

Einfluss einer intratrachealen Gabe von rSP-C Surfactant bei ARDS-
Patienten auf den Gasaustausch und die biochemischen und
biophysikalischen Surfactant-Eigenschaften

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Thorsten Colaris
aus Würselen/Kreis Aachen

Gießen 2005

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
Leiter: Prof. Dr. med. W. Seeger
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter I: PD Dr. med. A. Günther

Gutachter II: Prof. Dr. med. H. Lindemann

Tag der Disputation: 11. Juli 2005

Für Silke und Anne

Erklärung

„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.“

Gießen, im Januar 2005

Thorsten Colaris

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Vorwort	1
2. Einleitung	2
2.1. Das pulmonale Surfactant-System	2
2.1.1. Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants	2
2.1.2. Surfactant-Metabolismus	3
2.1.3. Funktionen des pulmonalen Surfactants	5
2.2. Pathophysiologie und -biochemie des pulmonalen Surfactantsystems am Beispiel des Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)	7
3. Fragestellung	14
4. Materialien	15
4.1. Geräte	15
4.2. Substanzen	16
5. Methoden	18
5.1. Patientenkollektiv	18
5.2. Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	20
5.2.1. Indikation zur BAL	20
5.2.2. Durchführung und Technik der BAL	20
5.3. Schematischer Ablauf der Probenverarbeitung	21
5.4. Biochemische Charakterisierung des Surfactants	21
5.4.1. Bestimmung des Phospholipidgehaltes	22
5.4.2. Bestimmung des Proteingehaltes	22
5.4.3. Berechnung des Phospholipid-Protein-Quotienten (PPQ)	23
5.4.4. Analyse der Phospholipidklassen (PL-Profil)	23
5.4.5. Analyse des Fettsäureprofils	24
5.4.6. Analyse der molekularen Spezies des Phosphatidylcholins	25
5.4.7. Surfactant-Protein (SP)-A Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	25
5.4.8. Surfactant-Protein (SP)-B ELISA	26

5.4.9.	Surfactant-Protein (SP)-C ELISA	28
5.4.10.	Surfactant-Protein (SP)-D ELISA	29
5.5.	Biophysikalische Charakterisierung des Surfactants	29
5.6.	Statistik	30
6.	Ergebnisse	31
6.1.	Basisdaten des Studienkollektives: Oxygenierungsindex, Proteingehalt	31
6.2.	Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen	33
6.2.1.	Phospholipid-Gehalt in der BAL	33
6.2.2.	Phospholipid-Protein-Quotient (PPQ) in der BAL	34
6.2.3.	Phospholipid-Profil	35
6.2.4.	Surfactant-Protein-Gehalt in der BAL	38
6.2.5.	„Large Surfactant Aggregates“ (LSA)	40
6.2.6.	Verteilung der molekularen Spezies des Phosphatidylcholins	41
6.3.	Ergebnisse der biophysikalischen Untersuchungen	43
6.4.	Korrelationen des Oxygenierungsindex (P_{aO_2}/F_{iO_2}) mit biophysikalischen und biochemischen Parametern	45
6.4.1.	Korrelation zwischen minimaler Oberflächenspannung (γ_{min}) und P_{aO_2}/F_{iO_2}	46
6.4.2.	Korrelation zwischen der Oberflächenspannung nach Adsorption (γ_{ads}) und P_{aO_2}/F_{iO_2}	47
6.4.3.	Korrelation zwischen der 16:0 PC-Fettsäure und P_{aO_2}/F_{iO_2}	48
6.4.4.	Korrelation zwischen LSA (% PL) und P_{aO_2}/F_{iO_2}	49
6.4.5.	Korrelation zwischen Phosphatidylglycerol (% PL) und P_{aO_2}/F_{iO_2}	50
7.	Diskussion	51
8.	Zusammenfassung	57
9.	Literaturverzeichnis	60
10.	Danksagung	66
11.	Lebenslauf	67

Häufig verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALI	Acute Lung Injury
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
°C	° Celsius
DPPC	Dipalmitoyliertes Phosphatidylcholin
γ ads	Oberflächenspannungswert nach 12 Sekunden Adsorptionszeit
γ min	Minimaler Oberflächenspannungswert nach fünf Minuten Filmoszillation
KG	Körpergewicht
h	Stunde
LSA	Large Surfactant Aggregates
min.	Minute(n)
n	Anzahl (Stichprobenumfang)
PaO ₂ /FiO ₂	Oxygenierungsindex
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipide
PPQ	Phospholipid-Protein-Quotient
PS	Phosphatidylserin
RT	Raumtemperatur
sec.	Sekunde
SPH	Sphingomyelin
SP-A	Surfactant-Protein A
SP-B	Surfactant-Protein B
SP-C	Surfactant-Protein C
SP-D	Surfactant-Protein D
Tab.	Tabelle

1. Vorwort

Ein verändertes Surfactant-System wurde für das „*Acute Respiratory Distress Syndrome*“, kurz ARDS genannt, in bislang vier klinischen Studien (HALLMAN 1982 [1], PISON 1989 [2], GREGORY 1991 [3] und GÜNTHER 1996 [4]) beschrieben. Zwar herrscht immer noch eine weitestgehende Ungewissheit über die grundlegenden pathomechanischen Abläufe, aber es konnte in allen Studien der Verlust an oberflächenaktiven Substanzen und eine veränderte Zusammensetzung des Surfactant-Pools nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde beobachtet, dass die surfactantvermittelte Oberflächenspannungsreduktion im alveolären Kompartiment bei ARDS-Patienten stark eingeschränkt ist.

Aufgrund der komplexen Pathogenese des ARDS sind in der Vergangenheit zahlreiche Bemühungen zur Therapieverbesserung (Beatmung, Lagerung, extrakorporale Verfahren und pharmakologische Ansätze) unternommen worden.

Im Rahmen einer Phase-II-Studie zur Sicherheit der intratrachealen Applikation eines auf rekombinantem Surfactant-Protein-C- (rSP-C) basierenden Surfactant-Präparates (Venticute®) erfolgte an der Medizinischen Universitätsklinik in Giessen die Durchführung der vorliegenden Studie. Ziel der hier vorgelegten Dissertation war es zu prüfen, ob bei ARDS-Patienten Veränderungen und Funktionsstörungen des Surfactant-Systems vorliegen, und ob sich eine nachgeschaltete Surfactant-Therapie positiv auf diese Eigenschaften auswirkt. Hierzu wurden bronchoalveoläre Lavagen repetitiv durchgeführt und biochemisch und biophysikalisch untersucht. Kardiopulmonal gesunde Probanden sowie nicht surfactantbehandelte ARDS-Patienten dienten als Kontrollen.

2. Einleitung

2.1. Das pulmonale Surfactant-System

Bei allen Säugetieren und ebenso auch beim Menschen wird der Alveolarraum der Lungen von einem feinen Surfactant (surface-active-agent)-Film überzogen. Dieser ist unerlässlich für die alveoläre Ventilation und den Gasaustausch bei physiologischen transpulmonalen Druckverhältnissen. In der endexpiratorischen Stellung der Atmung verhindert der Surfactant-Film durch Senkung der alveolären Oberflächenspannung ein Zusammenfallen der Alveolen und wirkt dadurch einem Verlust an Gasaustauschfläche entgegen. Das Surfactant-System trägt aber nicht nur zur Verbesserung der Atemmechanik bei, sondern spielt auch eine Rolle bei der alveolären Infektabwehr.

Folgend werden die für diese Arbeit relevanten biochemischen und funktionellen Aspekte des pulmonalen Surfactant-Systems näher erläutert:

2.1.1. Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants

Der zentrifugierte (200 x g; 4 °C; 1 h) und zellfreie Überstand der bronchoalveolären Lavage (BAL) stellt das Ausgangsmaterial für zahlreiche biochemische und biophysikalische Untersuchungen dar. Die Surfactanttrockenmasse besteht aus zwei Hauptfraktionen, den Lipiden (ca. 90 %) – im wesentlichen Phospholipiden – und den Proteinen (ca. 10 %).

Lipide

In der Surfactant-Trockenmasse findet sich innerhalb der Lipidfraktion (insgesamt 85-90 %) neben den anteilmäßig geringen Neutrallipiden (etwa 10 % der Lipidfraktion, insbesondere Cholesterol) die vorherrschende Klasse der Phospholipide (80-90 % der Lipidfraktion), die nur in den Typ-II-Alveolarzellen synthetisiert werden [5]. Die Phospholipidklassen Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylglycerol (PG) dominieren quantitativ mit etwa 80 % bzw. 10 % in der Klasse der Phospholipide. Gesättigte Fettsäuren, hier vor allem die Palmitinsäure, repräsentieren etwa 80 % der Fettsäuren des PC. Hochkonserviert innerhalb aller Säugetierspezies erscheint das dipalmitoylierte PC (DPPC) als vorherrschende molekulare Spezies. Als weitere, quantitativ untergeordnete Phospholipidklassen liegen Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS) und Sphingomyelin (SPH) vor [6, 7, 8, 9, 10].

Proteine

Die restlichen ca. 10 % der Surfactanttrockenmasse bilden Proteine, von denen ungefähr 50 % auf unspezifische Plasmaproteine entfallen. Die andere Hälfte stellen die vier bislang bekannten, *spezifischen* Surfactant-Proteine SP-A (35 kDa), SP-B (8 kDa), SP-C (4 kDa) und SP-D (43 kDa) dar [11, 12, 13]. Das bereits erwähnte SP-D scheint keine Rolle bei der klassischen Surfactant-Funktion der Oberflächenspannungssenkung zu haben, sondern eher mit der Abwehr von Mikroorganismen und der Regulation des Surfactant-Metabolismus verknüpft zu sein [14, 15]. Die zwei hydrophoben Proteine SP-B und SP-C besitzen eine Schlüsselrolle bei der Verstärkung der oberflächenspannungsreduzierenden Eigenschaften von Phospholipidfilmen. Dies wurde durch experimentelle Studien belegt [6, 16, 17, 18, 19, 20, 21]. Bei der Kompression des Surfactant-Films wird eine membranstabilisierende Wirkung durch SP-B vermutet, da sich zwischen positiv geladenen SP-B-Abschnitten und den negativ geladenen hydrophilen Kopfgruppen einzelner Phospholipiden (PL) elektrostatische Wechselwirkungen ausbilden [22, 23, 24]. Eine positive Beeinflussung vor allem der Adsorptionsfähigkeit der PL scheint SP-C in einer calciumabhängigen Art als sog. „Ankerprotein“ zu haben [25, 26, 27]. Das hydrophile SP-A reguliert den Surfactant-Pool im alveolären Kompartiment und hat einen Effekt auf die Adsorptionskinetik von PL [6, 28, 29]. SP-A bindet DPPC. Es hat einen positiven, rezeptorvermittelten Effekt auf die Wiederaufnahme der PL in die Typ-II-Alveolarzelle und einen negativen auf die Surfactant-Synthese sowie -Sekretion aus diesen Zellen [30, 31].

