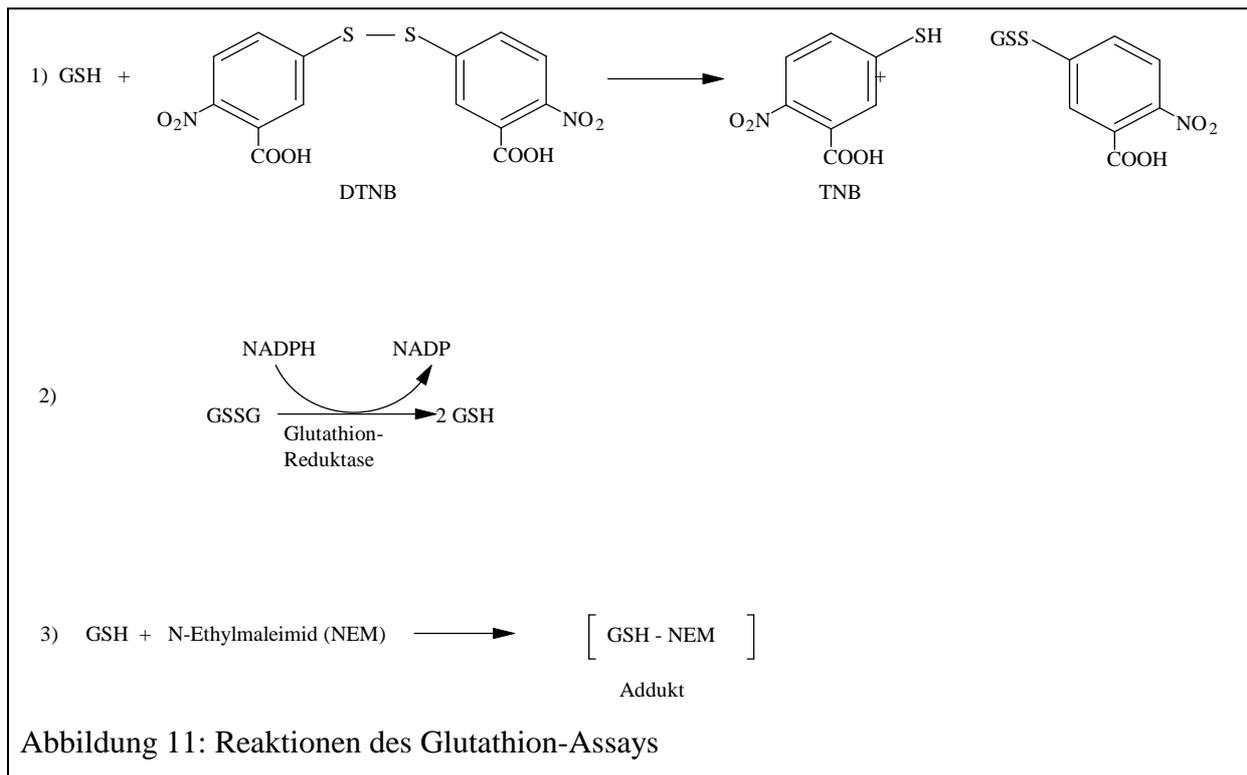
20	22:1	9	cis-13-Docosensäure	Erucinsäure
21	20:5	3	all-cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure	EPA
22	24:0		Tetracosansäure	Lignocerinsäure
23	22:3	3	all-cis-13,16,19-Docosatriensäure	
24	22:4	6	all-cis-7,10,13,16-Docosatetraensäure	
25	24:1	9	cis-15-Tetracosensäure	Nervonsäure
26	22:5	3	all-cis-7,10,13,16,19-Docosapentaensäure	
27	22:6	3	all-cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure	DHA

Tabelle 5: Komposition des bei der GC-Analytik verwendeten FAME-Gemisches

3.2.6 Messung des reduzierten und oxidierten Glutathions

Sowohl das oxidierte Glutathion (GSSG) als auch das Gesamt-Glutathion (GSX) wurden simultan mittels eines enzymatischen „Recycling-Assays“, der erstmalig von Tietze [153] beschrieben wurde, bestimmt. Hierzu wurde eine Adaption des Testverfahrens nach Baker et al. [154] angewandt, welches hinsichtlich der GSSG-Bestimmung weiter modifiziert wurde.

Abbildung 11 zeigt den schematischen Ablauf der Reaktion. Reduziertes Glutathion (GSH) reduziert DTNB zu TNB (Gleichung 1), das im Test als Chromophor fungiert. Anschließend wird das entstandene oxidierte Glutathion durch die Glutathion-Reduktase (unter Oxidation des NADPH) zurückreduziert (Gleichung 2) und steht für die erste Reaktion erneut zur Verfügung (enzymatischer „Recycling-Assay“). Zur Bestimmung von oxidiertem Glutathion wird das GSH mittels N-Ethylmaleimid (NEM) quantitativ als stabiles Addukt gebunden (Gleichung 3) und dieses mittels Festphasenextraktion nach Jaeschke et al. [155] abgetrennt. Die Konzentration von GSH wird nach der Gleichung $GSH = GSX - 2GSSG$ berechnet.



Herstellung der Standards und der Reaktionslösungen

Standards: 20 mg oxidiertes Glutathion (GSSG) wurden in 100 ml 0,9 % NaCl-Lösung gelöst. Die erreichte Konzentration von 327 nmol/ml wurde 1:100 mit 0,9 % NaCl verdünnt und ergab Standard 1. Danach konnten die Standards entsprechend Tabelle 6 seriell verdünnt werden.

Standard	nmol GSSG / ml	Verdünnung
1	3,27	1000 µl Standard 1
2	1,64	1000 µl 0,9 % NaCl + 1000 µl Standard 1
3	0,82	1000 µl 0,9 % NaCl + 1000 µl Standard 2
4	0,41	1000 µl 0,9 % NaCl + 1000 µl Standard 3
5	0,205	1000 µl 0,9 % NaCl + 1000 µl Standard 4
6	0,103	1000 µl 0,9 % NaCl + 1000 µl Standard 5
7	0,052	1000 µl 0,9 % NaCl + 1000 µl Standard 6
8	0,026	1000 µl 0,9 % NaCl + 1000 µl Standard 7

Tabelle 6: Serielle Verdünnung der GSSG-Standards

Die Standards wurden maximal drei Tage bei +4 °C im Kühlschrank gelagert.

Reaktionslösungen: Zuerst erfolgte die Herstellung des Reaktionspuffers: 907 mg KH_2PO_4 , 1190 mg Na_2HPO_4 und 1 mM Ethylendinitrioloessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA) (1 ml einer Lösung von 372 mg $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ in 10 ml H_2O = 100 mM) wurden in 100 ml H_2O gelöst. Anschließend wurde der Puffer mit 25 %iger NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,5 titriert.

Danach wurde eine 1 mM 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB)-Lösung (3,963 mg in 10 ml des oben angesetzten Puffers) und eine 1 mM β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH)-Lösung (8,334 mg in 10 ml des oben angesetzten Puffers) hergestellt. Die NADPH-Lösung wurde hierbei maximal drei Tage im Kühlschrank bei +4 °C gelagert.

Unmittelbar vor Messung der Proben erfolgte die Herstellung der Reaktionslösung mit 2,8 ml 1 mM DTNB, 3,75 ml 1 mM NADPH sowie 5,85 ml Puffer. Zusätzlich wurden 19 Units GSH-Reduktase zugegeben. Es ergaben sich Endkonzentrationen von 0,23 mM DTNB, 0,30 mM NADPH und 1,5 Units / ml Glutathion-Reduktase.

Probenvorbereitung für die GSSG-Bestimmung

Herstellung des Puffers und der GSH-Blockierlösung: 4535 mg KH_2PO_4 und 5950 mg Na_2HPO_4 wurden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst (Konzentration Na-K-P-Puffer: 100 mM, pH = 6,5). Für die Blockierlösung wurden 187,5 mg N-Ethylmaleimid (NEM) in 30 ml Puffer gelöst (Konzentration NEM: 50 mM).

Probenvorbereitung: Für die Messung des GSSG wurden jeweils 400 μl der Standards 1 bis 8, 12 Proben sowie 2 Blanks (0,9 % NaCl-Lösung), ein externer Standard (Kaninchen-BALF mit bekannter Konzentration) zur Validierung der Messung (siehe Kapitel 4.1.1) und ein GSH-Standard (6,4 nmol/ml) zur Kontrolle der Effizienz der Blockierung in 1,5 ml Eppendorf-Cups pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von 400 μl Blockierlösung. Nach einer Minute Schütteln ließ man die Cups bei Raumtemperatur für 60 Minuten reagieren. Alle 20 min wurde hierbei erneut geschüttelt. Während der Inkubation wurden die Vorsäulen (Chromabond 18 ec 200 mg) mit jeweils 6 ml MeOH gespült, danach mit 6 ml des Puffers äquilibriert. Daraufhin wurden jeweils 400 μl der Probe in die Vorsäulen gegeben. Die restlichen 400 μl wurden aufgegeben und in 1,5 ml Eppendorfcups aufgefangen. Danach wurde mit 1 ml des Puffers gespült, das Eluat wurde ebenfalls im selben Cup gesammelt.

Die Vorsäulen wurden nach Benutzung mit 6 ml MeOH gespült und insgesamt für maximal fünf Messungen verwendet.

Durchführung der Messung

Die Messungen für GSX und für GSSG wurden nacheinander auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Die Standards und Proben wurden hierzu nach folgendem Schema auf 96-Well-Mikrotiterplatten verteilt:

In die linke Hälfte pipettierte man entsprechend Tabelle 7 100 µl der vorbereiteten Proben für die GSSG-Messung (jeweils Doppelbestimmungen), in die rechte Hälfte wurden spiegelverkehrt jeweils 50 µl der Proben für die Gesamt-Glutathion-(GSX)-Messung aufgegeben.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	STD 1	STD 1	Leer- wert	Leer- wert	GSH	GSH	Probe 12	Probe 12	Probe 6	Probe 6	STD 8	STD 8
2	STD 2	STD 2	Leer- wert	Leer- wert	EXT. STD	EXT. STD	Probe 11	Probe 11	Probe 5	Probe 5	STD 7	STD 7
3	STD 3	STD 3	Probe 1	Probe 1	Probe 7	Probe 7	Probe 10	Probe 10	Probe 4	Probe 4	STD 6	STD 6
4	STD 4	STD 4	Probe 2	Probe 2	Probe 8	Probe 8	Probe 9	Probe 9	Probe 3	Probe 3	STD 5	STD 5
5	STD 5	STD 5	Probe 3	Probe 3	Probe 9	Probe 9	Probe 8	Probe 8	Probe 2	Probe 2	STD 4	STD 4
6	STD 6	STD 6	Probe 4	Probe 4	Probe 10	Probe 10	Probe 7	Probe 7	Probe 1	Probe 1	STD 3	STD 3
7	STD 7	STD 7	Probe 5	Probe 5	Probe 11	Probe 11	EXT. STD	EXT. STD	Leer- wert	Leer- wert	STD 2	STD 2
8	STD 8	STD 8	Probe 6	Probe 6	Probe 12	Probe 12	GSH	GSH	Leer- wert	Leer- wert	STD 1	STD 1

Tabelle 7: Anordnung der Standards und Proben auf der Mikrotiterplatte

Zuerst erfolgte die Messung des GSX auf der rechten Hälfte: Zu dem Probenvolumen von 50 µl pipettierte man mit einer ELISA-Transferpipette 100 µl Reaktionslösung. Es wurden vier Messpunkte über einen Zeitraum von drei Minuten bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

Danach wurden die Proben für GSSG auf der linken Seite der Mikrotiterplatte pipettiert (100 µl Probe + 100 µl Reaktionslösung) mit vier Messpunkten auf sechs Minuten verteilt (dies war aufgrund der niedrigeren GSSG-Konzentrationen und der somit geringeren Signalstärke notwendig; die Messdauer konnte bei Bedarf auch noch weiter erhöht werden).

Abschließend erfolgte die Berechnung einer Standardkurve mittels der Standards abzüglich der Leerwerte, mit deren Hilfe schließlich die Konzentrationen der Proben berechnet wurden. Die Berechnung des reduzierten Glutathions wurde mittels folgender Gleichung durchgeführt: $GSH = GSX - [2 \times GSSG]$.

3.2.7 Quantifizierung von Retinol und α -Tocopherol

Retinol (Vitamin A) und α -Tocopherol (Vitamin E) wurden simultan mittels HPLC und Dioden-Array-Detektion in Anlehnung an das Verfahren von Catignani und Bieri [156] bestimmt.

Herstellung der Standards

Es wurden Standardlösungen mit folgenden Konzentrationen hergestellt (alle Verdünnungen erfolgten in Methanol):

Retinol-Acetat: 1 mg / ml, 10 µg / ml, 1 µg / ml

Retinol: 500 µg / ml, 5 µg / ml, 0,5 µg / ml, 50 ng / ml, 5 ng / ml

α -Tocopherol: 5 mg / ml, 50 µg / ml, 5 µg / ml, 0,5 µg / ml, 50 ng / ml

Aus diesen Standards wurden zur Erstellung der Standardkurven die sechs folgenden Mischungen (jeweils Doppelbestimmungen) in HPLC-Vials zusammenpipettiert, im Stickstoffstrom getrocknet und in 100 µl Methanol wieder gelöst.

Standardmix (je 2x)	Retinol-Acetat [ng]	Retinol [ng]	α -Tocopherol [ng]
1	100	25,0	250
2	100	10,0	100
3	100	5,0	50
4	100	2,5	25
5	100	1,0	10
6	100	0,5	5

Tabelle 8: Substanzmengen von Retinol und α -Tocopherol zur Herstellung der Standards

Nach Aufgabe auf die HPLC und Messung erfolgte dann mit Hilfe der Chemstation-Software die Berechnung der Standardkurven und die Festlegung von Retinol-Acetat als internem Standard.

Probenvorbereitung

2 ml Probe wurden erst 100 μ l einer 1 μ g / ml all-trans-Retinol-Acetat-Lösung in MeOH (entsprechend 100 ng total) als interner Standard (zur Kompensation von Extraktionsverlusten) und anschließend 2 ml Hexan zugegeben (bei konzentrierteren Proben wurden auch kleinere Ausgangsvolumina eingesetzt). Danach wurde die Probe 45 sec kräftig geschüttelt und zur Ausbildung einer optimalen Phasengrenze 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Es erfolgte die Isolierung der Hexanphase mit einer Pasteurpipette und das Trocknen im Stickstoffstrom. Die getrocknete Probe wurde in 100 μ l Methanol gelöst und bis zur Analyse, die am selben Tag erfolgte, lichtgeschützt bei +4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Chromatographische Bedingungen

Die Analyse erfolgte über eine LiChrosorb RP-18 Säule (5 μ m, 250 x 4,6 mm, Merck, Darmstadt) bei einer konstanten Temperatur von +40 °C und einem Flow von 1 ml / min. Die mobile Phase bestand aus 97 % MeOH und 3 % H₂O. Die Detektion erfolgte mittels eines Dioden-Array Detektors bei den Absorptionsmaxima beider Analyten von 292 nm (α -Tocopherol) und 324 nm (Retinol). Die Peakreinheit der beiden Analyten wurde anhand der UV-Spektren überprüft.

3.2.8 Quantifizierung von Ascorbinsäure und Harnsäure

Ascorbinsäure (Vitamin C, AA) und Harnsäure (Uric Acid, UA) wurden simultan mittels HPLC und elektrochemischer Detektion in Anlehnung an die Verfahren von Iriyama et al. [157] und Kelly et al [73] bestimmt.

Herstellung der Standards und Erstellen der Standardkurve

10 mg Ascorbinsäure (AA) wurden in 10 ml 2 %iger Metaphosphorsäure (MPS) und 10 mg Harnsäure in 0,5 ml 1 M NaOH und 9,5 ml H₂O gelöst. Anschließend wurden beide Standards mit 2 %iger MPS zweimal um den Faktor 10 verdünnt (entsprechend einer Endkonzentration von 10 µg / ml). Je 2 ml dieser beiden Standards wurden gemischt (finale Konzentration AA und UA 5µg/ml) und mit 2 %iger MPS – Lösung daraus folgende Standards hergestellt:

- A 1 µg /ml
- B 0,5 µg / ml
- C 0,1 µg / ml
- D 0,025 µg / ml

Mit diesen Verdünnungen wurde die Standardkurve entsprechend Tabelle 9 erstellt (jeweils zwei Läufe pro Stufe).

Verdünnung	Volumen [µl]	Absolute Menge AA/UA [ng]
A	50	50
A	25	25
B	25	12,5
C	50	5
C	25	2,5
D	50	1,25
D	25	0,625
D	10	0,25

Tabelle 9: Verdünnungen zur Erstellung der AA/UA-Standardkurve

Vorbereitung der Proben

In 1,8 ml HPLC-Vials wurden 450 µl Probe, 50 µl 16 % MPS und 100 µl Heptan gegeben und 45 sec kräftig geschüttelt. Danach wurden die Proben bei 4000 rpm 5 min zentrifugiert.

Bis zur Analyse am selben Tag wurden die Proben bei +4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

HPLC – Bedingungen

Vor Installation der Säule und Beginn der Messungen musste das HPLC-System erst gereinigt und passiviert werden. Der Vorgang betraf alle Bestandteile (inklusive der Kapillaren des Injektors) außer der Detektorzelle und der Säule. Hierzu wurden bei maximaler Flussrate von 5 ml / min folgende Spülungen durchgeführt:

1. 20 min $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
2. 15 min Isopropanol
3. 15 min $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
4. 30 min 37,8 %ige (=6 molare) Salpetersäure

Anschließend wurde das System so lange mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gespült, bis ein pH-Wert von 7,0 am Systemausgang erreicht war. Nach einer Äquilibration von 30 min mit der mobilen Phase (siehe unten) bei maximalem Flow wurden Säule und Detektorzelle wieder installiert und das komplette System bei einem Fluss von 1 ml / min für eine Stunde mit der mobilen Phase weiter äquilibriert. Dieser Vorgang wurde nach jeder Benutzung der HPLC-Anlage durch andere Messungen wiederholt.

Der elektrochemische Detektor wurde im Amperometrie-Modus bei einem Potential von 800 mV (Limits -400 bis 1400 mV) betrieben. Die Polarität war auf Oxidation eingestellt bei einer Messbereichsskala von 500 nA. Die Messzelle war mit einer Ag / AgCl-Arbeits Elektrode und einer Solid-State-Referenzelektrode ausgestattet.

Das HPLC-System wurde mit einem 0,2 M H_3PO_4 / KH_2PO_4 Puffer (pH = 2,0) als mobile Phase gefahren. Hierzu wurden in ca. 900 ml H_2O 27,22 g KH_2PO_4 gelöst und anschließend mit ortho-Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 2,0 titriert. Der Puffer wurde anschließend mit H_2O auf 1000 ml eingestellt.

Zur Messung der Proben wurde das HPLC-System (stationäre Phase LiChrosorb RP-18, 5 μm , 250 x 4,6 mm, Merck, Darmstadt) bei einem Flow von 1 ml / min und einer konstanten Temperatur von +40 °C gefahren. Die Detektion der Proben erfolgte mittels eines elektrochemischen Detektors 1049A (Agilent, Waldbronn). Zur Aufnahme der Probe wurde die Hexan-Phase mit einer Hamilton-Spritze durchstoßen und 50 μl der unteren Phase injiziert. Bei zu hoher Konzentration der Proben (ECD-Messbereich über 500 nA) wurde weniger Volumen aufgeben bzw. die Probe verdünnt.

3.2.9 Quantifizierung von Malondialdehyd

Malondialdehyd (MDA) wurde in Anlehnung an das Verfahren von Draper und Hadley [158] bestimmt. MDA wurde hierzu bei +90 °C im sauren Medium mit Thiobarbitursäure (TBA)

umgesetzt. Das entstandene pinkfarbene Addukt (MDA[TBA]₂) wurde bei 532 nm Excitation und 553 nm Emission mittels HPLC und fluoreszenzspektrometrischer Detektion gemessen. Das geringe Vorkommen von MDA in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) sowie das Auftreten von farbigen Störkomponenten machten sowohl eine Konzentration als auch eine Reinigung der Proben durch Vorsäulen notwendig.

Präparation des MDA-Standards

1 mmol 1,1,3,3 Tetraethoxypropan (Tetraethylacetal von Malondialdehyd, 220,3 mg) wurden zur Freisetzung des Malondialdehyds in 100 ml 1 % H₂SO₄ 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt.

Das so freigesetzte MDA wurde 1:1000 (v / v) mit Aqua dest. verdünnt (resultierende Konzentration = 1 µM = 0,72 mg / l = 720 ng / ml).

Präparation des MDA-TBA-Addukts

Benötigte Reagenzien: Es wurde 10 % Trichloressigsäure (10 g TCA auf 100 ml Aqua dest.) sowie eine Lösung von 670 mg TBA in 100 ml Aqua dest. hergestellt (letztere wurde aufgrund ihrer schweren Löslichkeit auf +37 °C erhitzt und im Ultraschallbad beschallt).

Probenvorbereitung: 1000 µl Probe wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und danach in 100 µl Wasser resuspendiert. 200 µl 10 %ige TCA und 300 µl 0,67 %ige TBA wurden hinzugefügt, anschließend wurde die Probe in ein Glasgefäß mit Schraubverschluss umpipettiert und 10 Minuten bei 90-100 °C reagieren gelassen.

Nach dem Abkühlen folgte eine Zentrifugation der Probe für 10 Minuten bei 4000 rpm. Vorsäulen (Baker Octadecyl 7334-06, 8 ml) wurden mit 15 ml MeOH gespült und mit 15 ml Aqua dest. äquilibriert. Anschließend wurde die Probe aufgetragen und mit 4 ml Aqua dest. gespült. Schließlich wurde das MDA-TBA-Addukt mit 2 ml MeOH eluiert und in einem Eppendorf-Cup aufgefangen. Im letzten Schritt trocknete man die Probe erneut in einer Vakuumzentrifuge und löste sie dann in 200 µl Aqua dest. zur HPLC-Analytik.

HPLC-Analytik

Die stationäre Phase bestand aus einer LiChrosorb RP-18-Säule (10 µm, 250 x 4,6 mm, Merck, Darmstadt) mit einer mobilen Phase aus 18 % MeOH in Wasser. Der Flow betrug 0,5 ml / min bei einer durch einen Säulenofen konstant gehaltenen Temperatur von +40 °C. Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm und einer Emissionswellenlänge von 553 nm.

Von den Proben wurde ein Volumen von 150 µl in die HPLC-Anlage aufgegeben (auf vollständiges Lösen wurde geachtet, in einzelnen Fällen wurde die Probe im Ultraschallbad

behandelt und danach zentrifugiert). Nach etwa 10-20 Proben wurde die Säule etwa 1 h mit 100 % MeOH gespült.

3.2.10 Quantifizierung von 8-Isoprostanen

8-Isoprostane wurden mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits der Firma Cayman (via Alexis, Grünberg) gemessen.

Vorbereitung der Reagenzien

Zur Herstellung des EIA-Puffers wurde das Puffer-Konzentrat des Kits in einem Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Anschließend wurden für den Waschpuffer 5 ml Konzentrat mit Aqua dest. 1:400 zu einem Gesamtvolumen von 2 l verdünnt und mit 1 ml Tween 20 vermischt. Der 8-Isoprostan-AChE-Tracer und das 8-Isoprostan-Antiserum des Kits wurden dann jeweils in 6 ml EIA-Puffer gelöst.

Herstellung der Standards

Nach der Äquilibrierung einer Pipettenspitze mit Ethanol wurde diese benutzt, um 100 µl 8-Isoprostan-Standard in einen Eppendorf-Cup zu pipettieren. Danach wurde mit 1800 µl Aqua dest. verdünnt. Daraus resultierte eine Konzentration von 2,5 ng / ml.

Der Standard wurde nun in folgender serieller Reihe verdünnt:

Cup 1: 900 µl EIA-Puffer + 100 µl Stock = 250 pg / ml = 12,5 pg / well

Cup 2: 500 µl EIA-Puffer + 500 µl Cup 1 = 125 pg / ml = 6,25 pg / well

Cup 3: 500 µl EIA-Puffer + 500 µl Cup 2 = 62,5 pg / ml = 3,125 pg / well

usw. bis Cup 8

Probenvorbereitung

Zur Präparation der Proben erfolgte die Herstellung eines 1 M Acetat-Puffers (pH = 4,0). Dafür wurden 38 ml einer 1 M NaAcetat x 3 H₂O-Lösung (3,18 g in 100 ml Wasser) mit ca. 40 ml 1 M Essigsäure (1 M Essigsäure = 5,775 ml Eisessig ad 100 ml Wasser) unter pH-Meter-Kontrolle auf einen pH-Wert von 4,0 titriert. 1 ml der Proben (BALF) wurde anschließend 1:1 mit dem Acetat-Puffer versetzt.

Die Festphasenextraktion erfolgte mit Macherey-Nagel Chromabond C18ec-Säulen (3 ml / 200 mg, Cat. Nr. 730 012) in einer Vakuumkammer unter Wasserstrahlvakuum. Zuerst wurden die Säulen mit 5 ml MeOH (Fluka, HPLC grade) gespült, danach mit 5 ml Aqua dest. äquilibriert. Nach Probenauftrag (2 ml total) wurde zuerst mit 5 ml Aqua dest., anschließend mit 5 ml Hexan (Merck, Uvasol) gespült. Die Elution erfolgte mit 5 ml Essigsäureethylester (Ethylacetat, Merck, Uvasol) in Reagenzgläser. Die Proben wurden unter Stickstoff

getrocknet, in einem definierten Volumen (200 μ l) EIA-Puffer gelöst und in Eppendorf-Cups überführt. Für die Messung wurden 50 μ l / Well pipettiert (entspricht 250 μ l BALF / Well) und der resultierende Wert aufgrund der Konzentrierung durch die Festphasenextraktion durch einen Faktor von 5 dividiert (= pg / ml).

Die Säulen wurden nach Spülen mit 5 ml MeOH für insgesamt maximal drei Messungen wiederverwendet.

Messung der Proben

Auf einer 96 Well ELISA-Platte wurden acht Wells für die Standards sowie jeweils ein Well zur Messung der TA (*Total Activity*), NSB (*Non-Specific Binding*), MB (*Maximum Binding*) und ein Blank-Well reserviert. Die restlichen 84 Wells standen für Proben zur Verfügung.

Je 100 μ l EIA Puffer wurden in die NSB-Wells, 50 μ l EIA Puffer in die MB-Wells gegeben. 50 μ l der 8-Isoprostanstandards wurden in Einfach- oder Doppelbestimmung in die jeweiligen Wells pipettiert. Ebenso wurden 50 μ l jeder Probe in Einfach- oder Doppelbestimmung auf die Platte gegeben.

Der 8-Isoprostan-AChE-Tracer wurde bis auf TA- und Blank-Wells in jedes Well pipettiert (jeweils 50 μ l). Danach wurden 50 μ l des 8-Isoprostan-Antiserums zu jedem Well gegeben (ausgenommen TA-, NSB- und Blank-Wells).

Nach Abdeckung der Platte und Inkubation bei Raumtemperatur für 18 Stunden wurde anschließend die Platte dekantiert und fünfmal mit dem Waschpuffer gespült.

Jeweils 200 μ l Ellman's Reagenz (Zur Herstellung wurde eines der Vials Ellman's Reagenz, ausreichend für 100 Bestimmungen [100 dtn] des Kits in 20 ml Aqua dest. gelöst) wurden in jedes Well pipettiert (Mehrkanalpipette) und zusätzlich in den TA-Well 5 μ l Tracer gegeben.

Die Platte wurde dann ca. 2 h unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

3.3 Definition der Patientenkollektive

3.3.1 Patientenpopulation

Die Patienten wurden in der Abteilung für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen oder der Klinik für Lungen- und Bronchialheilkunde in Greifenstein-Elgershausen rekrutiert. Das Projekt wurde von der hiesigen Ethikkommission gebilligt und in jedem Fall lag die Einwilligung der Patienten oder ihrer nächsten Verwandten vor. Es wurden Patienten zwischen 15 und 75 Jahren untersucht und mit gesunden, spontan atmenden Probanden ohne Anhalt für eine kardiale oder pulmonale Schädigung (Stichprobenumfang $n = 20$), die ebenfalls ihre Zustimmung zur Durchführung der BAL gegeben hatten, verglichen.

Jeder Patient wurde in eines der folgenden Kollektive eingestuft:

- 1. *Pneumonie* ($n = 27$):** Patienten mit einer Infektion der Lunge bei Abwesenheit von akutem oder chronischem linksseitigen Herzversagen (PCWP < 16 mm Hg oder fehlender echokardiographischer Hinweis auf gestörte LV-Funktion). Diagnostische Kriterien waren Fieber, Tachykardie, Dyspnoe, typische Auskultationsgeräusche, charakteristische Thorax-Röntgenbilder und ein entsprechender Keimnachweis im Trachealsekret oder der BALF.
- 2. *ARDS* ($n = 16$):** (Atemnotsyndrom, engl. *acute respiratory distress syndrome*): Die Auswahl erfolgte entsprechend den Richtlinien der Konsensus-Konferenz für ARDS [159]. Patienten ohne primäre Lungeninfektion mussten folgende generelle Kriterien erfüllen: A) Vorangegangenes katastrophales Ereignis (Sepsis, Polytrauma, Pankreatitis), B) röntgenographisch diffuse und bilaterale alveoläre Infiltrationen, C) fehlender Nachweis eines akuten oder chronischen linksseitigen Herzversagens (PCWP < 16 mm Hg, keine LV Funktionsstörung im Echo) und D) paO_2 / FiO_2 -Werte < 200 mm Hg.
- 3. *Idiopathische pulmonale Fibrose (IPF)*, ($n = 16$):** Diese Patienten zeigten eine langsam progressive Lungenfibrose mit Beginn vor >6 Monaten mit inspiratorischem Knistern und Trommelschlegelfingern bei restriktiv eingeschränkter Lungenfunktion in Verbindung mit einem reduzierten CO-Transfer. In Thorax-Röntgenbildern oder CT/HRCT musste als typischer Befund ein bilateral, basal und subpleural betontes retikuläres Muster zu finden sein. Röntgenologische Ausschlusskriterien waren extensive Milchglastrübungen, noduläres Muster der Lungen oder asymmetrische Verteilung, ebenso das Vorliegen einer hilären oder mediastinalen Adenopathie. Weitere notwendige Einschlusskriterien waren Zunahme von neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage in Kombination mit normalen oder nur schwach erhöhten relativen Lymphozytenzahlen sowie typische

histologische Befunde (*usual interstitial pneumonia pattern*) im Falle einer durchgeführten offenen Lungenbiopsie (VATS).

4. **Exogen allergische Alveolitis (EAA, n = 7):** 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 Milchglasstrübungen und/oder fleckige interstitielle Infiltrationen in beiden Lungen, mit einem bronchiolozentrischem Ausbreitungsmuster, nachgewiesen. In der BALF imponierte eine Vermehrung der T8-Lymphozyten (T8>T4).
5. **Sarkoidose (n = 12):** Die Patienten wiesen auffällige Röntgenbefunde (bilaterale hiläre Adenopathie ohne (Sarkoidose I) oder mit (Sarkoidose II) pulmonalen Infiltraten wie grobe retikulonoduläre oder milchglasartige Verschattungen sowie Infiltrate ohne hiläre Adenopathie (Sarkoidose III)) auf. In der BALF fanden sich erhöhte T4-Lymphozytenzahlen (T4>T8) und in der Lungenbiopsie konnten die typischen Granulome nachgewiesen werden. Einige wenige Patienten zeigten Anzeichen eines Löfgren-Syndroms, einer akuten und systemischen Erscheinungsform der Sarkoidose.
6. **PCP (n=33):** Es wurden Patienten mit gesicherter HIV- und *P. jiroveci*-Infektion eingeschlossen. PCP wurde auf der Basis von klinischen Symptomen und typischen Thorax-Röntgen- oder CT-Befunden diagnostiziert und wurde durch zytologische Kontrollen im BALF unter Benutzung der Grocott's-Methenamin-Silbernitrat-Färbung bestätigt. Bronchoskopie und BAL wurden für diagnostische Zwecke innerhalb von zwei Tagen nach stationärer Aufnahme beim beatmeten (n = 13) oder spontan atmendem Patienten (n = 20) durchgeführt.

Zwischen den einzelnen Kollektiven traten keine Überschneidungen auf. Ausschlusskriterien bei allen Kollektiven waren erwiesene oder vermutete Malignome der Lunge, chronische obstruktive Lungenerkrankungen, Schädeltrauma, Herzinfarkt oder subarachnoidale Blutungen. Das Geschlecht, Alter oder Körpergewicht der Patienten zeigte innerhalb der Patientenkollektive keine signifikanten Unterschiede. Kontrollen waren signifikant jünger im Vergleich zu den Patientenkollektiven.

Die flexible Bronchoskopie und die Lavage wurde primär für diagnostische Zwecke (zum Beispiel für mikrobiologische Untersuchungen) durchgeführt und die überschüssige

Lavageflüssigkeit für die Bestimmung der in dieser Dissertation dargestellten Parameter verwendet.

3.2.2 Statistische Auswertung

Daten aus dem Bereich der Methodenentwicklung (Kapitel 3.2. und 4.1) sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben (Mean \pm SD). Alle Ergebnisse aus der Analyse biochemischer Proben (Kapitel 4.2 und 4.3) sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt (Mean \pm SE). Ebenfalls wurden auch der Median sowie die 25. und 75. Perzentile berechnet.

Die statistische Analyse auf Unterschiede zwischen den Hauptkollektivgruppen (ARDS, Pneumonie, exogen allergische Alveolitis, Sarkoidose, idiopathische pulmonale Fibrose, PCP) und den Kontrollen (Normalpatienten) erfolgte mit Hilfe von SPSS (SPSS Inc., Vers. 12.0).

Dazu wurden 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). Die statistische Analyse bei von einander abhängigen Proben (repetitive Analysen bei ARDS und Pneumonie) wurde mittels Wilcoxon's Rang-Test für zwei verbundene Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Dargestellt sind die Signifikanzniveaus im Text jeweils mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$). Die Korrelationsanalysen zwischen Redoxparametern und klinischen Parametern wurden mittels Origin (OriginLab Corp., Vers. 7G SR1 V7.0303) durchgeführt, die Korrelationskoeffizienten nach Pearson „r“ und die statistischen Signifikanzen „p“ wurden jeweils angegeben.

3.4 Beschreibung der Tiermodelle

3.4.1 Bleomycin-Modell am Kaninchen

Die sich nach Gabe einer hohen Bleomycindosis am Tier entwickelnde restriktive Lungenfunktionsstörung gilt als Standardmodell der Lungenfibrose, führt aber bei intraperitonealer / systemischer Gabe zur Myelosuppression und bei intratrachealer Instillation zur prädominant peribronchialen Fibrosierung. In der vorliegenden Studie wurde Bleomycin unter maschineller Beatmung durch Verneblung appliziert mit dem Ziel, eine gleichförmigere und distal (also alveolär) betonte Fibroseentwicklung erzielen zu können.

Klinisch gesunde, antibiotisch abgedeckte (Gyrasehemmer) New Zealand White Bastard Kaninchen wurden unter Narkose intratracheal intubiert und gewichtsadaptiert maschinell

beatmet (6,5 ml / kg KG). Über einen Ultraschallvernebler (MMAD 2,5 μm) wurden 1,8 U / kg KG Bleomycin pulmonal deponiert. Nach 4, 8, 16, 24, 32 und 64 Tagen wurde bei jeweils sechs Tieren nach erneuter Narkotisierung und Erfassung der statischen Lungencompliance und des paO_2 / FiO_2 unter maschineller Beatmung die Lungen isoliert, artifiziell perfundiert (modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer, 120 ml / min) und ventiliert. Hierbei wurden der kapilläre Filtrationskoeffizient (K_{fc}), der Beatmungsdruck (VP) und der pulmonal-arterielle Druck erfasst. Eine Lungenhälfte wurde perfusionsfixiert, die andere mit 3 x 50 ml Aliquots steriler, eisgekühlter 0,9 % NaCl lavagiert. Die gewonnene bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) wurde sofort zentrifugiert (300 x g, 10 Minuten, +4 °C) um Zellreste zu entfernen. Danach wurde sie aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

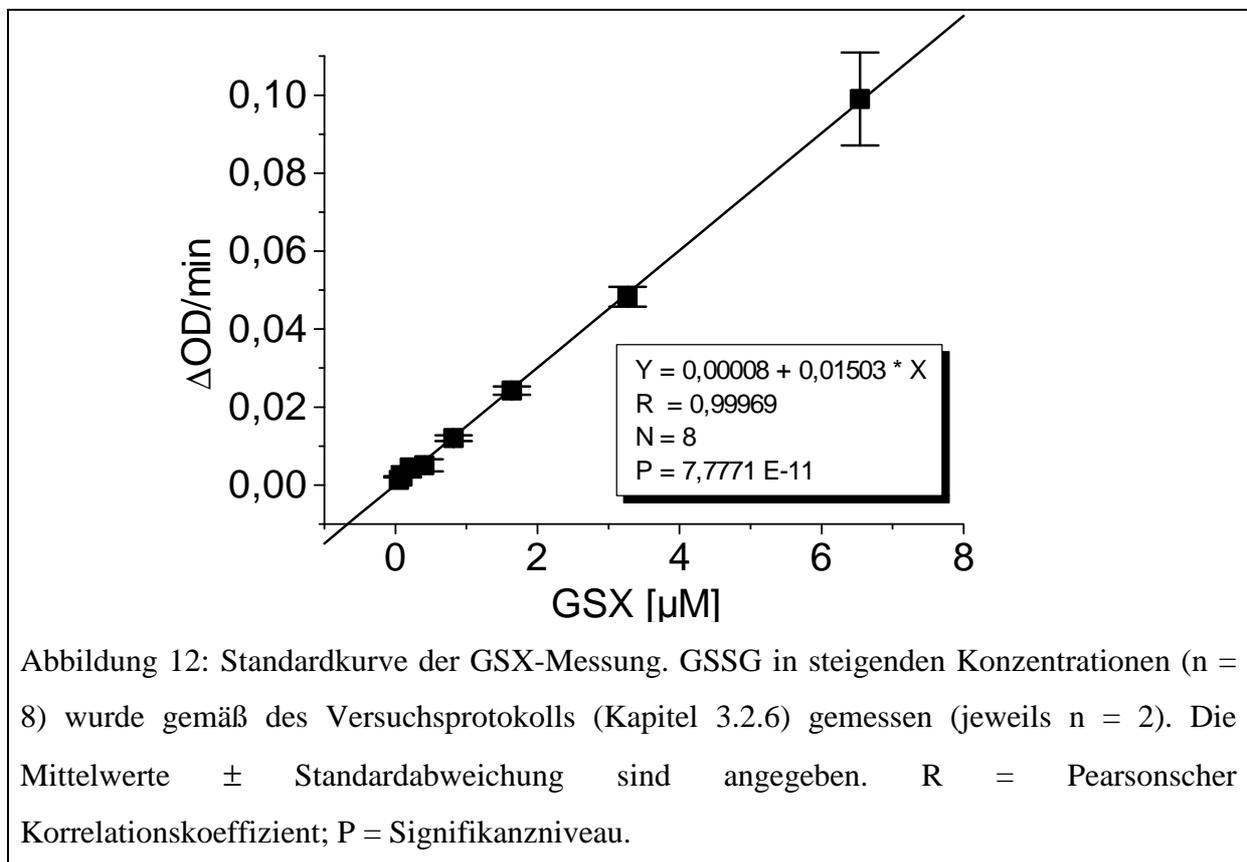
4 Ergebnisse

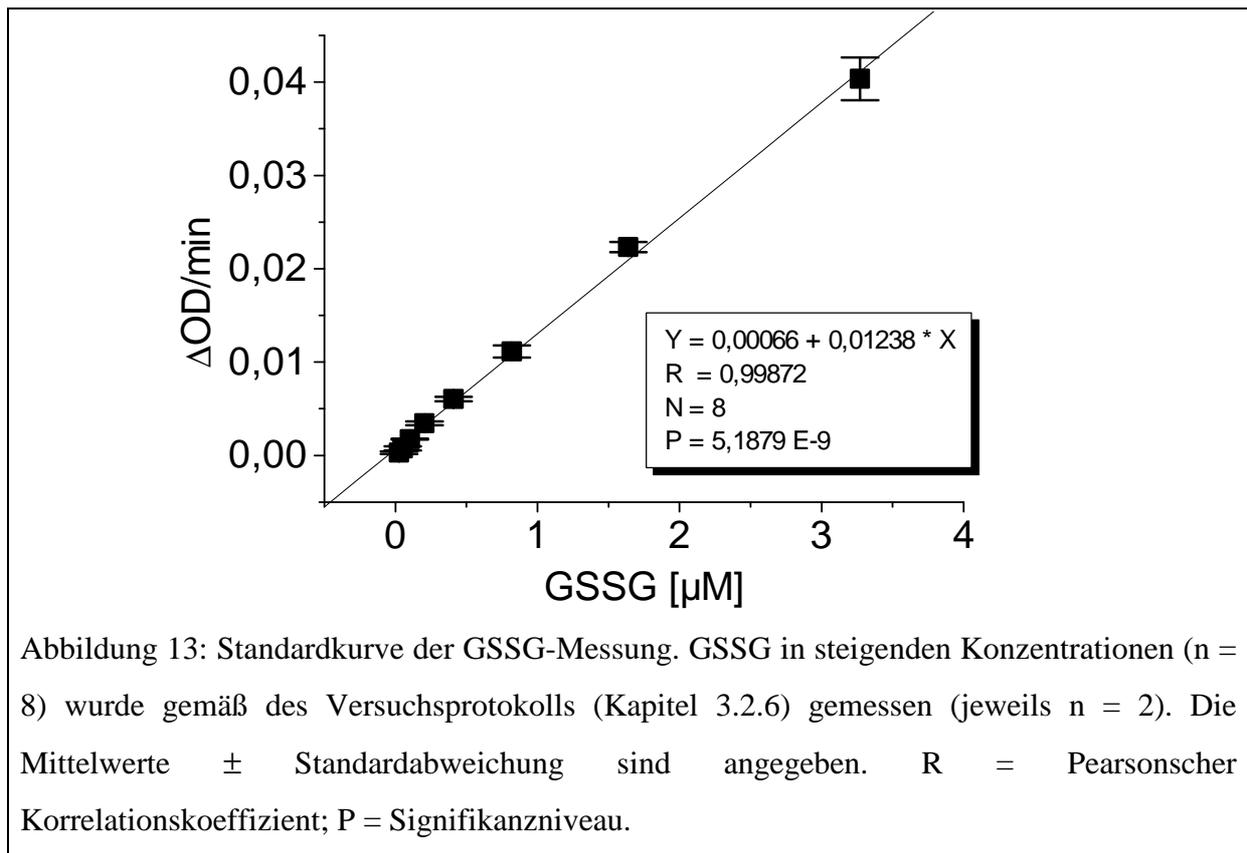
4.1 Validierung der Methoden

4.1.1 Validierung der Glutathion-Messung

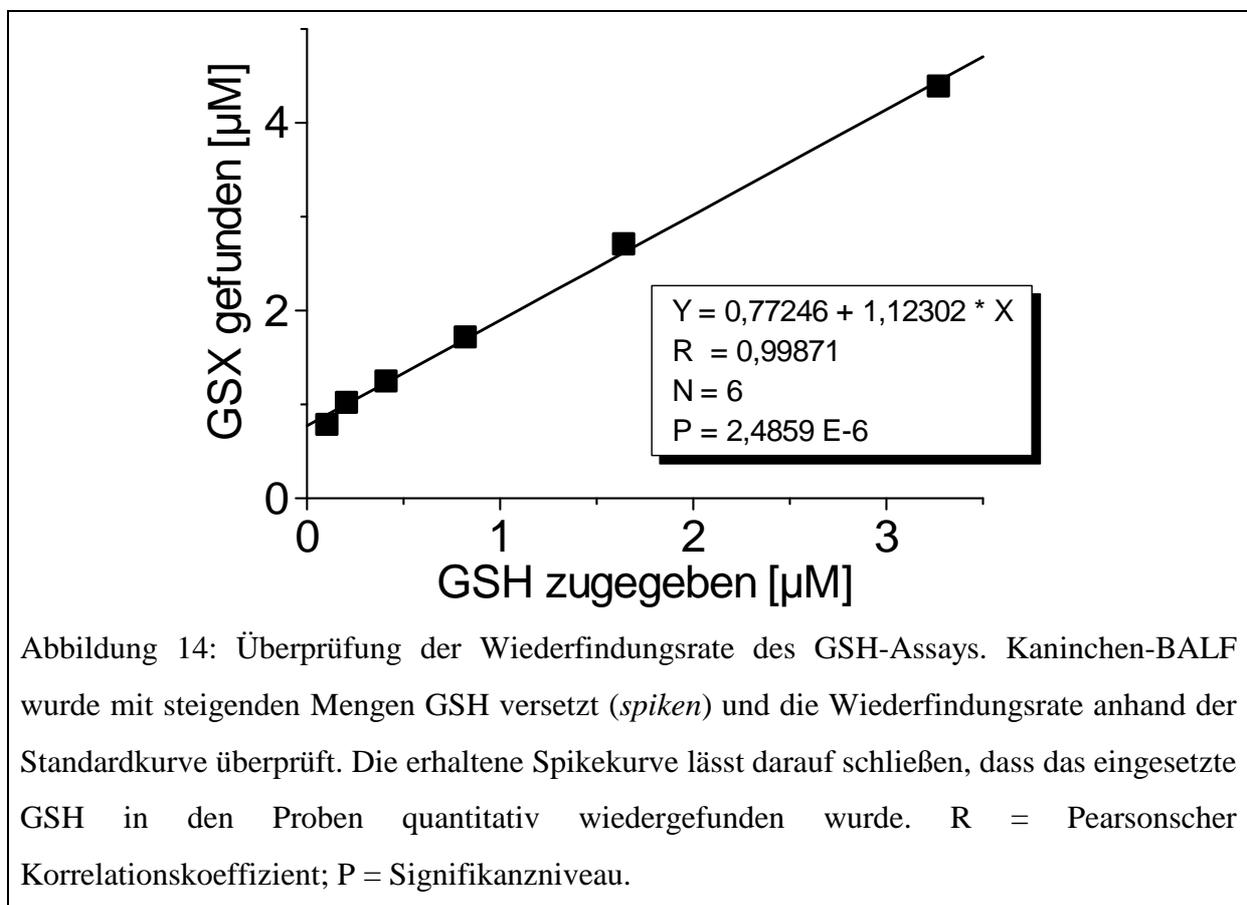
Verlauf der Standardkurven

Da durch die Komplexität der analytischen Methode die absoluten Werte für die Standards von Messung zu Messung differieren können, wurden zum Ausgleich bei jedem Messdurchgang mittels GSSG-Standards neue Standardkurven für die Berechnung der Probenkonzentrationen sowohl des oxidierten Glutathions als auch des Gesamt-Glutathions erstellt. Zu diesem Zweck enthielt jede Mikrotiterplatte acht verschiedene Standardkonzentrationen (jeweils Doppelbestimmungen, Konzentrationen siehe Kapitel 3.2.6). Über die Software des Photometers wurden per linearer Regression dann nach der Messung die Standardkurven für die GSX- (Abbildung 12) bzw. GSSG-Messung (Abbildung 13) erstellt. Für beide Messungen verliefen die Standardkurven streng stetig und wiesen eine sehr hohe Korrelation auf (Pearson-Korrelationskoeffizienten von $R = 0,99969$ bzw. $R = 0,99872$).