2.1.2. Surfactant-Metabolismus

Nach Aufnahme der Vorstufen (hauptsächlich Cholin und Fettsäuren) aus der Zirkulation werden im rauen endoplasmatischen Retikulum (raues ER) der Typ-II-Alveolarzelle die Phospholipide und Proteine synthetisiert [32]. Vom Golgi-Apparat in Vesikel (multivesikuläre Körperchen, MVK) verpackt, erreichen sie die sog. Lamellar-Körperchen (LK; „lamellar bodies“; zwiebelschalenförmige Phospholipid-Doppelschichten). Hier bzw. in den MVK findet wahrscheinlich die Vereinigung der Surfactant-PL mit den Proteinen statt [33]. Als die intrazelluläre Speicherform des Surfactants können somit die Lamellar-Körperchen angesehen werden. Das so genannte tubuläre Myelin (TM; „*Tubular Myelin*“; gitterförmige Struktur) wird in der alveolären Hypophase durch das exozytotisch-sezernierte Material in Gegenwart von Calcium sowie von SP-A und SP-B ausgebildet. Heutzutage wird diese gitterförmige Struktur als Vorläuferstruktur des Oberflächenfilms angesehen [12]. Aufgrund der Dichte des alveolären Surfactant-Pools, der aus bronchoalveolärer

Lavageflüssigkeit gewonnen werden kann, kann eine Unterscheidung in ultraschwere, schwere und leichte Fraktionen erfolgen. Die volle biophysikalische Aktivität erzielen nur die ultraschweren und schweren Fraktionen (Lamellar-Körperchen und tubuläres Myelin; auch „große Surfactant-Aggregate“ bzw. „Large Surfactant Aggregates“ genannt) [34]. Aus diesen wird der Grenzflächenfilm gespeist. Das Abbauprodukt des Grenzflächenfilms, das vor der Wiederaufnahme in die Typ-II-Alveolarzelle steht (UV; „unilamelläre Vesikel“), scheint die leichte Fraktion des Surfactant-Materials („kleine Surfactant-Aggregate“) zu sein. Eine Konversion von den „großen Surfactant-Aggregaten“ zu den „kleinen Surfactant-Aggregaten“ wird durch periodische Oberflächenänderungen und möglicherweise enzymatisch durch die so genannte „Surfactant-Konvertase“ vermittelt. Das extrazelluläre Surfactant-Material besteht unter normalen Bedingungen zu 80-90 % aus den „großen Surfactant-Aggregaten“ inklusive einem hohen Gehalt an SP-B und zu 10-20 % aus den „kleinen Surfactant-Aggregaten“. In der Grenzschicht liegen ca. 60-80 % des gesamten Surfactant-Pools der Lunge vor und ermöglichen eine atemabhängige Senkung der Oberflächenspannung. SP-A spielt durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor auf den Alveolarzellen-Typ-II eine möglicherweise wichtige Rolle bei der Regulation der Surfactant-Sekretion und -Wiederaufnahme. Eine enge Regulation des alveolären Surfactantpools durch Wiederaufnahme des Surfactant-Materials bzw. Abbau ist zwingend notwendig und zum Teil durch die bereits oben angedeutete SP-A-vermittelte Wiederaufnahme des Surfactant-Materials ($\approx 70-90\%$) in die Typ-II-Alveolarzelle gewährleistet [7, 9, 35, 36, 37, 38, 39]. Auch Alveolarmakrophagen sind zu etwa 10-15 % an dem Katabolismus des Surfactant-Materials beteiligt [39]. Der ebenfalls stattfindende ziliäre Abtransport entlang der Atemwege fällt mit $\approx 2-3\%$ am geringsten aus [40]. Die Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen dem intra- und extrazellulären Surfactant-Pool ist in Teilen durch SP-A über einen Alveolarzell-Typ-II SP-A-Rezeptor vermittelt [41]. Es gibt Hinweise, dass der Großteil des extrazellulären Surfactant-Materials in das umgebende Gewebe aufgenommen wird [40]. Die Elimination, die Wiederaufnahme sowie die schnelle, dehnungsvermittelte Sekretion des Surfactants und rasche Ausbreitung im alveolären Kompartiment ermöglichen den schnellen und stetigen Ablauf des Surfactant-Metabolismus an der Grenzschicht des alveolären Kompartiments. Interessanterweise kann sich die Zusammensetzung der Surfactant-Phospholipide aufgrund unterschiedlicher Faktoren, wie Diät [42,43], Alter [44] und körperlicher Anstrengung [45,46] verändern.

2.1.3. Funktionen des pulmonalen Surfactants

Reduktion der Oberflächenspannung

In endexpiratorischer Stellung nähern sich die Werte für die Oberflächenspannung durch ein bis heute nicht vollständig geklärtes und komplexes Zusammenspiel zwischen den Phospholipiden und den hydrophoben Proteinen fast an 0 mN/m an [18, 20, 21, 27, 47, 48, 49]. Die Phospholipide richten sich entsprechend ihrem amphiphilen Charakter unter Hinwendung ihrer hydrophoben Fettsäureenden zur Gasphase und ihrer hydrophilen Kopfgruppen zur wässrigen Phase an der Luft-Wasser-Grenzfläche aus. Diese Ausrichtung bleibt während der alveolären Kompression und Extension konstant und verringert so die starken Kohäsionskräfte der Alveolen untereinander. Unter statischen Bedingungen erzielen die Phospholipid-Proteingemische einen Oberflächenspannungswert von ca. 25 mN/m und somit nur etwa ein Drittel des Oberflächenspannungswert von reinem Wasser [50, 51]. In Abhängigkeit der weiteren Kompression der Grenzfläche bewirkt der stabile Oberflächenfilm eine weitere Senkung der Oberflächenspannung. Am Ende der Kompression (Endexpirationsstellung) zeigten sich in vitro Oberflächenspannungswerte von annähernd 0 mN/m für natürliches Surfactant-Material als auch für synthetische, SP-B und/oder SP-C enthaltende Phospholipid-Gemische. In tierexperimentellen Studien gelang es, diese niedrige Oberflächenspannung tatsächlich in situ am Ende der Expiration zu beobachten [52, 53, 54]. Aus diesen grundsätzlichen biophysikalischen Eigenschaften des Surfactants lassen sich folgende physiologische Funktionen des Surfactants ableiten:

Gasaustausch

Generell ist für die nass ausgekleideten Alveolen das LA-PLACE-Gesetz ($\Delta p = 2x \gamma / r$) anzuwenden. Aus diesem lässt sich ableiten, dass die Oberflächenspannung bei rein wässrigem Grenzfilm ansteigt, wenn sich der Durchmesser der Alveolen vermindert. Konsekutiv neigen die Alveolen verstärkt zum endexpiratorischen Kollaps, wodurch sich in der Folge Atelektasen ausbilden. Die Anwesenheit des Surfactant-Materials in der alveolären Grenzfläche wirkt dieser als unphysiologisch zu wertenden Auswirkung durch die Reduktion der Oberflächenspannung entgegen. Es scheint, dass das Surfactant-Material nicht nur im alveolären Kompartiment der Lunge seine Wirkung entfaltet, sondern ebenfalls einen Kollaps der vorgeschalteten Bronchiolen verhindern kann. Infolgedessen ist die Grundvoraussetzung für den Gasaustausch durch die konstante Belüftung der Lunge bis in die Alveolen gewährleistet. Eine Kongruenz mit dieser als theoretisch anzusehenden Vorstellung konnte in mehreren experimentellen Arbeiten (detergentienbedingte Erhöhung der Oberflächenspannung

in den Alveolen [55] oder durch repetitive BAL an der Ratte [56]) bzw. klinischen Untersuchungen (Surfactant-Applikation bei Neugeborenen mit fehlender Lungenreife und primärem Surfactant-Mangel [57, 58]) nachgewiesen werden und somit die elementare Bedeutung des Surfactant-Materials für die Aufrechterhaltung des physiologischen Gasaustausches belegt werden.

Compliance – Steigerung

Des Weiteren leitet sich aus dem LA-PLACE-Gesetz eine weitere wichtige Funktion des Surfactants in Bezug auf die Druck-Volumen-Beziehung der Lunge ab. Diesem Gesetz folgend, wären zu Beginn der Inspiration bei einer ausschließlich wässrigen Hypophase zur Entfaltung der Lunge extrem hohe Drücke aufzubringen, da die Alveolen sich erst öffnen müssten. Allerdings ist die reale Oberflächenspannung in den Alveolen deutlich geringer, als bei einer rein wässrigen Auskleidung zu erwarten wäre. Aufgrund der oben genannten Gründe kommt es unter physiologischen Bedingungen aber nicht zu einem Kollaps der Alveolen und durch die resultierende Stabilität der einzelnen Alveolen zu einer Verbesserung der Lungencompliance.

Protective Wirkung gegen Ödeme

Die ödemprotective Wirkung des Surfactant-Materials erklärt sich gemäß dem STARLING'schen Gesetz. Da jede Erhöhung der alveolären Oberflächenspannung, wie bei einem Surfactant-Mangel bzw. dessen Inaktivierung, zu einer Reduktion des interstiellen Druckes führt, kommt es letztlich zu Veränderungen des alveolären Flüssigkeitshaushaltes durch Flüssigkeitsverschiebungen vom Interstitium in die Alveolen. Das konsequent entstandene interstitielle und intraalveoläre Ödem verursacht eine progrediente Störung der Lungenfunktion sowie Surfactant-Inaktivierung [34, 55, 59].

Immunregulatorische Funktion

Es gibt bisher vier bekannte Mechanismen, über die das Surfactant-Material bei der pulmonalen Infektabwehr positiv mitwirkt. Dazu gehören eine Unterstützung der unspezifischen Abwehrmechanismen, eine direkte Wirtsabwehr durch Surfactant-Komponenten, eine Immunmodulation der Lymphozyten und eine Verstärkung bzw. Vergrößerung der Aktivität der Alveolarmakrophagen [60]. Die gleichmäßige Auskleidung des Alveolarraumes mit Surfactant verhindert, dass eingeatmete Partikel, wie z.B. pathogene Keime und Viren, in direkten Kontakt mit dem Alveolarepithel gelangen. Die für die

Pathogenität dieser inhalierten Partikel wichtige Adhäsion und Invasion kann somit weitestgehend unterbunden werden. Surfactant schützt ebenfalls das Epithel der Alveolen vor toxischen Sauerstoffradikalen. Die dominierende Rolle bei der direkten pulmonalen Infektabwehr spielt SP-A und teilweise SP-D. Die beiden hydrophilen SP-A und SP-D regulieren die Phagozytose, Chemotaxis und die oxidative Lyse von Mikroorganismen in den Makrophagen. Diese beiden Surfactant-Komponenten gelten mittlerweile auch als wichtige Opsonine verschiedener obligat- und fakultativ-pathogenen Mikroorganismen. Sie ermöglichen dadurch eine schnellere Phagozytose. SP-A und SP-D binden und inaktivieren ferner bakterielle Toxine [60, 61, 62, 63]. Des Weiteren unterdrücken die Phospholipide die Proliferation, Immunglobulinproduktion und Zytotoxizität der Lymphozyten. Verantwortlich für diese immunregulatorischen Effekte sind die Surfactant-Phospholipide, PC, PG und PI. Die Phospholipide inhibieren gleichsam die endotoxinstimulierte Zytokin-Ausschüttung der Alveolarmakrophagen. Darüber hinaus scheint durch die freien Fettsäuren des Surfactant-Gemisches eine direkte Zytolyse einiger Kokken, wie z.B. *Staphylococcus aureus*, wenigstens in vitro möglich zu sein [60, 61, 62].

2.2. Pathophysiologie und -biochemie des pulmonalen Surfactant-Systems am Beispiel des Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)

Inzidenz, Definition und Ätiologie

ASHBAUGH beschrieb 1967 erstmals das akute Lungenversagen des Erwachsenen („*Acute Respiratory Distress Syndrome*“, ARDS) [64]. Dabei handelt es sich um eine akute Funktionsstörung der pulmonalen Gasaustauschstrecke (Alveole ↔ Interstitium ↔ Kapillare). Das ARDS ist gekennzeichnet durch das akute Auftreten einer diffusen, inflammatorischen Reaktion der Lunge, mit Entwicklung eines nicht kardial bedingten Lungenödems, einer pulmonalen Hypertension sowie eines hohen intrapulmonalen Rechts-Links-Shunts mit konsekutiver Hypoxämie [64, 65]. Eine exakte Schätzung der Inzidenz des ARDS war vor der „Consensus-Conference“ von 1994 [65] eine – retrospektiv gesehen – schwierige Angelegenheit, da es keine einheitlich geltende Definition des ARDS gab. Vor der „American-European-Consensus-Conference“ [65] schwankten die Angaben zur Inzidenz des ARDS von 1,5/100.000 über 13,5/100.000 bis zu 75/100.000 Menschen und Jahr. Da Frühformen häufig nicht als ARDS erkannt werden, ist auch heute noch eine Häufigkeitsangabe schwierig. Die Inzidenz beträgt offiziell ca. 1-10/100.000. Von 1997 an wurde vom Acute-Respiratory-Distress-Syndrome-Network drei Jahre lang die Inzidenz beobachtet

und ermittelt, dass die wahrscheinliche ARDS-Inzidenz doch um 75/100.000 Menschen und Jahr liege [66]. Definitionsgemäß handelt es sich um ein ARDS, wenn folgende klinische Konstellation vorliegt:

- ü Akuter Beginn mit respiratorischer Insuffizienz, die sich auf Sauerstoffgabe nicht entscheidend bessert.
- ü Diffuse, bilaterale Infiltrate auf dem anterior-posterior Thoraxröntgenbild, so genannte „*White Lung*“ (und/oder Lungenfibrosierungszeichen „*Honey-combing*“ im ARDS-Spätstadium).
- ü Pulmonalarterieller Verschlussdruck ≤ 18 mmHg oder der fehlende klinische Hinweis einer linkskardialen Dekompensation.
- ü Oxygenierungsindex ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) ≤ 200 mmHg.

Dabei entspricht der FiO_2 der inspiratorischen Sauerstofffraktion am Respirator und PaO_2 dem arteriellen Sauerstoffpartialdruck in der Blutgasanalyse. Sollten die ersten drei Punkte der Definition erfüllt sein, der $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ hingegen zwischen ≤ 300 und > 200 liegen, spricht man heutzutage nicht mehr von einem ARDS, sondern von einem „Acute Lung Injury“ (ALI, akut-inflammatorische Lungenerkrankung). Das ALI kann in ein ARDS übergehen und somit als „Vorstufe“ des ARDS angesehen werden [65]. Es sind unterschiedliche ARDS-Auslöser bekannt, wobei zu beachten ist, dass es auch bei lungengesunden Menschen ohne spezielle prädisponierende Faktoren auftreten kann [67]. Ausgehend von ganz unterschiedlichen Ursachen manifestiert sich das vollausgebildete Krankheitsbild des ARDS mit einheitlichen histomorphologischen Veränderungen. Zu den Ursachen zählen die in Tabelle 1 aufgeführten Mechanismen.

Quantitativ gehören das Krankheitsbild der Sepsis und der Status nach Polytraumatisierung zu den bedeutenden Auslösern eines akuten Lungenversagens. Obwohl keine prädisponierenden ARDS-Faktoren bekannt sind, weisen Menschen mit einem primären oder sekundären Immundefizit (z.B. immunsuppressive Behandlung, chronische Kortikoidtherapie oder eine konsumierende Erkrankung) über die vermehrte Anfälligkeit gegenüber Infektionen und septischen Verläufen, ein indirekt erhöhtes Risiko auf, ein akutes Lungenversagen zu entwickeln. Klinisch zeigen sich Tachypnoe und Dyspnoe, Entfaltungsknistern über der ganzen Lunge und eine Zyanose, die sich auf Sauerstoffzufuhr nicht entscheidend bessert. Der Oxygenierungsindex als Verhältnis von arteriellem Sauerstoffpartialdruck zu inspiratorischer Sauerstoffkonzentration fällt ab. Es imponiert anfänglich eine deutliche Diskrepanz zwischen

der schlechten klinischen Situation des Patienten und den weniger richtungsweisenden diagnostischen Befunden. Es entstehen Atelektasen und damit Perfusions-Ventilations-Störungen, die zu einer deutlichen Reduktion des Oxygenierungsindex führen. Gleichzeitig tritt eine pulmonale Hypertension auf, der sowohl mechanische Faktoren, wie z. B. Thrombembolien und Kompression durch Ödembildung, als auch funktionelle Gefäßverschlüsse durch vasoaktive Mediatorsubstanzen oder durch die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) zugrunde liegen [68]. Das ARDS hat trotz aller Fortschritte der Intensivmedizin heute noch eine Letalität von 30-40 % [69, 70]. Bei den meisten Patienten, die dieses schwere Krankheitsbild überstehen, kehrt eine annähernd normale Lungenfunktion nach sechs bis zwölf Monaten nach der Entwöhnung vom Respirator („Weaning“) zurück [71]. Patienten mit einem verlängerten „Weaning“ bzw. einer schwereren Krankheitsphase zeigen aber oft eine restriktive Ventilationsstörung bei Durchlaufen einer post-ARDS-Lungenfibrose, verbunden mit einer resultierenden verminderten Lebensqualität [71].

Direkte (primäre) Lungenschädigung	Indirekte (sekundäre) Lungenschädigung (meist hämatogen bedingt)
<i>Häufige Ursachen</i>	<i>Häufige Ursachen</i>
Pneumonie (→„parapneumonisches ARDS“)	Sepsis
Aspiration von Magensekret/Mageninhalt	Schweres Trauma inkl. Schock und Massentransfusion
<i>Weniger häufige Ursachen</i>	<i>Weniger häufige Ursachen</i>
Lungenkontusion	Kardiopulmonaler Bypass
Fettembolie	Drogen-Intoxikation
„Beinahe-Ertrinken“ („Near-drowning“)	Akute Pankreatitis
Inhalation toxischer Substanzen	Transfusion von Blutprodukten
Pulmonales Reperfusionsödem nach Lungentransplantation oder pulmonaler Embolektomie	Weitere Auslöser: Verbrauchskoagulopathie Verbrennungskrankheit

Tab. 1: Ätiologie des Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) [66]

Pathogenese des ARDS

Beim akuten Lungenversagen kommt es durch komplexe Mechanismen zu einer Lungenschädigung. Zum einen ist die Akutphase des ARDS durch eine endotheliale und epitheliale Schädigung in der Lunge gekennzeichnet. Es strömt proteinreiche Ödemflüssigkeit

in das Interstitium und die Alveolen ein. Eine Permeabilitätssteigerung, die durch eine Kapillarschädigung zustande kommt, ist für den Übertritt des Exsudates von den Kapillaren über das Interstitium in den Alveolarraum verantwortlich [72]. Die flachen Alveolarzellen-Typ-I bedecken ungefähr 90 % der alveolären Gasaustauschfläche und sind vulnerabler als die kuboidalen Alveolarzellen-Typ-II, die die restlichen 10 % bedecken. Deren Funktion umfasst zum einen die erwähnte Surfactant-Produktion (s.o.), zum anderen den Ionenaustausch und des Weiteren eine Proliferation und Differenzierung in Alveolarzellen-Typ-I nach Epithelschädigung [66].

Polymorphkernige, neutrophile Granulozyten treten in der Akutphase des ARDS über das kapilläre Leck („*Capillary leakage*“) in das Interstitium ein, wandern in den Alveolarraum und tragen dort zur entzündlichen Antwort bei. Die Alveolarmakrophagen sezernieren in dieser Phase des ARDS Zytokine, Interleukine (IL-1,6,8,10) und den Tumornekrosefaktor α (TNF- α). IL-1 und TNF- α aktivieren die sich in der Alveole befindlichen neutrophilen Granulozyten. IL-1 kann darüber hinaus Fibroblasten zur Produktion von extrazellulärer Matrix und zu deren Deposition im Interstitium anregen. IL-8 lässt die Endothelzellen anschwellen, schädigt sie dadurch zunehmend, und verstärkt folgend das „*Capillary leakage*“. Die aktivierten neutrophilen Granulozyten können auch andere proinflammatorische Moleküle, wie z.B. Leukotriene, Proteasen und den plättchenaktivierenden Faktor (PAF) freisetzen. Der makrophageninhibierende Faktor (MIF) steuert der Sekretion der inflammatorischwirkenden Substanzen aus den Alveolarmakrophagen entgegen. Die vermehrte Bildung von „*Tissue factor*“ führt zur Ausbildung hyaliner Membranen in der Alveole, und der Einstrom proteinreicher Ödemflüssigkeit in die Alveolen führt zu einer Inaktivierung des Surfactant-Materials. Während der Akutphase des ARDS spielt nicht nur die vermehrte Produktion der proinflammatorischen Zytokine eine wichtige Rolle, sondern ist vielmehr das Gleichgewicht zwischen den proinflammatorischen und antiinflammatorischen Mediatoren entscheidend [66].

Surfactant-Veränderungen im Rahmen eines ARDS

Die pulmonale Surfactant-Zusammensetzung bei Patienten mit einem ARDS ist durch folgende Veränderungen im Gegensatz zu „Normalpatienten“ charakterisiert:

Es findet sich eine allenfalls geringgradige Verminderung des Gesamtphospholipidgehaltes in Korrelation mit der Schwere des ARDS, ein massiver Anstieg des Gesamtproteingehaltes, Veränderungen des Phospholipid-Profiles mit Reduktion des relativen Gehalts an PG und DPPC bzw. Erhöhung des relativen PI-, PE- und SPH-Gehalts, Abnahme des Phospholipid-

Protein-Quotienten, Verminderung der relativen SP-A-, SP-B- und SP-C-Konzentrationen [1, 2, 3, 4, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79] in den „großen Surfactant-Aggregaten“ im Vergleich zu Kontrollen sowie eine drastische Zunahme der minimalen und maximalen Oberflächenspannung [1, 2, 3]. Das Verhältnis der „großen“ zu den „kleinen Surfactant-Aggregaten“ kehrt sich bei einem ARDS, verbunden mit einem hohen Verlust an SP-B, um [4].

Verlauf des ARDS

Nach einer eher unspezifischen Initialphase lassen sich drei charakteristische ARDS-Stadien unterscheiden. Das erste Stadium wird auch als die exudative Phase beschrieben und kann innerhalb von Tagen bis Wochen vollreversibel sein. Es geht mit der erwähnten, gesteigerten Kapillarpermeabilität und der Ausbildung eines interstitiellen Lungenödems einher. Hier zeigt sich eine Hypoxämie bei Hyperventilation, was in der Regel eine Intubation des Patienten und eine Respiratorbehandlung notwendig macht. Im zweiten Stadium kommt es zum Absterben von Alveolarzellen-Typ-I und -II mit gestörter Surfactant-Bildung und konsekutivem alveolären Ödem, Ausbildung von Atelektasen sowie hyalinen Membranen und intrapulmonalen Shunts. Als physiologisch sinnvoller Mechanismus führt die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion normalerweise zu einer Umverteilung des Blutstroms von schlecht oder nicht belüfteten zu besser ventilerten Bereichen und verringert über eine Senkung des Rechts-Links-Shunts die Hypoxämie [80]. Dennoch reicht dieser physiologische Mechanismus beim ARDS nicht aus, um das „Matching“ von Perfusion an Ventilation aufrechtzuerhalten, was sich in der progredienten Hypoxämie widerspiegelt. In der proliferativen Phase (drittes Stadium) entwickelt sich eine restriktive Ventilationsstörung durch Aktivierung mesenchymaler Zellen (Fibroblasten) mit entsprechender Proliferation und vermehrter Deposition extrazellulärer Matrix im interstitiellen und alveolären Raum. Diese Fibrose kann bei Überleben des ARDS in einem Zeitraum von vielen Monaten reversibel sein [66].

Therapiemöglichkeiten

Aufgrund der vielfältigen Pathogenese des ARDS wurden in der Vergangenheit große Anstrengungen unternommen, die Prognose dieser Patienten zu verbessern. Die Fülle der alternativen Therapieansätze ergibt sich eben aus der komplexen Pathogenese des ARDS und umfasst Beatmungstherapie [81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90], Lagerungstherapien (intermittierende Bauchlagerung), die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) und pharmakologische Therapieansätze [91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102].