Überprüfung der Wiederfindungsrate



Die Wiederfindungsrate (*Recovery*) des Testverfahrens wurde überprüft, indem Aliquots derselben Kaninchen-BALF mit steigenden Mengen von GSH-Standards (insgesamt sechs Konzentrationen, jeweils Doppelbestimmung) versetzt wurden (*spiken*) und die Wiederfindung im Test anhand von Spikekurven verfolgt wurde. Die erhaltene Kurve (Abbildung 14) zeigte ein lineares Verhalten mit einer Steigung von $B = 1,123$ und einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,99871$.

Überprüfung der GSH-Blockierung

Zur Überprüfung der Blockierung des GSH bei der GSSG-Messung wurde in jedem Test ein GSH-Standard ($c = 6,4 \mu\text{M}$) mitgemessen. Dieser diente als Indikator für eine quantitative Blockierung des GSH und zeigte bei korrekter Durchführung des Testverfahrens und quantitativer Reaktion der Sulfhydrylgruppen keine Signale bei der kinetischen Messung.

Externer Standard

Sowohl bei der GSSG- als auch bei der GSX-Messung wurden regelmäßig Aliquots derselben Kaninchen-BALF als *day-to-day* Standard mitgemessen. Aus den daraus erhaltenen Daten ($n = 22$) wurden folgende Messwertverteilungen erstellt (Abbildung 15).

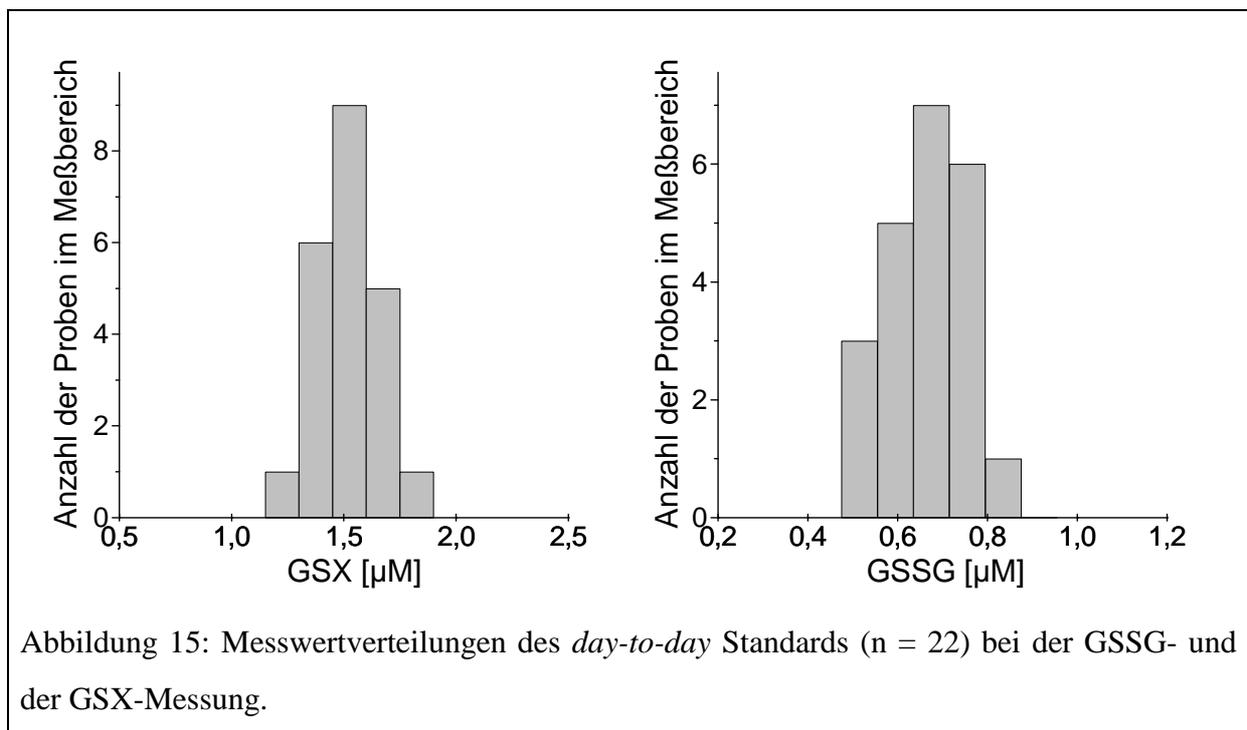


Abbildung 15: Messwertverteilungen des *day-to-day* Standards ($n = 22$) bei der GSSG- und der GSX-Messung.

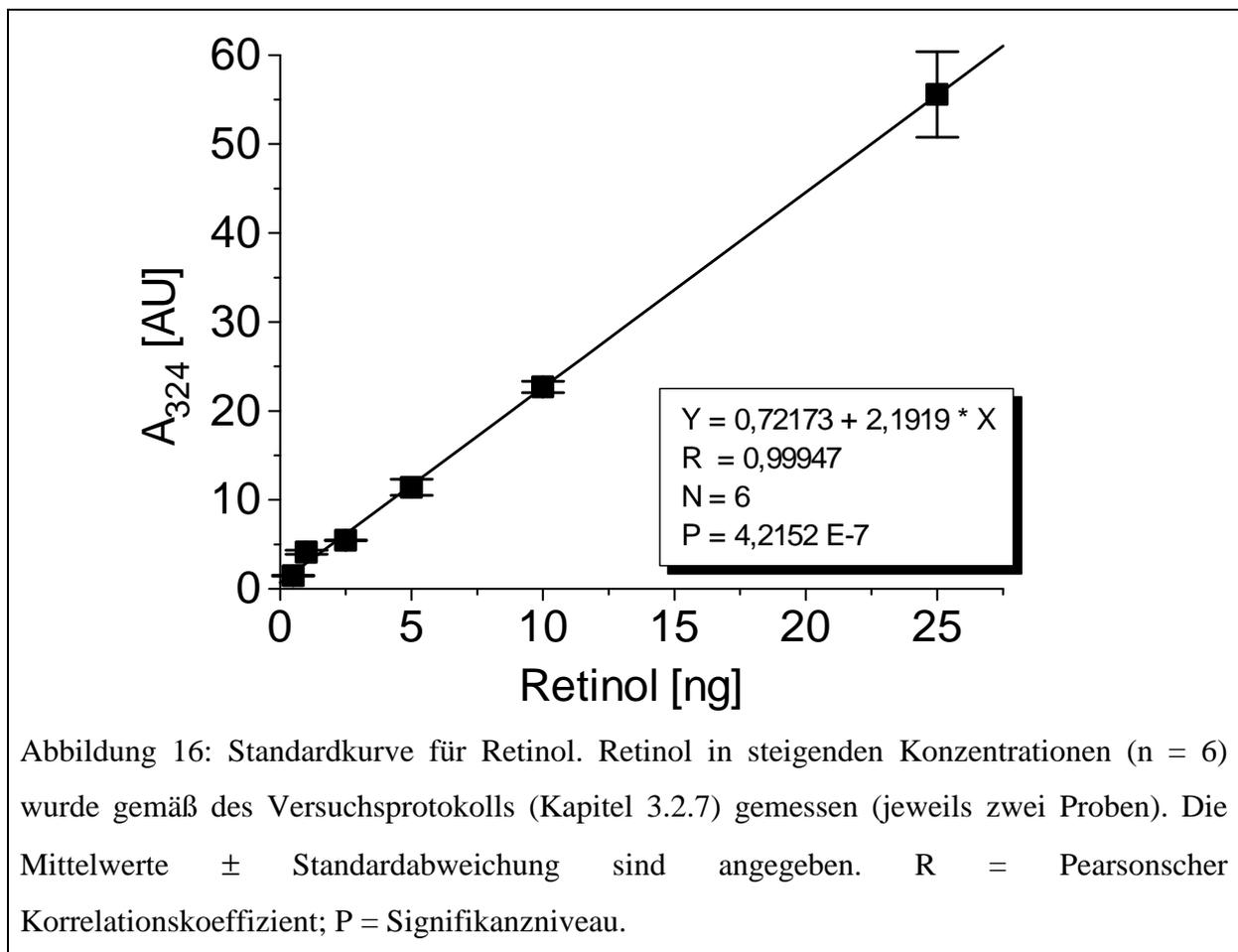
Für die GSSG Messung ergab sich ein arithmetischer Mittelwert von $0,67 \mu\text{M} \pm 0,09 \mu\text{M}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung), für die GSX-Messung ein Mittelwert von $1,54 \mu\text{M} \pm 0,13$.

4.1.2 Validierung der α -Tocopherol- / Retinol-Messung

Zum Ausgleich der variablen Verluste an Analyten sowohl während der Hexanextraktion als auch aufgrund von Pipettierungenauigkeiten wurden die zu messenden Proben vor dieser Prozedur mit 100 ng Retinol-Acetat (gelöst in 100 μ l Methanol) versetzt. Unter der Annahme, dass dieser interne Standard durch die Extraktion zu gleichen Anteilen (von den ursprünglichen 100 ng) gewonnen wird wie die eigentlichen Analyten Retinol und α -Tocopherol, ermöglicht dieses Verfahren die Berechnung eines Korrekturfaktors zur Bestimmung der eigentlichen Mengen an Analyten in der ursprünglichen Probe.

Verlauf der Standardkurven

Die Messung der Standards ergab lineare Standardkurven mit Korrelationskoeffizienten von $R = 0,99947$ für Retinol (Abbildung 16) und $R = 0,99909$ für α -Tocopherol (Abbildung 17).



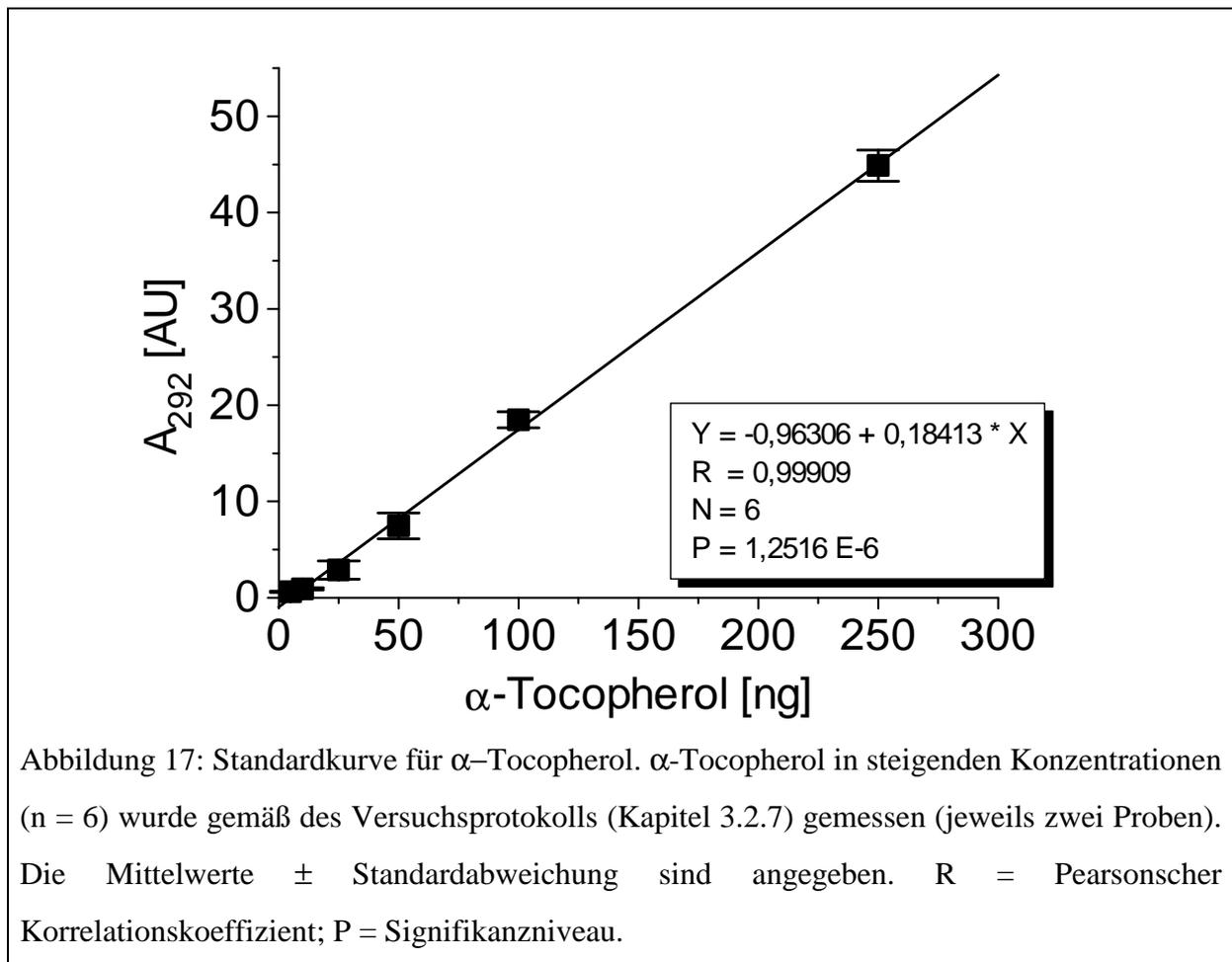
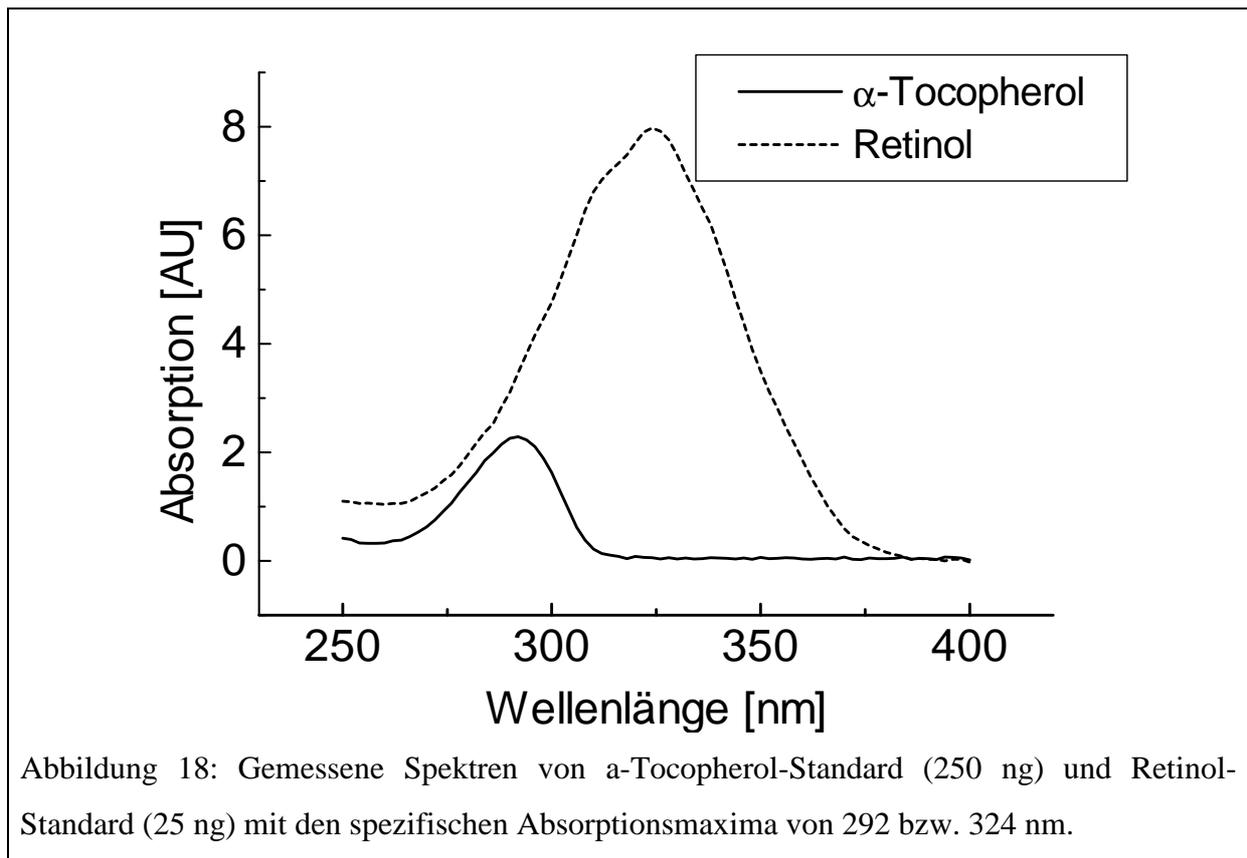


Abbildung 17: Standardkurve für α -Tocopherol. α -Tocopherol in steigenden Konzentrationen ($n = 6$) wurde gemäß des Versuchsprotokolls (Kapitel 3.2.7) gemessen (jeweils zwei Proben). Die Mittelwerte \pm Standardabweichung sind angegeben. R = Pearsonscher Korrelationskoeffizient; P = Signifikanzniveau.

Einsatz von Spektren zur Überprüfung der Peakreinheit

Die Peakcharakterisierung wurde nicht nur über die Retentionszeit, sondern auch mit Hilfe des mittels Dioden-Array-Detektion gewonnenen Peakspektrums durchgeführt. Retinol zeigte hierbei ein charakteristisches UV-Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 324 nm, α -Tocopherol ein Maximum bei 292 nm (Abbildung 18). Nur bei identischen Peakmaxima wurden die gemessenen Proben akzeptiert und flossen in die statistische Auswertung ein.



Überprüfung der Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate (*Recovery*) des Testverfahrens wurde überprüft, indem Aliquots derselben Kaninchen-BALF mit steigenden Mengen an α -Tocopherol- bzw. Retinol-Standards (insgesamt sechs Konzentrationen, jeweils Doppelbestimmungen) versetzt wurden (*spiken*) und die Wiederfindung im Test anhand von Spikekurven verfolgt wurde. Die erhaltenen Kurven Abbildung 19 und Abbildung 20 zeigten für Retinol ein lineares Verhalten mit einer Steigung von $B = 0,084$ und einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,99778$ und für α -Tocopherol ein lineares Verhalten mit einer Steigung von $B = 0,955$ und einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,99381$.

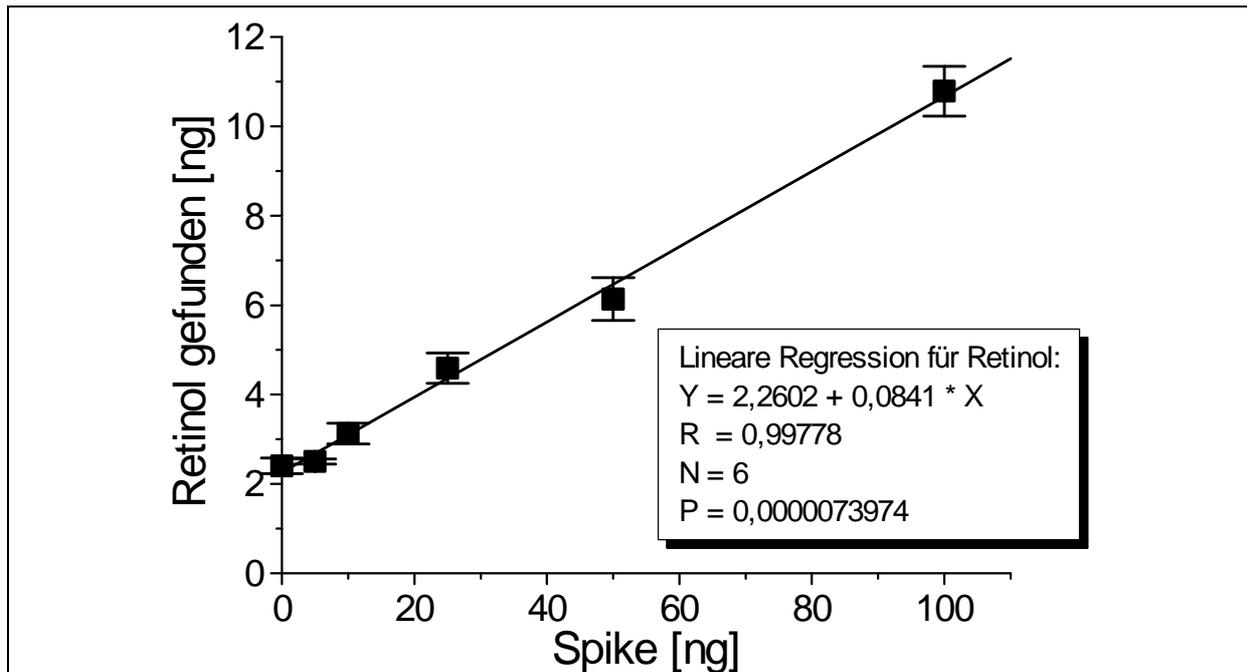


Abbildung 19: Überprüfung der Wiederfindungsrate der Retinol-Messung. Kaninchen-BALF wurde mit steigenden Mengen an Standards versetzt (spiken) und die Wiederfindungsrate anhand der Standardkurve überprüft. Die erhaltene Spikekurve lässt darauf schließen, dass die eingesetzte Menge Retinol in den Proben quantitativ wiedergefunden wurde.

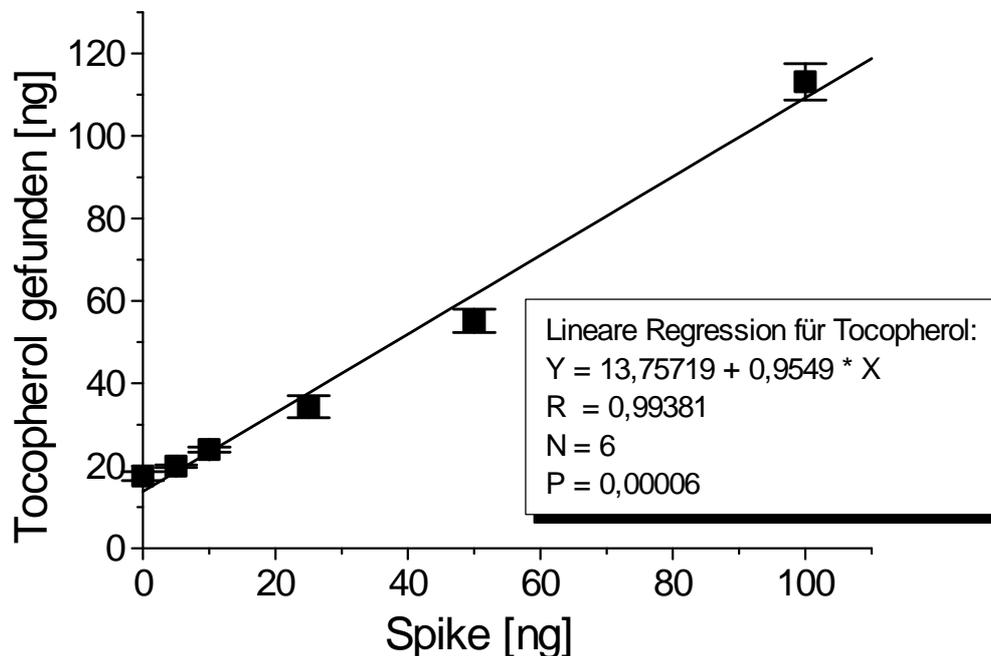


Abbildung 20: Überprüfung der Wiederfindungsrate der α -Tocopherol-Messung. Kaninchen-BALF wurde mit steigenden Mengen an Standards versetzt (spiken) und die Wiederfindungsrate anhand der Standardkurve überprüft. Die erhaltene Spikekurve lässt darauf schließen, dass die eingesetzte Menge α -Tocopherol in den Proben quantitativ wiedergefunden wurde.

Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit wurde Kaninchen-BALF aliquotiert ($n = 5$) und die Probenvorbereitung nach Kapitel 3.2.7 durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mittels HPLC gemessen. Es ergaben sich für die Retentionszeit bei Retinol $4,41 \pm 0,01$ min (MW \pm SD) und für α -Tocopherol $10,79 \pm 0,01$ min (MW \pm SD). Die jeweils gefundenen Mengen waren bei Retinol $2,25 \pm 0,12$ ng (MW \pm SD), bei α -Tocopherol $135,26 \pm 2,06$ ng (MW \pm SD).

4.1.3 Validierung der Ascorbinsäure- / Harnsäure-Messung

Verlauf der Standardkurven

Die Messung der Standards ergab lineare Standardkurven mit Korrelationskoeffizienten von $R = 0,999$ für Ascorbinsäure (Abbildung 21) und $R = 0,9985$ für Harnsäure (Abbildung 22).

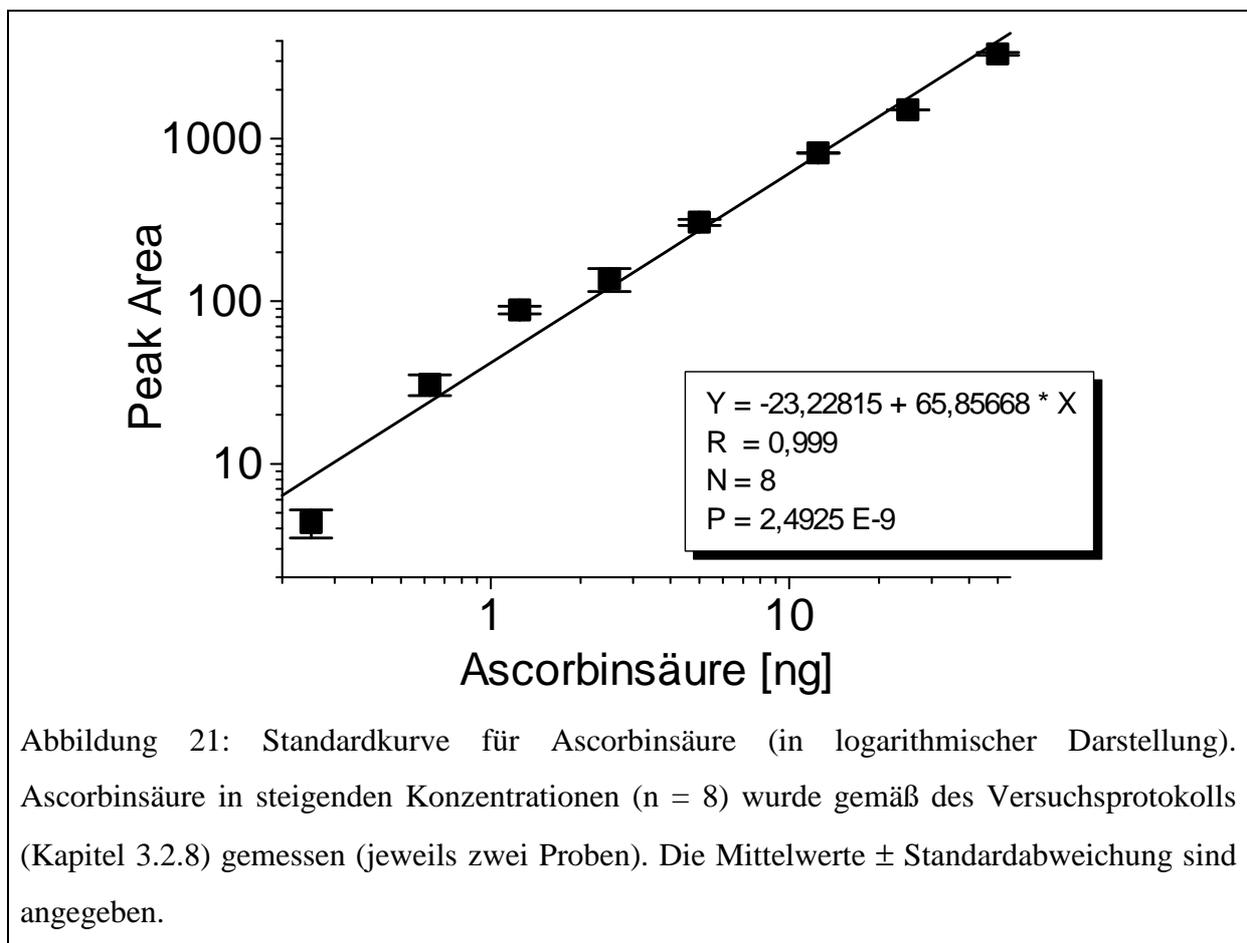


Abbildung 21: Standardkurve für Ascorbinsäure (in logarithmischer Darstellung). Ascorbinsäure in steigenden Konzentrationen ($n = 8$) wurde gemäß des Versuchsprotokolls (Kapitel 3.2.8) gemessen (jeweils zwei Proben). Die Mittelwerte \pm Standardabweichung sind angegeben.

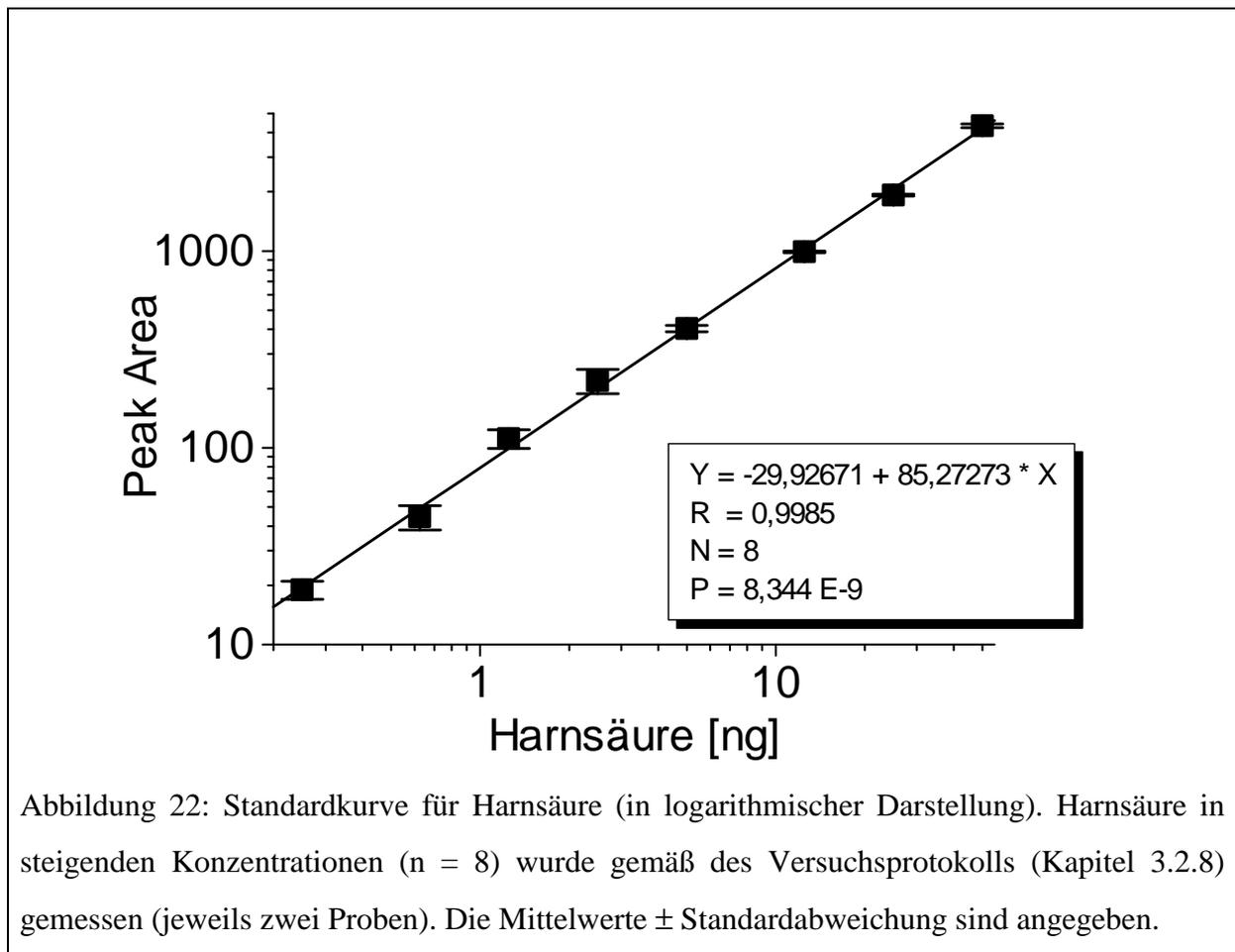


Abbildung 22: Standardkurve für Harnsäure (in logarithmischer Darstellung). Harnsäure in steigenden Konzentrationen ($n = 8$) wurde gemäß des Versuchsprotokolls (Kapitel 3.2.8) gemessen (jeweils zwei Proben). Die Mittelwerte \pm Standardabweichung sind angegeben.

Überprüfung der Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate (*Recovery*) des Testverfahrens wurde überprüft, indem Aliquots derselben Kaninchen-BALF mit steigenden Mengen an Ascorbin- bzw. Harnsäure-Standards (insgesamt sechs Konzentrationen) versetzt wurden (*spiken*) und die Wiederfindung im Test anhand von Spikekurven verfolgt wurde. Die erhaltene Kurve (Abbildung 23) zeigte für Ascorbinsäure (Harnsäure) ein lineares Verhalten mit einer Steigung von $B = 0,924$ ($B = 1,046$) und einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,99541$ ($R = 0,97122$).

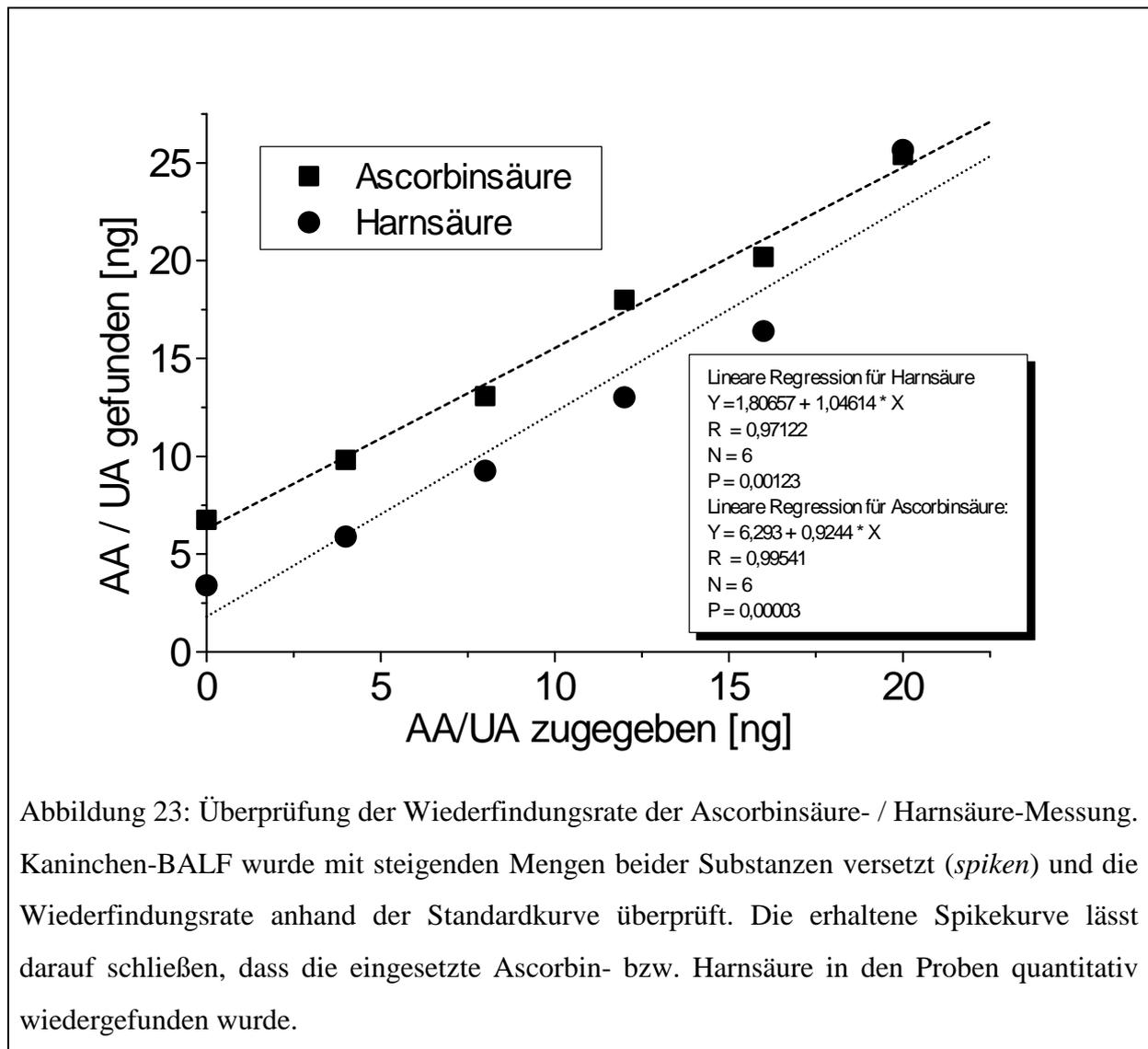


Abbildung 23: Überprüfung der Wiederfindungsrate der Ascorbinsäure- / Harnsäure-Messung. Kaninchen-BALF wurde mit steigenden Mengen beider Substanzen versetzt (*spiken*) und die Wiederfindungsrate anhand der Standardkurve überprüft. Die erhaltene Spikekurve lässt darauf schließen, dass die eingesetzte Ascorbin- bzw. Harnsäure in den Proben quantitativ wiedergefunden wurde.

Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit wurde Kaninchen-BALF aliquotiert ($n = 6$) und nacheinander gemessen. Es ergaben sich für die Retentionszeit bei Ascorbinsäure $4,271 \pm 0,001$ min (MW \pm SD) und für Harnsäure $7,170 \pm 0,004$ min (MW \pm SD). Die jeweils gefundenen Mengen waren bei Ascorbinsäure $8,69 \pm 0,26$ ng (MW \pm SD), bei Harnsäure $3,12 \pm 0,11$ ng (MW \pm SD).

In einem zweiten Versuch wurden 13 Human-BALF unterschiedlicher Patienten gemessen. Die Messung wurde circa drei Monate später mit anderen Aliquots derselben Lavagen wiederholt und die Ergebnisse miteinander korreliert (Abbildung 24 und Abbildung 25). Eine Regressionsanalyse ergab eine ausgezeichnete Korrelation zwischen beiden Messungen. Die Pearson'schen Korrelationskoeffizienten lagen bei $R = 0,995$ (Ascorbinsäure) und $R = 0,998$ (Harnsäure).

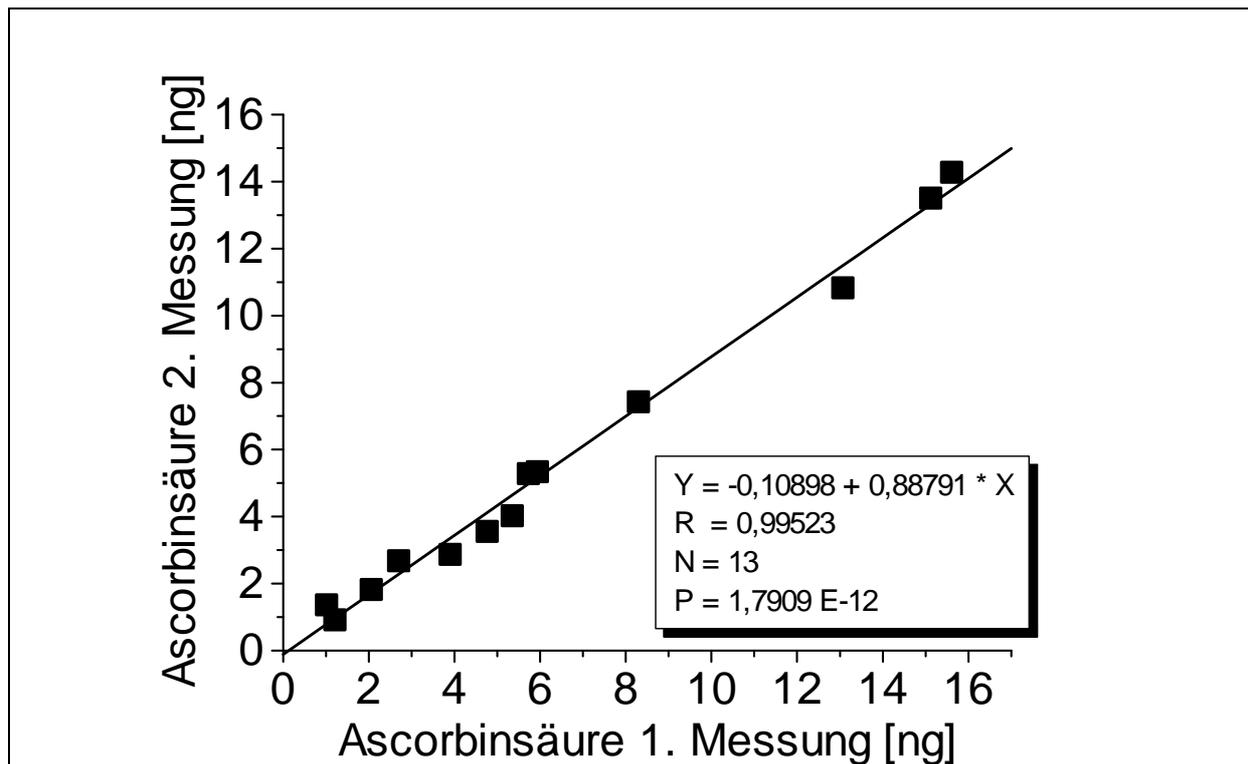


Abbildung 24: Korrelation zweier Messungen von Ascorbinsäure mit einem zeitlichen Abstand von drei Monaten.

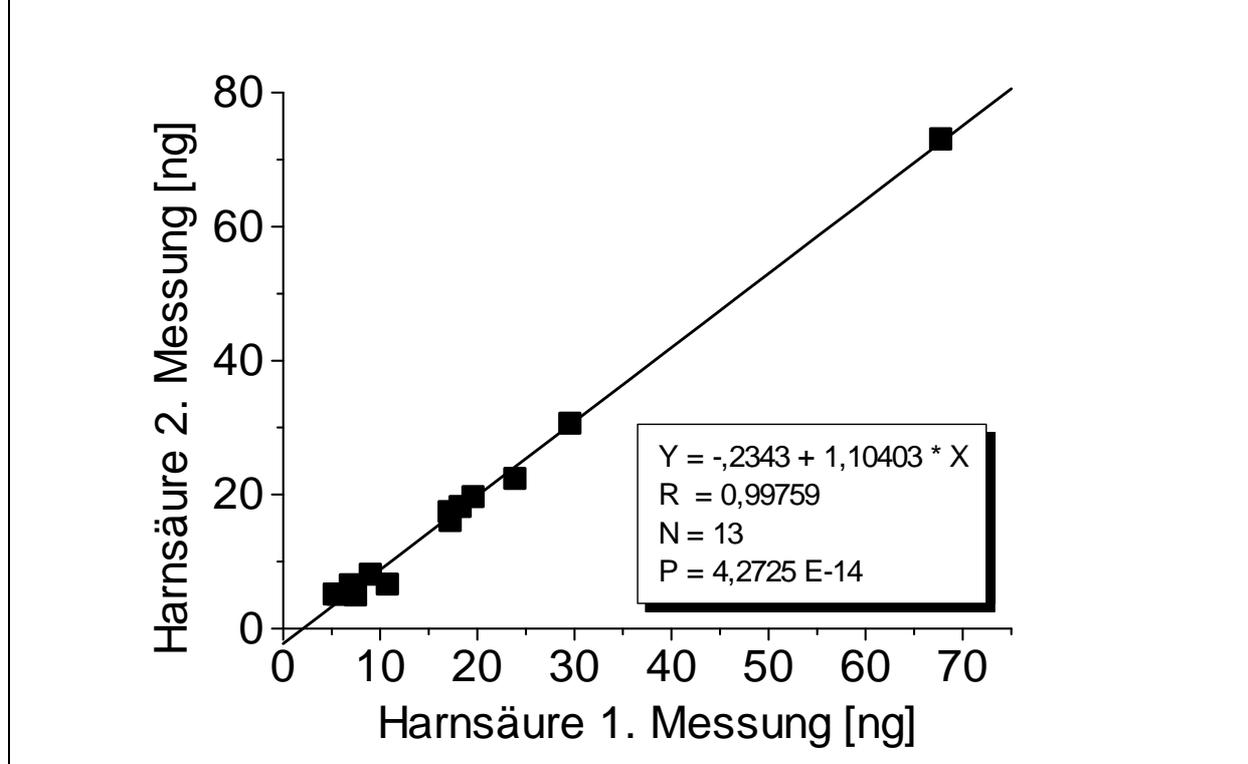
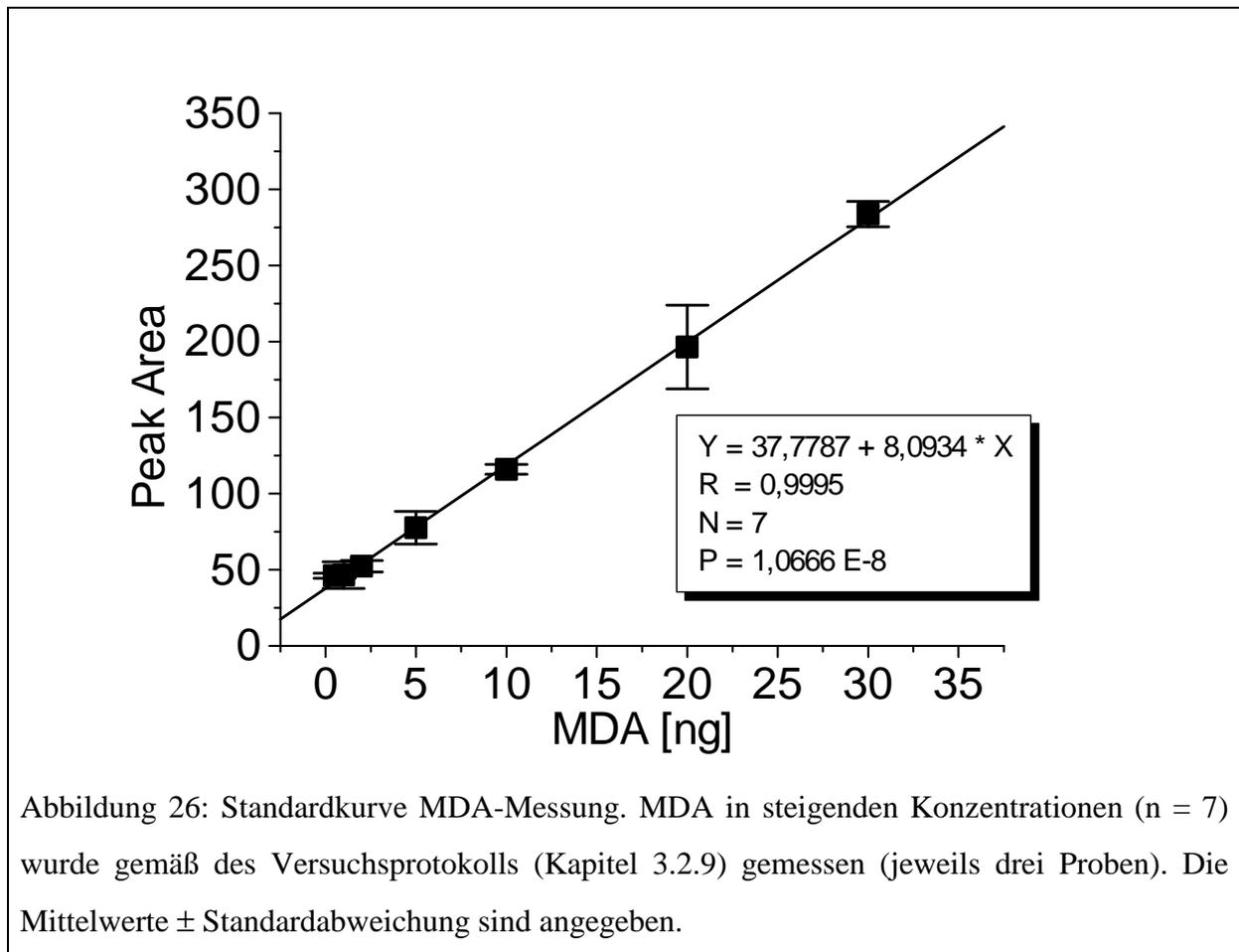


Abbildung 25: Korrelation zweier Messungen von Harnsäure mit einem zeitlichen Abstand von drei Monaten.

4.1.4 Validierung der Malondialdehyd-Messung

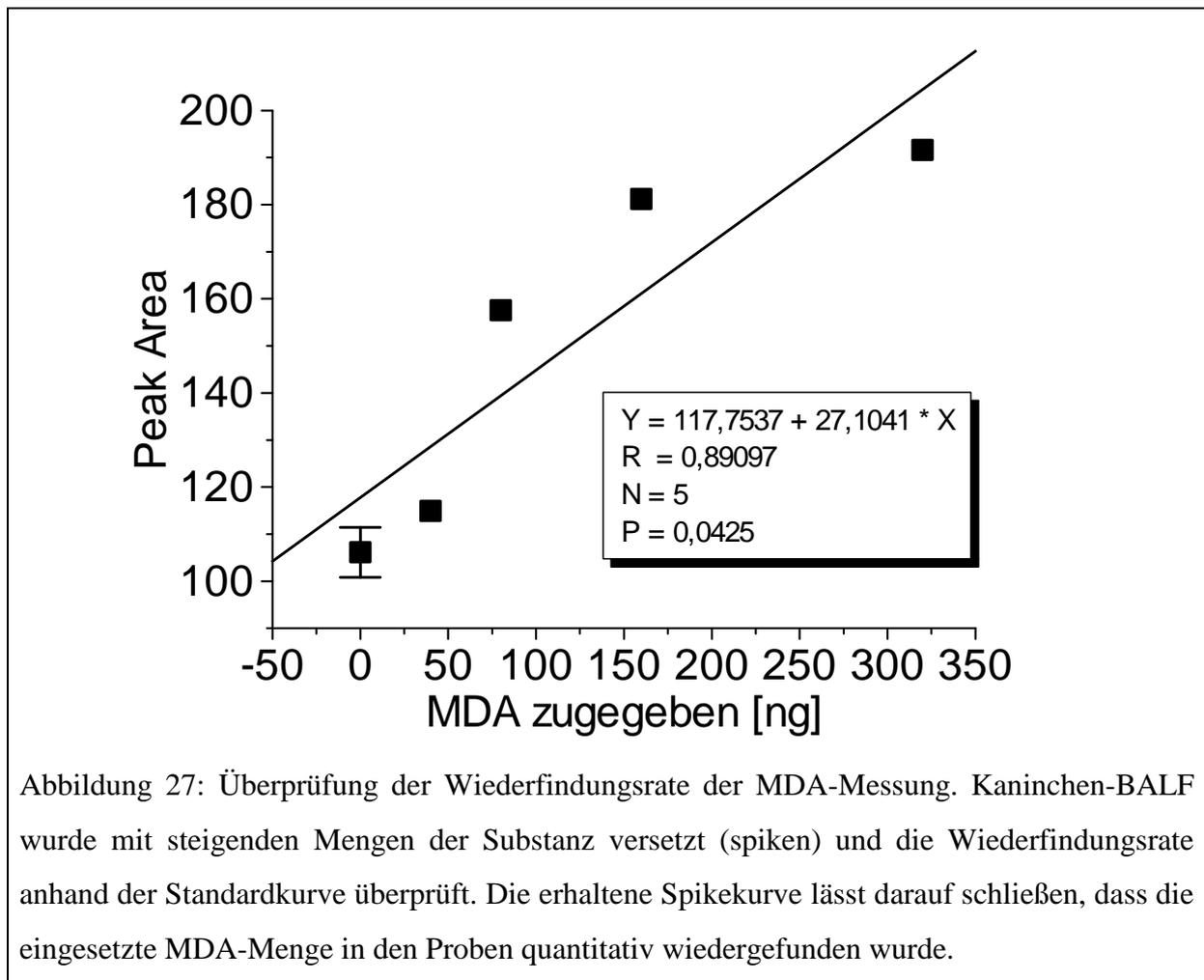
Verlauf der Standardkurve

Die Messung der Standards ergab eine lineare Standardkurve mit einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,9995$ (Abbildung 26).



Überprüfung der Wiederfindungsrate

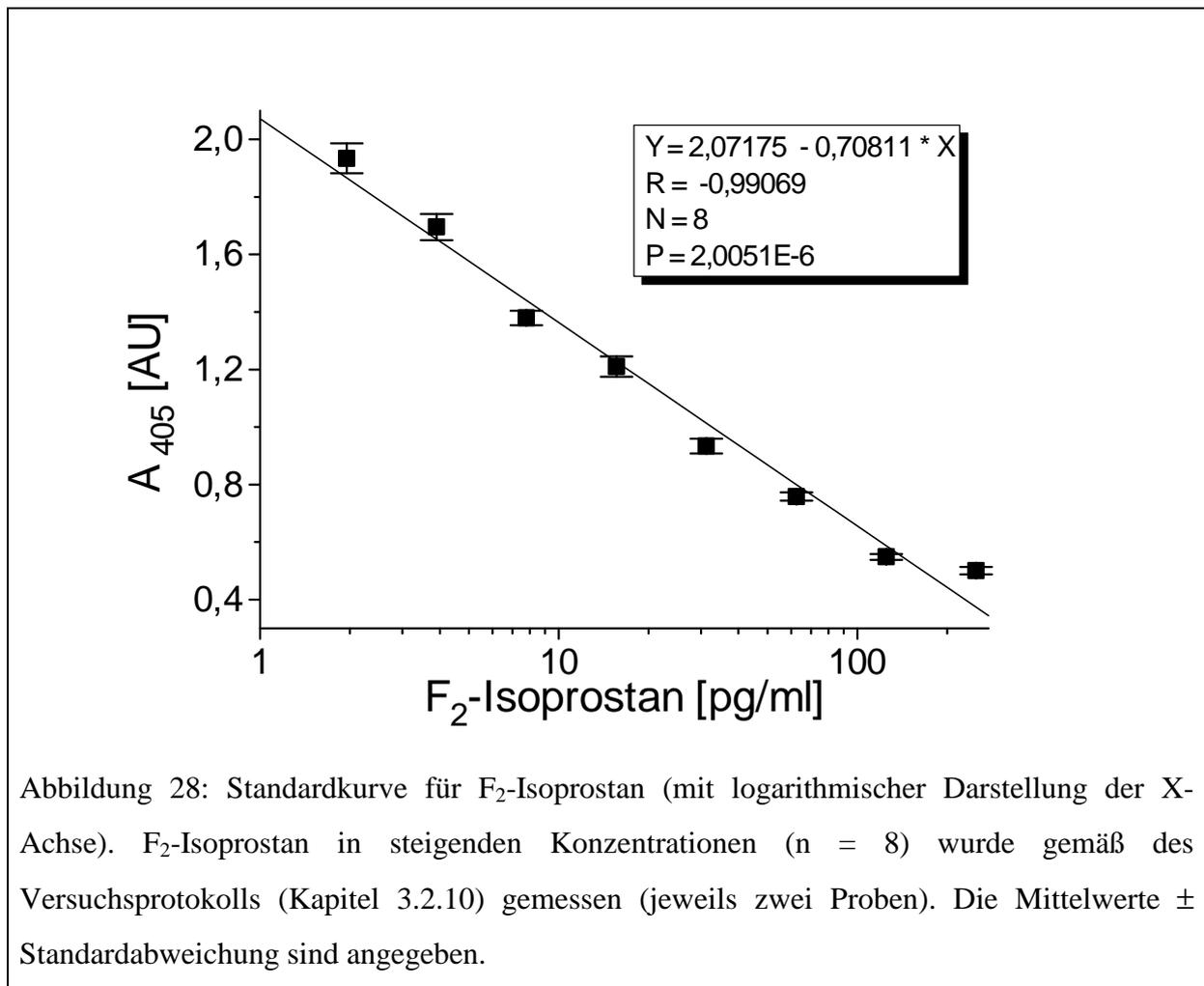
Die Wiederfindungsrate (*Recovery*) des Testverfahrens wurde überprüft, indem Aliquots derselben Kaninchen-BALF mit steigenden Mengen an MDA-Standard (insgesamt vier Konzentrationen bei jeweils $n = 1$ sowie BALF ohne Standard ($n = 3$)) versetzt wurden (*spiken*) und die Wiederfindung im Test anhand von Spikekurven verfolgt wurde. Die erhaltene Kurve (Abbildung 27) zeigte für MDA ein lineares Verhalten mit einer Steigung von $B = 27,1041$ und einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,89097$.



4.1.5 Validierung 8-Isoprostan-Messung

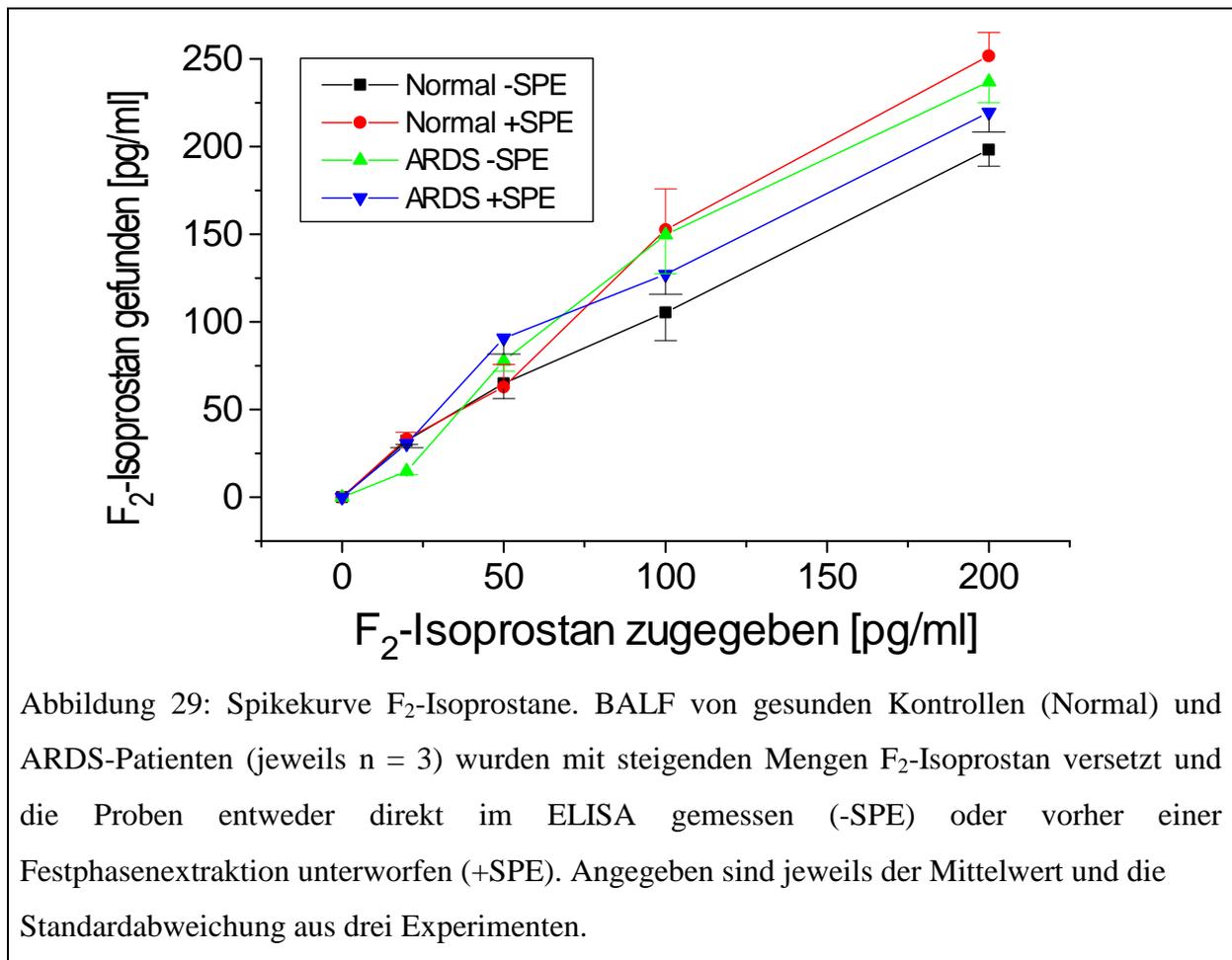
Verlauf der Standardkurve

Die Messung der Standards ergab lineare Standardkurven mit Korrelationskoeffizienten von $R = -0,991$ für F_2 -Isoprostan (Abbildung 28).



Überprüfung der Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate (*Recovery*) des ELISA wurde mittels Zugabe von endogenem F₂-Isoprostan (*Spiken*) zu BALF überprüft. Dazu wurden jeweils 400 µl BALF von gesunden Kontrollen (Normal) und von ARDS-Patienten (jeweils n = 3) mit steigenden Mengen F₂-Isoprostan (0, 20, 50, 100 und 200 pg / ml) versetzt und die Proben entweder direkt im ELISA eingesetzt (- SPE) oder vor dem ELISA eine Festphasenextraktion nach Kapitel 3.2.10 durchgeführt (+ SPE). Die erhaltenen Spikekurven (Korrelation zwischen zugegebener F₂-Isoprostan-Menge und im ELISA gefundener F₂-Isoprostan-Menge nach Abzug des in der Probe vorhandenen F₂-Isoprostan) waren sowohl zwischen ARDS-Patienten und Kontrollen als auch zwischen Proben, die direkt eingesetzt wurden und Proben mit Festphasenextraktion nahezu deckungsgleich.



Probe	A	B	R
Normal -SPE	9,3	0,96	0,996
Normal +SPE	6,2	1,27	0,994
ARDS -SPE	5,7	1,21	0,987
ARDS +SPE	14,9	1,06	0,985

Tabelle 10: Regressionsanalyse der in Abbildung 29 dargestellten Messwerte ($y = A + Bx$). Angegeben sind jeweils der y-Achsenabschnitt (A), die Geradensteigung (B) und der Pearson'sche Regressionskoeffizient R.

Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode

Die Reproduzierbarkeit des analytischen Verfahrens wurde durch Mitführen identischer interner BALF-Standards bei jedem Versuchsansatz überprüft. Hierbei ergab sich bei vier unabhängigen Experimenten ein Mittelwert von $21,08 \pm 2,30$ pg / ml (Mittelwerte \pm Standardfehler).

4.2 Messergebnisse Tiermodelle

4.2.1 Bleomycin-Modell

Aus den Lavagen der mit Bleomycin behandelten Kaninchen sowie der Kontrolltiere (siehe Kapitel 3.4.1) wurden die Parameter Glutathion (oxidiertes und reduziertes), Malondialdehyd, F₂-Isoprostane, Retinol, α -Tocopherol, Plasmalogene, Harnsäure und Ascorbinsäure bestimmt (siehe Tabelle 11)

	Kontrollen	bleo (d4)	bleo (d8)	bleo (d16)	bleo (d24)	bleo (d32)	bleo (d64)
n	9	7	7	6	6	7	6
GSH [μM]	1,06 ± 0,25 (0,52 / 0,79 / 1,88)	0,66 ± 0,26 (0,02 / 0,67 / 0,74)	0,73 ± 0,28 (0,00 / 0,61 / 1,33)	0,30 ± 0,12 * (0,03 / 0,21 / 0,60)	0,85 ± 0,31 (0,39 / 0,62 / 1,40)	1,33 ± 0,34 (0,74 / 1,22 / 1,59)	1,45 ± 0,39 (0,65 / 1,88 / 2,04)
Harnsäure [μM]	0,43 ± 0,08 (0,26 / 0,35 / 0,49)	2,32 ± 0,50 *** (1,34 / 1,61 / 3,62)	2,83 ± 1,25 ** (0,86 / 1,90 / 4,18)	1,60 ± 0,44 ** (0,94 / 1,41 / 2,15)	0,48 ± 0,09 (0,28 / 0,41 / 0,68)	0,61 ± 0,19 (0,30 / 0,46 / 0,62)	0,35 ± 0,05 (0,27 / 0,35 / 0,44)
Ascorbinsäure [μM]	2,34 ± 0,59 (0,70 / 1,93 / 3,42)	3,24 ± 0,92 (1,34 / 2,13 / 6,39)	3,64 ± 0,89 (1,86 / 3,35 / 5,33)	4,61 ± 1,80 (1,52 / 3,29 / 6,91)	6,59 ± 0,59 ** (5,06 / 6,72 / 7,63)	5,71 ± 0,61 ** (5,20 / 5,33 / 6,77)	12,36 ± 4,18 ** (7,36 / 8,70 / 21,03)
α-Tocopherol [nM]	101,1 ± 17,0 (48,9 / 116,3 / 134,2)	282,0 ± 68,9 ** (170,8 / 218,8 / 323,5)	374,5 ± 49,7 ** (234,3 / 409,2 / 480,0)	241,6 ± 69,4 (112,8 / 180,8 / 384,2)	385,2 ± 57,1 ** (244,8 / 392,6 / 535,0)	554,7 ± 111,0 *** (389,3 / 489,4 / 678,7)	288,2 ± 76,5 ** (167,7 / 248,6 / 448,3)
Retinol [nM]	6,05 ± 4,80 (0,00 / 0,52 / 4,70)	33,30 ± 7,05 * (19,23 / 39,40 / ...)	38,28 ± 10,23 * (19,34 / 42,65 / 55,03)	48,77 ± 17,43 ** (13,35 / 36,06/ 94,13)	22,26 ± 5,05 * (7,58 / 24,66 / 33,37)	21,31 ± 5,39 ** (8,34 / 19,13 / 37,45)	2,24 ± 1,66 (0,00 / 0,98 / 5,75)
Plasmalogene [μg/ml]	7,23 ± 0,55 (6,37 / 7,14 / 8,44)	7,73 ± 0,99 (5,12 / 8,00 / 10,35)	9,08 ± 1,62 (4,50 / 8,76 / 12,86)	7,40 ± 1,02 (5,76 / 6,37 / 9,32)	11,39 ± 0,48 ** (10,65 / 10,99 / 12,32)	14,98 ± 2,08 ** (10,80 / 15,60 / 17,87)	8,71 ± 1,58 (5,81 / 7,89 / 12,02)
GSSG [μM]	0,57 ± 0,08 (0,42 / 0,54 / 0,81)	0,79 ± 0,27 (0,08 / 0,78 / 0,86)	2,50 ± 1,04 (0,14 / 0,94 / 4,55)	2,13 ± 1,19 (0,72 / 0,98 / 3,21)	1,24 ± 0,58 (0,28 / 0,54 / 2,67)	1,28 ± 0,29 * (0,66 / 1,19 / 1,63)	2,23 ± 0,45 ** (1,32 / 2,18 / 3,18)
F2- Isoprostane [pM]	69,4 ± 22,7 (19,0 / 66,8 / 121,2)	173,8 ± 66,1 (71,1 / 112,6 / 307,2)	93,3 ± 23,5 (54,2 / 84,9 / 140,7)	131,3 ± 46,1 (48,2 / 119,5 / 220,2)	73,9 ± 20,5 (35,1 / 58,0 / 134,0)	85,5 ± 21,5 (33,2 / 87,7 / 117,5)	50,7 ± 9,9 (31,5 / 51,3 / 69,4)
MDA [nM]	47,8 ± 10,8 (18,3 / 46,3 / 76,7)	101,3 ± 15,8 * (66,8 / 97,7 / 138,5)	80,3 ± 13,2 (51,7 / 87,4 / 111,4)	62,3 ± 13,4 (33,5 / 69,8 / 85,0)	132,6 ± 47,4 (37,8 / 141,8 / 218,1)	268,2 ± 101,1 ** (130,3 / 200,0 / 474,4)	124,1 ± 64,3 (39,9 / 66,1 / 237,2)

Tabelle 11: Messergebnisse der Bleomycin-Studie. Alle Messungen wurden in zelldepletierter BALF durchgeführt. Kaninchen wurde 1,8 U / kg KG Bleomycin via Aerosol appliziert. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler sowie in Klammern die 25., 50. und 75. Perzentile; * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 verglichen mit den Kontrollen.

Marker für oxidativen Stress

Als Marker für alveolären oxidativen Stress wurden oxidiertes Glutathion (GSSG), Malondialdehyd (MDA) sowie F₂-Isoprostane herangezogen. Nach Bleomycin-Exposition fand sich während des gesamten Beobachtungszeitraumes (4-64 Tage) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) eine erhöhte Konzentration von GSSG. Insbesondere während der initialen, durch eine akute Lungenschädigung charakterisierten Phase, wurde ein mehrfach erhöhter Wert für GSSG gefunden. Überraschenderweise war die GSSG-Konzentration auch während der späten, fibrotischen Phase noch signifikant erhöht (Abbildung 30).

Malondialdehyd als Endprodukt der Lipidperoxidation zeigte sich initial signifikant erhöht gegenüber Kontrollen und blieb auch während des gesamten Zeitraumes oberhalb der Kontrollwerte. Nach 32 Tagen erreichte die MDA-Konzentration ihr Maximum und zeigte einen um etwa Faktor fünf über den der Kontrollen liegenden Wert (Abbildung 31).

Die Isoprostane waren vor allem in der Akutphase mit einem Maximum an Tag 4 erhöht (Abbildung 32). Ab Tag 24 folgte ein Abfall der Messwerte in den Bereich der Kontrolltiere.

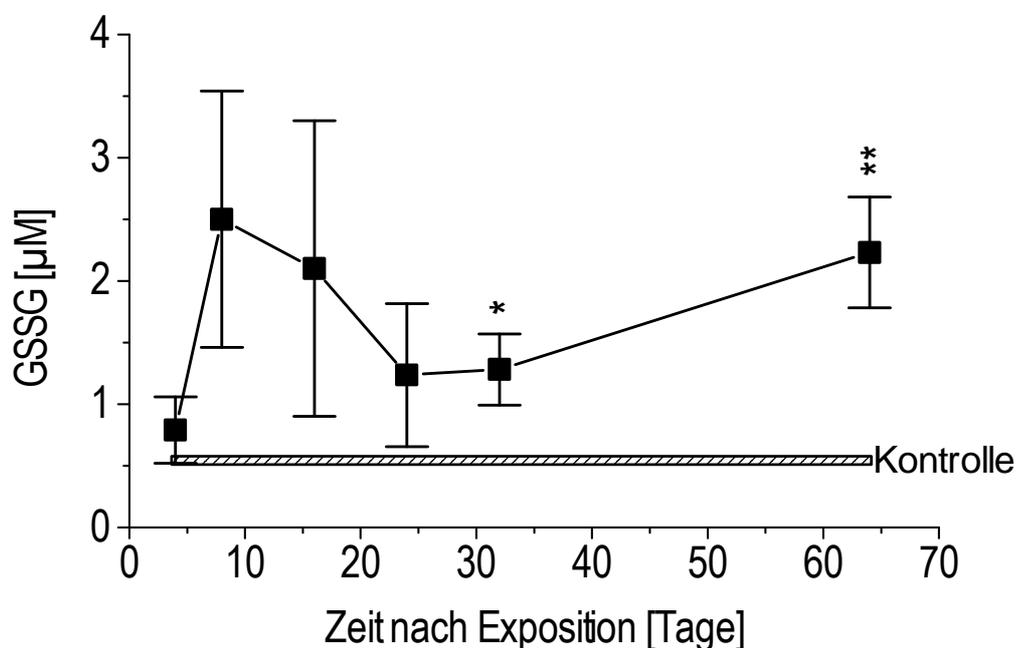


Abbildung 30: Oxidiertes Glutathion (GSSG) in BALF von Kaninchen nach Aerosolierung von Bleomycin. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ verglichen mit den Kontrollen.

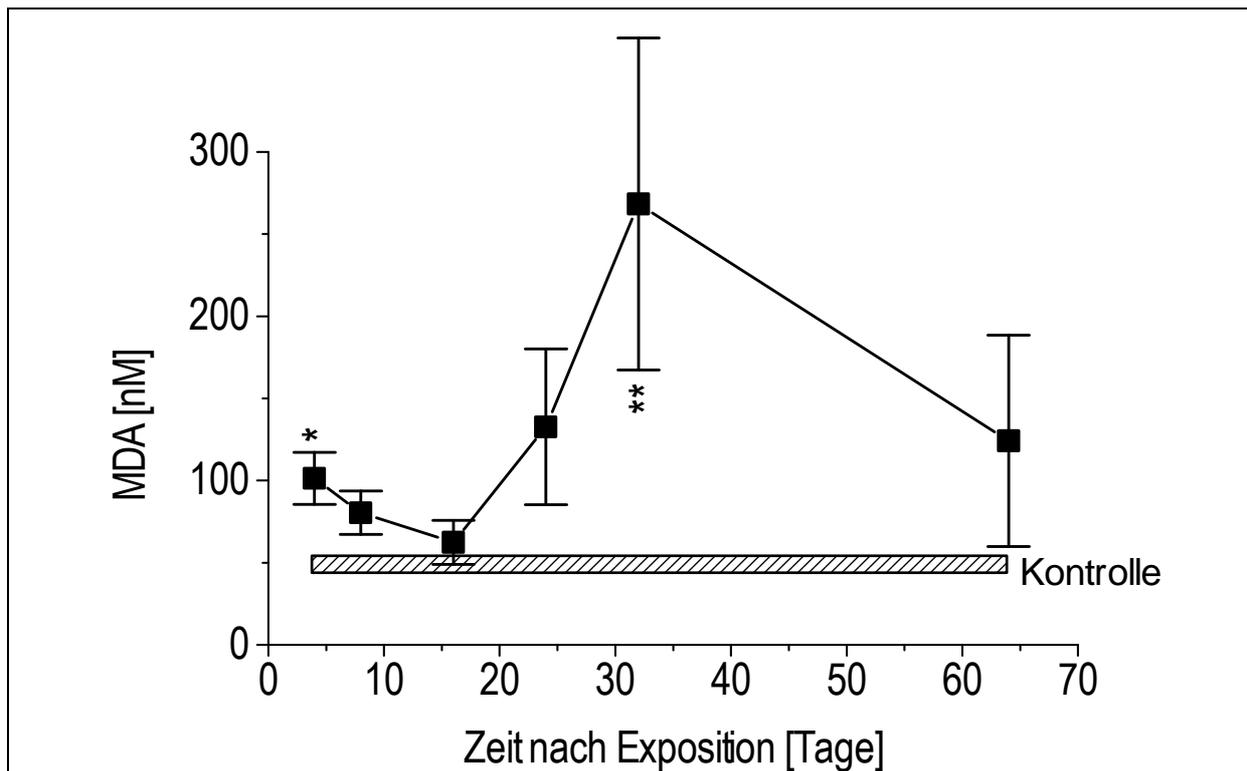


Abbildung 31: Malondialdehyd (MDA) in BALF von Kaninchen nach Aerosolierung von Bleomycin. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ verglichen mit den Kontrollen.

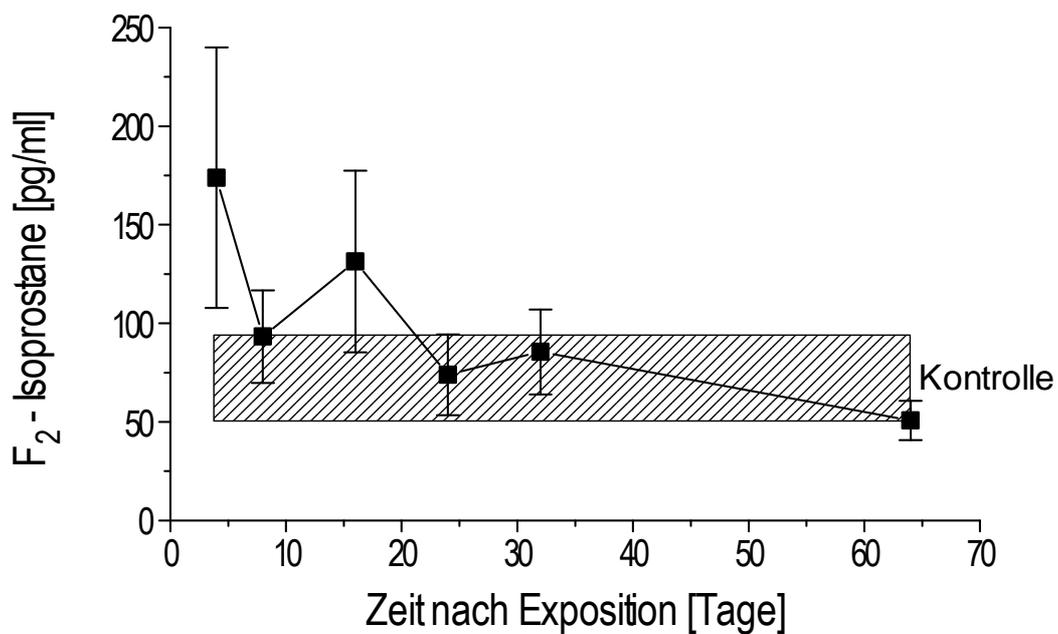


Abbildung 32: F₂-Isoprostane in BALF von Kaninchen nach Aerosolierung von Bleomycin. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler.

Antioxidantien

Die Konzentration für reduziertes Glutathion (GSH) zeigte sich in der initialen, ARDS-ähnlichen Phase gegenüber den Kontrollen erniedrigt. Insbesondere 16 Tage nach Exposition fand sich nur etwa ein Drittel der physiologischen Konzentration. Die spätere, fibroproliferative Phase zeigte eine weitgehende Normalisierung der GSH-Konzentration (Abbildung 33).

Das quantitativ gesehen häufigste Antioxidans in der BALF von jungen gesunden Kaninchen, das Plasmalogen (7,23 µg/ml, ~2,5 % der gesamten Phospholipide), zeigte nach initial unauffälligem Verlauf zu Beginn der akuten Phase einen signifikanten Anstieg bei Tag 24 und erreichte den Maximalwert bei Tag 32 nach Exposition der Kaninchen. Gegen Ende der Studie (Tag 64) glichen sich die Plasmalogenwerte der behandelten Tiere denen der Kontrollkaninchen wieder an (Abbildung 34).

Ein weiterhin untersuchter Parameter war die Harnsäure (*Uric acid*, UA). Sie zeigte charakteristischerweise einen sehr frühen Konzentrationsanstieg mit dem Maximum an Tag 8 ($p < 0,01$ gegenüber Kontrollen), um anschließend relativ rasch wieder auf gleiche Werte wie die der Kontrolltiere abzufallen und in der gesamten fibrotischen Spätphase (Tag 24-64) auf diesem Level zu bleiben (Abbildung 35). Demgegenüber zeigt Ascorbinsäure (*Ascorbic acid*, AA) als weiteres untersuchtes, wasserlösliches Antioxidans einen gegensätzlichen Verlauf: Initial nur gering erhöht, kam es erst an Tag 24 zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,01$ gegenüber Kontrollen). Interessanterweise erreichte die Ascorbinsäure ihr Maximum erst an Tag 64 ($p < 0,01$ gegenüber Kontrollen; Abbildung 36).

Das lipophile Antioxidans α -Tocopherol (Vitamin E) zeigte wiederum einen anderen zeitlichen Verlauf mit einer durchgehend signifikanten Erhöhung gegenüber den Kontrollen (lediglich Tag 16 nicht signifikant erhöht). Der Höchstwert wurde hierbei an Tag 32 erreicht (Abbildung 37).

Letzter untersuchter Parameter war das ebenfalls lipophile Retinol (Vitamin A). Anfangs kam es zu einem stetigen Anstieg dieses Parameters mit einem Maximum an Tag 16 ($p < 0,01$ gegenüber Kontrollen), um anschließend in der späteren Phase wieder abzufallen und am Tag 64 wieder auf Werte in Höhe der Kontrollgruppe zu gelangen (Abbildung 38).

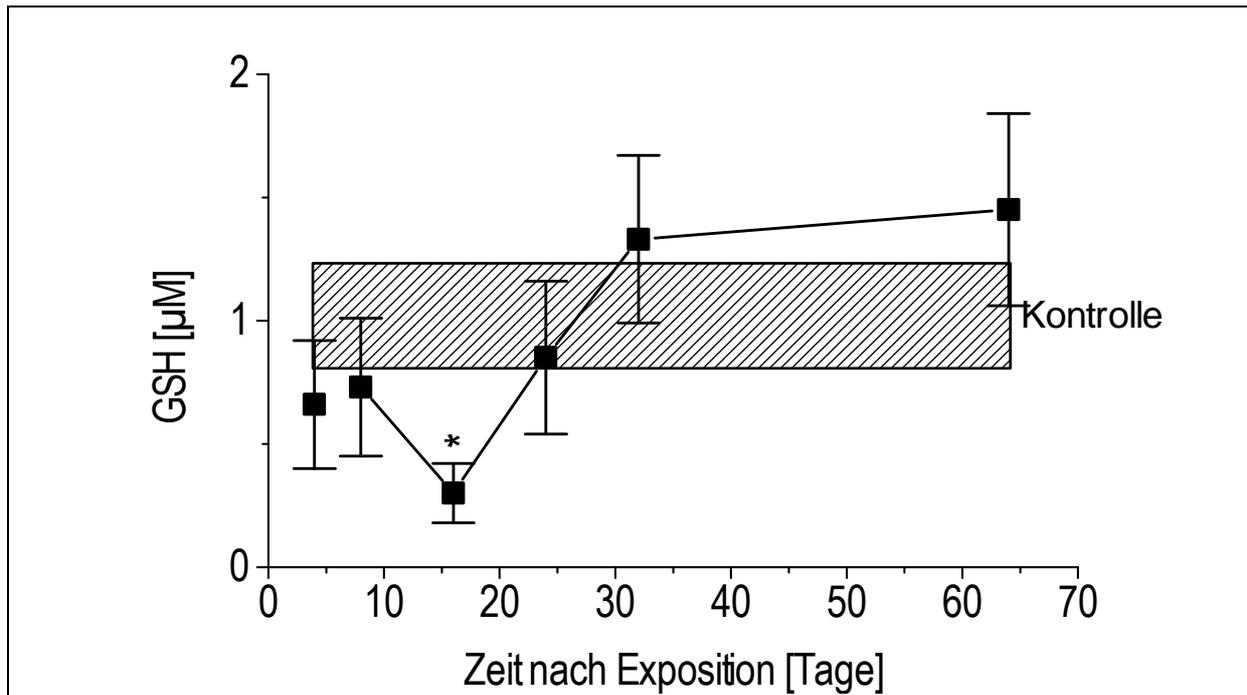


Abbildung 33: Reduziertes Glutathion (GSH) in BALF von Kaninchen nach Aerosolierung von Bleomycin. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler. * = $p < 0,05$ verglichen mit den Kontrollen.

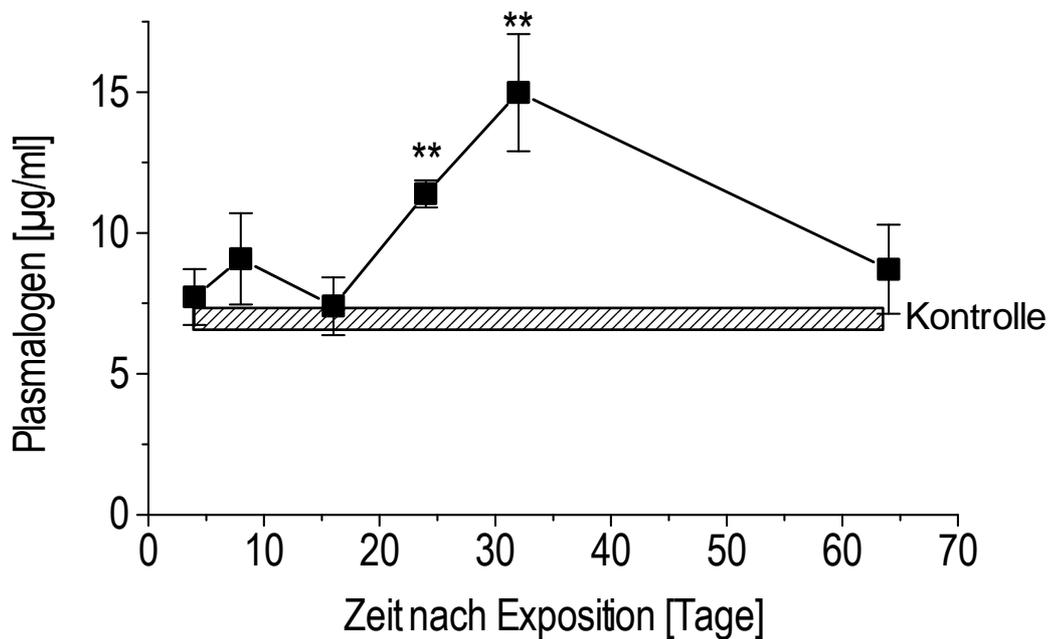


Abbildung 34: Plasmalogene des Phosphatidylcholins in BALF von Kaninchen nach Aerosolierung von Bleomycin. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler. ** = $p < 0,01$ verglichen mit den Kontrollen.