Unter den Beatmungstherapien versteht man heutzutage im engeren Sinne die lungenprotektive Beatmung, die Beatmung mit einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) und eine Einbindung der Spontanatmung des Patienten unter der Respiratorbehandlung bzw. eine Kombination daraus. Die respiratorbedingte Schädigung der Lungen ist eine lang bekannte Ursache für die Entstehung eines ARDS. In älteren Studien waren die potenziell toxischen Effekte einer hohen inspiratorischen Sauerstoffkonzentration bei der Beatmung hervorgehoben worden [81], aber experimentelle Arbeiten zeigten, dass die mechanische Ventilation mit hohen Druck- und Volumenparametern die Lunge zu schädigen vermag [82]. Ursächlich dafür ist eine Permeabilitätssteigerung und ein konsekutives Ödem in den nicht geschädigten Lungenanteilen [83, 84]. Des Weiteren verstärkt diese Beatmungsstrategie das bestehende Ödem in den bereits geschädigten Lungenanteilen [85]. Diese Effekte werden heutzutage durch die daraus resultierende alveoläre Überblähung und dem wiederholten Kollabieren und Wiedereröffnen der Alveolen, das eine proinflammatorische Zytokin-Kaskade in Gang setzt, erklärt [86]. Die Misserfolge mit der traditionellen Ventilation (10-15 ml Tidalvolumen/kg Körpergewicht) führte zu mehreren klinischen Versuchen, die eher eine lungenprotektive Beatmungsstrategie zur Reduktion der alveolären Überblähung und einer Steigerung des alveolären „*Recruitment*“ von atelektatischen Lungenbezirken bevorzugten. Interessanterweise zeigt eine neuere Studie, dass sich durch die protektive Beatmungsvariante sowohl die pulmonale als auch die systemische Zytokinausschüttung reduzieren lässt [87]. Das NIH-Acute-Respiratory-Distress-Syndrome-Network belegte im Jahr 2000, dass eine lungenprotektive Ventilation mit „*Low tidal volumes*“ (6 ml Tidalvolumen/kg KG) eine Abnahme der Mortalität um 22 % im Vergleich zu der traditionellen Ventilationsstrategie bewirkte [88]. Bezüglich einer optimalen PEEP-Einstellung bei Patienten mit einem ARDS wurde schon früh festgestellt, dass der Gebrauch eines PEEP die Oxygenierung bei diesen Patienten verbessert, und eine Reduktion des FiO_2 erlaubt [89, 90]. Der bestdokumentierte Effekt einer Beatmung mit PEEP auf die Funktion der Lunge ist die Verbesserung der funktionellen Residualkapazität wahrscheinlich aufgrund des stattfindenden „*Recruitments*“ der kollabierten Alveolen [90]. In einer jüngst von LEVY et al. veröffentlichten großen Studie zur Ermittlung der optimalen PEEP-Einstellung ($\text{PEEP} > 14 \text{ cm H}_2\text{O}$ bzw. $\text{PEEP} \leq 14 \text{ cm H}_2\text{O}$) bei gleichzeitiger „*Low tidal volumes*“- Beatmungsstrategie [88] konnte jedoch keine signifikante Senkung der Mortalität bzw. Verbesserung des „*Outcomes*“ bei hohen PEEP-Werten ($\text{PEEP} > 14 \text{ cm H}_2\text{O}$) nachgewiesen werden [103].

Eine Lagerungstherapie im Sinne einer intermittierenden Bauchlagerung sollte schwersten ARDS-Verläufen vorbehalten sein, da bei allen anderen Verläufen keine Verbesserung der Beatmungssituation erwartet werden kann. Die ECMO, eine Modifikation des kardiopulmonalen Bypasses aus der Herzchirurgie, ist aufgrund der großen Invasivität der Maßnahme und niedrigen Fallzahlen nicht zur routinemäßigen Therapie eines ARDS empfohlen, sondern stellt eher eine Ultima-ratio-Therapie bei schwersten ARDS-Verläufen mit drohender Hypoxie dar. Die mögliche pharmakologische Therapie im Rahmen eines ARDS beinhaltet die Inhalation von Stickstoffmonoxid (iNO), aerosolisiertes Prostazyklin (PGI₂), partielle Flüssigkeitsbeatmung, antiinflammatorische Medikamente und die Therapie mit Surfactant-Präparaten [91]. Die iNO-Therapie, die zu einer selektiven Vasodilatation von ventilierten Lungenabschnitten führt, ist nach neuesten Empfehlungen nicht für den Standardeinsatz geeignet, sondern stellt eine sinnvolle Therapieoption bei schwerer Hypoxie dar. Eine Anwendung von PGI₂ folgt dem Prinzip des iNO, ist aber wie die partielle Flüssigkeitsbeatmung eine noch rein experimentelle Therapieform. Die Gabe fast aller antiinflammatorisch wirkenden Medikamente gilt nach den neuesten Empfehlungen als kontraindiziert. Lediglich der Einsatz von niedrig dosiertem Kortison in der proliferativen Phase des ARDS scheint gesichert [91].

Mit Ausnahme des „*Low tidal volumes*“-Beatmungskonzeptes [88] hat sich aber keine der geprüften Therapieansätze als signifikant vorteilhaft bei der Behandlung des ARDS herausgestellt.

3. Fragestellung

Für das akute Atemnotsyndrom des Erwachsenen („*Acute Respiratory Distress Syndrome*“, kurz ARDS) wurden ausgeprägte Veränderungen des Surfactant-Systems bislang beschrieben. Diese Veränderungen stellen die Grundlage zur Überprüfung der Effizienz einer Surfactant-Substitutionstherapie, wie sie schon seit Jahren bei dem „*Infant Respiratory Distress Syndrome*“ (IRDS) etabliert ist, dar [104].

Es wurden drei ARDS-Kollektive (Standardtherapiertes Kollektiv, „*Low-dose*“-therapiertes Kollektiv und „*High-dose*“-therapiertes Kollektiv) untersucht. Diese Kollektive wurden mit einem Kontroll-Kollektiv, das aus Normalpatienten ohne kardiopulmonale Vorerkrankungen bestand, verglichen.

In der vorliegenden Dissertation sollten daher im Zusammenhang mit einer Phase-II-Studie zur Sicherheit der intratrachealen Applikation eines auf rekombinantem Surfactantprotein-C (rSP-C) basierenden Surfactant-Präparates (Venticute®) anhand biochemischer und biophysikalischer Untersuchungen des Surfactant-Systems sowie klinischer Beobachtung des Krankheitsverlaufes der ARDS-Patienten folgende Fragen beantwortet werden:

- Weist das ARDS-Kollektiv 3h vor Surfactant-Applikation gravierende biochemische und biophysikalische Veränderungen des Surfactant-Systems im Vergleich zur Kontrolle auf, wie es anhand der theoretischen Überlegungen und der bisher veröffentlichten klinischen Studien zu erwarten wäre?
- Bewirkt die Surfactant-Therapie der ARDS-Patienten eine Verbesserung des Gasaustausches, der Anzahl der beatmungsfreien Tage wie auch der Mortalität?
- Lassen sich die Veränderungen des Surfactant-Systems bei den ARDS-Patienten durch eine Surfactant-Therapie positiv beeinflussen? Zeigen sich dosisabhängige (4 x 1 mg rSP-C /kg Körpergewicht (KG) in der „*Low-dose*“-Gruppe bzw. 4 mg rSP-C /kg KG (Venticute®) + 2 mg rSP-C /kgKG bis zu dreimal in 24h in der „*High-dose*“-Gruppe) Veränderungen des Surfactantsystems?
- Ist eine Korrelation zwischen klinischer Verbesserung (Gasaustausch) und den biochemischen bzw. biophysikalischen Surfactant-Eigenschaften möglich?

4. Materialien

4.1. Geräte

Amersham Pharmacia (Freiburg)	HPLC – Gradientenpumpe 2249
Amersham Pharmacia (Freiburg)	Fraktionensammler RediFrac
Camag (MuttENZ, Schweiz)	Linomat Probenauftragegerät
Camag (MuttENZ, Schweiz)	TLC-Scanner II
DuPont (Bad Nauheim)	Zentrifuge Sorvall RC5C
Du Pont de Nemours Int.SA (Genf, Schweiz)	Klinische Systeme, ACA II & III
Electronetics Cooperation, Amherst (N.Y., USA)	Pulsating Bubble Surfactometer
Eppendorf (Frankfurt/ Main)	Digital Photometer 6115 S
Fisons (Mainz)	Gaschromatograph Carlo Erba Fractovap 2150 mit FID
GFL (Burgwedel)	Wasserbad
Heraeus (Hanau)	Ultrazentrifuge Omega II 70
Kontron (München)	Spektralphotometer Uvikon 922
Merck (Darmstadt)	Silica 60 Dünnschichtplatten
Nunc (Wiesbaden)	Mikrotiter-Platten (Maxisorp [®] ; Polysorp [®])
Olympus Optical GmbH (Hamburg)	Bronchoskop (BF Type P20 D)
Pierce (Rockford, Illinois, USA)	BCA Protein Assay Reagent
SLT (Overath)	ELISA-Photometer 400 V. 1.1

4.2. Substanzen

Anti-SP-A (PE10; monoklonal)	T.Akino (Dept. of Biochemistry, Sapporo Medical College, Sapporo, Japan; [105])
Anti-SP-B (8B5E; monoklonal)	Y. Suzuki (Chest Disease Research Institute, Kyoto-University, Japan; [106])
SP-A (human rekombinant)	K.P. Schäfer (Altana, Konstanz; 99 % Reinheit)
SP-B (human natürlich)	Aufgereinigt per LH60-Chromatographie nach Warr [19] (95 % Reinheit)
SP-C (rekombinant, Venticute [®])	K.P. Schäfer (Altana, Konstanz)
SP-D	M. Griese (Kinderklinik Universität München), aufgereinigt mittels Mannose-Affinitätschromatographie nach [107]
Bovines Serum Albumin (BSA)	Paesel and Lorei GmbH (Frankfurt/Main)
Anti-Maus-Antikörper (biotinyliert)	Amersham Biosciences (Freiburg)
Avidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase (AB-Komplex)	Dakopatts GmbH (Hamburg)
Tween 20	Sigma (München)
Triton X-100	Serva (Heidelberg)
Oxybuprocainhydrochlorid (Novesine [®])	Wander Pharma GmbH (Nürnberg)
May-Grünwald-Lösung (Eosin-Methylenblau-Lösung mit > 50 % Methanol)	Merck (Darmstadt)
Giemsa-S-Lösung (Azur-Eosin-Lösung)	Merck (Darmstadt)
ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-ethyl-benzthiazolinsulfonat(6)])	Boehringer GmbH (Mannheim)

PBS (phosphate buffered saline; pH: 7,4)

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

ad 1000 ml Aqua destillata

BSA-Puffer (pH: 7,4)

PBS-Puffer angereicht mit einprozentigem (wt/vol) Rinderalbumin

Waschpuffer (pH: 7,4)

PBS-Puffer angereicht mit 0,5% igem (wt/vol) TWEEN 20

Substratpuffer (pH: 4,2)

Na-Acetat-Trihydrat	8,2 g
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	6,9 g
ad 1000 ml Aqua destillata	

ABTS-Lösung

ABTS	20 mg
Substratpuffer	30 ml
H ₂ O ₂	10 µl

Molybdän-Blau-Färbe-Lösung

Lösung 1: 10,03 MoO₃ und 250 ml 12,5 M H₂SO₄ werden 15-30 Minuten unter Rückfluss, bis eine klargelbe Lösung entsteht, gekocht.

Lösung 2: Nach Abkühlen der Lösung 1 werden 125 ml dieser Lösung mit 0,445 g Molybdät-Pulver 1h unter Rückfluß gekocht.

Nach dem Abkühlen der Lösung 2 wird diese zum verbliebenen Volumen von Lösung 1 hinzugegeben. Daraufhin wird die neue Lösung mit dem doppelten Volumen Aqua destillata (500 ml) versetzt und anschließend mit konzentrierter Essigsäure bis zu einem Volumenverhältnis von Reagenz : Essigsäure von 4 : 1 (= 187,5 ml) angereichert.

Alle anderen Chemikalien in p.A.-Qualität von der Fa. Merck (Darmstadt).