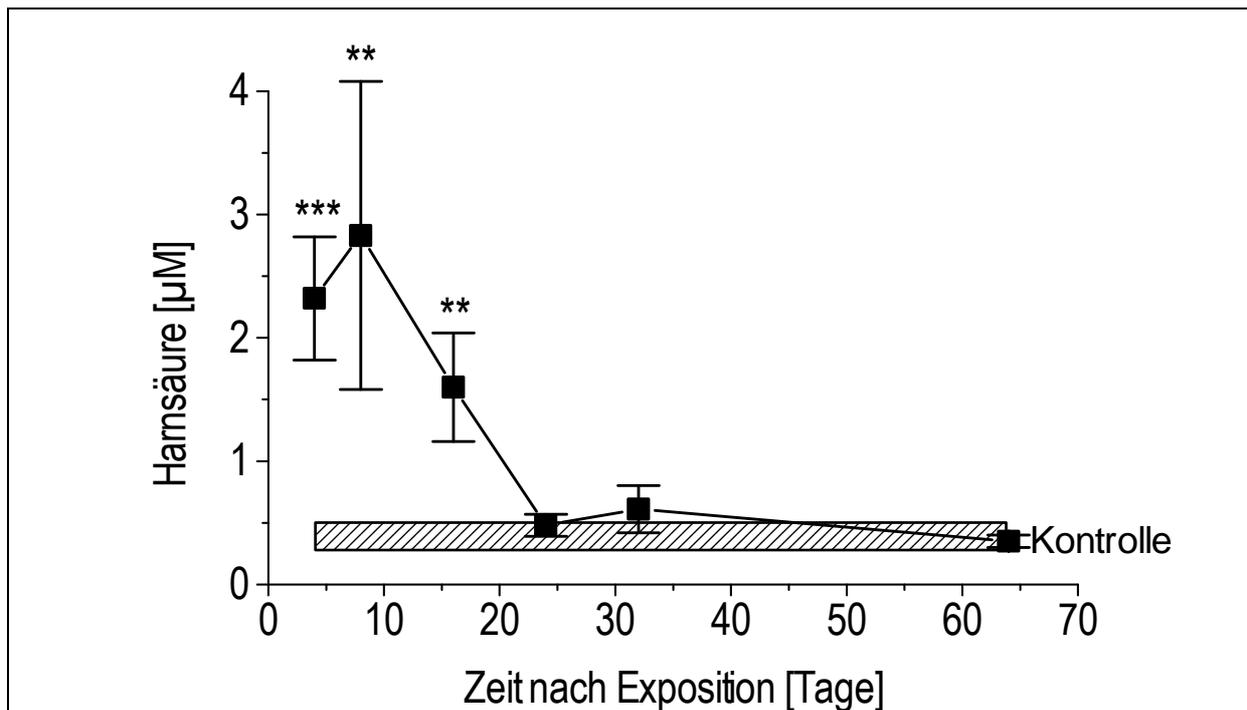


Abbildung 35: Harnsäure in BALF von Kaninchen nach Aerosolierung von Bleomycin. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ verglichen mit den Kontrollen.

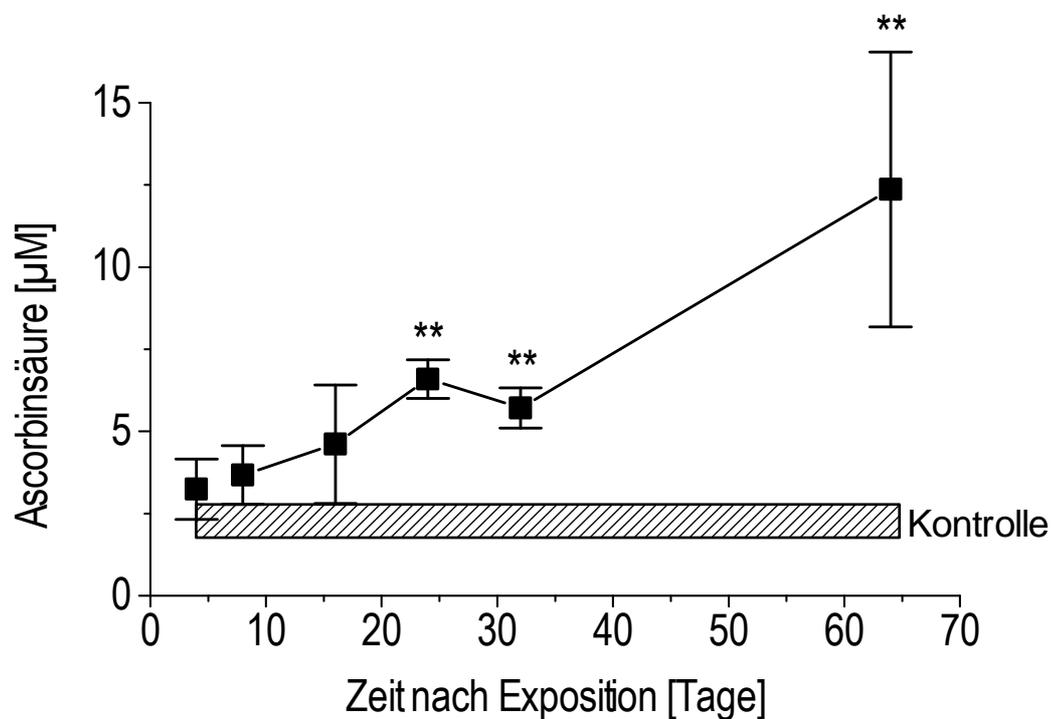


Abbildung 36: Ascorbinsäure in BALF von Kaninchen nach Aerosolierung von Bleomycin. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler. ** = $p < 0,01$ verglichen mit den Kontrollen.

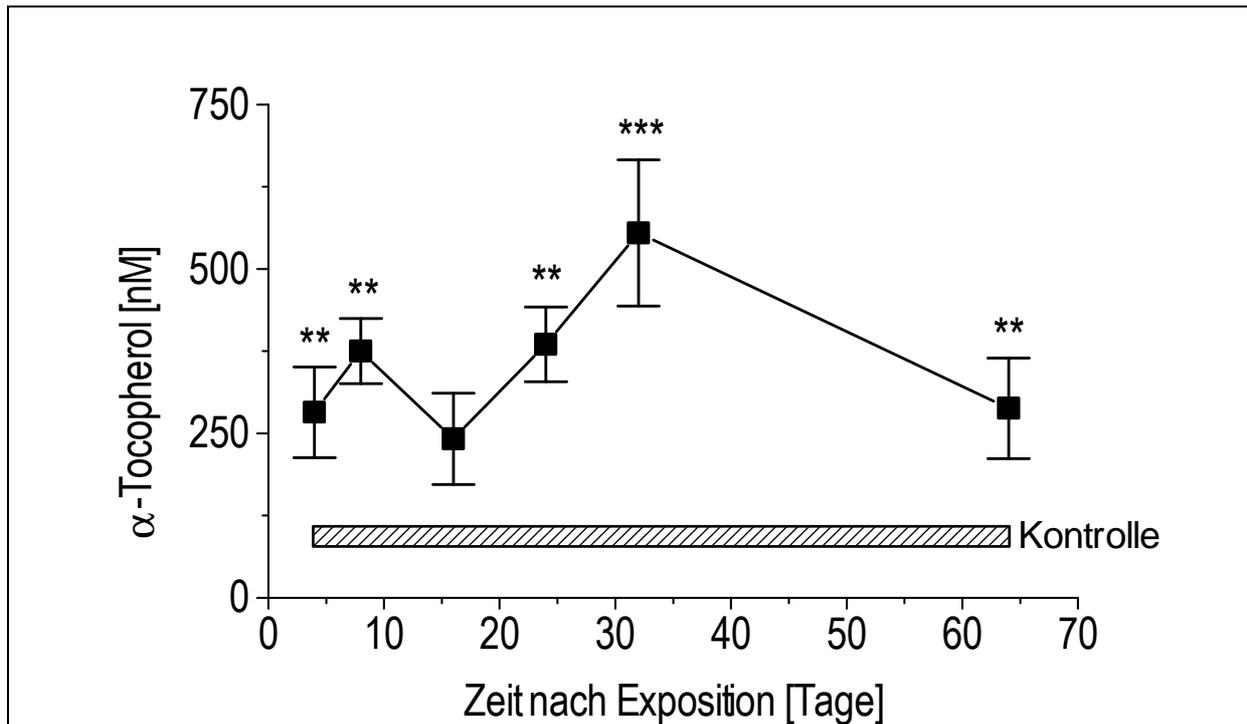


Abbildung 37: α -Tocopherol in BALF von Kaninchen nach Aerosolierung von Bleomycin. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ verglichen mit den Kontrollen.

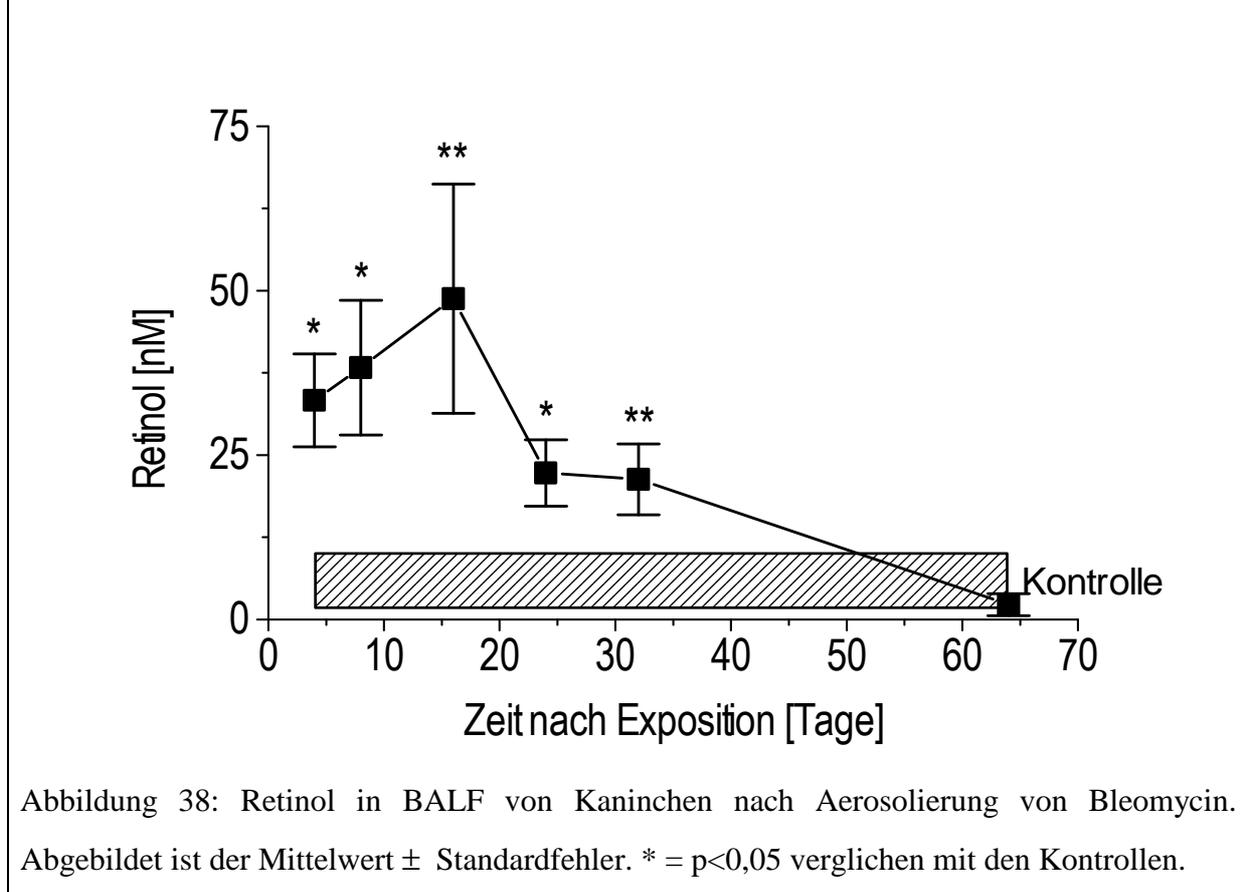


Abbildung 38: Retinol in BALF von Kaninchen nach Aerosolierung von Bleomycin. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler. * = $p < 0,05$ verglichen mit den Kontrollen.

4.3 Messergebnisse Humanlavagen

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die bei Patienten mit akut-inflammatorischen Lungenerkrankungen (ARDS und schwere Pneumonie) erhobenen Daten in zwei Bereiche unterteilt. Der erste Bereich repräsentiert Daten aus der initialen Lavage, die innerhalb eines sehr kurzen Zeitraumes nach der Intubation der Patienten durchgeführt wurde. Der zweite Bereich stellt die Entwicklung der beobachteten Parameter im Zeitverlauf dar. Hierzu wurden Patienten repetitiv in festen Zeitabständen (0, 3 und 7 Tage) lavagiert.

4.3.1 Akut-inflammatorische Lungenerkrankungen

4.3.2 ARDS und Pneumonie: Initiale Lavage

Demographische und klinische Basisdaten sind in Tabelle 12 angegeben. Die Patienten mit ARDS und Pneumonie waren signifikant älter als die Kontrollen, außerdem war der Anteil an Männern höher bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollen.

	Kontrollen	ARDS	PNEU
Anzahl [n]	20	16	27
Alter [Jahre]	29,3 ± 1,9	46,9 ± 2,9	58,8 ± 2,9
Geschlecht f/m	10 / 10	6 / 10	10 / 17
paO₂/FiO₂	n.b.	124,0 ± 9,9	222,3 ± 35,9
BALF Recovery [%]	70,7 ± 2,2	59,2 ± 3,7	59,0 ± 2,8
Neutrophile [%]	1,8 ± 0,6	61,4 ± 6,8	48,0 ± 5,9
Lymphozyten [%]	5,0 ± 0,6	4,6 ± 1,5	8,4 ± 3,3
Makrophagen [%]	93,0 ± 0,8	34,1 ± 5,7	43,6 ± 5,6
PL [µg / ml]	32,1 ± 3,4	24,0 ± 4,5	33,7 ± 5,1
Protein [mg / ml]	0,07 ± 0,00	1,01 ± 0,21	0,94 ± 0,17
PPQ	0,445 ± 0,030	0,043 ± 0,017	0,073 ± 0,014

Tabelle 12: Studienpopulation: Demographische, klinische und Routine-Labordaten. Bei allen Daten ist der Mittelwert ± Standardfehler angegeben. n.b. = nicht bekannt.

	Kontrollen	ARDS	PNEU
GSX [μM]	1,63 \pm 0,22 (1,10 / 1,43 / 1,72)	2,25 \pm 0,84 (0,67 / 1,42 / 2,13)	1,37 \pm 0,18 (0,67 / 1,13 / 2,88)
GSX / PL [M/M]	0,05 \pm 0,01 (0,02 / 0,03 / 0,05)	0,18 \pm 0,10 (0,02 / 0,06 / 0,15)	0,06 \pm 0,02 (0,01 / 0,04 / 0,08)
GSH [μM]	1,56 \pm 0,20 (1,10 / 1,40 / 1,69)	2,00 \pm 0,82 (0,56 / 1,18 / 1,93)	1,05 \pm 0,17 * (0,58 / 0,85 / 1,36)
GSH / PL [M/M]	0,05 \pm 0,01 (0,02 / 0,03 / 0,05)	0,16 \pm 0,10 (0,01 / 0,05 / 0,12)	0,05 \pm 0,02 (0,01 / 0,02 / 0,05)
GSSG [μM]	0,03 \pm 0,02 (0,00 / 0,00 / 0,03)	0,12 \pm 0,03 ** (0,00 / 0,11 / 0,22)	0,16 \pm 0,05 ** (0,00 / 0,07 / 0,18)
GSSG / PL [M / M]	0,001 \pm 0,001 (0,000 / 0,000 / 0,000)	0,007 \pm 0,002 ** (0,000 / 0,005 / 0,013)	0,007 \pm 0,003 ** (0,000 / 0,001 / 0,005)
Ascorbinsäure [μM]	0,54 \pm 0,06 (0,38 / 0,52 / 0,69)	1,44 \pm 0,36 (0,24 / 0,93 / 2,43)	1,95 \pm 0,82 (0,28 / 0,56 / 0,87)
Ascorbinsäure / PL [M / M]	0,015 \pm 0,002 (0,009 / 0,012 / 0,017)	0,070 \pm 0,022 (0,008 / 0,037 / 0,079)	0,073 \pm 0,039 (0,006 / 0,016 / 0,039)
Harnsäure [μM]	0,69 \pm 0,04 (0,57 / 0,69 / 0,82)	12,58 \pm 3,69 *** (3,77 / 9,98 / 15,83)	9,06 \pm 2,10 *** (1,69 / 3,56 / 12,06)
Harnsäure / PL [M / M]	0,020 \pm 0,002 (0,013 / 0,019 / 0,023)	0,475 \pm 0,104 *** (0,187 / 0,346 / 0,901)	0,236 \pm 0,080 *** (0,058 / 0,116 / 0,226)

Tabelle 13: Konzentrationen der hydrophilen Antioxidantien und hydrophilen Marker für oxidativen Stress in humaner BALF. Angegeben sind absolute und relative (verglichen mit der PL-Konzentration) Konzentrationen des gesamten (GSX), des oxidierten und des reduzierten Glutathion (GSSG resp. GSH), der Ascorbinsäure, und der Harnsäure. Der Mittelwert \pm Standardfehler sowie in Klammern die 25., 50. und 75. Perzentile sind gezeigt. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ verglichen mit gesunden Kontrollen.

	Kontrollen	ARDS	PNEU
α-Tocopherol [nM]	26,95 \pm 3,21 (13,33 / 28,31 / 33,37)	37,29 \pm 10,37 (12,84 / 20,44 / 41,78)	130,39 \pm 33,8 ** (27,50 / 44,93 / 176,54)
α-Tocopherol / PL [M / M] * 10³	0,67 \pm 0,06 (0,44 / 0,65 / 0,80)	1,12 \pm 0,16 * (0,61 / 0,95 / 1,65)	2,42 \pm 0,37 *** (1,34 / 1,86 / 3,67)
Retinol [nM]	3,97 \pm 0,66 (1,78 / 3,39 / 6,00)	10,57 \pm 3,06 * (2,34 / 7,68 / 14,66)	66,18 \pm 28,01 *** (4,77 / 9,63 / 52,44)
Retinol / PL [M / M] * 10³	0,10 \pm 0,02 (0,04 / 0,07 / 0,13)	0,39 \pm 0,12 *** (0,15 / 0,23 / 0,43)	0,89 \pm 0,25 *** (0,15 / 0,48 / 0,86)
Plasmalogene [ng / ml]	367,90 \pm 50,34 (193,36 / 328,44 / 470,27)	208,02 \pm 51,80 (63,76 / 208,96 / 345,64)	281,53 \pm 44,21 (123,09 / 223,54 / 402,59)
Plasmalogene / PL [M / M]	1,07 \pm 0,04 (0,99 / 1,05 / 1,16)	0,70 \pm 0,04 *** (0,60 / 0,67 / 0,80)	0,81 \pm 0,06 ** (0,60 / 0,73 / 1,06)
PUFA [μg / ml]	2,38 \pm 0,28 (1,51 / 2,19 / 3,31)	5,20 \pm 1,34 (1,57 / 4,05 / 9,34)	7,83 \pm 1,81 ** (2,24 / 5,11 / 10,50)
PUFA / FA total [%]	7,19 \pm 0,29 (6,39 / 6,79 / 8,28)	17,89 \pm 1,39 *** (15,59 / 17,48 / 20,42)	19,12 \pm 1,53 *** (13,50 / 16,36 / 25,12)
F₂-Isoprostane [pM]	26,29 \pm 5,24 (4,70 / 15,87 / 46,00)	93,50 \pm 18,22 ** (33,70 / 80,73 / 133,72)	59,01 \pm 7,55 ** (24,70 / 55,40 / 83,99)
F₂-Isoprostane / PL [M / M]	0,79 \pm 0,18 (0,15 / 0,47 / 1,34)	4,47 \pm 1,13 *** (0,94 / 3,80 / 6,21)	2,69 \pm 1,18 * (0,51 / 1,11 / 1,88)

Tabelle 14: Konzentrationen der lipophilen Antioxidantien und der lipophilen Marker für oxidativen Stress in humaner BALF. Angegeben sind absolute und relative (in Relation zur PL-Konzentration) Konzentrationen des α -Tocopherol, des Retinol, der Plasmalogene aus Gesamt-Phospholipiden, der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) und der F₂-Isoprostane. Der Mittelwert \pm Standardfehler sowie in Klammern die 25., 50. und 75. Perzentile sind gezeigt. * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 verglichen mit den Kontrollen.

Die Phospholipid-Konzentration (PL) bei den Pneumonie- und ARDS-Kollektiven unterschied sich nicht signifikant. Die Zellanalyse der BALF zeigte einen Anstieg des Anteils an Neutrophilen in Verbindung mit einem Abfall des relativen Makrophagenanteils. Das

Gesamtprotein bei Pneumonie- und ARDS-Patienten war stark erhöht, was zu einem Abfall des Phospholipid-Protein-Verhältnisses (PPQ) um etwa Faktor 10 führte.

Marker für oxidativen Stress

Patienten mit ARDS und Pneumonie zeigten signifikant ($p < 0,01$) erhöhte Konzentrationen an oxidiertem Glutathion (GSSG) verglichen mit den Kontrollen (Abbildung 39). In gleicher Weise waren F_2 -Isoprostane als Indikator für Lipidperoxidation signifikant erhöht, was auf oxidativen Stress hinweist (Abbildung 40).

Es war sowohl bei Patienten als auch bei den gesunden Kontrollen nicht möglich, mit der momentan im Labor etablierten Messmethodik (HPLC und Fluoreszenz-Detektion) Malondialdehyd (MDA) als Abbauprodukt der Lipidperoxidation zu messen. Dies deutete auf sehr niedrige MDA-Spiegel in BALF hin.

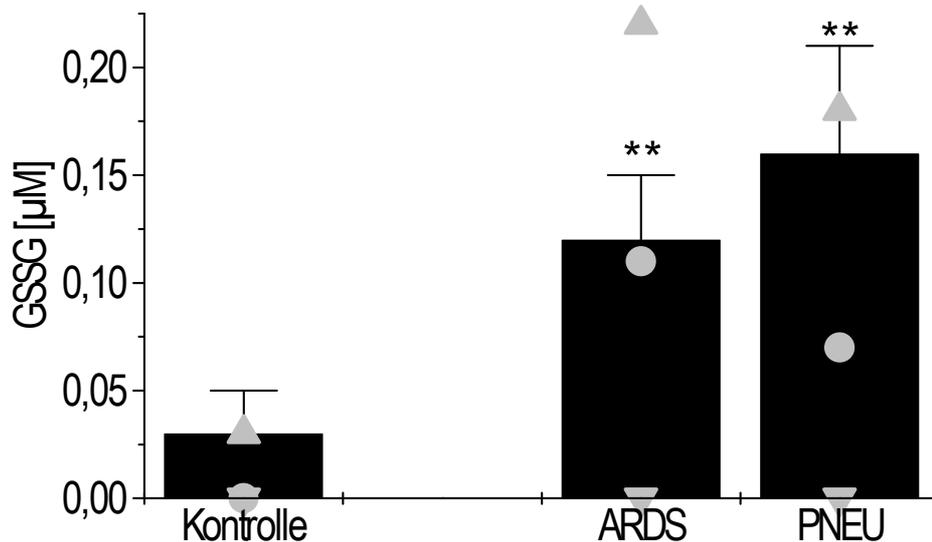
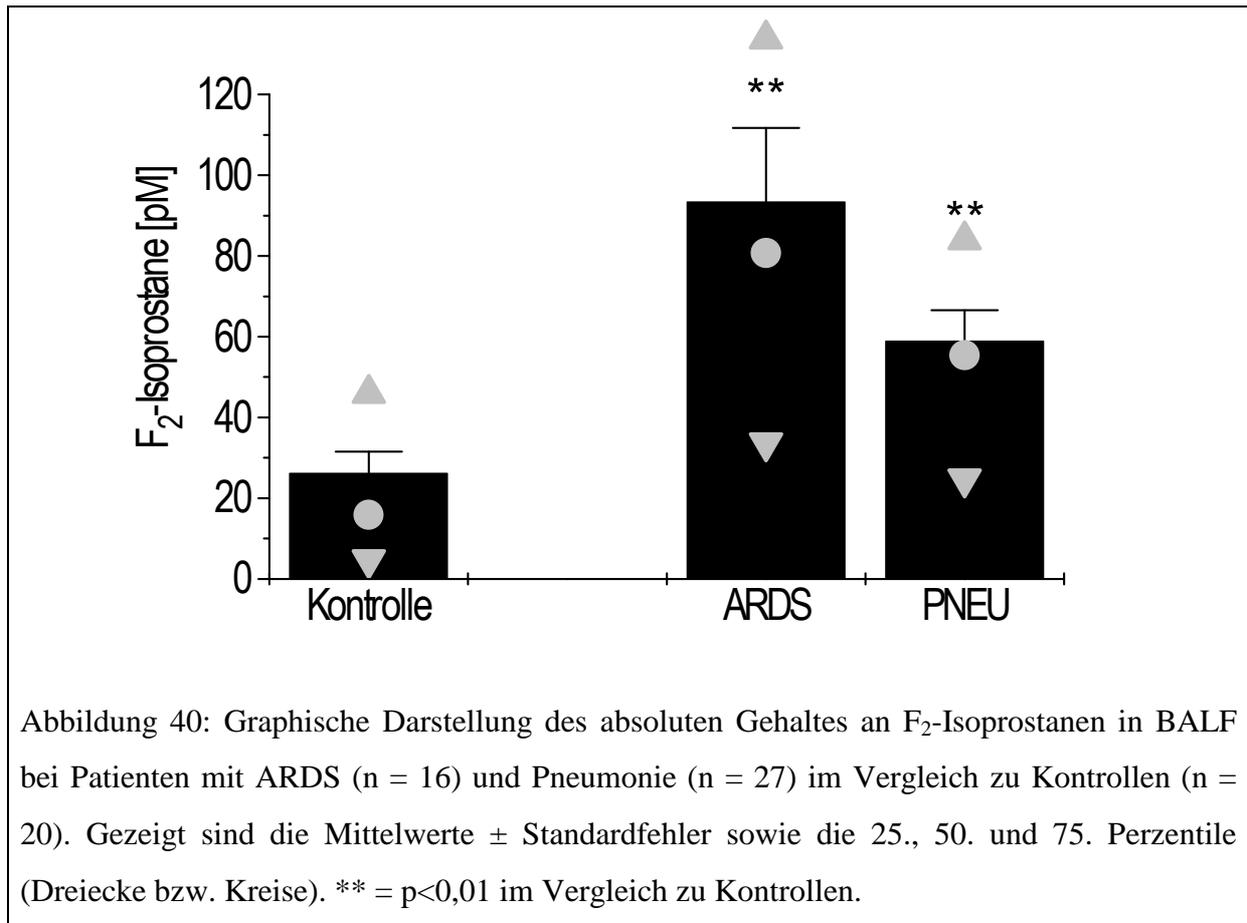


Abbildung 39: Graphische Darstellung des absoluten Gehaltes an oxidiertem Glutathion (GSSG) in BALF bei Patienten mit ARDS ($n = 16$) und Pneumonie ($n = 27$) im Vergleich zu Kontrollen ($n = 20$). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise). ** = $p < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.



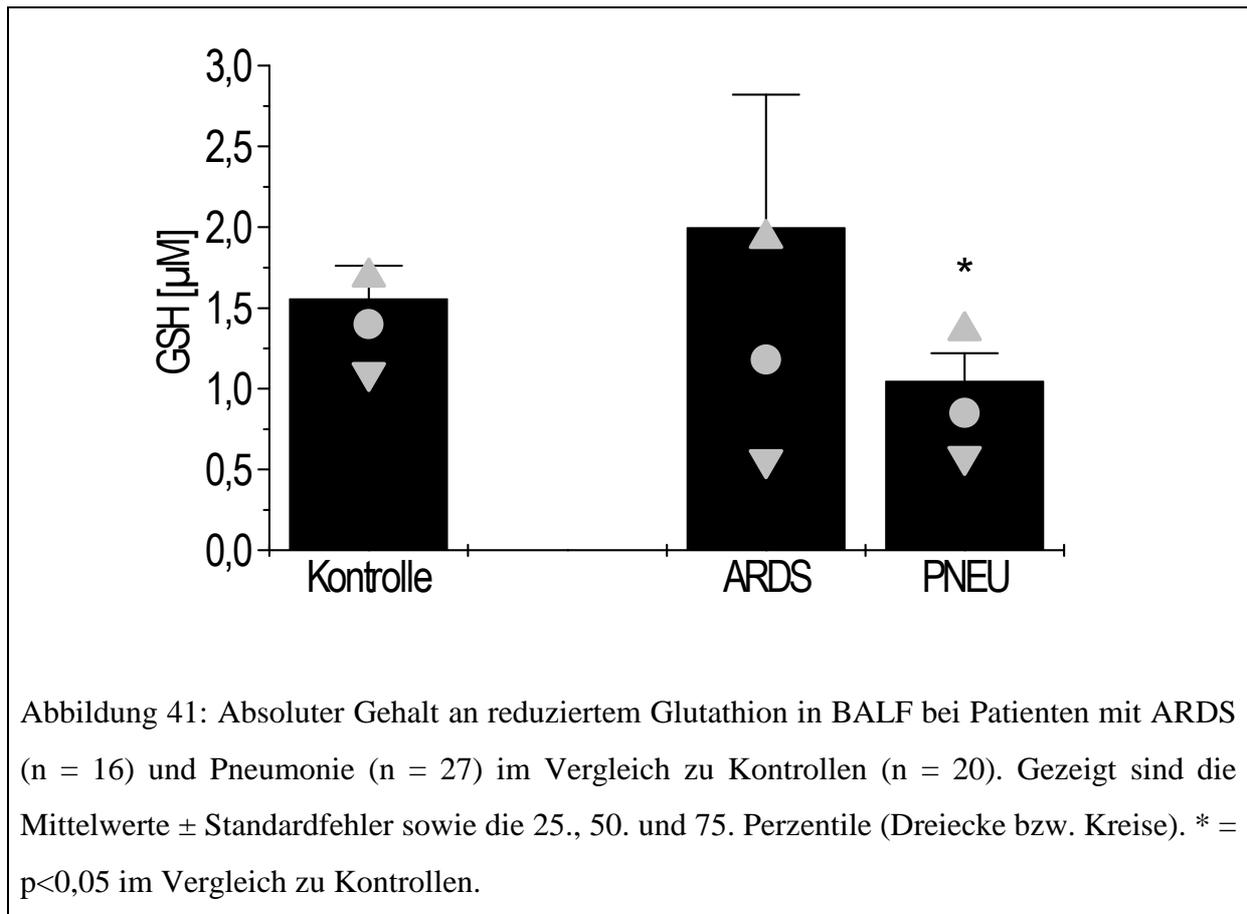
Antioxidantien

In BALF von gesunden Kontrollen ist reduziertes Glutathion quantitativ das häufigste Antioxidans (~1,6 µM), gefolgt von Ascorbinsäure (~0,5 µM) und Harnsäure (~0,7 µM). Häufigste lipophile Antioxidantien waren die Plasmalogene (368 ng/ml, entsprechend etwa 0,5 µM bei einer approximierten relativen Molekularmasse von 734), gefolgt von α-Tocopherol (~27 nM) und Retinol (~4 nM) (Tabelle 13 und Tabelle 14).

Die Konzentrationen an reduziertem Glutathion (GSH) waren bei Pneumonie gegenüber den Kontrollen signifikant reduziert (Abbildung 41). Die Analyse der Ascorbinsäure mittels HPLC zeigte zwar deutliche Anstiege bei beiden Kollektiven, aufgrund der Streubreite der Daten kam es jedoch zu keinen Signifikanzen (Abbildung 42). Harnsäure war bei beiden Patienten-Kollektiven hochsignifikant erhöht (Abbildung 43).

Die Messung von α-Tocopherol ergab einen leichten, aber nicht signifikanten Anstieg bei ARDS (Abbildung 44). Bei Korrektur durch die BALF-Gesamtphospholipidkonzentration zeigte sich jedoch eine signifikante Erhöhung (p<0,05). Die α-Tocopherol-Spiegel der Pneumonie-Patienten waren ungefähr fünffach (p<0,01) gegenüber den Kontrollen erhöht. Die Konzentrationen von Retinol waren circa dreifach bzw. sechzehnfach erhöht bei ARDS (p<0,05) und Pneumonie (p<0,001; Abbildung 45).

Aufgrund des Mangels an BHT-behandeltem BALF-Material wurden Plasmalogene und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) nur in 14 Kontrollen, 8 ARDS- und 24 Pneumonie-Patienten gemessen. Die Konzentrationen der PUFA, die sich unter oxidativem Stress als *sacrificial agents* verhalten könnten, waren bei den ARDS-Kollektiven etwas doppelt und den Pneumonie-Kollektiven etwa dreifach ($p < 0,01$) so hoch wie bei den Kontrollen. Hingegen fand sich eine erniedrigte Konzentration der Plasmalogene innerhalb der Patientengruppen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Der Abfall ist nicht signifikant.



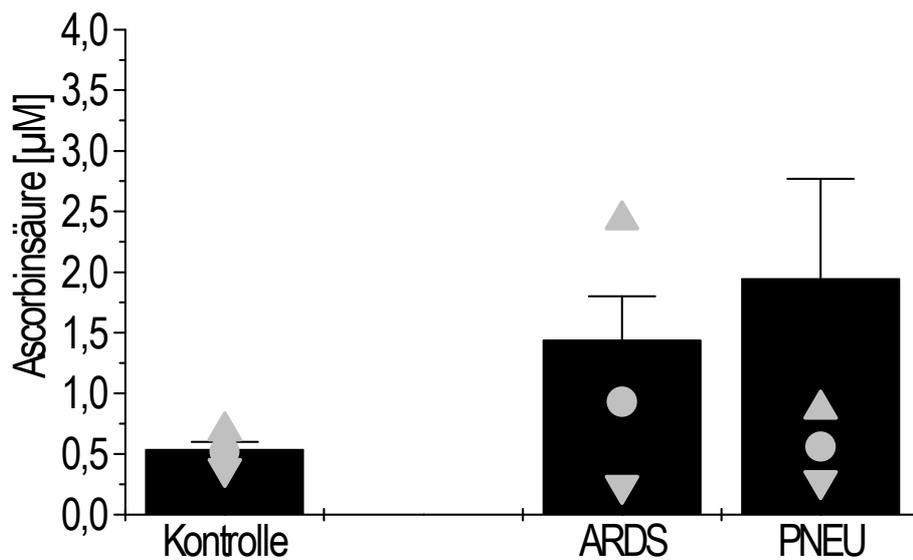


Abbildung 42: Absoluter Gehalt an Ascorbinsäure in BALF bei Patienten mit ARDS (n = 16) und Pneumonie (n = 27) im Vergleich zu Kontrollen (n = 20). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise).

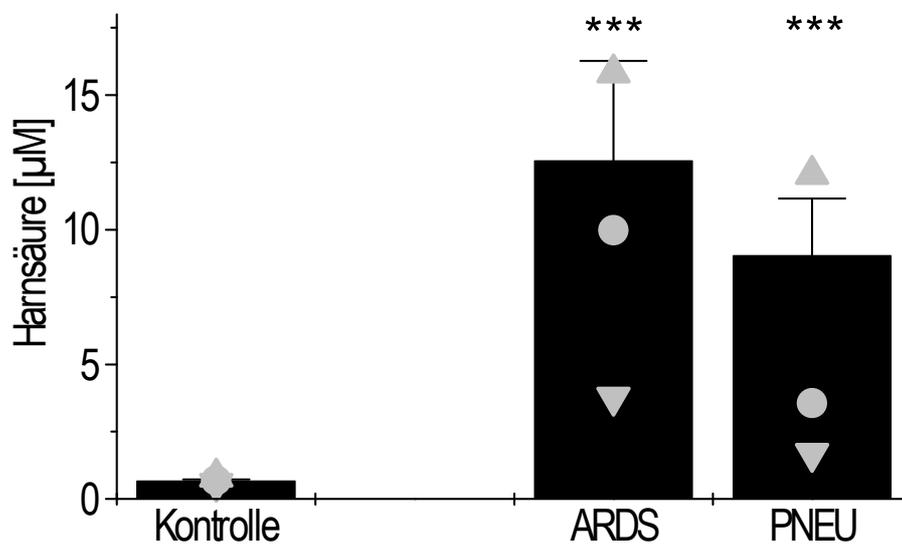


Abbildung 43: Absoluter Gehalt an Harnsäure in BALF bei Patienten mit ARDS (n = 16) und Pneumonie (n = 27) im Vergleich zu Kontrollen (n = 20). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise). *** = $p < 0,001$ im Vergleich zu Kontrollen.

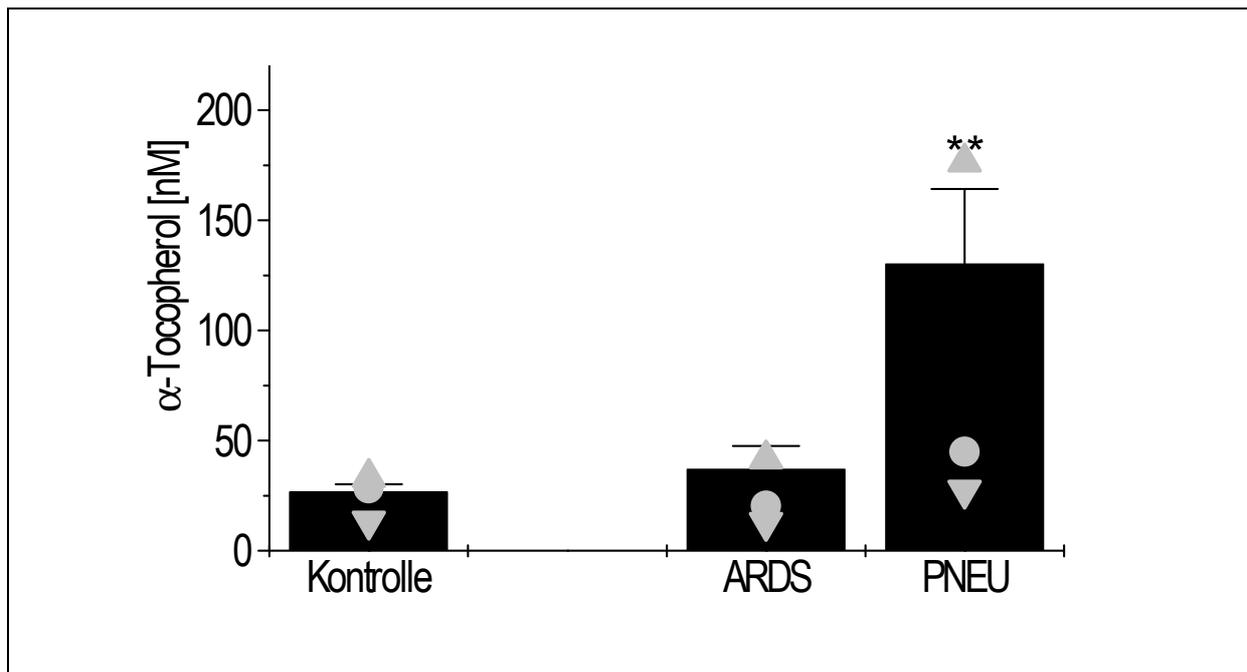


Abbildung 44: Absoluter Gehalt an α -Tocopherol in BALF bei Patienten mit ARDS (n = 16) und Pneumonie (n = 27) im Vergleich zu Kontrollen (n = 20). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise). ** = $p < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

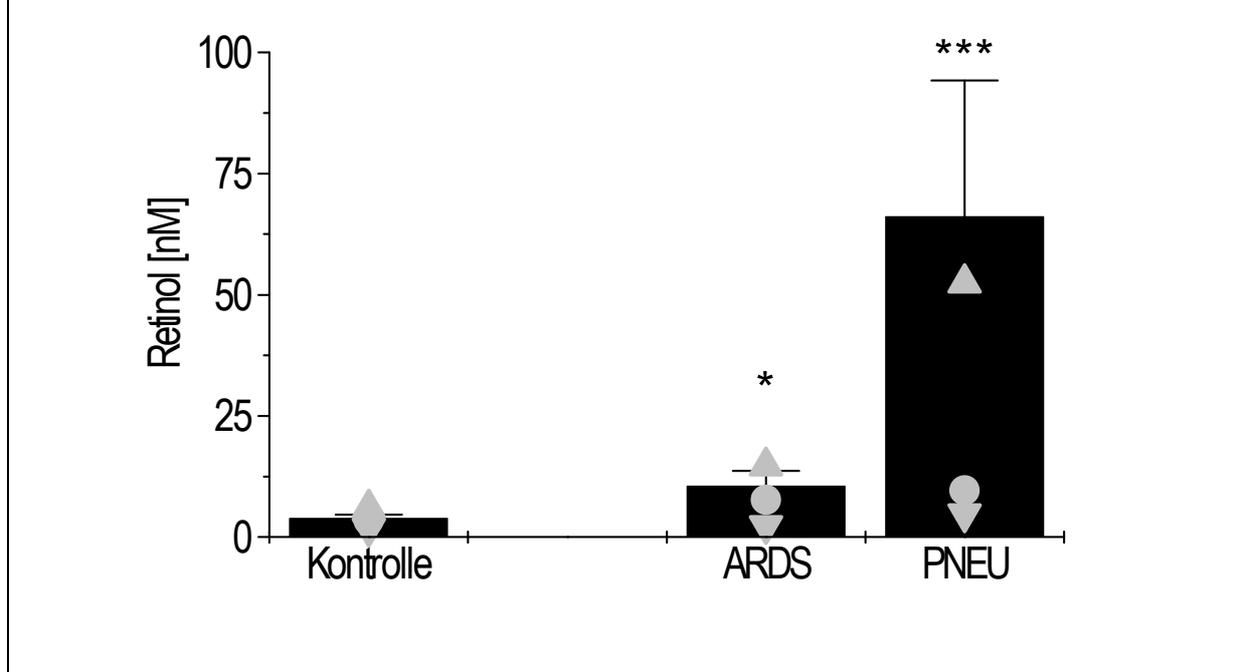


Abbildung 45: Absoluter Gehalt an Retinol in BALF bei Patienten mit ARDS (n = 16) und Pneumonie (n = 27) im Vergleich zu Kontrollen (n = 20). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise). * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$ im Vergleich zu Kontrollen.

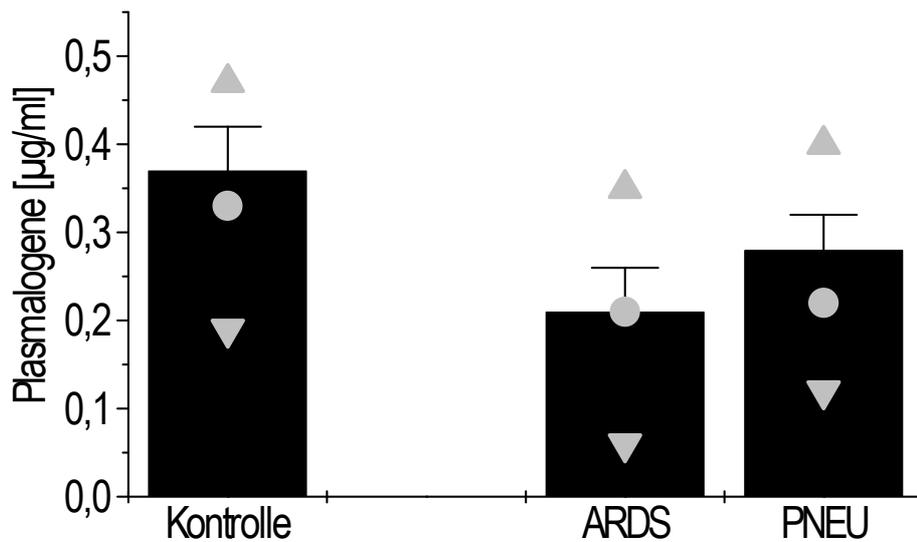


Abbildung 46: Absoluter Gehalt an Plasmalogenen in BALF bei Patienten mit ARDS (n=8) und Pneumonie (n=24) im Vergleich zu Kontrollen (n=14). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise).

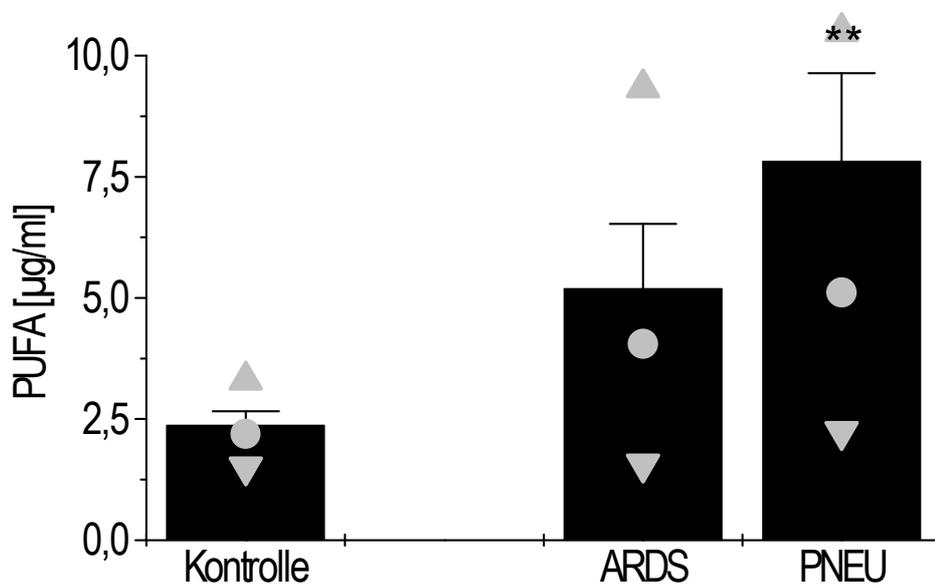


Abbildung 47: Absoluter Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) in BALF bei Patienten mit ARDS (n=8) und Pneumonie (n=24) im Vergleich zu Kontrollen (n=14). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise). ** = $p < 0,01$.