5. Methoden

5.1. Patientenkollektiv

Bei der dieser Dissertation zugrunde liegenden, europaweiten, multizentrischen, randomisierten, kontrollierten Phase-II-Studie an ARDS-Patienten wurde, nach vorheriger Zustimmung durch das jeweilige Ethik-Komitee und rechtskräftiger Einwilligung durch den Patienten bzw. dessen gesetzlichen Vertreter, ein auf gentechnologisch hergestelltes Surfactant-Protein-C (rSP-C)-basierendes Surfactant-Präparat (Venticute®) in einer Therapiedosis von 0,5 mg rSP-C + 25 mg Phospholipide bis maximal 1mg rSP-C + 50 mg Phospholipide/kg Körpergewicht (KG) intratracheal bis zu viermal in 24h instilliert. Die exakten Ein- und Ausschlusskriterien dieser Studie sind in Tabelle 2 dargestellt.

Die ARDS-Patienten wurden prospektiv randomisiert, um entweder mittels der Standardtherapie (Standard-Gruppe; n=15) behandelt zu werden, oder um mittels der Standardtherapie plus einer der beiden möglichen Dosisregime 4 x 1 mg rSP-C (Venticute®) /kg Körpergewicht (KG) in der „*Low-dose*“-Gruppe (n=18) bzw. 4 mg rSP-C /kg KG + 2 mg rSP-C /kgKG bis zu dreimal in 24h in der „*High-dose*“-Gruppe (n=13) des hier untersuchten rSP-C-basierenden Surfactant-Präparates (Venticute®) behandelt zu werden. Dieses rSP-C basierende Surfactant-Präparat (Venticute®) enthält (wt/wt) 1,8 % rSP-C, 63,4 % Dipalmitoyl-sn-Phosphatidylcholin (DPPC), 27,8 % 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-3-sn-Phosphatidylglycerol, 4,5 % Palmitinsäure und 2,5 % Calciumchlorid.

Die Patienten wurden entweder bis Tag 28 der Studie oder bis zu deren Verlegung in eine andere Klinik beobachtet. Für den stationären Aufenthalt erfolgte jeden Tag die körperliche Untersuchung der Patienten sowie laborchemische Untersuchungen des Blutes. Ebenfalls wurde täglich geprüft, ob nach den gültigen Richtlinien der Beginn bzw. die Durchführung der Respirator-Entwöhnung indiziert war.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> • ARDS-Diagnose: Innerhalb von 12h: 1. Diffuse, bilaterale Infiltrate im Thorax-Röntgenbild (innerhalb von 7d nach prädisponierendem Ereignis); 2. $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mmHg und 3. $\text{PEEP} \geq 5$ cmH₂O • Pulmonalarterieller Verschlussdruck ≤ 18mmHg (Swan-Ganz-Katheter) oder der fehlende klinische Hinweis einer linkskardialen Dekompensation • Lebensalter ≥ 18 Jahren und ≤ 70 Jahren • Komplette körperliche Untersuchung inklusive der Vitalzeichen • Der Patient muss intubiert und beatmet sein; Möglichkeit zur Sedierung und Relaxierung des Patienten während Surfactant-Applikation muss gegeben sein • Der Patient muss einen arteriellen Katheter zur invasiven Blutdruck-Messung („Arterie“) haben • Die „Baseline“-Phase muss spätestens 72h nach ARDS-Diagnose folgen • Die Zustimmung des jeweiligen Ethik-Komitees muss vorliegen • Der Patient bzw. sein gesetzlicher Vertreter muss vor der „Baseline“ sein Einverständnis („<i>Informed consent</i>“) geben 	<ul style="list-style-type: none"> • Vorherige ARDS-Episode oder bakterielle Pneumonie, die eine Beatmung indizierte und wieder Auftreten nach Besserung während des Krankenhausaufenthaltes • Primäres pulmonales Malignom oder pulmonale Metastasen oder ein Malignom im Endstadium • Stadium AIDS nach den CDC-Kriterien • ARDS durch „Beinahe-Ertrinken“ („near drowning“) • Erwartete Notwendigkeit einer Langzeit-Respiratorbehandlung aufgrund von nicht respiratorischen Gründen über die Beobachtungsphase (Tag 28) hinaus • Lebenserwartung von weniger als zwei Tagen aufgrund von nicht respiratorischen Gründen • Hinweis auf eine Leberinsuffizienz, akutes Leberversagen bzw. bekannte Leberzirrhose • Oxygenierungsindex < 60 mmHg zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie • Arterieller Mitteldruck < 60 mmHg zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie (mit oder ohne Behandlung mit inotropen Medikamenten) • Vorhandensein von diffusen, bilateralen pulmonalen Infiltraten länger als fünf Tage • Neutropenie $< 1/\text{nl}$ ($1000/\mu\text{l}$ oder $10^9/\text{l}$ oder 1G/l) oder bei einer Gesamtleukozytenzahl $\leq 2/\text{nl}$ ($2000/\mu\text{l}$ oder $2 \times 10^9/\text{l}$ oder 2G/l) binnen 24h vor Beginn der „Baseline“-Phase • Notwendigkeit der Langzeit-Respiratorbehandlung besteht aus anderen Gründen als ARDS (z.B. schwere COPD) • Eine Pneumonie (als prädisponierendes Ereignis) wurde weniger als 48h mit antibiotischen Substanzen behandelt • Teilnahme an einer klinischen Studie mit einer investigativen Substanz innerhalb der letzten 30 Tage • Einsatz anderer experimenteller Therapieformen bei ARDS, z.B. NO, ECMO, ..., zwischen ARDS-Diagnose und Einschluss in die Studie • Lobektomie oder Pneumektomie in der Anamnese • Lungentransplantation in der Anamnese • Dokumentierter Myokardinfarkt in den letzten drei Monaten vor Studieneintritt oder vorbekannte chronische Herzinsuffizienz NYHA-Stadium III-IV

Tab. 2: Ein- und Ausschlusskriterien

5.2. Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

5.2.1. Indikation zur BAL

Die Bronchoalveoläre Lavage findet heutzutage ihren weltweiten Einsatz in der Diagnostik und der Therapie bestimmter pneumologischer Krankheitsbilder. Mit Hilfe der BAL, die ein bronchoskopisches Untersuchungsverfahren darstellt, lassen sich für den Geübten aufgrund ihrer geringen Invasivität auf schnelle und einfache Art flüssige Bestandteile, Zellen und Krankheitserreger aus dem bronchoalveolären Raum gewinnen. Diese Maßnahme erlaubt bei pulmonalen Erkrankungen unklarer Genese eine differentialdiagnostische Abklärung. So können radiologisch auffällige Lungenareale im Rahmen einer Pneumonie auf den auslösenden bzw. verursachenden Mikroorganismus hin untersucht werden. Interstitielle Lungenerkrankungen wie z.B. Sarkoidose, exogen allergische Alveolitis, Idiopathische pulmonale Fibrose, Pneumokoniose und Histiozytosis X stellen häufig untersuchte Erkrankungen dar. Schließlich dient die BAL-Spülung ebenfalls zur Aspiration von verdächtigen Zellen bei pulmonalen Neubildungen unsicheren Verhaltens aus peripher gelegenen Lungenabschnitten. Auch bei der Diagnostik opportunistischer Lungeninfektionen, z.B. bei immunsupprimierten Patienten und Patienten mit HIV, hat die BAL mittlerweile einen hohen Stellenwert eingenommen. Therapeutisch wird die BAL vor allem bei den akuten Alveolarproteinosen, mit dem Ziel des „Herauswaschens“ der Proteine, angewandt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die BAL als Mittel zur Erregerisolierung und zur Gewinnung von Studienmaterial bei den Kollektivpatienten und zur Erhebung von „Referenzwerten“ bei freiwilligen Probanden, die weder pulmonale noch kardiologische Vorerkrankungen zum Zeitpunkt ihrer BAL hatten, eingesetzt.

5.2.2. Durchführung und Technik der BAL

Dem Studienprotokoll folgend wurden die Bronchoalveolären Lavagen, beginnend während der „Baseline“-Phase 3h vor Surfactantapplikation ($t = -3h$), dann 48h nach Applikation ($t = 48h$) sowie letztlich 120h nach der Surfactant-Gabe ($t = 120h$) am Tag 5, durchgeführt. Bei den intubierten und beatmeten Patienten wurde ein flexibles, fiberoptisches Bronchoskop über den endotracheal gelegenen Beatmungstubus in die unteren Luftwege eingebracht und nach primärer Bronchoskopie aller Lungensegmente zumeist der rechte Mittellappen oder die Lingula zur BAL ausgewählt. Nach atraumatischer Positionierung der Bronchoskopspitze in dem zu lavagierenden Segment wurde in 10 x 20 ml Schritten bis zu einem BAL-Volumen von 200 ml sterile, isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) über das Bronchoskop instilliert und unter milder Aspiration („Recovery“ jeweils 55-70 % der

Weiteren wurden mit Ausnahme der Fettsäure- und molekulare Spezies-Messungen stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

5.4.1. Bestimmung des Phospholipidgehaltes

Die Lipide wurden aus den aliquotierten BAL-Überständen nach der ersten Zentrifugation (s. 5.3., Abb. 1) mittels Bligh&Dyer-Extraktion [108] gewonnen. Hierzu wurde das zu untersuchende Material mit Methanol (MeOH) und Chloroform (CHCl_3) in einem Volumenverhältnis von 0,8 (Probe) : 2 (MeOH) : 1 (CHCl_3) gemischt und 30 Minuten lang intermittierend geschüttelt. Diesem Ansatz wurde im Anschluss je ein weiterer Volumenanteil Kochsalz (NaCl) und Chloroform zu einem Endverhältnis von 1,8 (wässrig) : 2 (MeOH) : 2 (CHCl_3) zugesetzt. Es erfolgte nun eine Phasentrennung, die durch eine Zentrifugation ($2000 \times g$) über einen Zeitraum von zehn Minuten forciert wurde. Folgend wurde die entstandene untere Phase (Chloroformphase), die quantitativ die Phospholipide und den Großteil des SP-B und SP-C enthielt, mit Pasteurpipetten isoliert und mittels Stickstoff (N_2) einer Trocknung unterzogen. Im weiteren Verlauf wurde der Phospholipid-Gehalt entsprechend der Methode nach *Rouser* [109] bestimmt. Hierbei wurde die getrocknete Chloroformphase nach ihrer Wiederaufnahme in $220 \mu\text{l}$ CHCl_3 in ein Reagenzglas (Schott, Mainz) zu zwei $100 \mu\text{l}$ -Proben pipettiert und nach einer Beimengung von $200 \mu\text{l}$ 70%iger Perchlorsäure bei 180°C über einen Zeitraum von vier Stunden erhitzt. In parallelen Ansätzen wurde Phosphatstandard (KH_2PO_4 zu $0,2 - 10 \mu\text{g}$ Phosphor/Ansatz) mitbestimmt. Nach dem Abkühlen wurden die verkochten Proben und die verkochten Standards mit je einem Milliliter Ammoniummolybdatlösung ($4,6\text{mM}$ Ammoniumheptamolybdat) versetzt und die Reduktion zum Farbkomplex durch eine Zugabe von je $20 \mu\text{l}$ 650mM Ascorbinsäure eingeleitet. Die Messung der optischen Dichte (OD) der Proben und Standards erfolgte nach einer Inkubation von 1h bei 60°C bei 698nm am Spektralphotometer. Im weiteren Arbeitsablauf wurden die Leerwerte abgezogen, mittels Computerunterstützung eine Eichgerade angefertigt und die Bestimmung des Phosphatgehaltes der einzelnen Proben durchgeführt. Unter Berücksichtigung der molaren Verhältnisse und der effektiven Verdünnung der Proben konnte der Phospholipidgehalt der einzelnen Proben unter Zuhilfenahme des Umrechnungsfaktors 23,45 (von μg Phosphat auf μg Phospholipid) errechnet werden. Als mittlere Molekularasse für Phospholipide wurde die relative Masse des DPPC ($M_r = 734$) verwendet.

5.4.2. Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung der Proteine wurde nach der *Lowry*-Methode [110] mittels eines

kommerziellen Analysenkits für Proteinbestimmungen [BCA protein quantifikation kit, Pierce, Bonn] durchgeführt.