Korrelationen zwischen den Redox-Parametern und der Oxygenierung der Patienten

Zur Eruiierung statistisch signifikanter Zusammenhänge zwischen einzelnen in der BALF gemessenen Redoxparametern und der Patientenoxxygenierung (p_{aO_2}/F_{iO_2}) wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson, r , und die statistische Signifikanz, p , wurden jeweils angegeben. Lediglich für die Plasmalogene fand sich eine signifikante Korrelation.

Substanz	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p
GSSG	-0,18829	0,2644
Isoprostane	-0,27408	0,10068
Ascorbinsäure	-0,20872	0,22184
GSH	-0,13943	0,41047
Harnsäure	-0,15818	0,35684
α -Tocopherol	0,09654	0,58703
Retinol	0,10841	0,54169
Plasmalogene	0,39369	0,04217

Tabelle 15: Korrelation zwischen dem Gehalt der untersuchten Parameter in der BALF und der Patientenoxxygenierung (p_{O_2}/F_{iO_2}) bei Patienten mit ARDS und schwerer Pneumonie. Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient r und die statistische Signifikanz p ist gegeben.

4.3.3 Repetitive Lavagen ARDS und Pneumonie

Bei jeweils sechs Patienten des ARDS- und des Pneumonie-Kollektives wurden bronchoalveoläre Lavagen direkt nach (T 0) sowie drei Tage (T 1) und sieben Tage (T 2) nach der Intubation durchgeführt. Die 20 gesunden Probanden dienten erneut als Kontrollen. Die Lavagen wurden nach dem in Kapitel 3.2.1.1 geschilderten standardisierten Protokoll durchgeführt. Demographische und klinische Basisdaten sind in Tabelle 16 und Tabelle 19 angegeben. Es wurden an Markern für oxidativen Stress und Antioxidantien die gleichen Parameter wie in Kapitel 4.3.2 gemessen.

Die Zeitpunkte T1 (drei Tage nach Intubation) und T2 (7 Tage nach Intubation) wurden in Bezug auf den Ausgangswert T0 (direkt nach Intubation) auf Signifikanzen untersucht. Aufgrund der eher kleinen Kollektive und der teilweise doch hohen Streubreite der Messergebnisse fanden sich lediglich für das oxidierte Glutathion und die Ascorbinsäure des

ARDS-Kollektives zum Zeitpunkt T1 signifikant erhöhte Werte ($p < 0,05$) sowie einen signifikanten Abfall der Harnsäure zum Zeitpunkt T2 bei beiden Kollektiven ($p < 0,05$).

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf eine Darstellung des Medianes und der 25. und 75. Perzentile in den Grafiken verzichtet.

	Kontrollen	PNEU T 0	PNEU T 1	PNEU T 2
Anzahl [n]	20	6	6	6
Alter [Jahre]	29,3 ± 1,9	59,7 ± 6,1	59,7 ± 6,1	59,7 ± 6,1
Geschlecht f/m	10 / 10	2 / 4	2 / 4	2 / 4
paO₂/FiO₂	n. b.	209,0 ± 90,0	138,2 ± 17,4	230,7 ± 108,6
BALF Recovery [%]	70,7 ± 2,2	63,8 ± 4,3	59,7 ± 6,3	68,6 ± 4,6
Neutrophile [%]	1,8 ± 0,6	45,2 ± 11,0	31,2 ± 11,7	18,8 ± 12,6
Lymphozyten [%]	5,0 ± 0,6	13,8 ± 11,9	13,0 ± 9,3	7,3 ± 5,4
Makrophagen [%]	93,0 ± 0,8	41,0 ± 9,5	55,8 ± 12,2	73,8 ± 12,1
PL [µg / ml]	32,1 ± 3,4	36,8 ± 7,1	22,3 ± 7,8	24,1 ± 9,2
Protein [mg / ml]	0,07 ± 0,00	1,00 ± 0,36	0,95 ± 0,30	0,36 ± 0,08
PPQ	0,445 ± 0,030	0,063 ± 0,024	0,029 ± 0,007	0,083 ± 0,041

Tabelle 16: Studienpopulation der Patienten mit Pneumonie der repetitiven Lavagen: Demographische, klinische und Routine-Labordaten. Bei allen Daten ist der Mittelwert ± Standardfehler angegeben. n.b. = nicht bekannt.

	Kontrollen	PNEU T0	PNEU T1	PNEU T2
GSX [μM]	1,63 \pm 0,22 (1,10 / 1,43 / 1,72)	0,92 \pm 0,26 (0,53 / 0,80 / 1,35)	1,84 \pm 0,65 (0,65 / 1,47 / 2,79)	2,83 \pm 1,39 (0,53 / 1,77 / 4,53)
GSX / PL [M/M]	0,05 \pm 0,01 (0,02 / 0,03 / 0,05)	0,03 \pm 0,02 (0,008 / 0,016 / 0,061)	0,12 \pm 0,05 (0,01 / 0,08 / 0,24)	0,21 \pm 0,13 (0,01 / 0,09 / 0,39)
GSH [μM]	1,56 \pm 0,20 (1,10 / 1,40 / 1,69)	0,79 \pm 0,23 (0,44 / 0,75 / 1,13)	1,68 \pm 0,64 (0,59 / 1,20 / 2,72)	2,64 \pm 1,30 (0,45 / 1,64 / 4,32)
GSH / PL [M/M]	0,05 \pm 0,01 (0,02 / 0,03 / 0,05)	0,03 \pm 0,01 (0,006 / 0,015 / 0,051)	0,11 \pm 0,05 (0,01 / 0,06 / 0,23)	0,20 \pm 0,12 (0,01 / 0,09 / 0,37)
GSSG [μM]	0,03 \pm 0,02 (0,00 / 0,00 / 0,03)	0,06 \pm 0,02 (0,01 / 0,07 / 0,11)	0,08 \pm 0,04 (0,00 / 0,04 / 0,17)	0,10 \pm 0,05 (0,03 / 0,07 / 0,15)
GSSG / PL [M / M]	0,001 \pm 0,001 (0,000 / 0,000 / 0,000)	0,002 \pm 0,001 (0,0001 / 0,001 / 0,005)	0,004 \pm 0,002 (0,000 / 0,002 / 0,006)	0,006 \pm 0,004 (0,001 / 0,003 / 0,010)
Ascorbinsäure [μM]	0,54 \pm 0,06 (0,38 / 0,52 / 0,69)	2,96 \pm 2,46 (0,33 / 0,54 / 4,42)	1,66 \pm 0,57 (0,81 / 1,18 / 2,56)	1,32 \pm 0,47 (0,67 / 0,89 / 2,07)
Ascorbinsäure / PL [M / M]	0,015 \pm 0,002 (0,009 / 0,012 / 0,017)	0,048 \pm 0,033 (0,006 / 0,012 / 0,081)	0,104 \pm 0,064* (0,02 / 0,04 / 0,16)	0,087 \pm 0,044 (0,02 / 0,06 / 0,13)
Harnsäure [μM]	0,69 \pm 0,04 (0,57 / 0,69 / 0,82)	11,49 \pm 5,07 (2,22 / 5,34 / 25,34)	6,61 \pm 2,07 (2,59 / 5,83 / 9,68)	2,76 \pm 0,94* (1,35 / 2,13 / 3,70)
Harnsäure / PL [M / M]	0,020 \pm 0,002 (0,013 / 0,019 / 0,023)	0,22 \pm 0,08 (0,05 / 0,16 / 0,43)	0,26 \pm 0,07 (0,14 / 0,18 / 0,47)	0,13 \pm 0,03 (0,05 / 0,16 / 0,20)

Tabelle 17: Konzentrationen der hydrophilen Antioxidantien und hydrophilen Marker für oxidativen Stress in humaner BALF bei Patienten mit Pneumonie in Abhängigkeit der Zeitdauer der Beatmung. T0: Die Lavage wurde direkt nach der Intubation durchgeführt; T1 und T2 = 3 resp. 7 Tage nach Intubation. Angegeben sind absolute und relative (verglichen mit der PL-Konzentration) Konzentrationen des gesamten (GSX), des oxidierten und des reduzierten Glutathion (GSSG resp. GSH), Ascorbinsäure, und Harnsäure. Der Mittelwert \pm Standardfehler sowie in Klammern die 25., 50. und 75. Perzentile sind gezeigt. * = $p < 0,05$ verglichen mit T0.

	Kontrollen	PNEU T0	PNEU T1	PNEU T2
α-Tocopherol [nM]	26,95 \pm 3,21 (13,33 / 28,31 / 33,37)	185,3 \pm 94,8 (14,7 / 73,1 / 412,0)	33,8 \pm 3,6 (28,1 / 33,5 / 39,9)	28,8 \pm 8,1 (13,0 / 29,6 / 44,2)
α-Tocopherol / PL [M / M] * 10³	0,67 \pm 0,06 (0,44 / 0,65 / 0,80)	3,03 \pm 1,16 (0,67 / 2,63 / 5,57)	1,80 \pm 0,51 (0,68 / 1,54 / 3,07)	1,50 \pm 0,69 (0,16 / 1,41 / 2,90)
Retinol [nM]	3,97 \pm 0,66 (1,78 / 3,39 / 6,00)	85,3 \pm 67,5 (5,8 / 8,2 / 203,4)	13,9 \pm 3,6 (7,3 / 12,5 / 19,7)	9,1 \pm 2,3 (5,7 / 6,7 / 13,6)
Retinol / PL [M / M] * 10³	0,10 \pm 0,02 (0,04 / 0,07 / 0,13)	1,30 \pm 0,91 (0,15 / 0,49 / 2,80)	0,76 \pm 0,29 (0,21 / 0,43 / 1,59)	0,57 \pm 0,25 (0,19 / 0,41 / 1,02)
Plasmalogene [ng / ml]	367,90 \pm 50,34 (193,36 / 328,44 / 470,27)	325,8 \pm 70,9 (165,2 / 363,9 / 467,6)	200,1 \pm 93,1 (60,15 / 98,81 / 390,85)	222,6 \pm 112,5 (51,95 / 170,13 / 419,44)
Plasmalogene / PL [M / M]	1,07 \pm 0,04 (0,99 / 1,05 / 1,16)	0,88 \pm 0,13 (0,61 / 0,80 / 1,16)	0,73 \pm 0,08 (0,57 / 0,74 / 0,89)	0,71 \pm 0,11 (0,48 / 0,78 / 0,91)
PUFA [μg / ml]	2,38 \pm 0,28 (1,51 / 2,19 / 3,31)	7,44 \pm 2,00 (2,55 / 7,48 / 12,07)	5,05 \pm 1,73 (2,38 / 3,20 / 8,65)	5,39 \pm 1,97 (1,59 / 5,34 / 9,23)
PUFA / FA total [%]	7,19 \pm 0,29 (6,39 / 6,79 / 8,28)	19,19 \pm 2,82 (13,82 / 18,30 / 26,69)	21,93 \pm 1,25 (19,34 / 21,83 / 24,57)	19,66 \pm 1,57 (16,34 / 20,14 / 22,75)
F₂-Isoprostane [pM]	26,29 \pm 5,24 (4,70 / 15,87 / 46,00)	62,03 \pm 13,85 (34,58 / 57,48 / 89,69)	105,39 \pm 51,46 (34,43 / 70,09 / 211,64)	76,53 \pm 7,84 (63,41 / 70,19 / 92,83)
F₂-Isoprostane / PL [M / M] * 10⁶	0,79 \pm 0,18 (0,15 / 0,47 / 1,34)	1,80 \pm 0,74 (0,69 / 1,21 / 2,75)	3,54 \pm 0,62 (2,61 / 3,19 / 4,82)	3,40 \pm 0,95 (1,61 / 2,82 / 5,48)

Tabelle 18: Konzentrationen der lipophilen Antioxidantien und der lipophilen Marker für oxidativen Stress in humaner BALF bei Patienten mit Pneumonie in Abhängigkeit der Zeitdauer der Beatmung. T0: Die Lavage wurde direkt nach der Intubation durchgeführt; T1 und T2 = 3 resp. 7 Tage nach Intubation. Angegeben sind absolute und relative (in Relation zur PL-Konzentration) Konzentrationen des α -Tocopherol, des Retinol, der Plasmalogene aus Gesamt-Phospholipiden, der vielfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) und der F₂-Isoprostane. Der Mittelwert \pm Standardfehler sowie in Klammern die 25., 50. und 75. Perzentile sind gezeigt.

	Kontrollen	ARDS T 0	ARDS T 1	ARDS T 2
Anzahl [n]	20	6	6	6
Alter [Jahre]	29,3 ± 1,9	47,3 ± 5,9	47,3 ± 5,9	47,3 ± 5,9
Geschlecht f/m	10 / 10	3 / 3	3 / 3	3 / 3
paO₂/FiO₂	n. b.	145,5 ± 17,3	143,4 ± 15,2	174,6 ± 26,6
BALF Recovery [%]	70,7 ± 2,2	65,6 ± 4,4	56,3 ± 7,2	67,5 ± 6,7
Neutrophile [%]	1,8 ± 0,6	76,0 ± 5,9	67,8 ± 10,2	33,2 ± 11,1
Lymphozyten [%]	5,0 ± 0,6	2,8 ± 0,8	3,0 ± 0,7	8,0 ± 5,6
Makrophagen [%]	93,0 ± 0,8	21,5 ± 5,7	29,2 ± 9,6	58,8 ± 10,3
PL [µg / ml]	32,1 ± 3,4	27,6 ± 7,3	23,1 ± 5,3	35,5 ± 7,4
Protein [mg / ml]	0,07 ± 0,00	1,30 ± 0,35	1,12 ± 0,23	0,56 ± 0,17
PPQ	0,445 ± 0,030	0,022 ± 0,003	0,022 ± 0,003	0,077 ± 0,015

Tabelle 19: Studienpopulation der Patienten mit ARDS der repetitiven Lavagen: Demographische, klinische und Routine-Labordaten. Bei allen Daten ist der Mittelwert ± Standardfehler angegeben. n.b. = nicht bekannt.

	Kontrollen	ARDS T0	ARDS T1	ARDS T2
GSX [μM]	1,63 \pm 0,22 (1,10 / 1,43 / 1,72)	3,07 \pm 2,30 (0,33 / 0,77 / 5,02)	3,02 \pm 1,19 (0,91 / 1,84 / 5,50)	1,15 \pm 0,32 (0,52 / 1,03 / 1,73)
GSX / PL [M/M]	0,05 \pm 0,01 (0,02 / 0,03 / 0,05)	0,30 \pm 0,27 (0,01 / 0,03 / 0,47)	0,14 \pm 0,05 (0,05 / 0,10 / 0,26)	0,03 \pm 0,02 (0,01 / 0,02 / 0,05)
GSH [μM]	1,56 \pm 0,20 (1,10 / 1,40 / 1,69)	2,93 \pm 2,23 (0,33 / 0,71 / 4,72)	2,44 \pm 0,97 (0,49 / 1,65 / 4,51)	1,10 \pm 0,30 (0,52 / 1,01 / 1,62)
GSH / PL [M/M]	0,05 \pm 0,01 (0,02 / 0,03 / 0,05)	0,29 \pm 0,26 (0,01 / 0,30 / 0,45)	0,10 \pm 0,04 (0,02 / 0,07 / 0,21)	0,03 \pm 0,01 (0,01 / 0,02 / 0,05)
GSSG [μM]	0,03 \pm 0,02 (0,00 / 0,00 / 0,03)	0,07 \pm 0,04 (0,00 / 0,03 / 0,15)	0,29 \pm 0,12* (0,10 / 0,20 / 0,50)	0,02 \pm 0,01 (0,00 / 0,00 / 0,07)
GSSG / PL [M / M]	0,001 \pm 0,001 (0,000 / 0,000 / 0,000)	0,005 \pm 0,004 (0,000 / 0,001 / 0,011)	0,011 \pm 0,005 (0,002 / 0,007 / 0,025)	0,001 \pm 0,001 (0,000 / 0,000 / 0,001)
Ascorbinsäure [μM]	0,54 \pm 0,06 (0,38 / 0,52 / 0,69)	1,44 \pm 0,63 (0,21 / 1,11 / 2,48)	3,25 \pm 1,43* (0,73 / 2,30 / 5,47)	1,83 \pm 0,66 (0,48 / 1,24 / 3,55)
Ascorbinsäure / PL [M / M]	0,015 \pm 0,002 (0,009 / 0,012 / 0,017)	0,064 \pm 0,033 (0,006 / 0,036 / 0,115)	0,085 \pm 0,021 (0,049 / 0,085 / 0,129)	0,036 \pm 0,009 (0,016 / 0,036 / 0,057)
Harnsäure [μM]	0,69 \pm 0,04 (0,57 / 0,69 / 0,82)	18,94 \pm 9,15 (6,91 / 12,10 / 27,84)	16,32 \pm 8,14 (4,71 / 9,16 / 26,24)	4,42 \pm 0,96* (2,35 / 4,62 / 6,75)
Harnsäure / PL [M / M]	0,020 \pm 0,002 (0,013 / 0,019 / 0,023)	0,515 \pm 0,163 (0,189 / 0,397 / 1,001)	0,430 \pm 0,109 (0,236 / 0,397 / 0,644)	0,092 \pm 0,014* (0,059 / 0,094 / 0,127)

Tabelle 20: Konzentrationen der hydrophilen Antioxidantien und hydrophilen Marker für oxidativen Stress in humaner BALF bei Patienten mit ARDS in Abhängigkeit der Zeitdauer der Beatmung. T0: Die Lavage wurde direkt nach der Intubation durchgeführt; T1 und T2 = 3 resp. 7 Tage nach Intubation. Angegeben sind absolute und relative (verglichen mit der PL-Konzentration) Konzentrationen des gesamten (GSX), des oxidierten und des reduzierten Glutathion (GSSG resp. GSH), Ascorbinsäure, und Harnsäure. Der Mittelwert \pm Standardfehler sowie in Klammern die 25., 50. und 75. Perzentile sind gezeigt. * = $p < 0,05$ verglichen mit T0.

	Kontrollen	ARDS T0	ARDS T1	ARDS T2
α-Tocopherol [nM]	26,95 \pm 3,21 (13,33 / 28,31 / 33,37)	39,81 \pm 19,18 (7,08 / 16,81 / 84,04)	15,98 \pm 7,70 (0,00 / 9,71 / 37,15)	27,72 \pm 7,29 (10,85 / 30,64 / 44,93)
α-Tocopherol / PL [M / M] * 10³	0,67 \pm 0,06 (0,44 / 0,65 / 0,80)	0,81 \pm 0,26 (0,32 / 0,82 / 1,29)	0,50 \pm 0,26 (0,00 / 0,28 / 1,08)	0,57 \pm 0,15 (0,27 / 0,59 / 0,87)
Retinol [nM]	3,97 \pm 0,66 (1,78 / 3,39 / 6,00)	15,36 \pm 8,21 (2,67 / 8,66 / 31,41)	29,22 \pm 10,46 (11,31 / 17,26 / 57,16)	20,42 \pm 7,20 (3,32 / 21,80 / 29,85)
Retinol / PL [M / M] * 10³	0,10 \pm 0,02 (0,04 / 0,07 / 0,13)	0,59 \pm 0,33 (0,12 / 0,15 / 1,29)	0,98 \pm 0,32 (0,33 / 0,65 / 1,92)	0,36 \pm 0,09 (0,15 / 0,33 / 0,58)
Plasmalogene [ng / ml]	367,90 \pm 50,34 (193,36 / 328,44 / 470,27)	247,46 \pm 76,81 (94,25 / 314,36 / 333,76)	106,30 \pm 7,70 (87,93 / 114,89 / 120,38)	229,12 \pm 50,86 (124,42 / 216,77 / 356,17)
Plasmalogene / PL [M / M]	1,07 \pm 0,04 (0,99 / 1,05 / 1,16)	0,64 \pm 0,03 (0,58 / 0,66 / 0,68)	0,47 \pm 0,06 (0,34 / 0,50 / 0,58)	0,65 \pm 0,06 (0,51 / 0,66 / 0,79)
PUFA [μg / ml]	2,38 \pm 0,28 (1,51 / 2,19 / 3,31)	7,30 \pm 1,99 (3,32 / 9,19 / 9,39)	6,21 \pm 1,34 (4,32 / 5,01 / 8,69)	6,91 \pm 1,28 (3,49 / 7,52 / 9,87)
PUFA / FA total [%]	7,19 \pm 0,29 (6,39 / 6,79 / 8,28)	19,65 \pm 0,74 (18,18 / 20,32 / 20,45)	24,74 \pm 2,09 (21,40 / 23,90 / 28,50)	20,76 \pm 2,84 (15,82 / 18,31 / 25,69)
F₂-Isoprostane [pM]	26,29 \pm 5,24 (4,70 / 15,87 / 46,00)	123,7 \pm 31,4 (62,9 / 100,3 / 182,7)	125,1 \pm 20,7 (86,3 / 126,6 / 162,4)	80,4 \pm 23,7 (38,5 / 81,1 / 121,6)
F₂-Isoprostane / PL [M / M] * 10⁶	0,79 \pm 0,18 (0,15 / 0,47 / 1,34)	5,85 \pm 2,50 (0,93 / 4,70 / 9,12)	5,60 \pm 0,43 (4,87 / 5,45 / 6,48)	1,49 \pm 0,58 (0,52 / 1,26 / 2,69)

Tabelle 21: Konzentrationen der lipophilen Antioxidantien und der lipophilen Marker für oxidativen Stress in humaner BALF bei Patienten mit ARDS in Abhängigkeit der Zeitdauer der Beatmung. T0: Die Lavage wurde direkt nach der Intubation durchgeführt; T1 und T2 = 3 resp. 7 Tage nach Intubation. Angegeben sind absolute und relative (in Relation zur PL-Konzentration) Konzentrationen des α -Tocopherol, des Retinol, der Plasmalogene aus Gesamt-Phospholipiden, der vielfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) und der F₂-Isoprostane. Der Mittelwert \pm Standardfehler sowie in Klammern die 25., 50. und 75. Perzentile sind gezeigt.

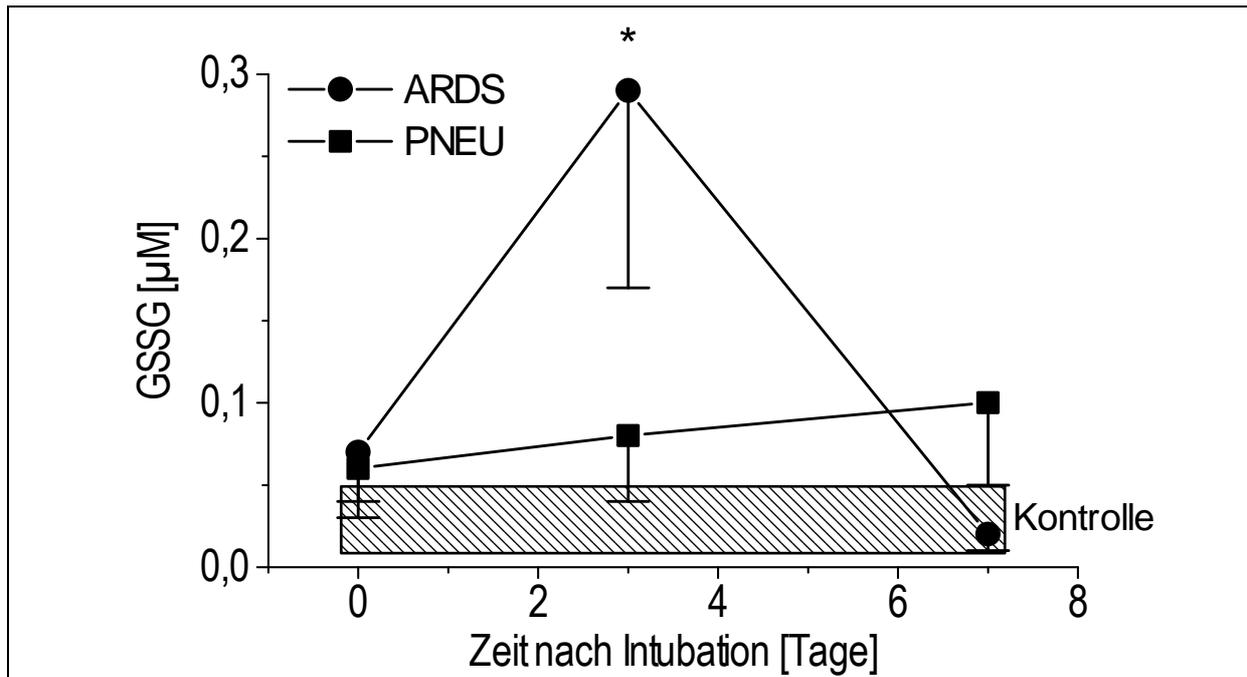


Abbildung 48: Verlauf der Konzentration des oxidierten Glutathions (GSSG) in BALF zu den Zeitpunkten 0, 3 und 7 Tage nach Intubation bei Patienten mit ARDS sowie schwerer, beatmungspflichtiger Pneumonie (jeweils $n = 6$). Zum Vergleich ist die Kontrollgruppe dargestellt (gesunde Kontrollen; schraffierter Balken). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. * = $p < 0,05$ verglichen mit T0.

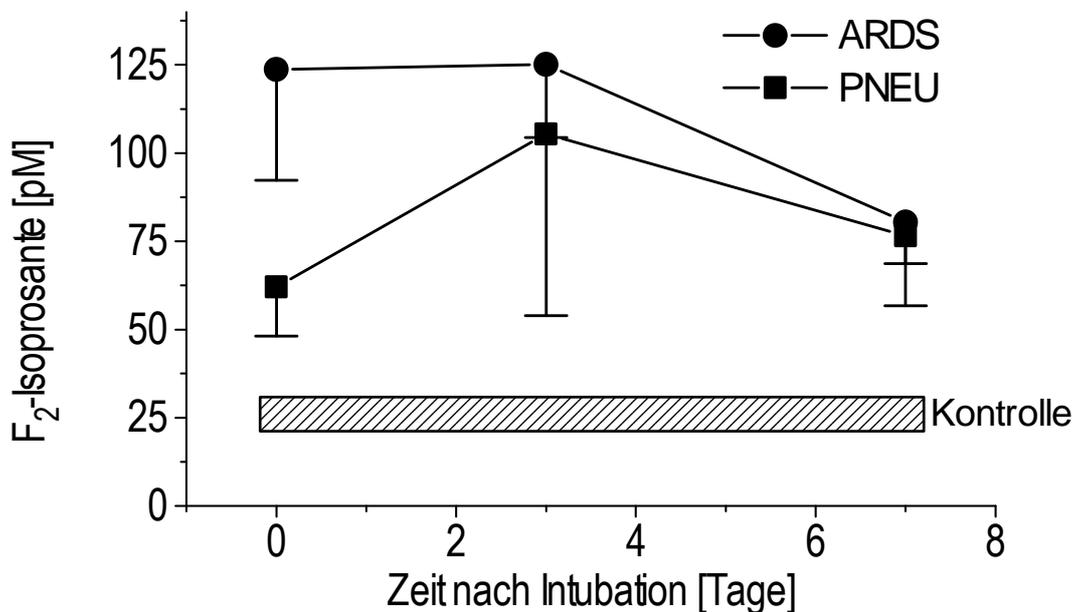


Abbildung 49: Verlauf der Konzentration von F₂-Isoprostanen in BALF zu den Zeitpunkten 0, 3 und 7 Tage nach Intubation bei Patienten mit ARDS sowie schwerer, beatmungspflichtiger Pneumonie (jeweils $n = 6$). Zum Vergleich ist die Kontrollgruppe dargestellt (gesunde Kontrollen; schraffierter Balken). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

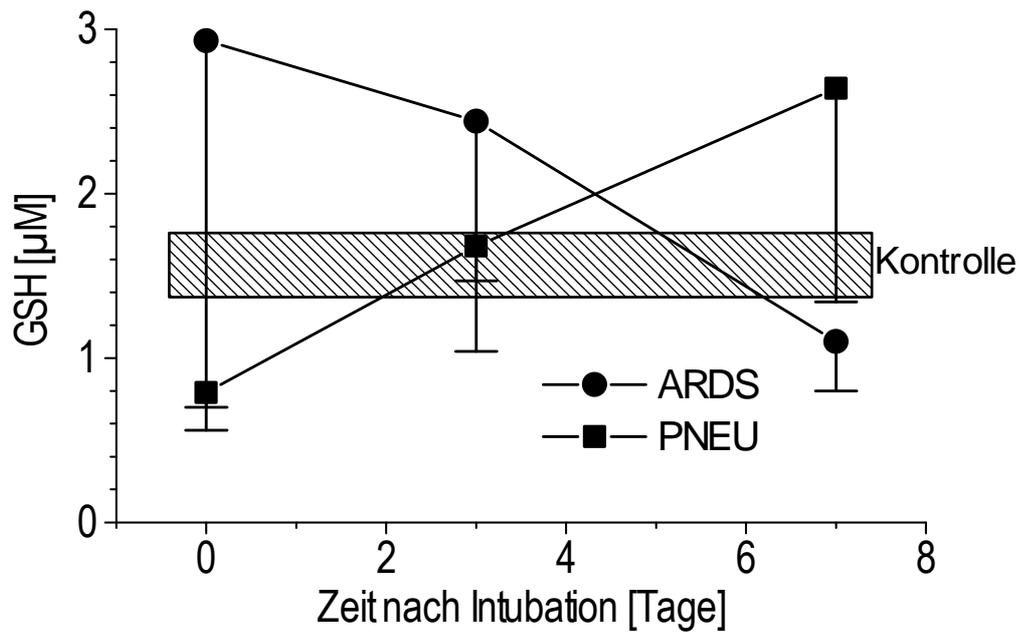


Abbildung 50: Verlauf der Konzentration des reduzierten Glutathions (GSH) in BALF zu den Zeitpunkten 0, 3 und 7 Tage nach Intubation bei Patienten mit ARDS sowie schwerer, beatmungspflichtiger Pneumonie (jeweils $n = 6$). Zum Vergleich ist die Kontrollgruppe dargestellt (gesunde Kontrollen; schraffierter Balken). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

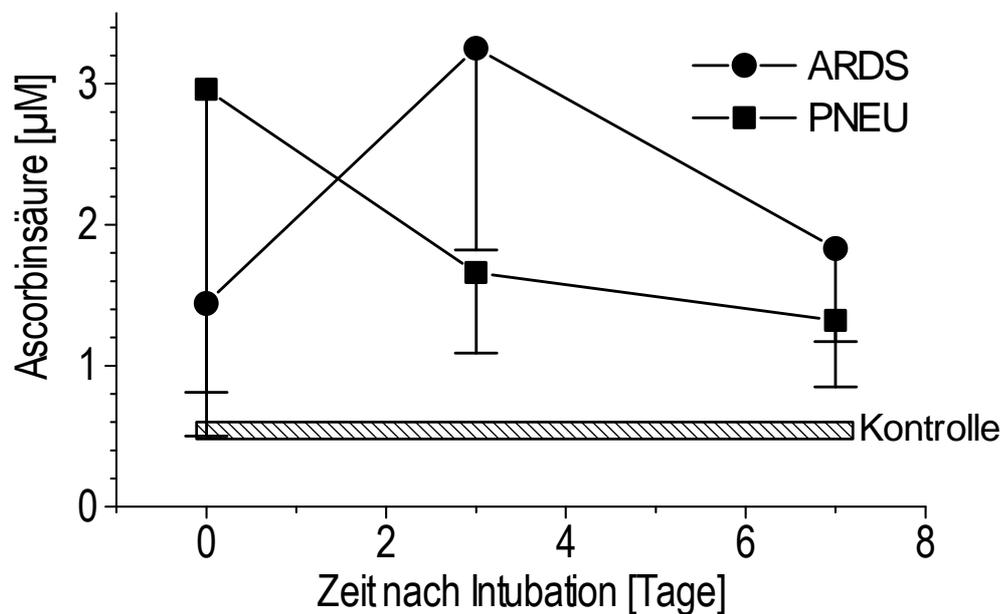


Abbildung 51: Verlauf der Konzentration der Ascorbinsäure in BALF zu den Zeitpunkten 0, 3 und 7 Tage nach Intubation bei Patienten mit ARDS sowie schwerer, beatmungspflichtiger Pneumonie (jeweils $n = 6$). Zum Vergleich ist die Kontrollgruppe dargestellt (gesunde Kontrollen; schraffierter Balken). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

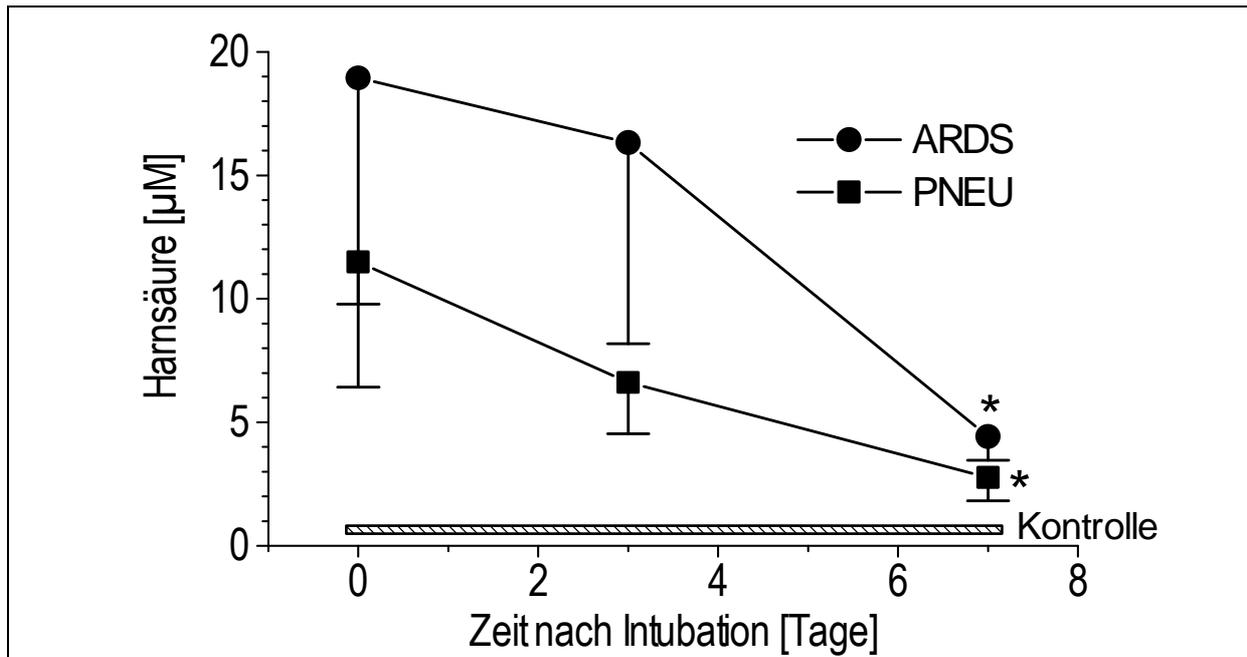


Abbildung 52: Verlauf der Konzentration der Harnsäure in BALF zu den Zeitpunkten 0, 3 und 7 Tage nach Intubation bei Patienten mit ARDS sowie schwerer, beatmungspflichtiger Pneumonie (jeweils $n = 6$). Zum Vergleich ist die Kontrollgruppe dargestellt (gesunde Kontrollen; schraffierter Balken). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. * = $p < 0,05$ im Vergleich zur initialen Lavage.

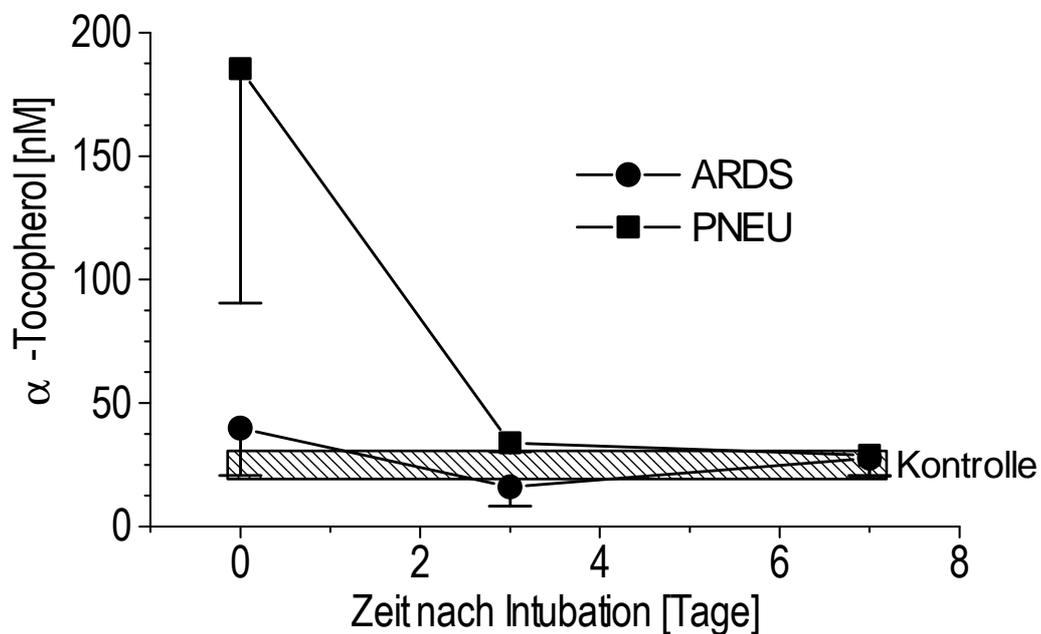


Abbildung 53: Verlauf der Konzentration von α -Tocopherol (Vitamin E) in BALF zu den Zeitpunkten 0, 3 und 7 Tage nach Intubation bei Patienten mit ARDS sowie schwerer, beatmungspflichtiger Pneumonie (jeweils $n = 6$). Zum Vergleich ist die Kontrollgruppe dargestellt (gesunde Kontrollen; schraffierter Balken). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

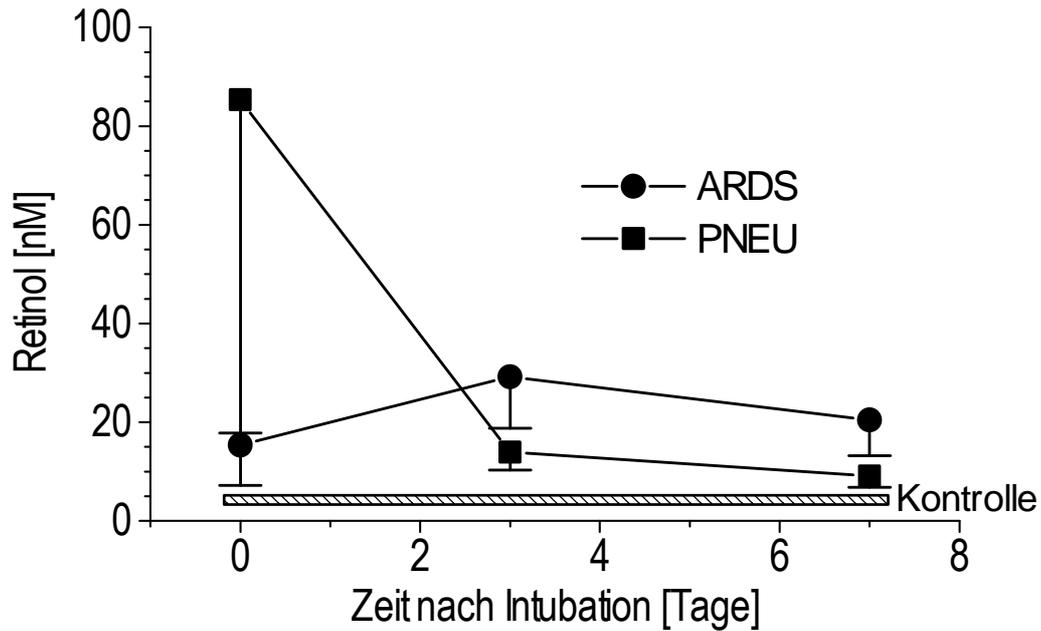


Abbildung 54: Verlauf der Konzentration von Retinol (Vitamin A) in BALF zu den Zeitpunkten 0, 3 und 7 Tage nach Intubation bei Patienten mit ARDS sowie schwerer, beatmungspflichtiger Pneumonie (jeweils $n = 6$). Zum Vergleich ist die Kontrollgruppe dargestellt (gesunde Kontrollen; schraffierter Balken). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

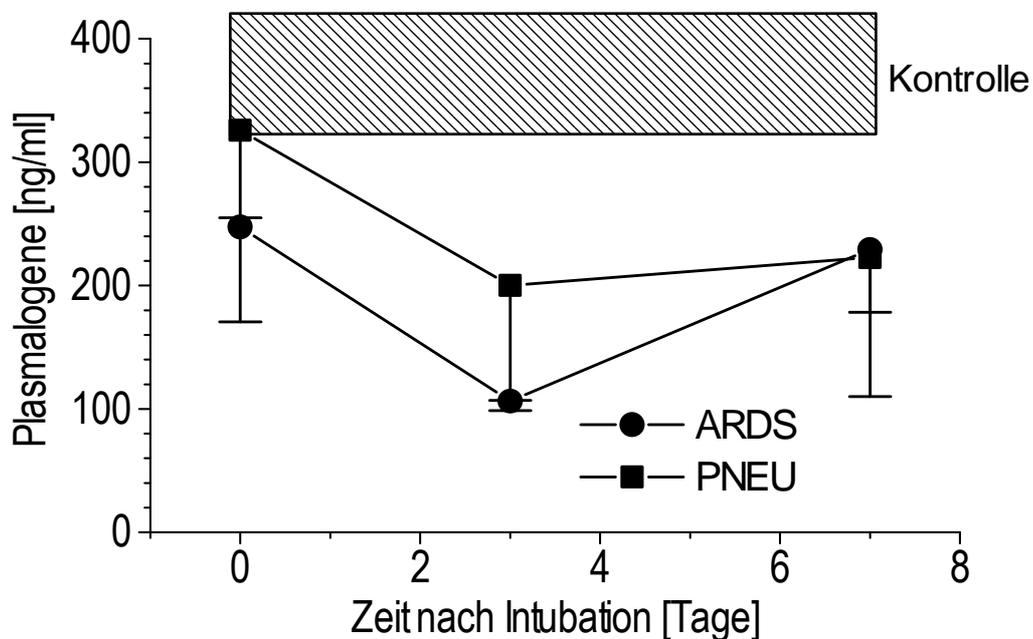
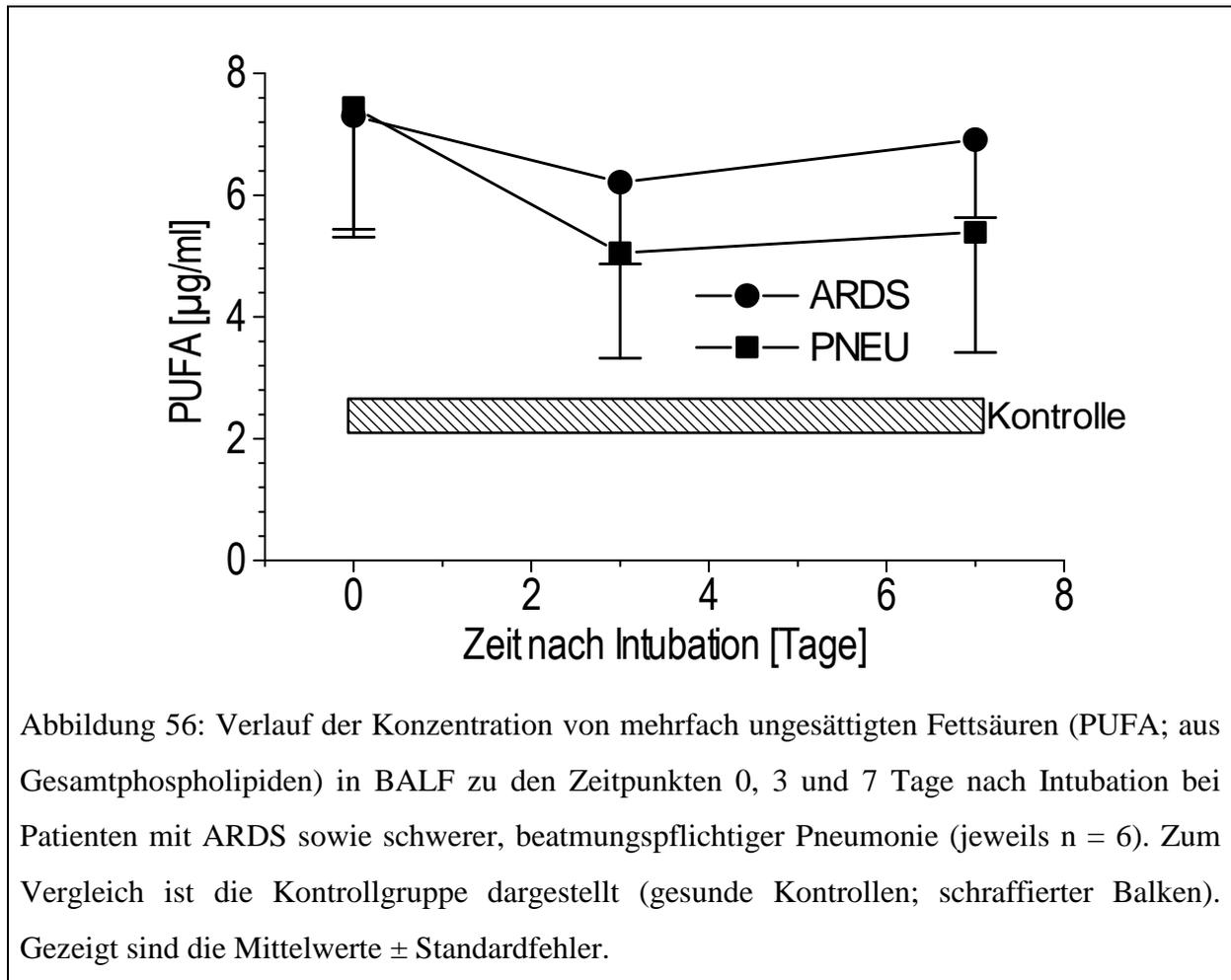


Abbildung 55: Verlauf der Konzentration von Plasmalogenen in BALF zu den Zeitpunkten 0, 3 und 7 Tage nach Intubation bei Patienten mit ARDS sowie schwerer, beatmungspflichtiger Pneumonie (jeweils $n = 6$). Zum Vergleich ist die Kontrollgruppe dargestellt (gesunde Kontrollen; schraffierter Balken). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.