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

Der Phospholipid-Protein-Quotient (PPQ) ließ sich nach vorausgehender Bestimmung der beiden Einzelparame-ter aus dem BAL-Überstand für jede einzelne Lavage nach folgender Formel berechnen:

$$\text{PPQ} = \text{Phospholipid/Protein.}$$

5.4.4. Analyse der Phospholipidklassen (PL-Profil)

Die Analyse des Phospholipidprofils wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie, der so genannten „High Performance Thin Layer Chromatography“ (HPTLC), durchgeführt. Hierbei wurden Aliquots (30 µg Phospholipide) der durch den zweiten Zentrifugationsschritt der BAL-Lösung (5.3., Abb. 1) gewonnenen „Large Surfactant Aggregates“ der bereits erwähnten *Bligh&Dyer*-Extraktion [108] unterzogen, um nach ihrer Wiederaufnahme in 50 µl CHCl₃ / MeOH 2/1 (vol/vol) unter Zuhilfenahme eines Applikators (Linomat IV, Camag®) auf Silica 60 Dünnschichtplatten (Merck®) aufgetragen zu werden. Eine aus acht unterschiedlichen Phospholipidklassen bestehende Lösung stellte bei dieser Analyse den Standard dar, der in sieben unterschiedlichen Konzentrationen (Konz.) auf dieselbe Dünnschichtplatte gegeben wurde. Die folgende Tabelle 3 gibt die Komposition dieses Standardmixes wieder:

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

PC = Phosphatidylcholin, LPC = Lyso-Phosphatidylcholin, PG = Phosphatidylglycerol, SPH = Sphingomyelin, PI = Phosphatidylinositol, PE = Phosphatidylethanolamin, PS = Phosphatidylserin

Tab. 3

Jede Laufkammer wurde 30 Minuten lang mit dem Laufmittel (Chloroform : MeOH : Eisessig: Aqua dest. = 50 : 37,5 : 3,5 : 2 vol/ vol/ vol/ vol) äquilibriert. Nachdem die Dünnschichtplatte in die Kammer eingebracht wurde, folgte die Trennung der Phospholipide über eine Dauer von 20 Minuten. Die auf der Dünnschichtplatte separierten Phospholipide ließen sich gemäß der *Gustavsson*-Methode [111] selektiv mit Molybdän-blau-Farbstoff anfärben. Dafür war im Anschluss an die Trocknung ein zehn-sekundenlanges, vertikales Eintauchen der Dünnschichtplatte in eine mit Molybdän-blau-Reagenz gefüllte Kammer erforderlich. Zur Anfärbung der einzelnen Phospholipide war eine 15-minütige Lagerung der mit Färbereagenz bearbeiteten Dünnschichtplatte an einem dunklen Ort notwendig. Hiernach wurde ein eventueller Überschuss des Färbereagenzes durch ein 30 Sekunden dauerndes Schwenken der Dünnschichtplatte in Aqua destillata entfernt und bis zum endgültigen Eindringen der Feuchtigkeit erneut für 15-20 Minuten an einem dunklen Ort gelagert. Mittels eines Kaltluftföns konnte die Dünnschichtplatte nun getrocknet werden und unter Benutzung eines TLC-II-Scanners [Camag®] bei 700 nm für die Phospholipid-Analyse densitometriert werden. Unter Berücksichtigung der in sieben Konzentrationen aufgetragenen Standards erfolgte dann computergestützt die Quantifizierung der einzelnen Phospholipide. In Abhängigkeit der untersuchten Phospholipide zeigte sich eine unterschiedliche Varianz für diese Methode. Diese lag zwischen 0,745 % für PC, 1,16 % für PG und 7,34 % für LPC.

5.4.5. Analyse des Fettsäureprofils

Die Analyse des Fettsäureprofils des Phosphatidylcholins wurde mit einem Gaschromatographie-Verfahren durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Lipide mit den bereits erwähnten Methoden nach *Bligh&Dyer* [108] aus der BAL-Flüssigkeit extrahiert und entsprechend 5.4.4. getrennt. Das Phosphatidylcholin wurde dann mittels Primulinreagenz [Sigma, München; nach *Wright* [112]] nicht-destruktiv visualisiert, und die zugehörigen Gelabschnitte sowie die Leerabschnitte des Gels wurden nach Zugabe von 10 µg Pentadecan - Säure als internen Standard mit 10 ml CHCl₃/MeOH (2/1; v/v) eluiert. Die Fettsäuremethylester wurden durch eine säure-katalysierte Transmethylierung mittels 2N Salzsäure (HCl) bei 100 °C (12h) erzeugt. Die derart generierten Fettsäuremethylester wurden mittels Hexan extrahiert und unter einem Stickstoffstrahl getrocknet. Das entstandene getrocknete Produkt konnte zur weiteren Analyse mit jeweils 10µl CHCl₃ gelöst werden. Die gaschromatographische Trennung zur Ermittlung des Fettsäureprofils, unter Verwendung eines Carlo Erba Fractovap 2150® Gaschromatographen, wurde isokratisch bei 198 °C mit Helium als Trägergas (Flussrate: 1 ml/min.) und einer Kapillarsäule (CP-Sil 88, 50mm x

25mm, Chrompack, Frankfurt/Main) erreicht. Die einzelnen Fettsäuremethylester-Peaks konnten durch Vergleich der Ergebnisse mit den Retentionszeiten und Peakflächen bzw. Responsefaktoren kommerzieller Standards [Sigma, München] identifiziert und quantifiziert werden.

5.4.6. Analyse der molekularen Spezies des Phosphatidylcholins

Die Phospholipide wurden mittels Chloroform/Methanol-Extraktion nach *Bligh&Dyer* [108] isoliert. Anschließend wurde das Phosphatidylcholin (PC) mittels HPTLC (High-Performance Thin Layer Chromatography, mobile Phase: Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser 50/37,5/3,5/2 (v/v), stationäre Phase Kieselgel 60 (Merck, Darmstadt)) von anderen Phospholipiden separiert, mit Primulin (Sigma, München) [112] identifiziert und mit 10 ml Chloroform/Methanol 2/1 (v/v) vom Gel isoliert. Das PC wurde darauf in Anlehnung an bei *Rüstow et al.* [113, 114] beschriebene Verfahren mit Phospholipase C (*Bacillus Cereus*, grade 1, Boehringer Mannheim, 100 U/ μ mol PC, 37 °C, 12h), in seine Diradylglycerole (DRG) gespalten und diese mit 1-Naphthylisocyanat (NIC) und DABCO (Diazobicyclooktan, Katalysator) in die jeweiligen Naphthylurethane umgewandelt (Bedingungen: 80 °C für 30 min, molare Ratios: NIC/DRG 200/1; NIC/DABCO 250/1). Nach Abtrennung von Reaktionsnebenprodukten über RP-18-HPLC (Bedingungen: Stationäre Phase LiChrosorb 5 μ m, 125x4.6 mm i.d. (Merck), mobile Phase: Solvent A: Methanol, Solvent B: 80 % Methanol; 0-25 min. 60 % Solvent A, 25-45 min. 100 % Solvent A; T=60 °C, Flow = 1 ml/min., Detektion bei 279 nm) wurden die Naphthylurethane zwischen 28 - 40 min. gesammelt und mittels DC (Silica 60, mobile Phase Benzol:Hexan:Diethylether 52/48/3; vol/vol) in Phospholipidsubklassen (Diacyl, Alkyl-Acyl, Alkenyl-Acyl) separiert. Nach Identifikation unter UV-Licht über Autofluoreszenz wurden die molekularen Spezies mittels 10 ml Chloroform isoliert und durch RP-18-HPLC und Gradientenelution separiert (Bedingungen: Stationäre Phase: Superspher 4 μ m, 250x4.6 mm (Merck), Solvent A: Methanol, Solvent B: 80 % Methanol, linearer Gradient 40-20 % Solvent B in 120 min., T = 60 °C, 1 ml/min) und bei 279 nm photometrisch identifiziert und quantifiziert. Dieses System erlaubte die Separierung und Quantifizierung von über 20 individuellen molekularen Spezies.

5.4.7. Surfactant-Protein (SP)-A Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Das generelle ELISA-Prinzip stellt die Detektion einer Substanz mittels eines enzymgekoppelten Antikörpers dar. Dazu wird eine Probe (z.B. BAL-Überstand) mit einem spezifischen, an die gesuchte Substanz (z.B. SP-A) bindenden Antikörper inkubiert. Dieser

primäre Antikörper wird anschließend von einem sekundären erkannt und gebunden, der mit einem Enzym (z. B. Meerrettichperoxidase) gekoppelt ist. Nach Zugabe eines Farbreagenzes (z.B. ABTS) wird diese durch das indirekt an die gesuchte Substanz gekoppelte Enzym verändert. Die Intensität der Farbreaktion ist somit von der Konzentration der gesuchten Substanz im Stoffgemisch abhängig. Zur Bestimmung von SP-A wurde ein kompetitiver ELISA entwickelt. Hierzu wurde eine Maxisorp[®] Mikrotiterplatte über Nacht mit 100 µl der monoklonalen Antihuman-SP-A-Antikörpern in einer Konzentration von 1 µg/ml in Carbonatpuffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6) beschichtet und anschließend über eine Stunde mit 200 µl Blockpuffer (1 % BSA in PBS) bei 37 °C geblockt, danach dreimal mit Waschpuffer (PBS-Puffer mit 0,5 % Tween 20, pH 7,4) gewaschen. Alle Proben wurden mit 10 mM EDTA in PBS vier zu eins verdünnt und im Ultraschallbad eine Minute lang homogenisiert. Jeweils 100µl dieser BAL-Verdünnung wurde mit Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 14 % (25µl einer 20%igen Lösung in PBS) versetzt und 125µl PBS-Puffer sowie 250µl einer 1:15000 Verdünnung des Primärantikörpers (s.o.) zugegeben (Gesamtvolumen 500µl) und anschließend 60 min. bei 37 °C inkubiert. Standards definierter Konzentrationen wurden identisch behandelt. Anschließend wurden jeweils 200µl der Proben und Standards auf die Antikörper-beschichtete Microtiterplatte gegeben, 1h bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Mikrotiterplatte wurde danach eine Stunde bei Raumtemperatur mit 200 µl einer 1:1000 Verdünnung des Zweitantikörpers (biotinyierter Rabbit-Anti-Maus-Antikörper) in Blockpuffer inkubiert und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Reaktion mit AB-Komplex (200 µl einer Lösung von sechs Tropfen AB-Komplex Stocklösung in 40ml Blockpuffer). Die Farbreaktion wurde nach erneutem dreimaligem Waschen (Waschpuffer) mit 100 µl ABTS-Lösung (20 mg ABTS und 10 µl H₂O₂ (30 %) in 30 ml H₂O) erzeugt, und die Extinktion bei $\lambda = 450$ nm nach einer Stunde mittels ELISA-Photometer gemessen.

5.4.8. Surfactant-Protein (SP)-B ELISA

Als Trägermaterial für den ELISA wurden Mikrotiterplatten mit 96 Nöpfchen aus Polystyrol (Polysorp[®] F96 mit Zertifikat, Nunc, Wiesbaden) verwendet. Der Standard (humanes, dimeres SP-B) wurde über eine LH60-Chromatographie isoliert und die Proteinkonzentration nach *Bradford* bestimmt. Die Reinheit der Präparation wurde über Gelelektrophorese und Western-Blot untersucht und betrug >95 %. Die für SP-B beschriebene reduzierte Anfärbbarkeit mit hydrophoben Farbstoffen bedingte bei dem *Bradford*-Test zu

niedrige Werte und wurde durch Division mit einem empirischen Faktor von 0,66 ausgeglichen.