4.3.4 Pneumocystis Jirovecii Pneumonie (PCP)

Demographische und klinische Basisdaten sind in Tabelle 22 angegeben. Die an PCP erkrankten Patienten wurden in nicht beatmete (Kollektiv PCP 1) und beatmete (Kollektiv PCP 2) unterteilt. In den Tabellen wurden zusätzlich die Durchschnittswerte des Gesamtkollektives der PCP-Patienten angegeben. Die Patienten waren signifikant älter als die Kontrollen, außerdem war das Geschlechterverhältnis bei den Patienten zu Gunsten der Männer verschoben. Die Lavage-Recovery war vor allem bei den beatmeten Patienten deutlich erniedrigt. In der Zellanalyse waren bei den Patienten ein relativer Anstieg der Neutrophilen und ein relativer Abfall der Makrophagen zu verzeichnen. Auffällig war weiterhin analog zu den ARDS- und Pneumonie-Patienten eine stark erhöhte Proteinkonzentration (bei den beatmeten PCP-Patienten um den Faktor 15). Die absoluten Phospholipid-Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant.

	Kontrollen	PCP gesamt	PCP nicht beatmet	PCP beatmet
Anzahl [n]	20	33	20	13
Alter [Jahre]	29,3 ± 1,9	42,8 ± 2,0	43,7 ± 3,0	41,5 ± 2,3
Geschlecht w/m	10 / 10	4 / 29	2 / 18	2 / 11
paO₂/FiO₂	n.b.	n. b.	n. b.	172,1 ± 11,8
BALF Recovery [%]	70,7 ± 2,2	62,9 ± 2,2	69,6 ± 1,9	53,0 ± 3,3
Neutrophile [%]	1,8 ± 0,6	25,5 ± 4,9	12,4 ± 3,9	45,2 ± 8,0
Lymphozyten [%]	5,0 ± 0,6	10,5 ± 2,1	15,0 ± 3,0	3,8 ± 1,1
Makrophagen [%]	93,0 ± 0,8	64,0 ± 4,6	72,6 ± 4,7	51,1 ± 7,9
PL [µg / ml]	32,1 ± 3,4	28,9 ± 3,2	31,2 ± 4,5	25,1 ± 4,0
Protein [mg / ml]	0,07 ± 0,00	0,61 ± 0,17	0,33 ± 0,06	1,04 ± 0,41
PPQ	0,445 ± 0,030	0,118 ± 0,023	0,161 ± 0,032	0,047 ± 0,013

Tabelle 22: Studienpopulation der Patienten mit *Pneumocystis jirovecii* Pneumonie: Demographische, klinische und Routine-Labordaten. Bei allen Daten ist der Mittelwert ± Standardfehler angegeben. n.b. = nicht bekannt.

	Kontrollen	PCP gesamt	PCP nicht beatmet	PCP beatmet
GSX [μM]	1,63 \pm 0,22 (1,10 / 1,43 / 1,72)	1,66 \pm 0,27 (0,70 / 1,19 / 2,15)	1,75 \pm 0,29 (0,74 / 1,63 / 2,40)	1,51 \pm 0,54 (0,45 / 0,97 / 1,52)
GSX / PL [M/M]	0,05 \pm 0,01 (0,02 / 0,03 / 0,05)	0,066 \pm 0,019 (0,021 / 0,035 / 0,075)	0,055 \pm 0,010 (0,022 / 0,046 / 0,077)	0,086 \pm 0,050 (0,019 / 0,034 / 0,064)
GSH [μM]	1,56 \pm 0,20 (1,10 / 1,40 / 1,69)	1,55 \pm 0,24 (0,68 / 1,18 / 2,12)	1,70 \pm 0,27 (0,74 / 1,57 / 2,39)	1,31 \pm 0,43* (0,45 / 0,93 / 1,45)
GSH / PL [M/M]	0,05 \pm 0,01 (0,02 / 0,03 / 0,05)	0,060 \pm 0,015 (0,019 / 0,034 / 0,075)	0,053 \pm 0,010 (0,021 / 0,043 / 0,077)	0,072 \pm 0,039 (0,019 / 0,028 / 0,064)
GSSG [μM]	0,03 \pm 0,02 (0,00 / 0,00 / 0,03)	0,054 \pm 0,026 (0,000 / 0,000 / 0,040)	0,023 \pm 0,014 (0,000 / 0,000 / 0,028)	0,102 \pm 0,063 (0,000 / 0,030 / 0,095)
GSSG / PL [M / M]	0,001 \pm 0,001 (0,000 / 0,000 / 0,000)	0,003 \pm 0,002 (0,000 / 0,000 / 0,002)	0,001 \pm 0,000 (0,000 / 0,000 / 0,001)	0,006 \pm 0,005 (0,000 / 0,001 / 0,003)
Ascorbinsäure [μM]	0,54 \pm 0,06 (0,38 / 0,52 / 0,69)	0,64 \pm 0,13 (0,15 / 0,35 / 0,98)	0,72 \pm 0,18 (0,15 / 0,50 / 0,82)	0,54 \pm 0,18 (0,098 / 0,29 / 0,86)
Ascorbinsäure / PL [M / M]	0,015 \pm 0,002 (0,009 / 0,012 / 0,017)	0,029 \pm 0,009 (0,005 / 0,013 / 0,029)	0,029 \pm 0,012 (0,005 / 0,015 / 0,025)	0,027 \pm 0,014 (0,003 / 0,008 / 0,037)
Harnsäure [μM]	0,69 \pm 0,04 (0,57 / 0,69 / 0,82)	4,55 \pm 1,09*** (1,37 / 2,83 / 5,85)	2,93 \pm 0,55*** (0,99 / 1,84 / 4,43)	6,92 \pm 2,47*** (1,76 / 3,45 / 6,85)
Harnsäure / PL [M / M]	0,020 \pm 0,002 (0,013 / 0,019 / 0,023)	0,155 \pm 0,035 *** (0,040 / 0,098 / 0,159)	0,126 \pm 0,043 *** (0,023 / 0,074 / 0,130)	0,205 \pm 0,058 *** (0,074 / 0,126 / 0,429)

Tabelle 23: Konzentrationen der hydrophilen Antioxidantien und hydrophilen Marker für oxidativen Stress in humaner BALF bei Patienten mit Pneumocystis jirovecii Pneumonie. Angegeben sind absolute und relative (verglichen mit der PL-Konzentration) Konzentrationen des gesamten (GSX), des oxidierten und des reduzierten Glutathion (GSSG resp. GSH), Ascorbinsäure, und Harnsäure. Der Mittelwert \pm Standardfehler sowie in Klammern die 25., 50. und 75. Perzentile sind gezeigt. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ verglichen mit gesunden Kontrollen.

	Kontrollen	PCP gesamt	PCP nicht beatmet	PCP beatmet
α-Tocopherol [nM]	26,95 \pm 3,21 (13,33 / 28,31 / 33,37)	43,04 \pm 6,73 (25,32 / 32,22 / 58,73)	38,16 \pm 5,55 (25,73 / 33,11 / 38,90)	52,78 \pm 17,10 (21,18 / 29,71 / 74,80)
α-Tocopherol / PL [M / M] * 10³	0,67 \pm 0,06 (0,44 / 0,62 / 0,80)	1,38 \pm 0,23* (0,65 / 0,98 / 1,85)	1,33 \pm 0,27* (0,64 / 0,95 / 1,76)	1,47 \pm 0,47* (0,70 / 1,19 / 1,54)
Retinol [nM]	3,97 \pm 0,66 (1,78 / 3,39 / 6,00)	12,13 \pm 2,0*** (4,86 / 8,00 / 14,39)	9,15 \pm 1,55** (3,43 / 7,89 / 11,96)	18,09 \pm 4,77 *** (7,92 / 12,63 / 23,12)
Retinol / PL [M / M] * 10³	0,10 \pm 0,02 (0,04 / 0,07 / 0,13)	0,37 \pm 0,06 * (0,15 / 0,28 / 0,49)	0,26 \pm 0,05 (0,09 / 0,20 / 0,34)	0,57 \pm 0,14 ** (0,27 / 0,43 / 0,84)
Plasmalogene [ng / ml]	367,90 \pm 50,34 (193,36 / 328,43 / 470,27)	222,2 \pm 19,5 * (126,6 / 195,7 / 311,3)	256,3 \pm 24,5 (172,7 / 253,2 / 349,1)	160,7 \pm 22,6 ** (116,1 / 136,4 / 202,3)
Plasmalogene / PL [M / M]	1,07 \pm 0,04 (0,99 / 1,05 / 1,16)	0,74 \pm 0,05 *** (0,55 / 0,74 / 0,97)	0,82 \pm 0,06 ** (0,61 / 0,84 / 1,03)	0,62 \pm 0,07 *** (0,48 / 0,58 / 0,86)
PUFA [μg / ml]	2,38 \pm 0,28 (1,51 / 2,19 / 3,31)	4,92 \pm 0,66 * (2,02 / 3,77 / 7,71)	4,06 \pm 0,70 (1,92 / 2,91 / 5,30)	6,48 \pm 1,27 ** (3,30 / 5,81 / 8,67)
PUFA / FA total [%]	7,19 \pm 0,29 (6,39 / 6,79 / 8,28)	15,50 \pm 1,35 *** (9,99 / 13,47 / 20,57)	11,37 \pm 0,85 *** (8,12 / 10,42 / 13,64)	22,24 \pm 2,04 *** (17,35 / 21,18 / 27,45)
F₂-Isoprostane [pM]	26,29 \pm 5,24 (4,70 / 15,87 / 46,00)	48,18 \pm 8,72 (19,07 / 30,92 / 52,55)	34,59 \pm 7,26 (13,58 / 25,97 / 41,38)	69,09 \pm 18,07** (27,39 / 39,58 / 85,98)
F₂-Isoprostane / PL [M / M] * 10⁶	0,79 \pm 0,18 (0,15 / 0,47 / 1,34)	2,09 \pm 0,53 (0,34 / 0,69 / 2,29)	1,59 \pm 0,47 (0,28 / 0,52 / 2,16)	3,01 \pm 1,20* (0,64 / 1,38 / 4,33)

Tabelle 24: Konzentrationen der lipophilen Antioxidantien und der lipophilen Marker für oxidativen Stress in humaner BALF bei Patienten mit *Pneumocystis jirovecii* Pneumonie. Angegeben sind absolute und relative (in Relation zur PL-Konzentration) Konzentrationen des α -Tocopherol, des Retinol, der Plasmalogene aus Gesamt-Phospholipiden, der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) und der F₂-Isoprostane. Der Mittelwert \pm Standardfehler sowie in Klammern die 25., 50. und 75. Perzentile sind gezeigt. * = p<0,05; ** = p<0,01, *** = p<0,001 verglichen mit gesunden Kontrollen.

Marker für oxidativen Stress

Die nicht beatmeten Patienten unterschieden sich bezüglich der Isoprostane und des oxidierten Glutathions nicht signifikant von den Kontrollen. Bei den beatmeten waren hingegen die

Isoprostane um fast den Faktor 3 ($p < 0,01$) als Ausdruck eines gesteigerten oxidativen Stresses signifikant erhöht (Abbildung 57 und Abbildung 58).

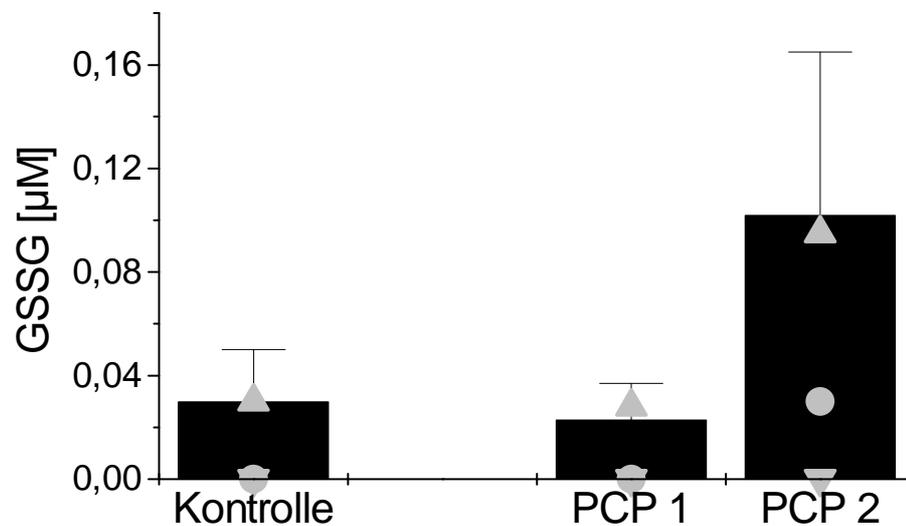


Abbildung 57: Absoluter Gehalt an oxidiertem Glutathion (GSSG) in BALF von spontan atmenden Patienten mit PCP (PCP 1; $n = 20$) und beatmeten Patienten mit PCP (PCP 2; $n = 13$) im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($n = 20$). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise).

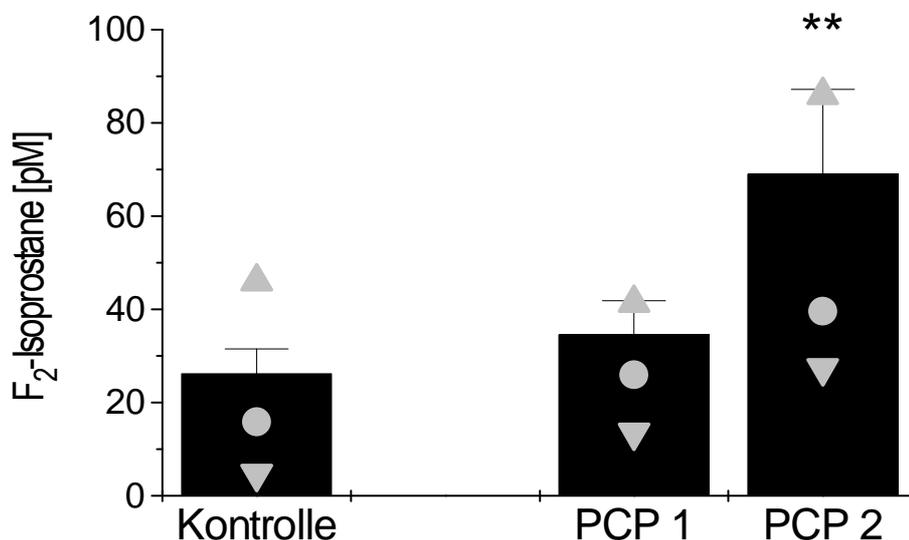


Abbildung 58: Absoluter Gehalt an F₂-Isoprostanen in BALF von spontan atmenden Patienten mit PCP (PCP 1; $n = 20$) und beatmeten Patienten mit PCP (PCP 2; $n = 13$) im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($n = 20$). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise). ** = $p < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

Antioxidantien

Von den gemessenen hydrophilen Antioxidantien zeigte das reduzierte Glutathion im Gegensatz zu den oxidierten Anteilen eine signifikante Erniedrigung bei den beatmeten Patienten ($p < 0,05$; Abbildung 59). Im Gegensatz zur Ascorbinsäure, bei der sich keine relevante Änderung fand, wies die Harnsäure bei beiden Patientenkollektiven eine hochsignifikante Zunahme auf (Abbildung 61; $p < 0,001$ im Vergleich zu den Kontrollen).

Unter den lipophilen Parametern kam es bei α -Tocopherol nur zu Signifikanzen, wenn die Konzentrationen auf die Phospholipide bezogen wurden ($p < 0,05$). Retinol stieg dagegen in beiden Kollektiven an (bei den beatmeten stärker signifikant mit $p < 0,001$ gegenüber $p < 0,01$, Abbildung 63). Aufgrund des Mangels an BHT-behandeltem BALF-Material wurden Plasmalogene und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) nur in 14 Kontrollen gemessen. Die Plasmalogene fielen bei den beatmeten PCP-Patienten signifikant im Vergleich zu den Kontrollpatienten ab ($p < 0,01$; Abbildung 64). Der letzte untersuchte Parameter, die mehrfach ungesättigten Fettsäuren, zeigte bei den beatmeten PCP-Patienten einen hochsignifikanten Anstiege ($p < 0,01$; Abbildung 65).

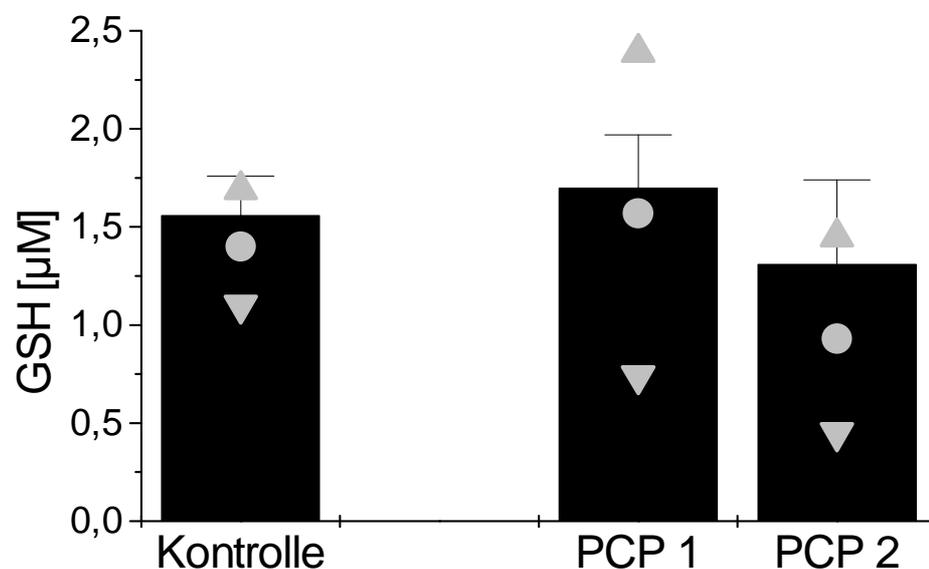


Abbildung 59: Absoluter Gehalt an reduziertem Glutathion (GSH) in BALF von spontan atmenden Patienten mit PCP (PCP 1; $n = 20$) und beatmeten Patienten mit PCP (PCP 2; $n = 13$) im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($n = 20$). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise).

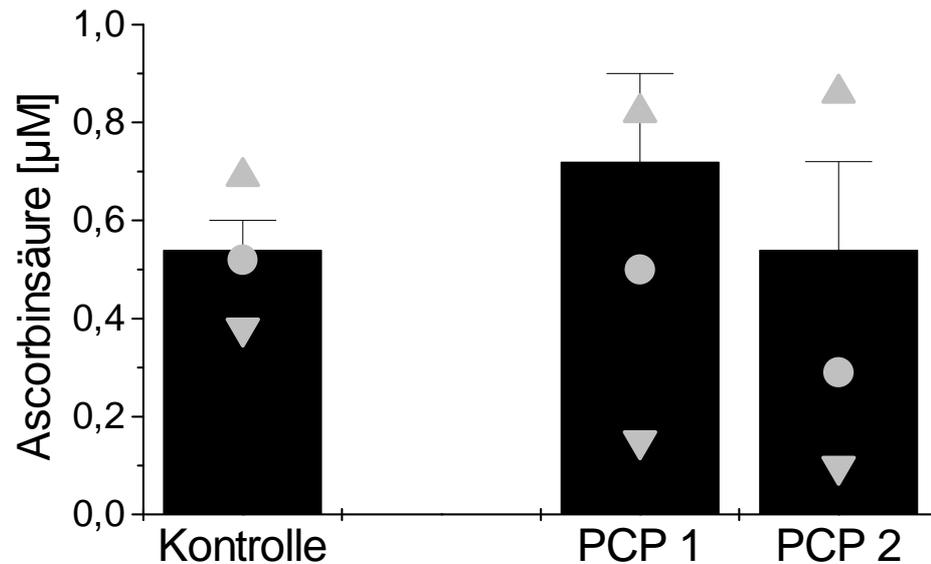


Abbildung 60: Absoluter Gehalt an Ascorbinsäure in BALF von spontan atmenden Patienten mit PCP (PCP 1; n = 20) und beatmeten Patienten mit PCP (PCP 2; n = 13) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n = 20). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise).

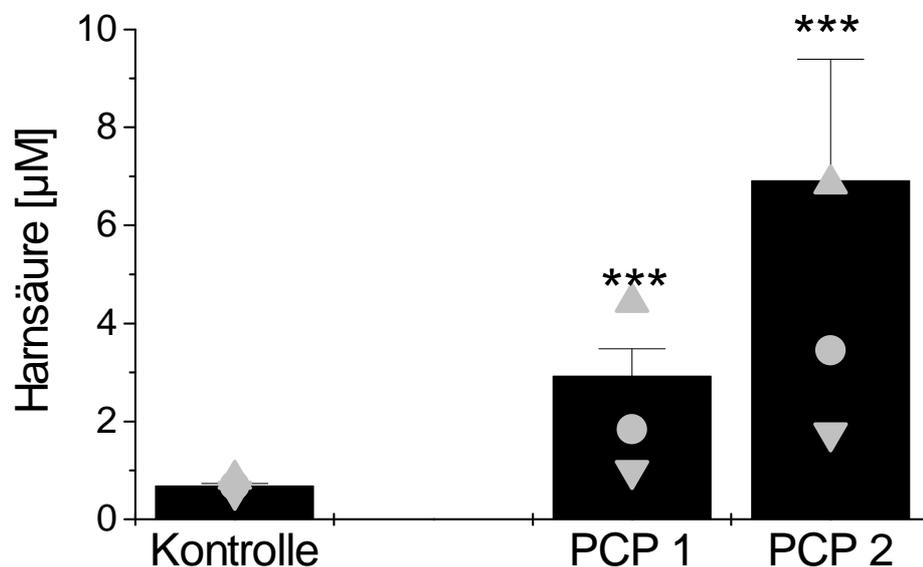


Abbildung 61: Absoluter Gehalt an Harnsäure in BALF von spontan atmenden Patienten mit PCP (PCP 1; n = 20) und beatmeten Patienten mit PCP (PCP 2; n = 13) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n = 20). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise). *** = $p < 0,001$ im Vergleich zu Kontrollen.

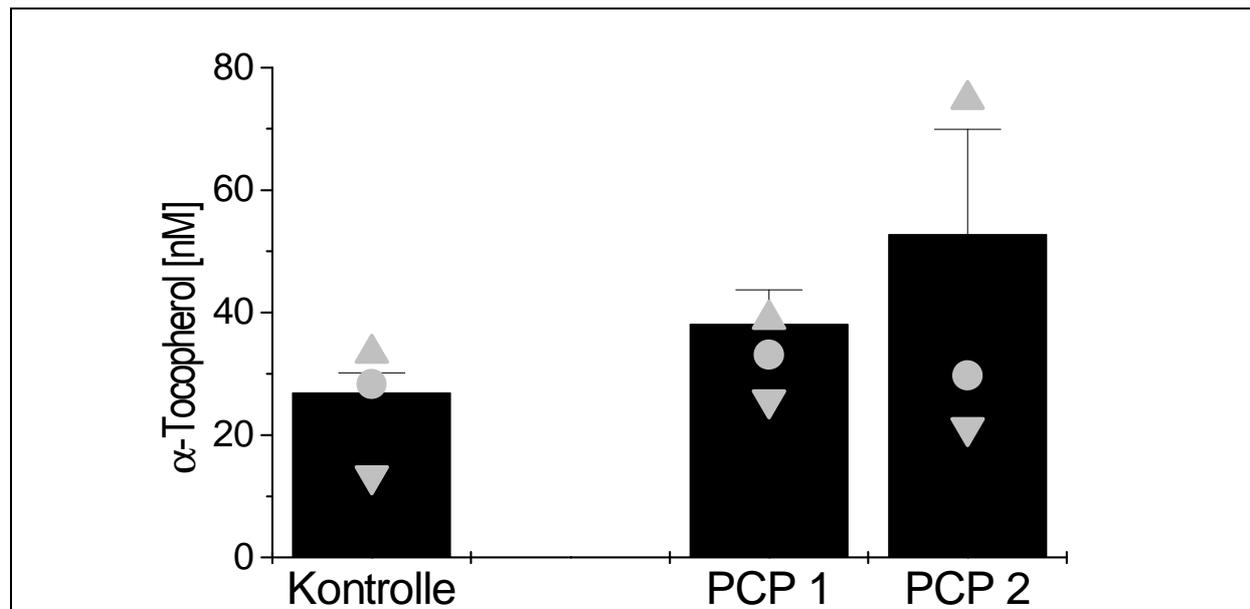


Abbildung 62: Absoluter Gehalt an α -Tocopherol in BALF von spontan atmenden Patienten mit PCP (PCP 1; n = 20) und beatmeten Patienten mit PCP (PCP 2; n = 13) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n = 20). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise).

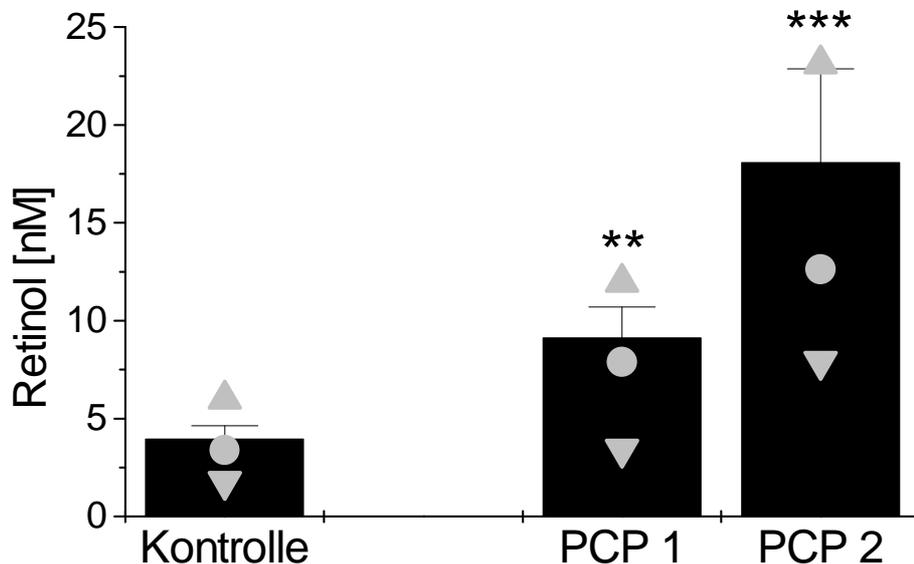


Abbildung 63: Absoluter Gehalt an Retinol in BALF von spontan atmenden Patienten mit PCP (PCP 1; n = 20) und beatmeten Patienten mit PCP (PCP 2; n = 13) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n = 20). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise). ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ im Vergleich zu Kontrollen.

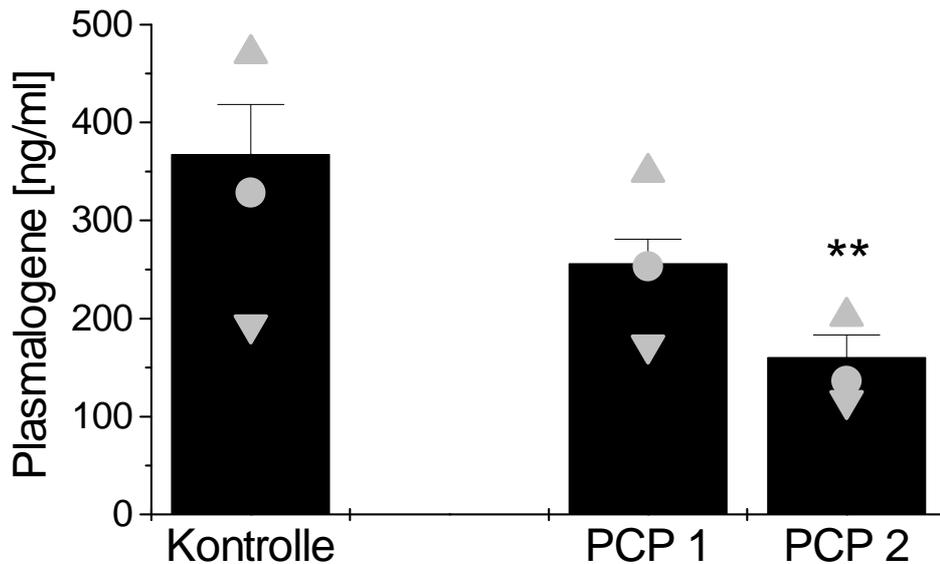


Abbildung 64: Absoluter Gehalt an Plasmalogenen in BALF von spontan atmenden Patienten mit PCP (PCP 1; n = 20) und beatmeten Patienten mit PCP (PCP 2; n = 13) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n = 20). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise). ** = $p < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

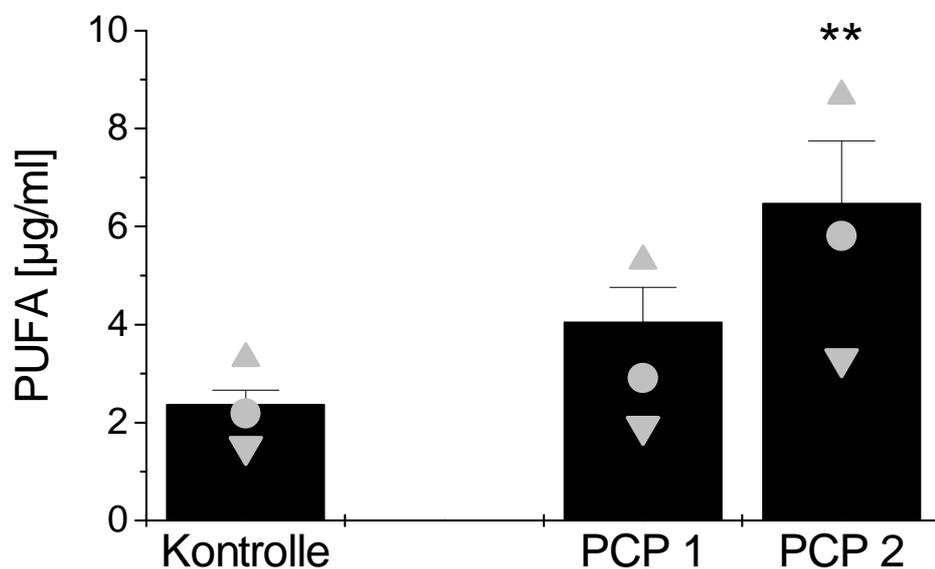


Abbildung 65: Absoluter Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) in BALF von spontan atmenden Patienten mit PCP (PCP 1; n = 20) und beatmeten Patienten mit PCP (PCP 2; n = 13) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n = 20). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise). ** = $p < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

4.3.5 Chronisch-interstitielle Lungenerkrankungen

Demographische und klinische Basisdaten sind in Tabelle 25 angegeben. Die Phospholipid-Konzentration unterschied sich bei den IPF-, Sarkoidose und EAA-Kollektiven im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant. Die Zellanalyse der BALF zeigte einen Anstieg des Anteils an Neutrophilen und Lymphozyten (vor allem im EAA-Kollektiv) in Verbindung mit einem Abfall des relativen Makrophagenanteils. Das Gesamtprotein bei IPF-, Sarkoidose und EAA-Patienten war erhöht, was zu einem Abfall des Phospholipid-Protein-Verhältnisses um etwa Faktor 2 führte.

	Kontrollen	IPF	Sarkoidose	EAA
Anzahl [n]	20	16	12	7
Alter [Jahre]	29,3 ± 1,9	59,3 ± 2,3	40,6 ± 3,3	54,9 ± 6,3
Geschlecht f/m	10/10	5/11	3/9	3/4
Raucher NS / ES / CS	20/0/0	10/5/1	6/5/1	4/3/0
BALF Recovery [%]	70,7 ± 2,2	68,6 ± 3,3	69,6 ± 3,5	71,1 ± 4,2
FVC [% predicted]	101,5 ± 2,1	62,3 ± 12,2	77,5 ± 9,2	68,5 ± 7,9
BAL-fluid Zelldifferenzierung				
Makrophagen [%]	93,0 ± 0,8	73,2 ± 6,1	73,4 ± 8,1	57,4 ± 7,5
Neutrophile [%]	1,8 ± 0,6	16,5 ± 4,3	4,7 ± 2,6	11,3 ± 4,1
Lymphozyten [%]	5,0 ± 0,6	6,8 ± 3,2	21,3 ± 5,5	29,7 ± 8,0
Eosinophile [%]	0,2 ± 0,2	3,5 ± 1,3	0,6 ± 0,4	1,6 ± 0,5
PL [µg/ml]	32,8 ± 3,4	33,6 ± 4,3	37,3 ± 7,5	35,5 ± 3,3
Protein [mg/ml]	0.07 ± 0.00	0.19 ± 0.02	0.25 ± 0.06	0.21 ± 0,05
PPQ	0.460 ± 0.028	0.235 ± 0.042	0.188 ± 0.037	0.211 ± 0,051

Tabelle 25: Studienpopulation: Demographische, klinische und Routine-Labordaten. Bei allen Daten ist der Mittelwert±Standardfehler angegeben. NS =Nichtraucher; ES = Exraucher; CS = Raucher. n.b. = nicht bekannt.

	Kontrollen	IPF	Sarkoidose	EAA
GSX [μM]	1,63 \pm 0,22 (1,10 / 1,43 / 1,72)	2,15 \pm 0,27 * (1,32 / 1,97 / 2,57)	2,31 \pm 0,39 * (1,41 / 2,03 / 3,02)	1,78 \pm 0,58 (0,62 / 1,42 / 2,84)
GSX / PL [M/M]	0,05 \pm 0,01 (0,02 / 0,03 / 0,05)	0,05 \pm 0,01 (0,03 / 0,05 / 0,08)	0,20 \pm 0,12 (0,02 / 0,04 / 0,20)	0,05 \pm 0,02 (0,01 / 0,05 / 0,08)
GSH [μM]	1,56 \pm 0,20 (1,10 / 1,40 / 1,69)	1,88 \pm 0,28 (1,28 / 1,72 / 2,25)	1,78 \pm 0,31 (1,07 / 1,70 / 2,14)	1,32 \pm 0,48 (0,15 / 1,18 / 2,27)
GSH / PL [M/M]	0,05 \pm 0,01 (0,02 / 0,03 / 0,05)	0,05 \pm 0,01 (0,03 / 0,05 / 0,06)	0,13 \pm 0,06 (0,02 / 0,04 / 0,17)	0,04 \pm 0,01 (0,01 / 0,04 / 0,06)
GSSG [μM]	0,03 \pm 0,02 (0,00 / 0,00 / 0,03)	0,14 \pm 0,07 * (0,01 / 0,05 / 0,10)	0,26 \pm 0,10 * (0,00 / 0,15 / 0,48)	0,23 \pm 0,08 * (0,00 / 0,26 / 0,43)
GSSG / PL [M/M]	0,001 \pm 0,001 (0,000 / 0,000 / 0,000)	0,002 \pm 0,001 * (0,000 / 0,002 / 0,002)	0,035 \pm 0,029 (0,000 / 0,002 / 0,017)	0,004 \pm 0,002 (0,000 / 0,005 / 0,008)
Ascorbinsäure [μM]	0,54 \pm 0,06 (0,38 / 0,52 / 0,69)	0,87 \pm 0,14 (0,50 / 0,66 / 1,05)	0,96 \pm 0,19 (0,47 / 0,81 / 1,43)	0,59 \pm 0,25 (0,10 / 0,49 / 0,90)
Ascorbinsäure / PL [M/M]	0,015 \pm 0,002 (0,009 / 0,012 / 0,017)	0,022 \pm 0,003 * (0,012 / 0,020 / 0,028)	0,023 \pm 0,006 (0,007 / 0,018 / 0,035)	0,015 \pm 0,007 (0,003 / 0,012 / 0,031)
Harnsäure [μM]	0,69 \pm 0,04 (0,57 / 0,69 / 0,82)	1,87 \pm 0,24 *** (1,07 / 1,73 / 2,59)	1,66 \pm 0,44 ** (0,76 / 1,29 / 2,25)	2,43 \pm 0,99 ** (0,71 / 1,31 / 2,84)
Harnsäure/ PL [M/M]	0,020 \pm 0,002 (0,013 / 0,019 / 0,023)	0,055 \pm 0,011 ** (0,025 / 0,043 / 0,071)	0,048 \pm 0,014 (0,015 / 0,039 / 0,058)	0,047 \pm 0,026 (0,016 / 0,027 / 0,100)

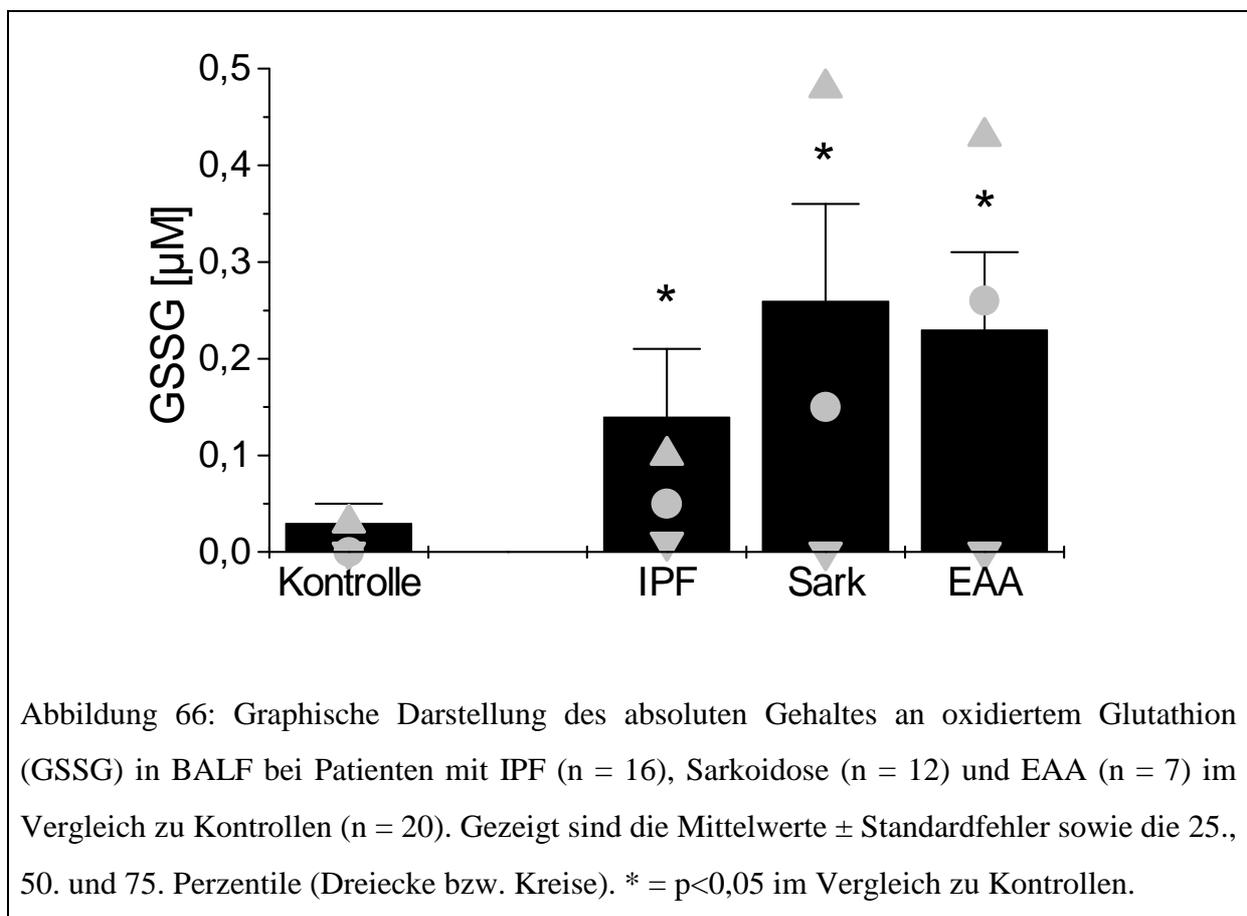
Tabelle 26: Konzentrationen der hydrophilen Antioxidantien und hydrophilen Marker für oxidativen Stress in der BALF. Angegeben sind absolute und relative (verglichen mit den PL) Konzentrationen des gesamten (GSX), des oxidierten und des reduzierten Glutathion (GSSG resp. GSH), Ascorbinsäure, und Harnsäure. Der Mittelwert \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise) sind gezeigt. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ verglichen mit den Kontrollen.