Die zu messenden Proben (bronchoalveoläre Lavagen, BAL) wurden mit 1-Propanol und PBS auf ein Mischungsverhältnis 1-Propanol/PBS von 50/50 (v/v) eingestellt. Üblicherweise wurden 20 µl BAL in einem Gesamtvolumen von 100 µl in die Näpfchen pipettiert. Angereichertes Surfactant-Material (z. B. über eine 48000 x g-Zentrifugation) wurde mit 1-Propanol/PBS (50/50 (v/v)) auf eine Phospholipidkonzentration von 1 µg PL/Näpfchen verdünnt. SP-B-Standards wurden ebenfalls mit 1-Propanol/PBS 50/50 (v/v) seriell in Konzentrationen von 40 ng/Näpfchen bis 312,5 pg/Näpfchen verdünnt. Auf jeder Platte wurde ein interner Standard (BAL mit definierter SP-B-Konzentration) mitgeführt. Alle Proben und Standards wurden als Doppelbestimmung eingesetzt. Alle Verdünnungen erfolgten in 2 ml Reaktionsgefäßen aus Polypropylen (Eppendorf, Hamburg).

Nach dem Pipettieren der Proben und Standards wurden die Mikrotiterplatten im Trockenschrank bei 37 °C 6h bis zur Trocknung inkubiert. Die durch Inhomogenitäten der biologischen Proben bedingte variable Adsorption des SP-B an die Plattenoberfläche wurde durch Wiederaufnahmen in 100 µl Trifluorethanol minimiert. Nach einem weiteren Trocknungsschritt (37°C, 6 h) wurden die in ca. 50-fachem Überschuss zu SP-B vorliegenden Phospholipide durch zwei aufeinander folgende Waschschriffe selektiv entfernt. Im ersten Schritt erfolgte Zugabe von 200 µl Diisopropylether/1-Butanol 3/2 (v/v) und Inkubation unter Schütteln (15 min.) bei Raumtemperatur. Nach dem Dekantieren der Solventien wurde nochmals mit 200 µl Diisopropylether/1-Butanol 3/2 (v/v) gewaschen und sofort dekantiert. Darauf wurden die Platten mit 200 µl 50mM Tris/Cl pH 7,6/0,5 % Tween 20 dreimal gewaschen.

Zum Blockieren überschüssiger Bindungsstellen wurde 2h mit 50 mM Tris/Cl pH 7,6/1 % Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit 50 mM Tris/Cl pH 7,6/0,5% Tween 20 erfolgte der Auftrag des SP-B-Antikörpers (8A5E, monoklonaler Antikörper (Maus) gegen porcines SP-B). Dazu wurde eine Antikörper-Stammlösung (1 mg/ml) in 50 mM Tris/Cl pH 7,6/1 % BSA mit 50 mM Tris/Cl pH 7,6/1 % BSA 1/200 (v/v) verdünnt, 200 µl dieser Lösung pro Näpfchen pipettiert und 12h bei Zimmertemperatur inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit 50 mM Tris/Cl pH 7,6 /0,5 % Tween (200 µl) wurden 200 µl einer 1:1000-Verdünnung von biotinyliertem Anti-Maus-Antikörper (Schaf) (Amersham-Buchler, Braunschweig) in 50 mM Tris/Cl pH 7,6 /1 % BSA aufgetragen und 120 min. bei

Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem Antikörper wurde dreimal gewaschen.

Anschließend erfolgte eine Verstärkung der Empfindlichkeit des Tests mit der Avidin/Biotin-Peroxidase-Technik (AB-Komplex, Dako, Hamburg). Dazu wurden ein Tropfen Avidinlösung und ein Tropfen biotinylierte Meerrettich-Peroxidaselösung in 5 ml PBS gegeben und 30 min lang äquiliert. 200 µl einer Verdünnung aus einem Tropfen dieser Stammlösung mit 5 ml 50 mM Tris/Cl pH 7,6 / 1 % BSA wurden 120 min auf den Platten inkubiert, anschließend wurde wieder dreimal gewaschen.

Die enzymatische Farbentwicklung wurde durch Zugabe von 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat(6)] als Substrat eingeleitet. Dazu wurden 20 mg ABTS und 10 µl 30 % H₂O₂ in 30 ml Substratpuffer (60 mM Natriumacetat-Trihydrat, 50 mM Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat pH 4,2) gelöst und 200 µl dieser Lösung in die Nöpfchen pipettiert. Nach der Farbentwicklung (60 min. RT oder über Nacht bei +4 °C) erfolgte die spektralphotometrische Auswertung bei 405 oder 450 nm in einem ELISA-Photometer (Reader 400 V. 1.1, SLT, Crailsheim). Die Standardkurven wurden durch rechnergestützte Cubic-Spline-Interpolation gewonnen.

5.4.9. Surfactant-Protein (SP)-C ELISA

Die Proben wurden 1:5 (v/v), der SP-C-Standard (humanes SP-C) seriell bis 3,125 ng/ml in Lösungsmischung (2-Propanol : H₂O = 80:20 (v/v), pH 3,5) verdünnt. Davon wurden jeweils 100 µl in die Microtiterplatten pipettiert und bei 37 °C über Nacht getrocknet. Hiernach wurden 100 µl Trifluorethanol pro Nöpfchen hinzugegeben und, um das SP-C optimal an die Oberfläche der Platte zu binden, bei 37 °C über drei Stunden getrocknet. Daraufhin wurden die Phospholipide selektiv mit Methanol ausgewaschen. 200 µl Methanol wurde pro Nöpfchen hinzugegeben und die Platte 20 min. lang vorsichtig bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und die Platte nochmals kurz mit Methanol, und dann dreimal mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,46) gewaschen. Anschließend wurde mit 200 µl Blockpuffer (50 mM Tris/HCl, 1 % BSA (w/v), pH 7,6) pro Nöpfchen bei Raumtemperatur für zwei Stunden geblockt und dann wiederum dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Der polyklonale SP-C-Antikörper (Kaninchen anti Mensch), der 1:2000 in Blockpuffer verdünnt worden war, wurde dann in einer Menge von jeweils 200 µl zugesetzt und konnte über 12 bis 15 Stunden mit dem SP-C auf der Platte reagieren. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 200 µl einer 1:1000-Lösung eines Anti-Kaninchen-Antikörpers (biotin) in Blockpuffer zwei Stunden lang inkubiert.

Wiederum folgte das bereits erwähnte dreimalige Waschen. Hiernach wurden 200 µl des AB-Komplexes, der 1:200 in Blockpuffer verdünnt worden war, für zwei Stunden hinzugegeben. Auf dreimaliges Waschen folgte dann die Farbreaktion mit 200 µl ABTS-Lösung (20 mg ABTS und 10 µl H₂O₂ (30 %) in 30 ml Substratpuffer (s.o.)), die nach einer Nacht bei 4 °C bei $\lambda = 450$ nm am nächsten Tag abgelesen wurde [77].

5.4.10. Surfactant-Protein (SP)-D ELISA

Das SP-D wurde mittels eines Sandwich-ELISAs mit zwei monoklonalen Antikörpern (IE11, V1 F11-Biotin, BMA, Heidelberg) quantifiziert. Die verwendeten Maxisorp[®] Platten wurden bei 4 °C über Nacht mit 1 µg/ml des IE11 Antikörpers beschichtet, der eine Kreuzreaktion mit humanem SP-D aufweist (gelöst in 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6). Die Platten wurden mit Waschpuffer gewaschen und mit 200 µl Blockpuffer pro Näpfchen bei 37 °C für eine Stunde geblockt. Nach drei Waschvorgängen mit Waschpuffer (Tris-NaCl-Lösung, 5 mM CaCl₂, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4) wurden die Proben eins zu fünf in Blockpuffer verdünnt und 100 µl davon bei 37 °C eine Stunde lang inkubiert, dann nochmals mit Waschpuffer dreimal gewaschen. Die Detektion des gebundenen SP-D erfolgte bei 37 °C über 30 Minuten mit einem weiteren monoklonalen, mit humanem SP-D kreuzreagierenden SP-D-Antikörper (VI11-Biotin, 100 µl Lösung pro Näpfchen, 1 µg/ml). Erneut folgten drei Waschvorgänge mit Waschpuffer. Anschließend erfolgte die Umsetzung mit AB-Komplex (100 µl/Näpfchen, 1h bei 37 °C, siehe SP-A-ELISA). Die Farbreaktion wurde mit 200 µl ABTS-Lösung (siehe SP-A-ELISA) erzeugt und bei $\lambda = 405$ nm nach einer Stunde im ELISA-Reader gemessen.

5.5. Biophysikalische Charakterisierung des Surfactants

Der biophysikalischen Analyse des Surfactants ging eine Isolierung der Präkursorfraktion des alveolären Oberflächenfilms, der sogenannten „*Large Surfactant Aggregates*“ (LSA) voraus. Hierzu wurde die BAL-Flüssigkeit einer Ultrazentrifugation (1h, 48000 x g, 4 °C) unterworfen und das resultierende LSA-Pellet durch erneute Phospholipid-Bestimmung auf einen Phospholipidgehalt von 2 mg/ml eingestellt. Hierdurch konnte auch der prozentuale Anteil der LSA-Fraktion an den Gesamt-Phospholipiden in der BAL ermittelt werden.

Die Oberflächenspannungsmessungen der solcherart isolierten LSA erfolgte mit dem von *Enhoring* 1977 erstmals beschriebenen „*Pulsating Bubble Surfactometer*“ [115]. Hierbei steht eine Surfactant-Probe in einer Messzelle über eine Kapillare mit der Raumluft in

Verbindung. Es wird eine Luftblase über diese Kapillare angesogen und auf einen vorgegebenen Radius mittels Okular justiert. Nach dem *Laplace*'schen Gesetz kann die bestehende Oberflächenspannung (γ , [mN/m]) an der Grenzfläche zwischen der wässrigen Lösung und der luftgefüllten Blase aus dem gemessenen Druck in Wassersäule und unter Berücksichtigung der vorgegebenen Blasenradien berechnet werden. Wichtige Voraussetzung für eine korrekte Messung ist die kontinuierliche, visuelle Kontrolle des Luftblasenradius in dieser modellhaften Alveole und eine Anpassung des Blasenradius. Es wurden zwei Parameter erfasst: Nach schlagartigem Anstellen der Blase auf den minimalen Blasenradius wurde nach 12 sec. der Equilibrium-Oberflächenspannungswert nach Adsorption (γ_{ads}) gemessen. Weiterhin wurde nach Pulsation der Blase für 5 min mit einer Frequenz von 20x/min der minimale Oberflächenspannungswert (γ_{min}) ermittelt.

5.6. Statistik

Alle klinischen Daten sind für jedes Kollektiv als Mittelwerte \pm Standardabweichung der Mittelwerte angegeben. Alle Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Sofern ein signifikanter Unterschied bestimmt werden konnte, ist dies angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem nonparametrischen Test für verbundene Proben (*Wilcoxon*-Test). Das Signifikanzniveau (p) wurde in den graphischen Darstellungen wie folgt gekennzeichnet: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). Bei Korrelationen zwischen klinischen Parametern und den Resultaten aus der biochemischen Analytik wurde der *Pearson*'sche Korrelationskoeffizient r angegeben.

6. Ergebnisse

6.1. Basisdaten des Studienkollektives: Oxygenierungsindex, Proteingehalt

In die Studie wurden 46 Patienten (34 männlich/12 weiblich) mit einem mittleren Lebensalter von 48 ± 16 Jahren, einer mittleren Körpergröße von 175 ± 8 cm und einem mittlerem Körpergewicht von $81,7 \pm 15$ kg eingeschlossen. Der Apache-II-Score betrug 3h vor Applikation für alle Patienten $14,8 \pm 5,8$ Punkte. Für die Therapiearme ergab sich ein Apache-II-Mittelwert in der Gruppe „Standard“ von $16,5 \pm 7,4$ Punkten, in der „Low-dose“-Gruppe von $13,3 \pm 5,2$ Punkten und in der Gruppe „High-dose“ von $14,7 \pm 4,9$ Punkten. Die Zeit zwischen Diagnosestellung und Randomisierung betrug im Mittel $42,5 \pm 36,8$ Stunden. Für die beatmungsfreien Tage ergab sich bis zum Tag 28 unter der *Standard*-Therapie ein Mittelwert von $3,4 \pm 6,9$ Tagen, für den *Low-dose*-Therapiearm ein Mittelwert von $11,0 \pm 10,3$ Tagen und für den *High-dose*-Therapiearm ein Mittelwert von $3,1 \pm 6,7$ Tagen. Am Tag 28 des Beobachtungszeitraumes lebten 29 der 46 Patienten. Es verstarben in der *Standard*-Therapiegruppe 38 % der Patienten im Beobachtungszeitraum und im *Low-dose*-Therapiearm 28,6 %, während im *High-dose*-Therapiearm 60 % der Patienten am Tag 28 nicht mehr lebten.