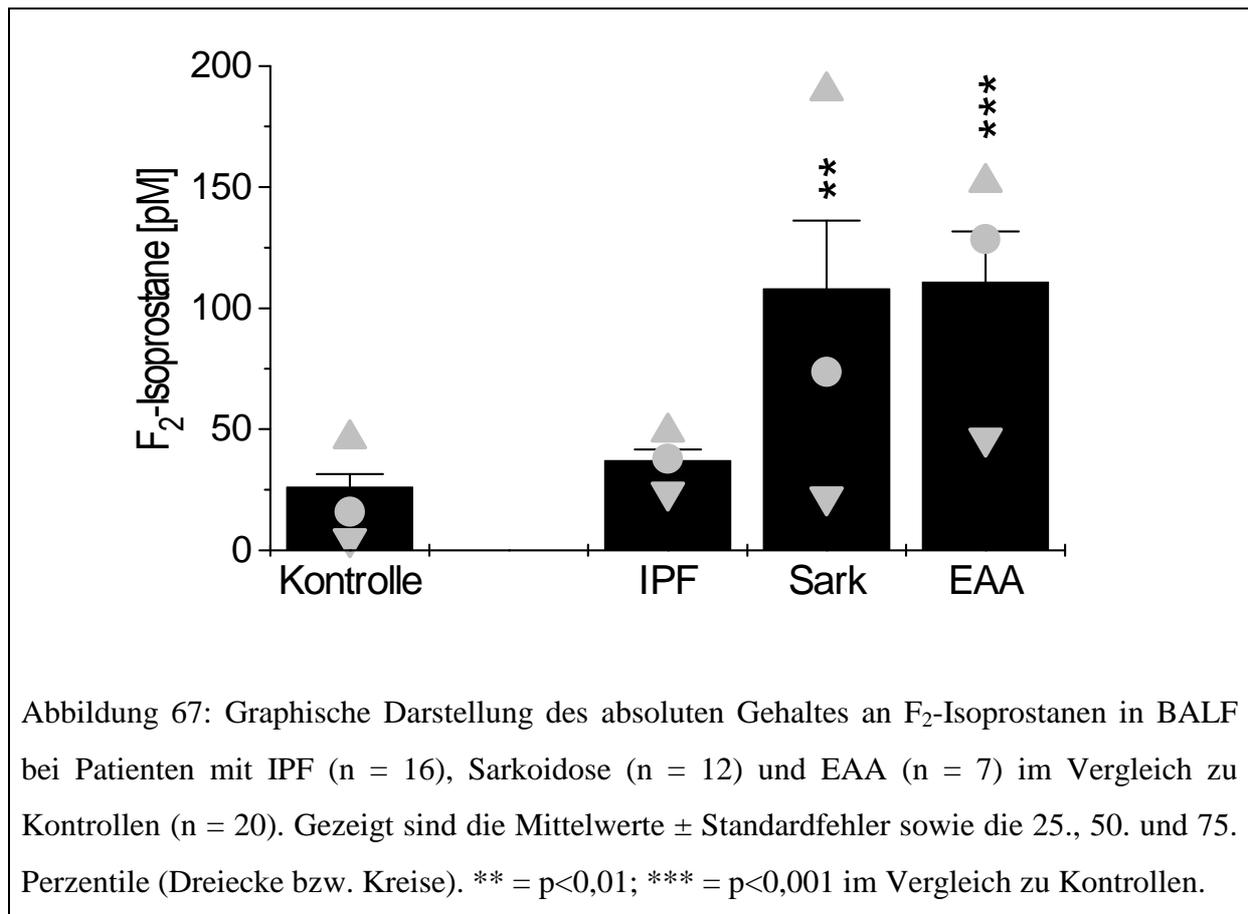
	Kontrollen	IPF	Sarkoidose	EAA
α-Tocopherol [nM]	26,95 \pm 3,21 (13,33 / 28,31 / 33,37)	53,68 \pm 7,02 *** (37,89 / 43,46 / 72,64)	47,45 \pm 10,51 (21,52 / 42,97 / 70,81)	n. b.
α-Tocopherol / PL [M/M] * 10³	0,67 \pm 0,06 (0,44 / 0,65 / 0,80)	1,67 \pm 0,26 *** (0,83 / 1,40 / 2,64)	0,73 \pm 0,14 (0,30 / 0,89 / 1,13)	n. b.
Retinol [nM]	3,97 \pm 0,66 (1,78 / 3,39 / 6,00)	11,58 \pm 2,83 ** (4,36 / 7,35 / 14,66)	9,52 \pm 2,16 * (5,44 / 7,70 / 9,62)	n. b.
Retinol/PL [M/M] * 10³	0,10 \pm 0,02 (0,04 / 0,07 / 0,13)	0,31 \pm 0,08 (0,11 / 0,23 / 0,37)	0,26 \pm 0,08 (0,08 / 0,20 / 0,37)	n. b.
Plasmalogene [ng/ml[]]	367,90 \pm 50,34 (193,36 / 328,43 / 470,27)	338,78 \pm 57,00 (228,68 / 379,27 / 459,48)	444,99 \pm 69,31 (281,10 / 426,83 / 653,43)	336,83 \pm 37,73 (258,77 / 352,64 / 399,09)
Plasmalogene / PL [M/M]	1,07 \pm 0,04 (0,99 / 1,05 / 1,16)	0,87 \pm 0,08 (0,66 / 0,98 / 1,06)	0,97 \pm 0,11 (0,66 / 1,00 / 1,20)	0,88 \pm 0,15 (0,57 / 0,90 / 1,16)
PUFA [μg/ml]	2,38 \pm 0,28 (1,51 / 2,19 / 3,31)	3,39 \pm 0,50 (2,27 / 3,26 / 3,67)	4,61 \pm 1,24 ** (2,62 / 3,68 / 4,41)	3,77 \pm 0,58 * (2,91 / 3,41 / 5,00)
PUFA / FA total [%]	7,19 \pm 0,29 (6,39 / 6,79 / 8,28)	10,71 \pm 1,51 * (7,96 / 9,54 / 11,19)	9,34 \pm 0,97 (6,88 / 8,62 / 12,33)	9,29 \pm 0,76 * (7,89 / 9,19 / 10,79)
F₂-Isoprostane [pM]	26,29 \pm 5,24 (4,70 / 15,87 / 46,00)	37,21 \pm 4,41 (23,95 / 37,83 / 48,80)	108,11 \pm 28,10 ** (21,99 / 73,65 / 189,69)	110,96 \pm 20,65 *** (46,26 / 128,52 / 151,88)
F₂-Isoprostane / PL [M / M]	0,79 \pm 0,18 (0,15 / 0,47 / 1,34)	1,17 \pm 0,19 (0,64 / 1,24 / 1,57)	11,51 \pm 8,86 * (0,59 / 1,59 / 4,43)	1,53 \pm 0,55 (0,68 / 1,23 / 2,69)

Tabelle 27: Konzentrationen der lipophilen Antioxidantien und der lipophilen Marker für oxidativen Stress in der BALF. Angegeben sind absolute und relative (verglichen mit PL) Konzentrationen des α -Tocopherol, des Retinol, der Plasmalogene, der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) und der F₂-Isoprostane. Der Mittelwert \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise) sind gezeigt. * = p<0,05; ** = p<0,01, *** = p<0,001 verglichen mit gesunden Kontrollen.

Marker für oxidativen Stress

Das oxidierte Glutathion als Marker für erhöhten oxidativen Stress ergab signifikant erhöhte Werte ($p < 0,05$) in allen drei Patientenkollektiven. Die F_2 -Isoprostane waren bei den Sarkoidose- und EAA-Patienten signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Die höchste Signifikanz wurde bei Patienten mit EAA erreicht ($p < 0,001$), wo ein etwa 4-fach höherer Wert im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden wurde (Abbildung 67).





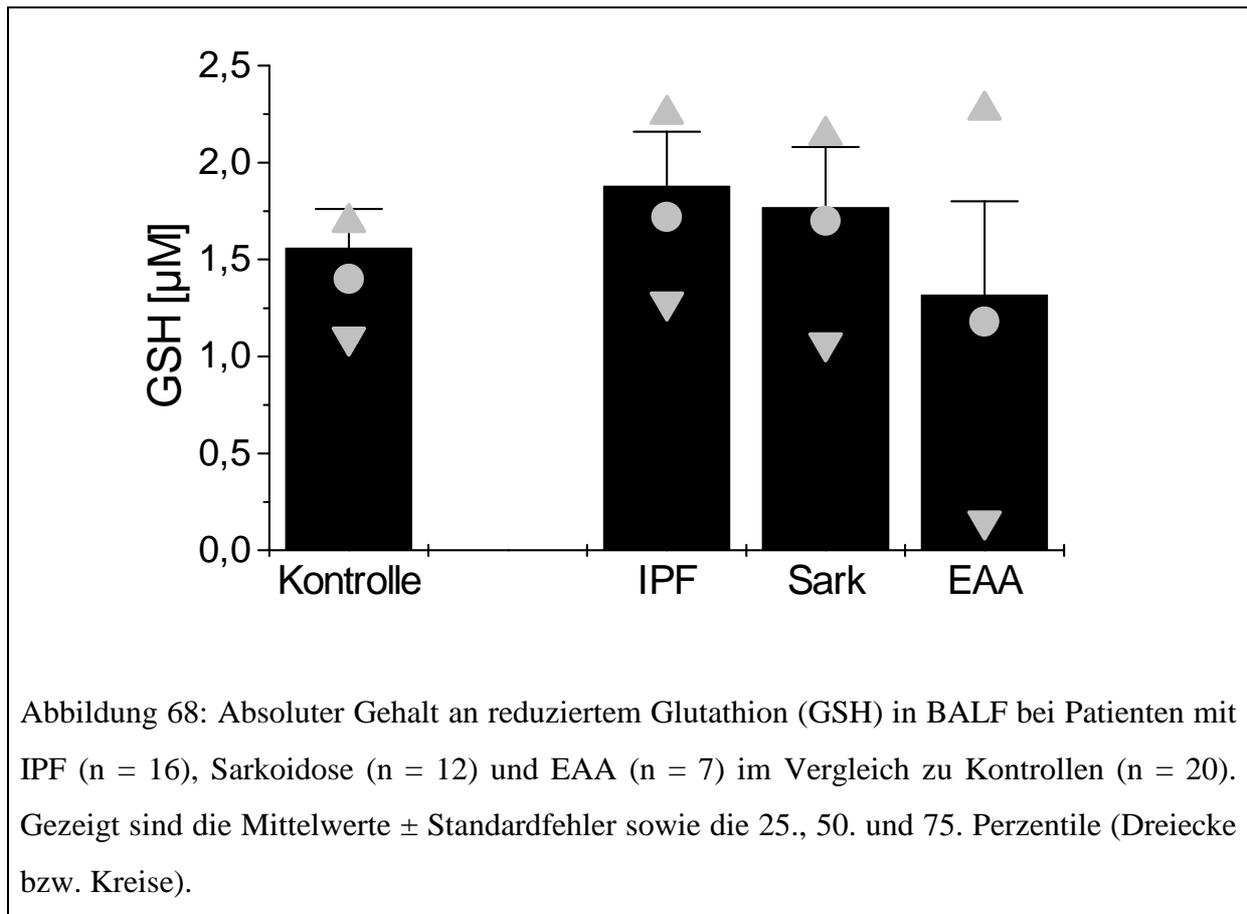
Antioxidantien

Gemessen wurden die antioxidativ wirksamen Substanzen reduziertes Glutathion, Ascorbinsäure, Harnsäure, α -Tocopherol und Retinol. Die beiden letzteren konnten aufgrund von Probenmaterialmangel im Kollektiv EAA nicht gemessen werden. Außerdem wurden die ebenfalls antioxidativ wirksame Lipidkomponente Plasmalogene (aus Gesamt-Phospholipiden) und die mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) aus der BALF gemessen.

Gegenüber nur geringen, nicht signifikanten Veränderungen bei der Messung des reduzierten Glutathions und der hydrophilen Ascorbinsäure zeigten sich Signifikanzen in allen Kollektiven bei den Werten der Harnsäure: IPF- und Sarkoidose-Patienten wiesen durchschnittlich eine circa 2,5fache, EAA-Patienten sogar eine fast 3,5fache Erhöhung gegenüber den Kontrollen auf (Abbildung 70).

Im Rahmen der Messung der lipophilen Antioxidantien fanden sich bei α -Tocopherol im IPF-Kollektiv Signifikanzen ($p < 0,001$) gegenüber den Kontrollen (Abbildung 71). Die Retinol-Spiegel waren in beiden Gruppen signifikant erhöht ($p < 0,05$ bzw. $0,01$; Abbildung 72). Aufgrund des Mangels an BHT-behandeltem BALF-Material wurden Plasmalogene und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) nur in 14 Kontrollen gemessen. Die Absolutwerte

der Plasmalogene aus Gesamt-Phospholipiden ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen und den Kontrollen (Abbildung 73). Der absolute Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) war bei Sarkoidose- und EAA-Patienten bezogen auf gesunde Kontrollen signifikant erhöht (Abbildung 74).



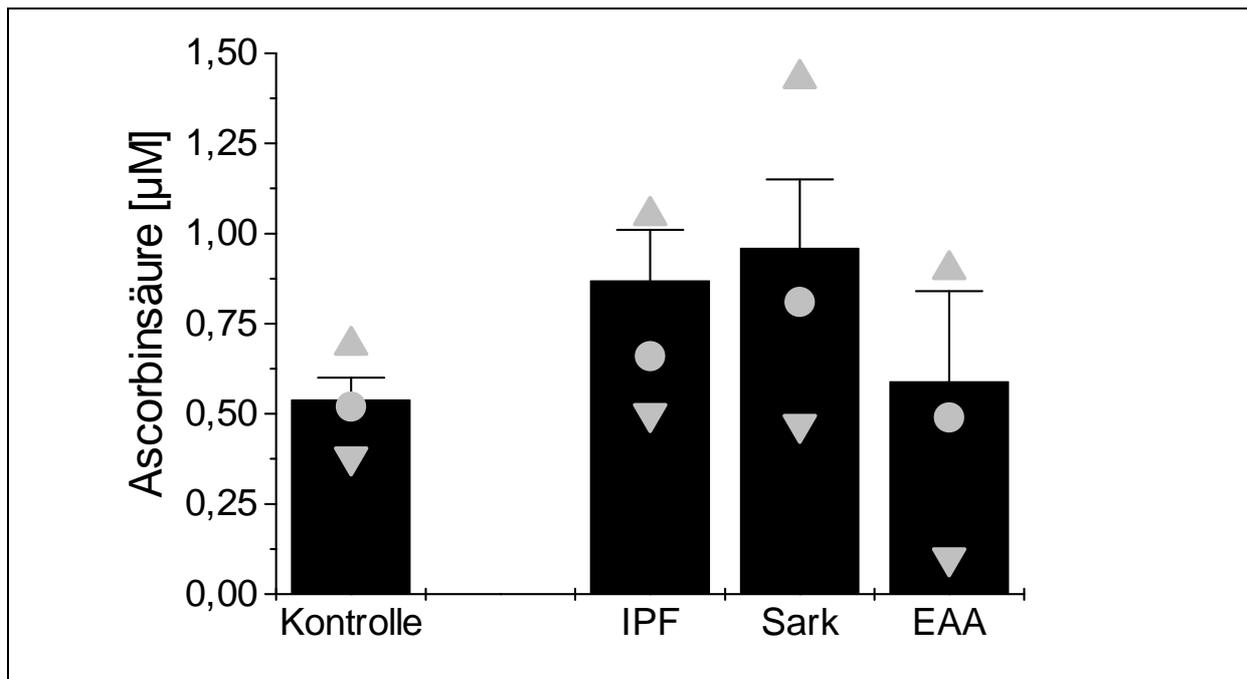


Abbildung 69: Absoluter Gehalt an Ascorbinsäure in BALF bei Patienten mit IPF (n = 16), Sarkoidose (n = 12) und EAA (n = 7) im Vergleich zu Kontrollen (n = 20). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise).

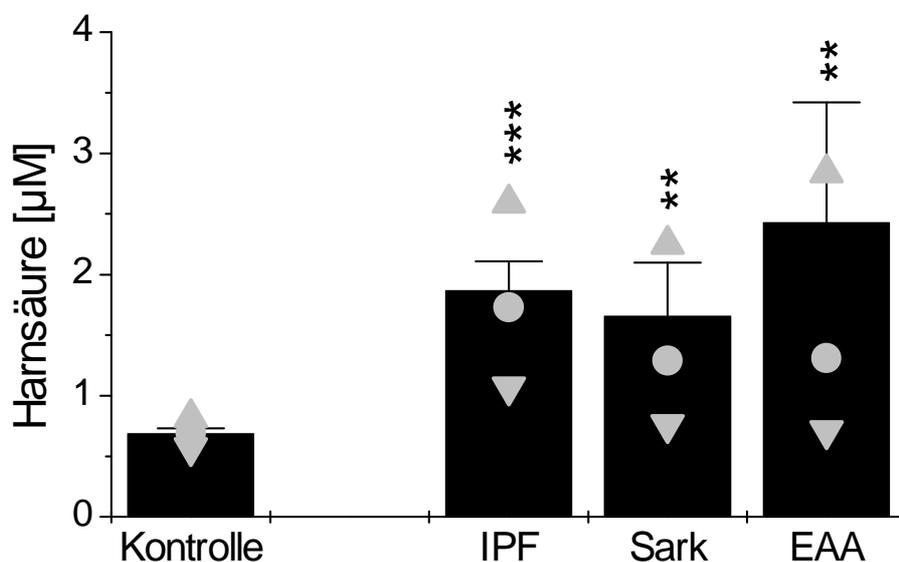


Abbildung 70: Absoluter Gehalt an Harnsäure in BALF bei Patienten mit IPF (n = 16), Sarkoidose (n = 12) und EAA (n = 7) im Vergleich zu Kontrollen (n = 20). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise). ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ im Vergleich zu Kontrollen.

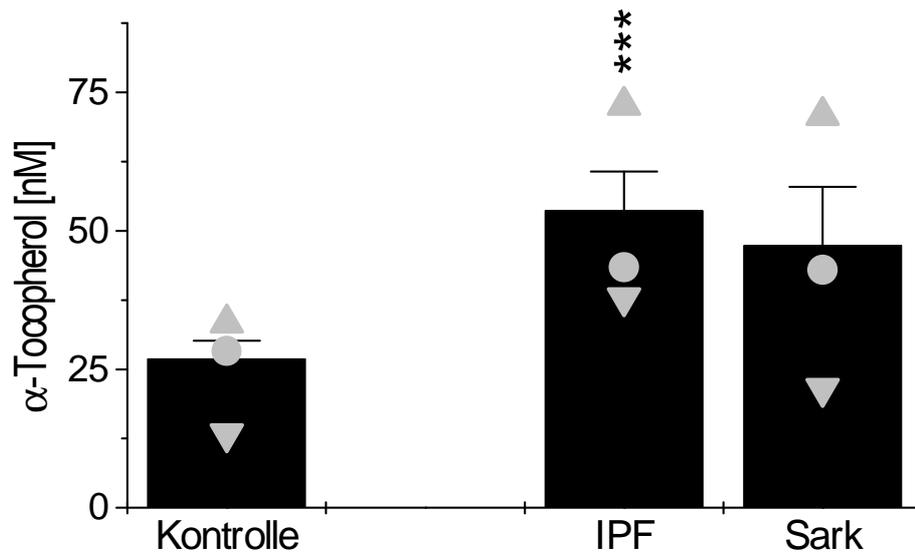


Abbildung 71: Absoluter Gehalt an α -Tocopherol in BALF bei Patienten mit IPF (n = 16) und Sarkoidose (n = 12) im Vergleich zu Kontrollen (n = 20). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise). *** = $p < 0,001$ im Vergleich zu Kontrollen.

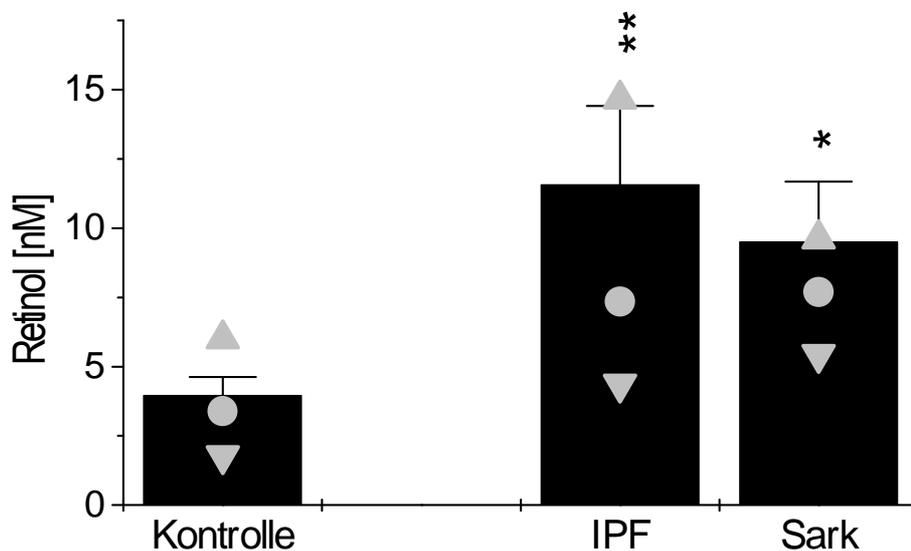


Abbildung 72: Absoluter Gehalt an Retinol in BALF bei Patienten mit IPF (n = 16) und Sarkoidose (n = 12) im Vergleich zu Kontrollen (n = 20). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

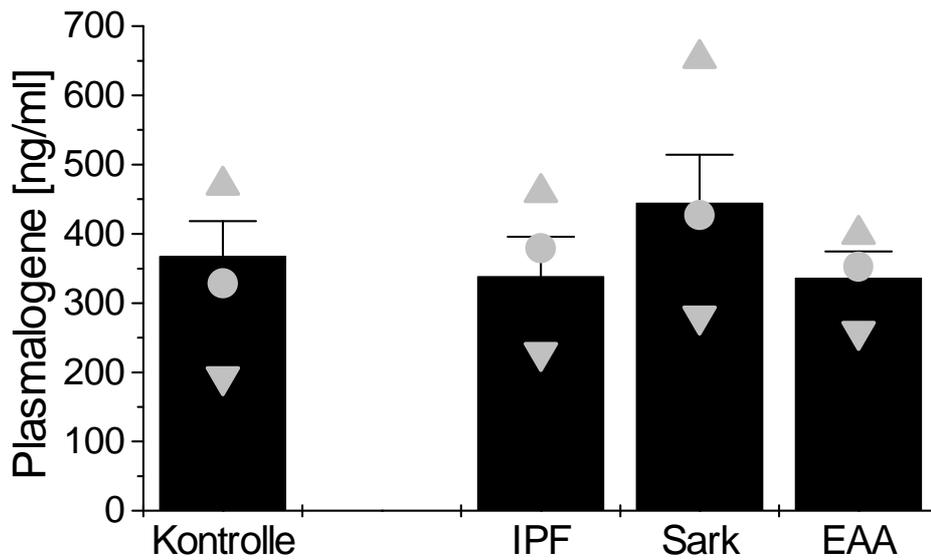


Abbildung 73: Absoluter Gehalt an Plasmalogen in BALF bei Patienten mit IPF (n = 16), Sarkoidose (n = 12) und EAA (n = 7) im Vergleich zu Kontrollen (n = 14). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise).

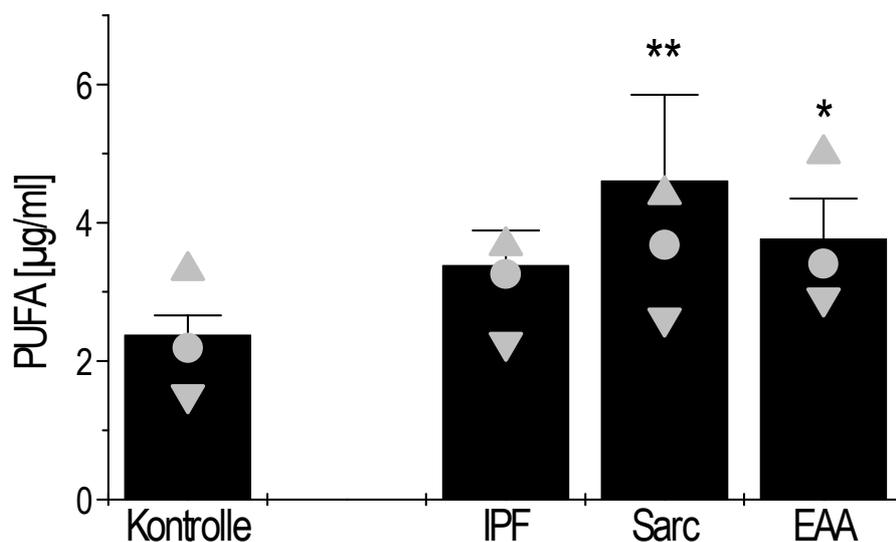


Abbildung 74: Absoluter Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) in BALF bei Patienten mit IPF (n = 16), Sarkoidose (n = 12) und EAA (n = 7) im Vergleich zu Kontrollen (n = 14). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler sowie die 25., 50. und 75. Perzentile (Dreiecke bzw. Kreise). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollen.

5 Diskussion

Im Folgenden soll zuerst auf die Validität der Messmethoden, anschließend kurz auf die einzelnen untersuchten Studien bzw. Modelle und abschließend auf allgemeine Mechanismen des oxidativen Stresses und der antioxidativen Abwehr sowie auf die aus dieser Arbeit möglicherweise resultierenden Schlussfolgerungen eingegangen werden.

5.1 Messmethodik

Generell wurde bei allen Proben streng darauf geachtet, dass die Lagerung bei -80°C erfolgte und die Proben erstmalig direkt vor der Messung aufgetaut wurden. In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise, dass ansonsten die Konzentrationen der einzelnen Antioxidantien durch Zerfall oder Umwandlung falsch niedrig gemessen werden können [70].

Es war sowohl bei Patienten als auch bei den gesunden Kontrollen nicht möglich, mit der momentan im Labor etablierten Messmethodik (HPLC und Fluoreszenz-Detektion) auch nach einer Konzentrierung der Proben Malondialdehyd (MDA) als Abbauprodukt der Lipidperoxidation zu messen. Dies wies auf sehr niedrige MDA-Spiegel in BALF hin. Diese Beobachtung ist in der Literatur bereits beschrieben worden [70, 73]. Hingegen existieren Untersuchungen, in denen von den Autoren in der BALF MDA als Thiobarbitursäure-reaktive Substanz (TBARS) mittels simpler Spektralphotometrie gemessen wurde [160, 161]. In der Regel liegen die so erhaltenen Ergebnisse um ein Mehrfaches höher als die mittels HPLC gewonnenen Daten, was durch die Reaktion unspezifischer Chromophore, insbesondere anderer Aldehyde oder in den Proben bereits vorhandener Substanzen wie Pigmente oder Glycoproteine, mit der Thiobarbitursäure erzeugt wird [70, 162]. Dies mag als weiteres Indiz dafür gelten, dass die Bestimmung von MDA mittels Spektralphotometer keine spezifischen Ergebnisse liefert.

In den Kaninchen-BALF (Bleomycin-Modell) war die Bestimmung hingegen möglich. Dies mag daran liegen, dass Kaninchen-Lavagen um ein Vielfaches höher konzentriert sind. So ist die Phospholipidkonzentration im Vergleich zu humanen Lavagen circa zehnfach erhöht.

Als weitere Parameter zur Bestimmung des oxidativen Stresses in der BALF wurden in dieser Dissertation das oxidierte Glutathion (GSSG) und die F_2 -Isoprostane herangezogen. Das GSSG wurde mittels des seit langem etablierten enzymatischen Recyclingassays gemessen, der aufgrund der besonderen Gegebenheiten in der BALF weiter optimiert wurde. Die F_2 -Isoprostane wurden mittels eines ELISA-Verfahrens gemessen, welches bereits von anderen Autoren durch Vergleich mit der Referenzmethode, GC/MS, validiert wurde. Beide Assays

wurden (wie auch alle anderen hier verwendeten Verfahren zur Messung von Antioxidantien und oxidativen Zerfallsprodukten), im Zuge dieser Dissertation hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Linearität validiert.

Bei der weiteren Analytik der alveolären Antioxidantien stellte sich die Lavage-bedingte, starke Verdünnung der *epithelial lining fluid* (ELF) ebenfalls als messtechnische Herausforderung dar. Die Etablierung sehr sensitiver Messmethoden war hierzu notwendig. Die Validität konnte hierbei bei allen nachgewiesenen Substanzen obligatorisch durch den linearen Verlauf der Standardkurven als auch durch das sogenannte *spiken* bewiesen werden. Hier wurde einzelnen Aliquots einer BALF-Probe jeweils steigende Mengen von Standards zugefügt, ein streng linearer und proportionaler Verlauf der Messkurven wies auf ein valides Messverfahren hin. Dies war bei allen hier verwendeten Methoden der Fall.

Für die einzelnen Messverfahren wurden weiterhin noch spezielle Validitätsprüfungen etabliert. So wurde bei jeder GSSG-Messung die erfolgreiche Blockade von GSH durch das jeweilige Mitmessen eines GSH-Standards gezeigt. Weiterhin wurde die Tagesvariabilität anhand eines Aliquots einer bestimmten Kaninchen-BALF (die ebenfalls für alle Messungen verwendet wurde) im Sinne eines *day-to-day* Standards kontrolliert.

Ein Problem der Tocopherol/Retinol-Messung war die unterschiedliche Probenbehandlung im Rahmen der Hexanextraktion. Hier wurde die dadurch erzielte Messvariabilität durch das obligatorische Mitmessen eines internen Standards (Retinol-Acetat) kompensiert. Nach Etablierung dieses „Sicherheitsfaktors“ konnte die Validität der Messmethode durch eine Überprüfung der Reproduzierbarkeit an Aliquots ein und derselben Probe demonstriert werden.

5.2 Bleomycin-Modell

Bleomycin induziert oxidativen Stress in der Lunge, welcher unter anderem über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zur Apoptose von alveolären Epithelzellen führt [163]. Der zeitliche Verlauf im Bleomycin-Modell lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: Zuerst (Tag 4-16) kommt es zu einer ARDS-ähnlichen Lungenschädigung, mit erhöhter mikrovaskulärer Permeabilität, konsekutiver Exsudation von Plasmaproteinen in den Alveolarraum und Lungenödembildung [164]. Die Oxygenierung ist in dieser Phase am schlechtesten, die biophysikalischen Eigenschaften des Surfactant maximal reduziert. Im weiteren Verlauf entwickelt sich die fibroproliferative Phase mit erhöhter extrazellulärer Matrixdeposition und Fibroblasteninvasion und einer typischen, im HRCT deutlich erkennbaren, retikulären Fibrose.

Zwei Ergebnisse der Messungen kristallisieren sich aus den Daten heraus: Erstens finden sich deutlich erhöhte Spiegel an Markern des oxidativen Stresses (GSSG, MDA, Isoprostane) während des gesamten Beobachtungszeitraums (0–64 Tage). Der Peak des GSSG und der F₂-Isoprostane liegt hierbei in der Akutphase, während MDA sein Maximum am 32. Tag erreicht. Zweitens zeigen die Antioxidantien durchweg erhöhte Spiegel, was auf eine Hochregulation im Sinne einer adaptiven Antwort des Metabolismus auf den erhöhten Stress schließen lässt. Einzig reduziertes Glutathion zeigt anfangs im Vergleich zu den Kontrollen leicht erniedrigte Spiegel. Hervorzuheben ist hierbei, dass vor allem in der akuten inflammatorischen Phase ein erhöhter Verbrauch der Antioxidantien aufgrund der ROS zu postulieren ist und letztlich trotz der adaptiven Fähigkeiten der Lunge die antioxidative Abwehr überfordert ist. Wäre diese Abwehr suffizient, wären normwertige Marker des oxidativen Stresses zu erwarten gewesen. Im weiteren Verlauf sinken die einzelnen Marker in der fibroproliferativen Phase tendenziell wieder in Richtung Kontrollen ab, lediglich Ascorbinsäure erreicht den Peak erst am 64. Tag nach Bleomycin-Verneblung. Da Vitamin C für Kaninchen nicht essentiell ist, sondern von ihnen selbstständig produziert werden kann, liegt hier möglicherweise eine durch den oxidativen Stress getriggerte und persistierend gesteigerte Produktion vor, die letztlich auf genetischer Ebene reguliert werden muss. Bereits in früheren Studien konnte ja gezeigt werden, dass alveoläre Typ-II-Zellen die lipophilen Antioxidantien Plasmalogene, Retinol und α -Tocopherol als integrale Bestandteile des pulmonalen Surfactant synthetisieren bzw. sezernieren können [165, 48].

5.3 Humane Studien

5.3.1 Akut-Inflammatorische Lungenerkrankungen

Ein primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Regulation von niedermolekularen Antioxidantien bei den akut-inflammatorischen Lungenerkrankungen ARDS und schwerer Pneumonie, innerhalb der letzteren Gruppe zudem auch separat für spontan atmende oder maschinell beatmete, immuninkompetente Patienten mit *Pneumocystis jirovecii* Pneumonie (PCP). Bei einem Teil der Patienten wurde auch der zeitliche Verlauf anhand repetitiv durchgeführter Lavagen untersucht.

Im Unterschied zu anderen Erkrankungen mit zugrundeliegenden entzündlichen Ereignissen, wie zum Beispiel Asthma [83] oder Bronchiolitis obliterans bei Lungentransplantierten [170], ist in diesen Entitäten bislang wenig bekannt bezüglich der Regulation und Verteilung der alveolären niedermolekularen antioxidativen Moleküle. Bisherige Untersuchungen bei ARDS

und Pneumonie waren auf Glutathion-Spiegel und BALF-Konzentrationen einiger Enzyme und antioxidativ wirksamer Proteine fokussiert. In der vorliegenden Studie wurden GSH, die hydrophilen Antioxidantien Ascorbinsäure und Harnsäure sowie die membranassoziierten Antioxidantien Plasmalogene, Vitamin A und E als prädominierende niedermolekulare Antioxidantien in der BALF gesunder Individuen identifiziert. Vergleichsweise geringe Mengen an Oxidationsprodukten wie GSSG und F₂-Isoprostane wurden detektiert.

Unter den Bedingungen von ARDS und Pneumonie waren die Marker für oxidativen Stress (GSSG und F₂-Isoprostane) um ein Mehrfaches erhöht, wie bereits in früheren Untersuchungen festgestellt wurde [98, 100]. Weiterhin wurde die Hochregulation der Mehrzahl der untersuchten Antioxidantien konsistent in allen beteiligten Kollektiven beobachtet. Tendenziell gab es zwischen den Kollektiven nur eine Unterscheidung, nämlich der fehlende Anstieg des α -Tocopherol in der ARDS-Gruppe. Ansonsten fielen lediglich die Signifikanzen unterschiedlich aus. Das alveolär am zahlreichsten vorhandene Antioxidans GSH zeigte hierbei jedoch keine signifikante Veränderung im Vergleich mit den Kontrollen. Die Hochregulation der hydrophilen Antioxidantien (AA und UA) war ausgeprägter in Relation zu den lipophilen Antioxidantien (Vitamin A und E). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA), die als „*sacrificial antioxidants*“ fungieren könnten, waren ebenfalls in den aktuellen Patientenkollektiven deutlich erhöht.

Im Kontrast zu allen anderen hier bestimmten Antioxidantien waren die Plasmalogene, die als integrale Komponenten des pulmonalen Surfactants [127] und kraftvolle Antioxidantien angesehen werden, in allen Patientengruppen sowohl bezüglich ihres absoluten als auch ihres relativen Gehaltes (verglichen mit den Gesamtphospholipiden) erniedrigt. Einerseits könnte dies auf gesteigerte Degradation und/oder andererseits auf gestörte Synthese/Sekretion hinweisen. Interessanterweise differiert diese Beobachtung deutlich von den ebenfalls von den alveolären Epithelzellen Typ II sezernierten und unter diesen Prämissen als hochreguliert identifizierten Vitamine A und E [127]. Als Begründung liegt möglicherweise eine unterschiedliche Regulation auf zellulärer Ebene vor oder das Plasmalogen wird von der Zelle nicht als eigenständig wirksames Antioxidans erkannt, sondern nur als „Surfactant-Schutz“ co-synthetisiert und daher an Surfactant gekoppelt.

Bei einigen ARDS- bzw. Pneumonie Patienten wurde auch der zeitliche Verlauf beobachtet. Hier zeigte sich bei beiden Kollektiven tendenziell ein Absinken der Konzentrationen der Antioxidantien. Die antioxidative Abwehr ist hierbei nicht nur durch die akute Entzündung kompromittiert; auch die mechanische Überdruckbeatmung mit hohen

Sauerstoffkonzentrationen führt als zweiter Faktor zur zusätzlichen Schädigung der Lunge (dies war bei den PCP-Vergleichslavagen beatmet/nicht beatmet nachzuweisen). Klinisch sind die Folgen längerfristiger Beatmung unter anderem in Form von Barotraumen, Dys- und Atelektasen und Schädigung durch erhöhten FiO_2 bekannt. Diese treten auch beim zuvor Lungengesunden auf, so dass beim bereits initial lungengeschädigten ARDS- oder Pneumonie-Patienten der (oxidative) Stress umso größer wird. Das hauptsächliche Absinken der niedermolekularen antioxidativen Marker könnte somit durchaus als Erschöpfung des Organismus trotz adaptiver Antwort im Rahmen dieser „Doppelbelastung“ interpretiert werden. Interessanterweise sinken beim Bleomycin-Modell am Kaninchen, das in der frühen Phase ja eine akut-entzündliche Lungenerkrankung simuliert, die antioxidativen Marker erst nach Beendigung dieser Phase ab, eine Belastung in Form längerfristiger maschineller Beatmung fehlte bei diesen Tieren.

Als Hinweis für sehr frühe fibroproliferative Veränderungen bei ARDS ließ sich bei ALI bereits 24 Stunden nach Intubation Prokollagen Typ III nachweisen [180], ebenfalls fanden sich bei Bleomycin-induziertem ALI erhöhte TGF-beta-Spiegel bereits nach zwei Tagen [181]. Es somit davon auszugehen, dass durch die bereits sehr früh beginnende Fibrosierung bei ARDS der oxidative Stress (wie auch bei Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen) noch verstärkt wird.

5.3.2 Chronisch-interstitielle Lungenerkrankungen

Bezüglich der hier untersuchten Kollektive (Idiopathische pulmonale Fibrose (IPF), Sarkoidose (SARK) und exogen allergische Alveolitis (EAA)) liegen bislang nur wenige Untersuchungen hinsichtlich der antioxidativen Abwehr des ELF und oxidativer Degradationsprodukte vor [101, 86, 88]. Aus Materialmangel konnten die fettlöslichen Vitamine A und E bei der EAA leider nicht bestimmt werden.

Drei untersuchte Parameter fallen bei diesen Krankheitsentitäten vor allem ins Auge: Wie bei den BALF von Patienten mit akut-entzündlichen pulmonalen Erkrankungen weisen die hier untersuchten Kollektive deutlich erhöhte GSSG-Spiegel im Vergleich zu den Kontrollen auf. Der bei diesen Krankheiten vorhandene, persistierende oxidative Stress manifestiert sich ebenfalls in hochsignifikant erhöhten Spiegeln an F_2 -Isoprostanen, was vor allem bei der SARK und der EAA ins Auge fällt (etwa 10-fach erhöhte Werte für GSSG und etwa 4-fach erhöhte Werte für F_2 -Isoprostane). In Analogie zu den Resultaten aus BALF von akut-inflammatorischen Lungenerkrankungen waren hier ebenfalls die GSH-Spiegel nur wenig verändert. Weiterhin war vor allem eine Substanz, die Harnsäure, ca. dreifach und damit

deutlich hochreguliert. Ob dies wirklich eine adaptive Antwort der Lunge zur Stärkung der antioxidativen Barriere ist, oder die Harnsäure möglicherweise auch im Rahmen eines chronischen Zellunterganges oder –schadens erhöht ist, bleibt unklar. Die weiteren Antioxidantien Vitamin C, A und E waren z. T. nur tendenziell, z. T. aber auch signifikant erhöht. Wie auch bei den akut-entzündlichen BALF fanden sich tendenziell erniedrigte Plasmalogenspiegel. Interpretiert man die deutlich heraufregulierte antioxidative Barriere bei den ARDS- und Pneumonie-Patienten als adaptive Antwort, so müsste man für ILD Patienten schlussfolgern, dass bei diesen chronischen Erkrankungen keine weitere und damit adäquate Hochregulation mehr stattfinden kann und die inkompetente antioxidative Abwehr für den Krankheitsprozess mitverantwortlich ist [46, 171]. Die Ätiologie der Krankheiten der hier untersuchten Proben ist ja bisher nur teilweise aufgeklärt. Gezeigt werden konnte jedoch bereits zuvor, dass bei IPF ein erhöhter oxidativer Stress vorliegt [86, 87], der durch hochdosierte Gabe von Acetylcystein (im Rahmen einer Normalisierung der Glutathion-Spiegel) korrigierbar ist. Im Rahmen der IFIGENIA-Studie konnte dann bewiesen werden, dass der klinische Verlauf durch Acetylcystein-Gabe der IPF in Form einer Verbesserung der Vitalkapazität und der Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid im Vergleich zur Placebogruppe verlangsamt werden kann [180].

5.4 Allgemeine Diskussion

In den für die vorliegende Dissertation durchgeführten Studien konnte zuvor dargelegt werden, dass einerseits die Lunge durch oxidativen Stress kompromittiert wird (nachgewiesen in Form der erhöhten Spiegel an Degradationsprodukten), andererseits im ELF deutlich erhöht Mengen an Antioxidantien zur Protektion der Lunge vorliegen. Generell lässt sich sagen, dass die relativ niedrigen Konzentrationen von F₂-Isoprostanen in BALF darauf hindeuten, dass die Generation dieser oxidierten Lipide unter diesen Bedingungen limitiert ist oder dass sie schnell aus dem Alveolarraum entfernt werden, entweder über metabolische Stoffwechselwege oder über den Transfer in das Blut-Kompartiment.

Das alveolär dominierende Antioxidans GSH zeigte bei fast allen untersuchten Proben keine signifikante Veränderung im Vergleich mit den Kontrollen (Lediglich in der Akutphase der Bleomycinstudie erniedrigte Spiegel). Dies steht im Kontrast zu früheren Studien, in denen eine signifikante Reduktion der GSH-Spiegel bei ARDS gefunden wurde [98, 106]. Der Hauptgrund für diese Diskrepanz könnte dabei die Benutzung eines Harnstoff-Koeffizienten zur Korrektur der BALF-Variabilität in diesen Studien gewesen sein. Es wurde bereits wiederholt diskutiert, dass der BALF/Blut-Harnstoff-Quotient aufgrund der schnellen

Nachdiffusion des Harnstoffes unter der BAL fast nicht fehlerfrei durchführbar ist. Dies gilt natürlich besonders für Zustände, in denen ein *capillary leak* im Rahmen entzündlicher Lungenerkrankungen vorliegt. Außerdem könnte die existierende Ödemflüssigkeit, reich an Harnstoff, zu falsch niedrigen Werten und zu großen Variationen zwischen den Patienten führen [67]. In der vorliegenden Studie wurden ebenfalls diese Harnstoff-korrigierten Werte bei Patienten mit ARDS und gesunden Kontrollen berechnet, die Resultate sind hier nicht im Detail dargestellt. Tendenziell ergab sich eine sehr hohe Variabilität im Vergleich zu den ursprünglichen Daten. Als einziges Antioxidans war das GSH nach dieser Korrektur signifikant erniedrigt, bei allen weiteren Parametern ergaben sich leichte Erhöhungen der Konzentrationen der Antioxidantien im Vergleich zu Kontrollen, die aber im Wesentlichen nun unsignifikant waren.

Aufgrund der hier beobachteten stark erhöhten Variabilität der Daten, aber auch als Konsequenz auf eine große Anzahl Veröffentlichungen, die von der Ungenauigkeit dieser Harnstoffkorrektur berichten, wurden in den vorliegenden Studien die Richtlinien der Europäischen Respiratorischen Gesellschaft (ERS) berücksichtigt [70, 69, 68] und alle Werte als Konzentrationen pro mL der BALF dargestellt. Zusätzlich, wie von der ERS Taskforce vorgeschlagen, wurde die Recovery der instillierten Lavage-Flüssigkeit dargestellt und die BALF Phospholipid-Konzentration wurde zusätzlich als Denominator benutzt.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde ein persistierender oxidativer Stress der pulmonalen Endstrecke sowohl bei akut entzündlichen und fibroproliferativen Lungenerkrankungen des Menschen wie auch des Kaninchens beobachtet. Bezüglich der untersuchten Parameter sind Kaninchen im Vergleich zum Menschen allerdings in der Lage, Ascorbinsäure zu synthetisieren. Noch weitgehend ungeklärt ist hierbei, in welchem Ausmaß dies in der Lunge geschieht. Vergleicht man einerseits die Ergebnisse der Bleomycinstudie mit der humanen Verlaufsstudie bei ARDS- und Pneumonie-Patienten, so stellt der hochsignifikante Anstieg der Ascorbinsäure bei den Kaninchen möglicherweise eine Ausnutzung dieser Fähigkeit zur Anpassung an den oxidativen Stress dar. Als weiterer metabolischer Unterschied zwischen Menschen und Kaninchen gilt, dass Harnsäure von Kaninchen in das wasserlösliche Allantoin verstoffwechselt werden kann [184]. Harnsäure mit seiner antioxidativen Fähigkeit fällt als Produkt des Purinstoffwechsel unter anderem bei Zelluntergang und -schädigung an. Einen Unterschied der Tendenzen gab es hier in der akut-inflammatorischen Phase zwischen Mensch und Kaninchen nicht, bei beiden fanden sich signifikant erhöhte Harnsäurespiegel. Vergleicht man allerdings die späte, fibroproliferative

Phase der Bleomycinstudie mit den gemessenen Proben der humanen chronisch-interstitiellen Lungenerkrankungen, so findet sich interessanterweise bei ersteren eine Wertenormalisierung, während letztere hochsignifikant erhöht sind. Neben den Unterschieden im Pathomechanismus zwischen den durch Bleomycin verursachten Veränderungen und den hier untersuchten ILD könnten diese unterschiedlichen Befunde die metabolisch unterschiedlichen Fähigkeiten von Mensch und Tier widerspiegeln.

Trotz der Tatsache, dass bei vielen Messungen alveoläre Antioxidantien vermehrt gefunden wurden, persistiert ein Überschuss an oxidativen Kräften, welcher letztlich zum Ungleichgewicht der Oxidantien/Antioxidantien führt. Im Ergebnis kommt es durch die Bildung von ROS und RNS zu molekularen Veränderungen, unter anderem in Form von Lipidperoxidation, DNA- und Proteinschaden. Diese könnten zu folgenden Konsequenzen führen:

1. Parenchym-, Epithel- und Endothelialzellen werden durch ROS geschädigt, was zu erhöhter vaskulärer Permeabilität führen könnte.
2. Schädigung der Surfactant-Proteine und chemische Modifikation durch reaktive Radikale könnte eine gestörte Surfactant-Aktivität hervorrufen. Dies wurde tatsächlich in mehreren Studien beobachtet [94].
3. Möglicherweise wichtiger als direkter Surfactant-Schaden könnte die durch Oxidantien induzierte Störung der Surfactant-Synthese und des Surfactant-Metabolismus der Alveolarepithel II-Zellen für die bei ARDS beobachtete starke Störung der Surfactant-Funktion verantwortlich sein [123, 122, 125].
4. Induktion fibroproliferativer Prozesse

Trotz der zahlreichen Untersuchungen bleiben die genauen Wege der Aktionen von niedermolekularen Antioxidantien in biologischen Flüssigkeiten und Geweben, die relative Wichtigkeit der individuellen Oxidantien und der individuelle Einfluss auf die antioxidative Gesamtkapazität im Alveolarraum unklar. Sogar die Quellen der Antioxidantien und ihr Metabolismus sind relativ unbekannt.

Das auffälligste Ergebnis der für diese Dissertation durchgeführten Studien, der Anstieg zahlreicher Antioxidantien im Alveolarraum, könnte Spekulationen hervorrufen, dass der antioxidative Metabolismus in Alveolarepithelzellen und oxidativem Stress bei ALI (und in etwas geringerem Maße auch bei chronisch interstitiellen Erkrankungen) beschleunigt ist. Es sollte hierbei jedoch beachtet werden, dass die hier benutzten Studiendesigns eine solche Hypothese nicht stärken können, vor allem da die BALF Spiegel der Antioxidantien nur

Nettoeffekte verschiedener Prozesse widerspiegeln. Weitere Untersuchungen zum Metabolismus der Antioxidantien in Lungenepithel unter oxidativem Stress sind notwendig. Bisherige Arbeiten waren hauptsächlich auf die Regulation von Glutathion fokussiert. Zum Beispiel zeigten Rahman et al. [172], dass sowohl Glutathion als auch gamma-Glutamylcystein-Synthetase-Spiegel in Alveolarepithelzellen Typ II nach Behandlung mit Oxidantien anstiegen. Dies könnte durch Aktivierung redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel nukleärer Faktor kappa-B und Aktivator-Protein-1 hervorgerufen werden, die in die Regulation antioxidativer Gene involviert sind. Eine Studie von Bloomberg et al. [111] zeigte, dass einzelne alveoläre Antioxidantienspiegel nach Verlust durch Dieselabgase rasch wieder aufgefüllt wurden, was auf schnelle Stoffwechselfade in der Lunge hinweist. Während der Exposition von Tabakrauch [75] und bei Patienten mit Asthma [173] wurden erhöhte GSH-Spiegel der BALF gefunden. Weiterhin zeigten Tiere, die subletalem oxidativem Stress (unter anderem Ozon, Hypoxie und Hyperoxie) ausgesetzt waren, erhöhte Antioxidantienspiegel [174, 175] und eine gesteigerte Toleranz gegenüber nachfolgender Hyperoxie [175]. Zusammengenommen könnten diese Beobachtungen auf die adaptiven Fähigkeiten der Lunge im Laufe von Oxidantien-induzierten Lungenschäden hinweisen.

Ein weiterer Aspekt, der beachtet werden sollte, ist, dass die Art und Weise einer maschinellen Beatmung ebenfalls die Genexpression der Antioxidantien und deren Freisetzung beeinflussen kann. Copland et al. [176] demonstrierten überzeugend den Einfluss der Beatmungsart auf die Genexpression der Lunge. Im Vergleich zur nichtbeatmeten Lunge fanden sie erhöhte Spiegel von proinflammatorischen Genen (z.B. Interleukin-1 beta) in bronchialen Epithelzellen unter Benutzung des „cell picking“, in situ Hybridisation und Microarray-Techniken nach Hochfrequenz-Beatmung. Signifikante Hoch- und Herunterregulation verschiedener Gene wurde 30 Minuten nach Hochfrequenz-Beatmung beobachtet. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass die mechanische Dehnung während der Hochfrequenz-Beatmung das Lungen-Gen-Profil signifikant beeinflusst und diese Gen-Änderungen der Lungenschädigung vorausgehen. Obwohl die Autoren keine Daten von antioxidativen Genen präsentierten, demonstrierten sie die Bereitschaft der Lunge, auf mechanische Ventilation mit einem profunden Wechsel der Genexpressionsmuster zu antworten. Diese Wechsel könnten auch antioxidative Gene beinhalten.

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die alveoläre oxidative Belastung mit einem Netto-Anstieg der niedermolekularen Antioxidantien einhergeht. Weitere Studien müssen herausfinden, ob dieser Anstieg durch lokale Produktion oder durch Wechsel

aus dem Blut-Kompartiment bedingt ist. Letzten Endes erscheint die globale antioxidative Kapazität des epithelialen lining fluids trotz des Anstieges einzelner antioxidativer Komponenten nicht in der Lage zu sein, die erhöhte oxidative Last komplett auszugleichen. Weitere Studien könnten helfen, die relative Wichtigkeit einzelner Antioxidantien für den Schutz der Lunge vor oxidativen Angriffen herauszufinden.

6 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund der nach wie vor erschreckend hohen Mortalität beim akuten Atemnotssyndrom (ARDS) und auch bei der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose (IPF), für deren Verlauf auch eine überschießende Aktivierung reaktiver Sauerstoffspezies und somit ein oxidativer Stress mitverantwortlich gemacht wurde, sind in der vorliegenden Arbeit einzelne Bestandteile der antioxidativen Abwehr und Abbauprodukte des oxidativen Stoffwechsels in bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten (BALF) analysiert worden. Nach Etablierung und Validierung der Messverfahren wurden hierin Phospholipide, Proteine, Fettsäuren, oxidiertes und reduziertes Glutathion, Retinol, α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Harnsäure, Malondialdehyd und Isoprostane bestimmt, und zwar zunächst von gesunden Probanden und Patienten mit ARDS oder Pneumonien (mit der Untergruppe PCP) sowie mit interstitiellen Lungenerkrankungen (IPF, Exogen Allergische Alveolitis und Sarkoidose), später auch von Kaninchen mit Bleomycin-induzierter Lungenfibrose. Es wurden hierbei sowohl Einzelpunktmessungen (z.B. bei chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen) wie auch Verlaufsmessungen (z.B. bei akut-inflammatorischen ARDS- und Pneumonie-Patienten; Bleomycinmodell) durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass unter verschiedenen pathologischen Bedingungen der antioxidative Status der Lunge zahlreichen Veränderungen unterliegt. Hervorzuheben ist hierbei vor allem, dass es unter erhöhtem oxidativem Stress erwartungsgemäß zu einem vermehrten Anfall von Abbauprodukten des oxidativen Stoffwechsels (GSSG, Isoprostane, Malondialdehyd) kommt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Spiegel der einzelnen Antioxidantien in den meisten Fällen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen unter vermehrtem Stress erstaunlicherweise erhöht sind, ohne dass hierdurch eine effektive Neutralisierung des oxidativen Stresses erzielt werden kann. So sind beispielsweise bei Pneumoniepatienten die Konzentrationen von α -Tocopherol, Retinol und Harnsäure hochsignifikant gesteigert. Ob dies eine adaptive Antwort des Organismus mit erhöhter lokaler Produktion von Antioxidantien oder vermehrtem Einstrom aus dem Blutkompartiment ist, bleibt jedoch noch unklar und bedarf weiterer Untersuchung.

7 Summary

In view of the still alarmingly high mortality rate in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), for which course a overflowing activation of reactive oxygen species and thus oxidative stress has been considered jointly responsible, in the present thesis individual components of the antioxidative defense and by-products of oxidative metabolism in bronchoalveolar lavage fluid were examined. After measurement methods had been set up and validated, phospholipids, proteins, fatty acids, oxidised and reduced glutathione, retinol, α -tocopherol, ascorbic acid, uric acid, malondialdehyde and isoprostanes were measured. First, we analysed lavage fluid from healthy volunteers as well as patients with ARDS or pneumonia (with the subgroup PCP) and interstitial lung diseases (IPF, exogene allergic alveolitis and sarcoidosis), later we analysed rabbits with bleomycin-induced fibrosis. Isolated measurements (e.g. of chronic interstitial diseases) were carried out as well as measurements over the course of several days (e.g. for acute-inflammatory ARDS-, and pneumonia patients; bleomycin-treated rabbits).

It could be demonstrated that under different pathologic circumstances the antioxidative state of the lung changes in many ways. In this context it must be especially emphasized that – as expected - the amount of by-products (GSSG, malondialdehyde, isoprostanes) is higher, too. Furthermore, it could be shown that in most cases the levels of individual antioxidants under oxidative stress were surprisingly increased as compared to healthy controls without reaching an effective neutralisation of oxidative stress. In pneumonia patients for example concentrations of α -tocopherol, retinol and uric acid are highly significantly elevated. The question whether this is due to an adaptive answer of the organism with higher local production of antioxidants or an increased flood from the blood-compartment hasn't been solved yet and requires further research.

8 Abkürzungen

A	Absorption
AA	Ascorbinsäure
ALI	Acute Lung Injury
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
Area	Integratorfläche
AU	Absorptionseinheiten
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläres Lining Fluid
BCA	Bicinchoninsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-Phosphatidylcholin
DTT	Dithiothreitol
EAA	Exogen-allergische Alveolitis
EDRF	Endothel Derived Relaxing Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELF	Epithelial Lining Fluid
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FS	Fettsäure
γ	Oberflächenspannung
GC	Gaschromatographie
GSH	Reduziertes Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IL	Interleukin
ILD	Interstitielle Lungenerkrankung
IPF	Idiopathische pulmonale Fibrose
MDA	Malondialdehyd
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
PC	Phosphatidylcholin

PCP	Pneumocystis Jirovecii Pneumonie
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipide
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SP-A	Surfactantprotein A
SP-B	Surfactantprotein B
SP-C	Surfactantprotein C
SP-D	Surfactantprotein D
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TNF	Tumornekrosefaktor
UA	Harnsäure

9 Literatur

- 1) Neergaard K. v.. Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Z Gesamte Exp Med*, 1929: 66: 373-394.
- 2) Laplace P. S.. *Traité de Mécanique Céleste. Crapelet, Courcier, Paris, 1798-1827: 5:.*
- 3) Clements J. A.. Surface tension of lung extracts. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1957: 95: 170-172.
- 4) Pattle R. E.. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature (Lond)*, 1955: 175: 1125-1126.
- 5) Creuwels L. A. J. M., van Golde L. M. G., Haagsman H. P.. The pulmonary surfactant system: Biochemical and clinical aspects. *Lung*, 1997: 175: 1-39.
- 6) Putman E., van Golde L. M., Haagsman H. P.. Toxic oxidant species and their impact on the pulmonary surfactant system. *Lung*, 1997: 175: 75-103.
- 7) Hefner, E. J., Repine, E. J.. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis*, 1989: 140: 531-554.
- 8) Kelly F. J.. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med*, 2003: 60: 612-616.
- 9) Morgenroth K.. *Das Surfactantsystem der Lunge. Morphologische Grundlagen und klinische Bedeutung. Berlin, New York: de Gruyter, 1986.*
- 10) Wright J. R., Clements J. A.. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis*, 1987: 136: 426-444.
- 11) Corbet A., Bedi H., Owens M., Taesch W.. Surfactant protein-A inhibits lavage-induced surfactant secretion in newborn rabbits. *Am J Med Sci*, 304: 1992: 246-251.
- 12) J. Goerke. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta*, 1998: 1408: 79-89.
- 13) Hawgood S.. Pulmonary surfactant apoproteins: a review of protein and genomic structure. *Am J Physiol*, 1989: 257: L13-L22.
- 14) Veldhuizen R., Nag K., Orgeig S., Possmayer F.. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim Biophys Acta*, 1998: 1408: 90-108.
- 15) Veldhuizen R., Possmayer F.. Phospholipid metabolism in lung surfactant. *Subcell Biochem*, 2004: 37: 359-388.

- 16) Griese M.. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J*, 1999: 13: 1455-1476.
- 17) Haagsman H. P., Diemel R. V.. Surfactant-associated proteins: functions and structural variation. *Comp Biochem Physiol A*, 2001: 129: 91-108.
- 18) Possmayer F.. A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis*, 1988: 138: 990-998.
- 19) Whitsett J. A., Weaver T. E.. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med*, 2002: 347: 2141-2148.
- 20) Gortner L., Hilgendorff A.. Surfactantproteine SP-B und SP-C: Molekularbiologie und Physiologie. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2004; 208: 91-97, 2004: 208: 91-97.
- 21) Wright J. R.. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol*, 2005: 5: 58-68.
- 22) McCormack F. X., Whitsett J. A.. The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest*, 2002: 109: 707-712.
- 23) Hickman-Davis J. M., Fang F. C., Nathan C., Shepherd V. L., Voelker D. R., Wright J. R.. Lung surfactant and reactive oxygen-nitrogen species: antimicrobial activity and host-pathogen interactions. *Am J Physiol*, 2001: 281: L517-L523.
- 24) Pison U., Max M., Neuendank A., Weissbach S., Pietschmann S.. Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence for 'non-surfactant' functions of the surfactant system. *Eur J Clin Invest*, 1994: 24: 586-599.
- 25) Whitsett J. A.. Surfactant proteins in innate host defense of the lung. *Biol Neonate*, 2005: 88: 175-180.
- 26) Rodriguez Capote K., McCormack F. X., Possmayer F.. Pulmonary surfactant protein-A (SP-A) restores the surface properties of surfactant after oxidation by a mechanism that requires the Cys6 interchain disulfide bond and the phospholipid binding domain. *J Biol Chem*, 2003: 278: 20461-20474.
- 27) Halliwell B., Gutteridge J. M.. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview. *Methods Enzymol*, 1990: 186: 1-85.
- 28) Stocker R., Frei B.. Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In: Sies, H., ed. Oxidative stress. Oxidants and antioxidants London: Academic Press, 1991: 213-243.
- 29) Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G.. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*, 1992: 13: 341-390.

- 30) Halliwell B.. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *Lancet*, 1994: 344: 721-724.
- 31) Dean R. T., Fu S., Stocker R., Davies M. J.. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, 1997: 324: 1-18.
- 32) Kelly F. J., Mudway I. S.. Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino Acids*, 2003: 25: 375-396.
- 33) Stadtman E. R., Levine R. L.. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci*, 2000: 899: 191-208.
- 34) Requena J. R., Levine R. L., Stadtman E. R.. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids*, 2003: 25: 221-226.
- 35) In: Sies, H., ed. Oxidative stress. Oxidants and antioxidants London: Academic Press, 1991.
- 36) Yu T. W., Anderson D.. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutat Res*, 1997: 379: 201-210.
- 37) Epe B.. DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1996: 127: 223-249.
- 38) Halliwell B., Aruoma O. I.. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, 1991: 281: 9-19.
- 39) Gutteridge J. M.. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact*, 1994: 91: 133-140.
- 40) Löffler G., Petrides P. E.. Biochemie und Pathobiochemie.. 5.th ed. Berlin: Springer Verlag, 1997.
- 41) Ahmad S.. Oxidative stress and antioxidant defenses in biology . In: Sami Ahmad, ed. Chapman & Hall, 1995.
- 42) Halliwell B., Gutteridge J. M.. The superoxide theory of oxygen toxicity. In: Halliwell, B., Gutteridge, J. M., eds. Free Radicals In Biology And Medicine New York: Oxford University Press, 1989: 136-176.
- 43) Alexander K. e. a.. Thiemes Innere Medizin.. 1.st ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1999.
- 44) Becker. B. F.. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med*, 1993: 14: 615-631.
- 45) Becker B. F., Reinholz N., Leipert B., Raschke P., Permanetter B., Gerlach E.. Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. *Chest*, 1991: 100: 176S-181S.

- 46) Rahman I., MacNee W.. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation.. *Eur Respir J*, 2000: 16: 534-554.
- 47) Kelly F. J., Rodgers W., Handel J., Smith S., Hall M. A.. Time course of vitamin E repletion in the premature infant. *Br J Nutr*, 1990: 63: 631-638.
- 48) Kolleck I., Sinha P., Rustow B.. Vitamin E as an antioxidant of the lung: mechanisms of vitamin E delivery to alveolar type II cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002: 166: S62-S66.
- 49) Schmidt R.. Entwicklung von Methoden zur biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung des pulmonalen Surfactants. VVB Laufersweiler Verlag, 1996.
- 50) Zoeller R. A., Morand O. H., Raetz C. R. H.. A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J Biol Chem*, 1988: 263: 11590-11596.
- 51) Morand O. H., Zoeller R. A., Raetz C. R. H.. Disappearance of plasmalogens from membranes of animal cells subjected to photosensitized oxidation. *J Biol Chem*, 1988: 263: 11597-11606.
- 52) Sindelar P. J., Guan Z., Dallner G., Ernster L.. The protective role of plasmalogens in iron-induced lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*, 1999: 26: 318-324.
- 53) Brites P., Waterham H. R., Wanders R. J.. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 2004: 1636: 219-231.
- 54) Engelmann B., Brautigam C., Thiery J.. Plasmalogen phospholipids as potential protectors against lipid peroxidation of low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994: 204: 1235-1242.
- 55) Morand O. H.. Reactivity of plasmalogens to singlet oxygen and radicals. *Methods Enzymol*, 1994: 234: 603-620.
- 56) Fridovich I.. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem*, 1989: 264: 7761-7764.
- 57) Esterbauer H., Cheeseman K. H., Dianzani M. U., Poli G., Slater T. F.. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochem J*, 1982: 208: 129-140.
- 58) Becker P. M., Sanders S. P., Price P., Christman, B. W.. F₂-isoprostane generation in isolated ferret lungs after oxidant injury or ventilated ischemia. *Free Radical Biol Med*, 1998: 25: 703-711.

- 59) Montuschi P., Corradi M., Ciabattoni G., Nightingale J., Kharitonov S. A., Barnes P. J.. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999; 160: 216-220.
- 60) Janssen L. J., Catalli A., Helli P.. The pulmonary biology of isoprostanes. *Antioxid Redox Signal*, 2005; 7: 244-255.
- 61) Kelly F. J.. Urinary F2-isoprostane metabolite analysis: a step closer to obtaining a reliable measure of oxidative stress?. *Clin Exp Allergy*, 2001; 31: 355-356.
- 62) Montuschi P.. Isoprostanes and other exhaled breath markers in respiratory disease. *Eur Respir Rev*, 1999; 9: 249-253.
- 63) Morrow J. D., Roberts L. J. 2.. Mass spectrometry of prostanoids: F2-isoprostanes produced by non-cyclooxygenase free radical-catalyzed mechanism. *Methods Enzymol*, 1994; 233: 163-174.
- 64) Proudfoot J., Barden A., Mori T. A., Burke V., Croft K. D., Beilin L. J., Puddey I. B.. Measurement of urinary F(2)-isoprostanes as markers of in vivo lipid peroxidation - A comparison of enzyme immunoassay with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem*, 1999; 272: 209-215.
- 65) Morrow J. D., Roberts L. J.. The isoprostanes: their role as an index of oxidant stress status in human pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002; 166: S25-S30.
- 66) Gil J., Weibel E. R.. Improvements in Demonstration of Lining Layer of Lung Alveoli by Electron Microscopy. *Respir Physiol*, 1969; 8: 13-36.
- 67) von Wichert P., Joseph K., Müller B., Franck W. M.. Bronchoalveolar lavage. Quantification of intraalveolar fluid. *Am Rev Respir Dis*, 1993; 147: 148-152.
- 68) Ward C., Effros R. M., Walters E. H.. Assessment of epithelial lining fluid dilution during bronchoalveolar lavage. *Eur Respir Rev*, 1999; 9: 32-37.
- 69) Baughman R. P., Rennard S. I.. Bronchoalveolar lavage: general approaches to correct for variability of dilution and lung permeability. *Eur Respir Rev*, 1999; 9: 28-31.
- 70) Kelly, J. F., Buhl, R., Sandström, T.. Measurement of antioxidants, oxidants and oxidation products in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir Rev*, 1999; 9:66: 93-98.
- 71) Slade R., Crissman K., Norwood J., Hatch G.. Comparison of antioxidant substances in bronchoalveolar lavage cells and fluid from humans, guinea pigs, and rats. *Exp Lung Res*, 1993; 19: 469-484.

- 72) Hatch G. E.. Comparative biochemistry of airway lining fluid. In: Schlesinger, R. B., ed. Comparative biology of the lung Baton Rouge: Louisiana State University Press, 1992: 617-632.
- 73) Kelly F. J., Blomberg A., Frew A., Holgate S. T., Sandstrom T.. Antioxidant kinetics in lung lavage fluid following exposure of humans to nitrogen dioxide. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996; 154: 1700-1705.
- 74) Kelly F. J., Tetley T. D.. Nitrogen dioxide depletes uric acid and ascorbic acid but not glutathione from lung lining fluid. *Biochem J*, 1997; 325: 95-99.
- 75) Cantin A. M., North S. L., Hubbard R. C., Crystal R. G.. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol*, 1987; 63: 152-157.
- 76) Schmidt R., Luboinski T., Markart P., Ruppert C., Daum C., Grimminger F., Seeger W., Günther A.. Alveolar antioxidant status in patients with ARDS and severe pneumonia. *In revision: Eur J Respir*, 2004.
- 77) van der Vliet A., O'Neill C. A., Cross C. E., Koostra J. M., Volz W. G., Halliwell B., Louie S.. Determination of low-molecular-mass antioxidant concentrations in human respiratory tract lining fluids. *Am J Physiol*, 1999; 276: L289-L296.
- 78) Tsuchiya M., Asada A., Kasahara E., Sato E. F., Shindo M., Inoue M.. Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation*, 2002; 105: 1155-1157.
- 79) Schunemann H. J., Grant B. J., Freudenheim J. L., Muti P., Browne R. W. D. J. K. R. T. M.. The relation of serum levels of antioxidant vitamins C and E, retinol and carotenoids with pulmonary function in the general population. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001; 163: 1246-1255.
- 80) Metnitz P. G., Bartens C., Fischer M., Fridrich P., Steltzer H., Druml W.. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med*, 1999; 25: 180-185.
- 81) Chow C. W., Herrera Abreu M. T., Suzuki T., Downey G. P.. Oxidative stress and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003; 29: 427-431.
- 82) MacNee W.. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol*, 2001; 429: 195-207.
- 83) Kelly, J. F., Mudway, I., Blomberg, A., Frew, A., Sandström, T.. Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma. *Lancet*, 1999; 354: 482-483.

- 84) Schock B. C., Young I. S., Brown V., Fitch P. S., Shields M. D., Ennis M.. Antioxidants and oxidative stress in BAL fluid of atopic asthmatic children.. *Pediatr Res*, 2003: 53: 375-381.
- 85) Paredi P., Kharitonov S. A., Leak D., Shah P. L., Cramer D., Hodson M. E., Barnes P. J.. Exhaled ethane is elevated in cystic fibrosis and correlates with carbon monoxide levels and airway obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000: 161: 1247-1251.
- 86) Rahman I., Skwarska E., Henry M., Davis M., O'Connor C. M., FitzGerald M. X., Greening A., MacNee W.. Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med*, 1999: 27: 60-68.
- 87) Cantin A. M., Hubbard R. C., Crystal R. G.. Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis*, 1989: 139: 370-372.
- 88) Lenz A. G., Costabel U., Maier K. L.. Oxidized BAL fluid proteins in patients with interstitial lung diseases. *Eur Respir J*, 1996: 9: 307-312.
- 89) Chabot F., Mitchell J. A., Gutteridge J. M., Evans T. W.. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J*, 1998: 11: 745-757.
- 90) Lang J. D., McArdle P. J., O'Reilly P. J., Matalon S.. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest*, 2002: 122: 314S-320S.
- 91) Birukov K. G., Leitinger N., Bochkov V. N., Garcia J. G.. Signal transduction pathways activated in human pulmonary endothelial cells by OxPAPC, a bioactive component of oxidized lipoproteins. *Microvasc Res*, 2004: 67: 18-28.
- 92) Freeman B. A., Crapo J. D.. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem*, 1981: 256: 10986-10992.
- 93) Haddad I. Y., Pataki G., Hu P., Galliani C., Beckman J. S., Matalon S.. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest*, 1994: 94: 2407-2413.
- 94) Lamb N. J., Gutteridge J. M., Baker C., Evans T. W., Quinlan G. J.. Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination. *Crit Care Med*, 1999: 27: 2028-2030.

- 95) Sittipunt C., Steinberg K. P., Ruzinski J. T., Myles C., Zhu S., Goodman R. B., Hudson L. D., Matalon S., Martin T. R.. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001; 163: 503-510.
- 96) Mohsenin V.. Lipid peroxidation and antielastase activity in the lung under oxidant stress: role of antioxidant defenses. *J Appl Physiol*, 1991; 70: 1456-1462.
- 97) Cochrane C. G., Spragg R., Revak S. D.. Pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome: Evidence of oxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Invest*, 1983; 71: 754-761.
- 98) Bunnell E., Pacht E. R.. Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 1993; 148: 1174-1178.
- 99) Baldwin S. R., Simon R. H., Grum C. M., Ketai L. H., Boxer L. A., Devall L. J.. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet*, 1986; 4: 11-14.
- 100) Carpenter C. T., Price P. V., Christman B. W.. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest*, 1998; 114: 1653-1659.
- 101) Montuschi P., Ciabattini G., Paredi P., Pantelidis P., du Bois R. M., Kharitonov S. A., Barnes P. J.. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998; 158: 1524-1527.
- 102) Lykens M. G., Davis W. B., Pacht E. R.. Antioxidant activity of bronchoalveolar lavage fluid in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Physiol*, 1992; 262: L169-L175.
- 103) Krsek-Staples J. A., Kew R. R., Webster R. O.. Ceruloplasmin and transferrin levels are altered in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 1992; 145: 1009-1015.
- 104) Clerch L. B., Massaro D.. Tolerance of rats to hyperoxia. Lung antioxidant enzyme gene expression. *J Clin Invest*, 1993; 91: 499-508.
- 105) Comhair S. A., Bhatena P. R., Farver C., Thunnissen F. B., Erzurum S. C.. Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human epithelial cells. *FASEB J*, 2001; 15: 70-78.
- 106) Pacht E. R., Timerman A. P., Lykens M. G., Merola A. J.. Deficiency of alveolar fluid glutathione in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Chest*, 1991; 100: 1397-1403.

- 107) Buhl R.. Imbalance between oxidants and antioxidants in the lungs of HIV-seropositive individuals. *Chem Biol Interact*, 1994: 91: 147-158.
- 108) Bowler R. P., Velsor L. W., Duda B., Chan E. D., Abraham E., Ware L. B., Matthay M. A., Day B.. Pulmonary edema fluid antioxidants are depressed in acute lung injury. *Crit Care Med*, 2003: 31: 2309-2315.
- 109) Kodavanti U. P., Costa D. L., Richards J., Crissman K. M., Slade R., Hatch G. E.. Antioxidants in bronchoalveolar lavage fluid cells isolated from ozone--exposed normal and ascorbate-deficient guinea pigs. *Exp Lung Res*, 1996: 22: 435-448.
- 110) Morrison D., Rahman I., Lannan S., MacNee W.. Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999: 159: 473-479.
- 111) Blomberg A., Sainsbury C., Rudell B., Frew A. J., Holgate S. T., Sandstrom T., Kelly F. J.. Nasal cavity lining fluid ascorbic acid concentration increases in healthy human volunteers following short term exposure to diesel exhaust. *Free Radic Res*, 1998: 28: 59-67.
- 112) Vento G., Mele M. C., Mordente A., Romagnoli C., Matassa P. G., Zecca E., Zappacosta B., Persichilli S.. High total antioxidant activity and uric acid in tracheobronchial aspirate fluid of preterm infants during oxidative stress: an adaptive response to hyperoxia?. *Acta Paediatr*, 2000: 89: 336-342.
- 113) Holter J. F., Weiland J. E., Pacht E. R., Gadek J. E., Davis W. B.. Protein permeability in the adult respiratory distress syndrome. Loss of size selectivity of the alveolar epithelium. *J Clin Invest*, 1986: 78: 1513-1522.
- 114) Messent M., Sinclair D. G., Quinlan G. J., Mumby S. E., Gutteridge J. M., Evans T. W.. Pulmonary vascular permeability after cardiopulmonary bypass and its relationship to oxidative stress. *Crit Care Med*, 1997: 25: 425-429.
- 115) Jain A., Martensson J., Mehta T., Krauss A. N., Auld P. A., Meister A.. Ascorbic acid prevents oxidative stress in glutathione-deficient mice: effects on lung type 2 cell lamellar bodies, lung surfactant, and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992: 89: 5093-5097.
- 116) Gilliard N., Heldt G. P., Loredó J., Redl H., Merritt T. A., Spragg R. G.. Exposure of the hydrophobic components of porcine lung surfactant to oxidant stress alters surface tension properties. *J Clin Invest*, 1994: 93: 2608-2615.

- 117) Seeger, W., Lepper, H., Wolf, D. H. R., Neuhof, H.. Alteration of alveolar surfactant function after exposure to oxidative stress and to oxygenated and native arachidonic acid in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 1985: 835: 58-67.
- 118) Minoo P., King R. J., Coalson J. J.. Surfactant proteins and lipids are regulated independently during hyperoxia. *Am J Physiol*, 1992: 263: L291-L298.
- 119) Zhu S., Haddad I. Y., Matalon S.. Nitration of surfactant protein A (SP-A) tyrosine residues results in decreased mannose binding ability. *Arch Biochem Biophys*, , 1996: 333: 282-290.
- 120) Haddad I. Y., Zhu S., Ischiropoulos H., Matalon S.. Nitration of surfactant protein A results in decreased ability to aggregate lipids. *Am J Physiol*, 1996: 270: L281-L288.
- 121) Haddad, I. Y., Ischiropoulos H., Holm B. A., Beckman J. S., Baker J. R., Matalon S.. Mechanisms of peroxynitrite-induced injury to pulmonary surfactants. *Am J Physiol*, 1993: 265: L555-L5644.
- 122) Crim C., Longmore W. J.. Sublethal hydrogen peroxide inhibits alveolar type II cell surfactant phospholipid biosynthetic enzymes. *Am J Physiol*, 1995: 268: L129-L135.
- 123) Holm B. A., Matalon S., Finkelstein J. N., Notter R. H.. Type II pneumocyte changes during hyperoxic lung injury and recovery. *J Appl Physiol*, 1988: 65: 2672-2678.
- 124) Holm B. A., Notter R. H., Siegle J., Matalon S.. Pulmonary physiological and surfactant changes during injury and recovery from hyperoxia. *J Appl Physiol*, 1985: 59: 1402-1409.
- 125) Guthmann F., Kolleck I., Schachtrup C., Schlame M., Spener F., Rustow B.. Vitamin E deficiency reduces surfactant lipid biosynthesis in alveolar type II cells. *Free Radic Biol Med*, 2003: 34: 663-673.
- 126) Minoo P., Segura L., Coalson J. J., King R. J., DeLemos R. A.. Alterations in surfactant protein gene expression associated with premature birth and exposure to hyperoxia. *Am J Physiol*, 1991: 261: L386-L392.
- 127) Tölle, A., Kolleck, I., Schlame, M., Wauer, R., Stevens, A. P., Rüstow, B.. Effect of hyperoxia on the composition of the alveolar surfactant and the turnover of surfactant phospholipids, cholesterol, plasmalogens and vitamin E. *Biochim Biophys Acta*, 1997: 1346: 198-204.
- 128) Goode H. F., Webster N. R.. Free radicals and antioxidants in sepsis. *Crit Care Med*, 1993: 21: 1770-1776.

- 129) Gillissen A., Nowak D.. Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy. *Respir Med*, 1998; 92: 609-623.
- 130) Demertzis S., Scherer M., Langer F., Dwenger A., Hausen B., Schafers H. J.. Ascorbic acid for amelioration of reperfusion injury in a lung autotransplantation model in sheep. *Ann Thorac Surg*, 2000; 70: 1684-1689.
- 131) Weinbroum A. A., Kluger Y., Ben Abraham R., Shapira I., Karchevski E., Rudick V.. Lung preconditioning with N-acetyl-L-cysteine prevents reperfusion injury after liver no flow-reflow: a dose-response study. *Transplantation*, 2001; 71: 300-306.
- 132) Langley S. C., Kelly F. J.. N-acetylcysteine ameliorates hyperoxic lung injury in the preterm guinea pig. *Biochem Pharmacol*, 1993; 24: 841-846.
- 133) Hagiwara S. I., Ishii Y., Kitamura S.. Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 162: 225-231.
- 134) Suliman H. B., Ryan L. K., Bishop L., Folz R. J.. Prevention of influenza-induced lung injury in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol*, 2001; 280: L69-L78.
- 135) Kozower B. D., Christofidou-Solomidou M., Sweitzer T. D., Muro S., Buerk D. G., Solomides C. C., Albelda S. M., Patterson G. A., Muzykantov V. R.. Immunotargeting of catalase to the pulmonary endothelium alleviates oxidative stress and reduces acute lung transplantation injury. *Nat Biotechnol*, 2003; 21: 392-398.
- 136) Muller B., Oske M., Hochscheid R., Seifart C., Barth P. J., Garn H., von Wichert P.. Effect of N-acetylcysteine treatment on NO₂-impaired type II pneumocyte surfactant metabolism. *Eur J Clin Invest*, 2001; 31: 179-188.
- 137) Thebaud B., Barlier-Mur A. M., Chailley-Heu B., Henrion-Caude A., Tibboel D., Dinh-Xuan A. T., Bourbon J. R.. Restoring effects of vitamin A on surfactant synthesis in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001; 164: 1083-1089.
- 138) Samet J. M., Hatch G. E., Horstman D., Steck-Scott S., Arab L., Bromberg P. A., Levine M., McDonnell W. F., Devlin R. B.. Effect of antioxidant supplementation on ozone-induced lung injury in human subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001; 164: 819-825.

- 139) Block G., Jensen C., Dietrich M., Norkus E. P., Hudes M., Packer L. Plasma C-reactive protein concentrations in active and passive smokers: influence of antioxidant supplementation. *J Am Coll Nutr*, 2004; 23: 141-147.
- 140) Mooney L. A., Madsen A. M., Tang D., Orjuela M. A., Tsai W. Y., Garduno E. R., Perera F. P.. Antioxidant vitamin supplementation reduces benzo(a)pyrene-DNA adducts and potential cancer risk in female smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005; 14: 237-242.
- 141) Behr J., Maier K., Degenkolb B., Krombach F., Vogelmeier C.. Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis. Adjunctive therapy to maintenance immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 156: 1897-1901.
- 142) Meyer A., Buhl R., Kampf S., Magnussen H.. Intravenous N-acetylcysteine and lung glutathione of patients with pulmonary fibrosis and normals. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995; 152: 1055-1060.
- 143) Borok Z., Buhl R., Grimes G. J., Bokser A. D., Hubbard R. C., Holroyd K. J., Roum J. H., Czerski D. B., Cantin A. M., Crystal R. G.. Effect of glutathione aerosol on oxidant-antioxidant imbalance in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*, 1991; 338: 215-216.
- 144) Antioxidant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. Hunninghake, G. W.. *N Engl J Med*, 2005; 353: 2285-2287.
- 145) Suter P. M., Domenighetti G., Schaller M. D., Laverriere M. C., Ritz R., Perret C.. N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Chest*, 1994; 105: 190-194.
- 146) Bernard G. R., Wheeler A. P., Arons M. M., Morris P. E., Paz H. L., Russell J. A., Wright P. E., and the antioxidant in ARDS study group. A trial of antioxidants N-acetylcysteine and procysteine in ARDS . *Chest*, 1997; 112: 164-172.
- 147) Jepsen S., Herlevsen P., Knudsen P., Bud M. I., O. N., Klausen. Antioxidant treatment with N-acetylcysteine during adult respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, placebo-controlled study.. *Crit Care Med*, 1992; 20: 918-923.
- 148) Nathens A. B., Neff M. J., Jurkovich G. J., Klotz P., Farver K., Ruzinski J. T., Radella F., Garcia I., Maier R. V.. Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. *Ann Surg*, 2002; 236: 814-822.
- 149) Pacht E. R., DeMichele S. J., Nelson J. L., Hart J., Wennberg A. K., Gadek J. E.. Enteral nutrition with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants

- reduces alveolar inflammatory mediators and protein influx in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, 2003; 31: 491-500.
- 150) Bligh E. G., Dyer W. J.. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959; 37: 911-917.
- 151) Rouser G., Fleischer S., Yamamoto A.. Two-dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 1970; 5: 494-496.
- 152) Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C.. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985; 150: 76-85.
- 153) Tietze F.. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*, 1969; 27: 502-522.
- 154) Baker M. A., Cerniglia G. J., Zaman A.. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem*, 1990; 190: 360-365.
- 155) Jaeschke H., Mitchell J. R.. Use of isolated perfused organs in hypoxia and ischemia / reperfusion oxidant stress. *Methods Enzymol*, 1990; 186: 752-759.
- 156) Catignani G. L., Bieri J. G.. Simultaneous determination of retinol and a-tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clin Chem*, 1983; 29: 708-712.
- 157) Iriyama K., Yoshiura M., Iwamoto T., Ozaki Y.. Simultaneous determination of uric and ascorbic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Biochem*, 1984; 141: 238-243.
- 158) Draper H. H., Hadley M.. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 1990; 186: 421-431.
- 159) Bernard G. R., Artigas A., Brigham K. L., Carlet J., Falke K., Hudson L., Lamy M., Legall J. R., Morris A., Spragg R.. The american-european consensus conference on ARDS. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994; 149: 818-824.
- 160) Zhao G., al-Mehdi A. B., Fisher A. B.. Anoxia-reoxygenation versus ischemia in isolated rat lungs. *Am J Physiol*, 1997; 273: L1112-L1117.
- 161) Wang Y., Manevich Y., Feinstein S. I., Fisher A. B.. Adenovirus-mediated transfer of the 1-cys peroxiredoxin gene to mouse lung protects against hyperoxic injury. *Am J Physiol*, 2004; 286: L1188-L1193.

- 162) Chirico S.. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. *Methods Enzymol*, 1994: 233: 314-318.
- 163) Wallach-Dayana S. B., Izbicki G., Cohen P. Y., Gerstl-Golan R., Fine A., Breuer R.. Bleomycin Initiates Apoptosis of Lung Epithelial Cells by ROS but not by Fas/FasL Pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005 Epub ahead of print.
- 164) Schmidt R., Ruppert C., Markart P., Lübke N., Ermert L., Weissmann N., Breithecker A., Ermert M., Seeger W., Günther A.. Changes in pulmonary surfactant function and composition in bleomycin-induced pneumonitis and fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004: 195: 218-231.
- 165) Ruestow B., Haupt R., Stevens P. A., Kunze D.. Type II pneumocytes secrete vitamin E together with surfactant lipids. *Am J Physiol*, 1993: 265: L131-L139.
- 166) Schmidt R., Schäfer C., Luboinski T., Lockinger A., Hermle G., Grimminger F., Seeger W., Ghofrani A., Schutte H., Günther A.. Increase in alveolar antioxidant levels in hyperoxic and anoxic ventilated rabbit lungs during ischemia. *Free Radic Biol Med*, 2004: 36: 78-89.
- 167) Haddad J. J.. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir Res*, 2002: 3: 1-27.
- 168) Haddad J. J.. Oxygen homeostasis, thiol equilibrium and redox regulation of signalling transcription factors in the alveolar epithelium. *Cell Signal*, 2002: 14: 799-810.
- 169) Foldes-Papp Z., Domej W., Demel U., Tilz G. P.. Oxidative stress caused by acute and chronic exposition to altitude. *Wien Med Wochenschr*, 2005: 155: 136-142.
- 170) Riise G. C., Williams A., Kjellstrom C., Schersten H., Andersson B. A., Kelly F. J.. Bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients is associated with increased neutrophil activity and decreased antioxidant status in the lung. *Eur Respir J*, 1998: 12: 82-88.
- 171) Kinnula V. L., Fattman C. L., Tan R. J., Oury T. D.. Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005: 172: 417-422.
- 172) Rahman I., Bel A., Mulier B., Donaldson K., MacNee W.. Differential regulation of glutathione by oxidants and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol*, 1998: 275: L80-L86.

- 173) Smith L. J., Houston M., Anderson J.. Increased levels of glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. *Am Rev Respir Dis*, 1993; 147: 1461-1464.
- 174) Kodavanti U. P., Costa D. L., Dreher K. L., Crissman K., Hatch G. E.. Ozone-induced tissue injury and changes in antioxidant homeostasis in normal and ascorbate-deficient guinea pigs.. *Biochem Pharmacol*, 1995; 17: 243-251.
- 175) Jackson R. M., Frank L.. Ozone-induced tolerance to hyperoxia in rats.. *Am Rev Respir Dis*, 1984; 129: 425-429.
- 176) Chesnutt AN, Matthay MA. Early Detection of Type III Procollagen Peptide in Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997 September, Vol 156, 840-845
- 177) Copland I. B., Kavanagh B. P., Engelberts D., McKerlie C., Belik J., Post M.. Early changes in lung gene expression due to high tidal volume. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003; 168: 1051-1059.
- 178) Yoshida M, Whitsett JA. Alveolar macrophages and emphysema in surfactant protein-D-deficient mice. *Respirology*. 2006 Jan;11 Suppl:S37-40. Review.
- 179) Hawgood S; Clements JA. Pulmonary surfactant and its apoproteins. *J Clin Invest* 86 (1990), S. 1-6.
- 180) Demedts M, Behr J, Buhl R et al.. High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2005 Nov 24; 353(21): 2229-42.
- 181) Pittet JF, Griffiths MJ. TGF-beta is a critical mediator in acute lung injury. *J Clin Invest*. 2001 Jun;107(12):1537-44.
- 182) Robbins CG, Davis JM, Merritt TA, Amirkhanian JD, Sahgal N, Morin FCIII, Horowitz S. Combined effects of nitric oxide and hyperoxia on surfactant function and pulmonary inflammation. *Am J Physiol* 1995; 269:L545-50
- 183) Hawgood S, Ochs M, Jung A, Akiyama J, Allen L, Brown C, Edmondson J, Levitt S, Carlson E, Gillespie AM, Villar A, Epstein CJ, Poulain FR. Sequential targeted deficiency of SP-A and -D leads to progressive alveolar lipoproteinosis and emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Nov;283(5):L1002-10.
- 184) Sauermost, R.. *Lexikon der Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 1994.

10 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Werner Seeger, dem Leiter der II. Medizinischen Klinik, bedanken. Er ermöglichte das wissenschaftliche Umfeld für die Realisierung dieser Dissertation.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. Andreas Günther, dem Leiter des „Surfactant-Labors“, für die Überlassung des Themas und Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Ohne sein unermüdliches Engagement und seine Kompetenz wäre diese Arbeitsgruppe so sicher nicht entstanden.

Besonders danke ich Herrn Dr. rer. nat. Reinhold Schmidt, dem direkten Betreuer meiner Dissertation. Ohne sein Wissen, seine Ratschläge und Hilfestellung sowohl im praktischen Abschnitt als auch in der schriftlichen Fertigstellung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau Christina Daum danke ich für ihre Mithilfe bei zahlreichen, sehr zeitaufwendigen Messungen und ihrer Hilfestellung bei allen praktischen Problemen.

Weiterhin möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der II. Medizinischen Klinik der Universität Giessen bedanken, die mir bei meiner Promotionsarbeit geholfen haben und hier namentlich nicht explizit erwähnt sind.

Einen besonderen Dank schulde ich nicht zuletzt auch meinen Eltern, die mir mein Studium und somit die Realisierung dieser Dissertation ermöglicht haben sowie meiner Frau und meinen Kindern, die geduldig die Fertigstellung abgewartet und auf viel Zeit mit mir verzichtet haben.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Ich erkläre:

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

Thomas Luboeinski

Karlsruhe, 12.11.2008