Die Mittelwerte des Oxygenierungsindex ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) zeigten sich im Verlauf bezüglich der drei Therapiearme sehr different (Abb. 2). Die drei beobachteten Kollektive wiesen bei Diagnosestellung kaum unterschiedliche $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Quotienten (*Standard*-Therapiearm 123 ± 34 mmHg, *Low-dose*-Therapiearm 122 ± 29 mmHg, *High-dose*-Therapiearm 120 ± 48 mmHg) auf. Für die *High-dose*-Patienten zeigte sich in der ersten Stunde eine Erhöhung des Oxygenierungsindex von 11,8 %, wobei in den nächsten drei Stunden niedrigere Mittelwerte mit einem Minimum von 119 mmHg bei „4h“ bestimmt wurde. Im *Low-dose*-Therapiearm konnte eine Verbesserung der Mittelwerte innerhalb der ersten vier Stunden (hauptsächlich 2h nach Gabe beginnend) von fast 43 % festgestellt werden. Während diese Mittelwerte für den *Low-dose*-Therapiearm zwischen dem dritten und vierten Tag nach Applikation Werte von > 200 mmHg einnahmen und diese beibehielt, stieg der $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ für die *Standard*-Behandlung erst am zehnten Tag auf einen Mittelwert von 200 mmHg und zeigte sich nach einer erneuten Depression am elften Tag, ab dem zwölften Tag ebenfalls mit Mittelwerten von > 200 mmHg. Für die *High-dose*-Therapie wurde in den ersten vierzehn Tagen nach Surfactant-Applikation kein Mittelwert ≥ 200 mmHg beobachtet. Es zeigte sich ab dem achten Tag, dass ein deutlicher Einbruch der Mittelwert des Oxygenierungsindex im Therapiearm „High-dose“ beobachtet werden konnte, wobei sich vom achten bis zum

vierzehnten Tag nach Applikation nur Mittelwerte von 135-165 mmHg messen ließen.

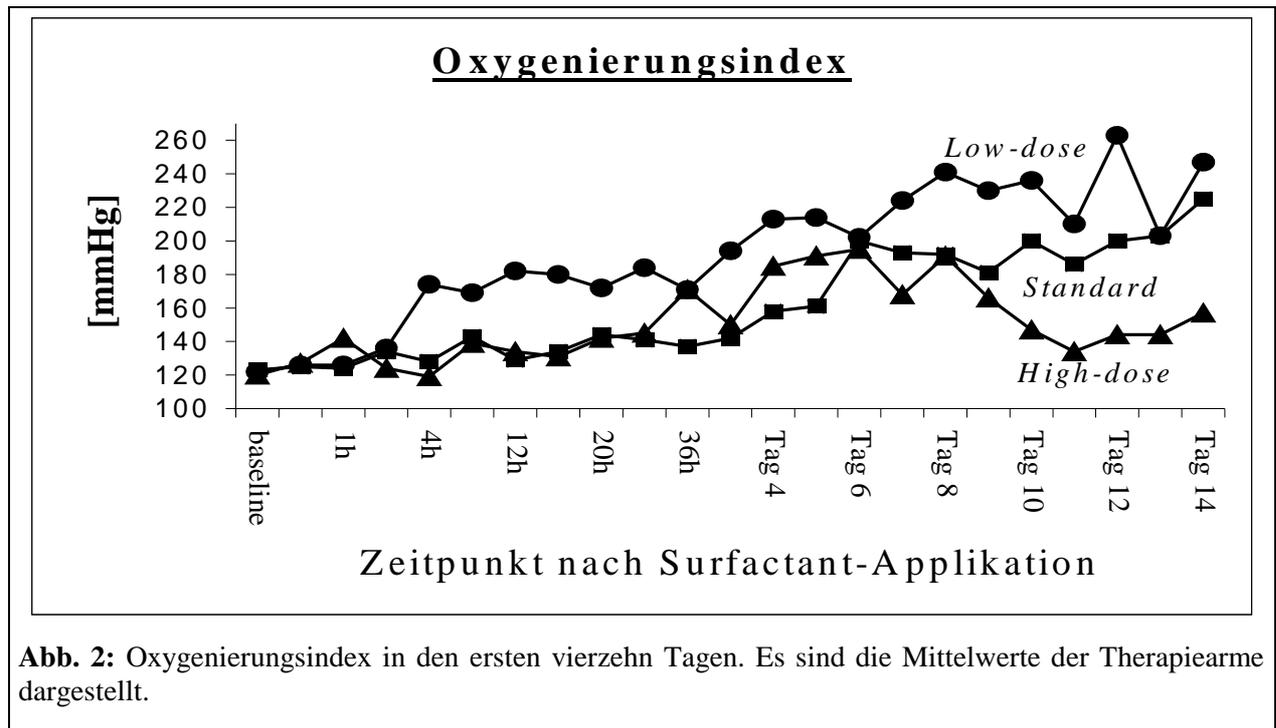


Abb. 2: Oxygenierungsindex in den ersten vierzehn Tagen. Es sind die Mittelwerte der Therapiearme dargestellt.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe, die an 15 gesunden Probanden erhoben wurde, zeigte sich bei bestehendem ARDS eine erwartete Erhöhung des Gesamtproteingehaltes in der BAL um etwa das 20-Fache der Kontrolle ($73 \pm 14 \mu\text{g/ml}$). Während sich bei der *Standard*-Therapie nach 120h eine signifikante Senkung des Proteingehaltes fand, konnte bei der *Low-dose*-Therapie eine hochsignifikante ($p < 0,01$) Reduktion des Gesamtproteinwertes in der BAL-Flüssigkeit im Vergleich zum Ausgangswert ($t = -3\text{h}$) festgestellt werden (Tab. 4).

MW \pm SE		<i>Standard</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>
Gesamt-Protein BAL Kontrolle (n=15) 73 ± 14 [$\mu\text{g/ml}$]	3 h vor Gabe	1439,5 \pm 679,82	1109,6 \pm 235,7	1176,8 \pm 424,9
	n	15	18	13
	nach 48 h	838,9 \pm 211,6	980,1 \pm 270,2	684,1 \pm 199,8
	n	12	16	12
	nach 120 h	534,7 \pm 141,4	458,5 \pm 107,0	427,2 \pm 97,43
	n	10	14	7

Tab. 4: Gesamtproteingehalt der bronchoalveolären Lavagen. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Das Signifikanzniveau p findet sich in der Tabelle wie folgt wieder: * ($p < 0,05$) oder ** ($p < 0,01$)

6.2. Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen

6.2.1. Phospholipid-Gehalt in der BAL

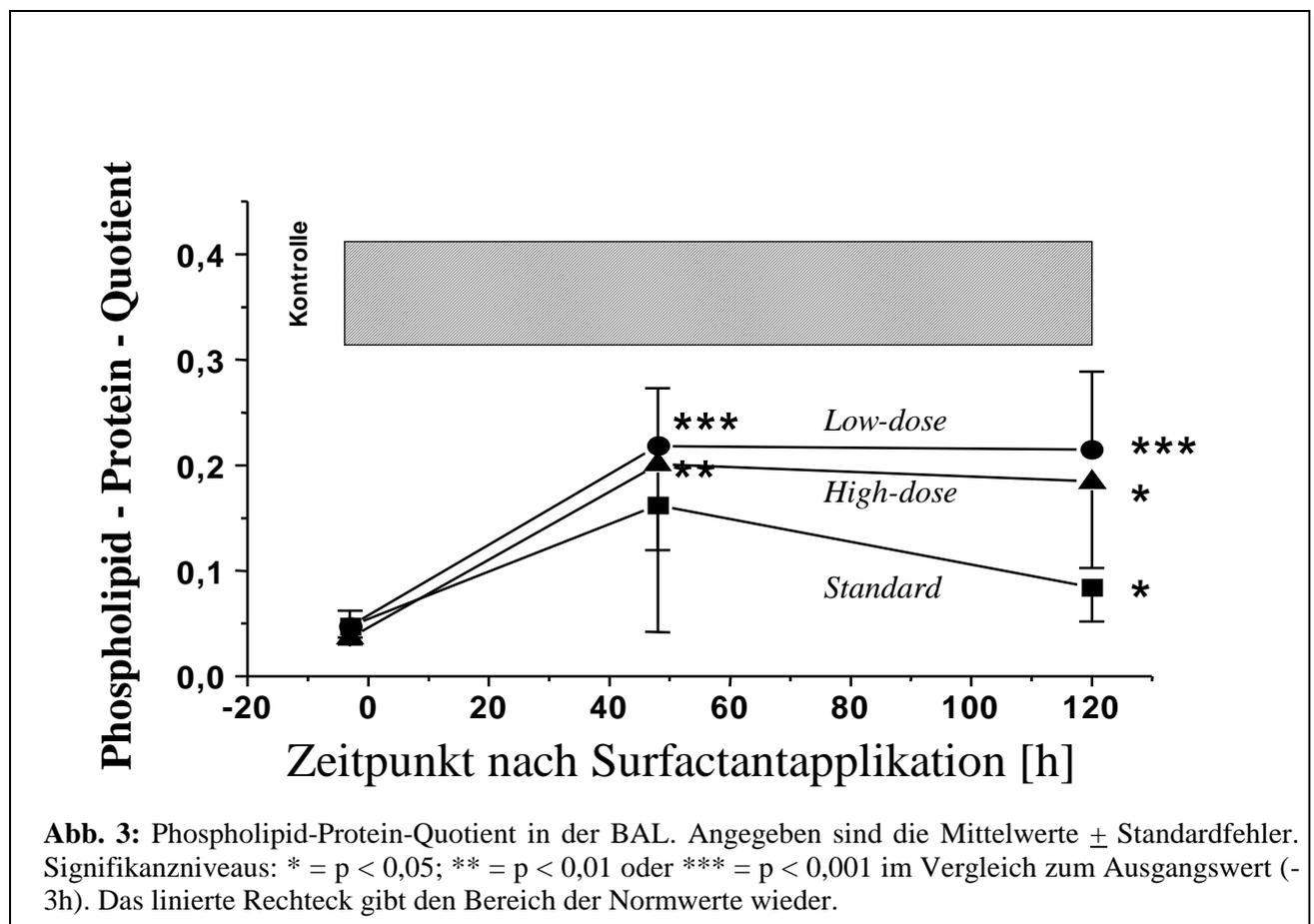
Der Vergleich der drei Therapiearme spiegelte eine unterschiedliche Beeinflussung des Gesamphospholipidgehaltes wider. Die Gesamphospholipide verringerten sich bei der *Standard*-Therapie stetig. Unter der *High-dose*-Therapie kam es zu einen hochsignifikanten Anstieg dieses Parameters nach 48h im Vergleich zu Ausgangswert (t = -3h). Eine drastische (p<0,001) Steigerung des Gesamphospholipidgehaltes konnte bei der *Low-dose*-Therapie 48h nach Administration gemessen werden, wobei diese Steigerung als weiterhin signifikant nach 120h (Tab. 5) bestand.

MW ± SE		<i>Standard</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>
Gesamt- Phospholipide Kontrolle (n=17) 30 ± 5,0 [µg/ml]	3h vor Gabe	38,0 ± 13,9	37,7 ± 7,6	23,4 ± 6,5
	n	15	18	13
	nach 48h	34,8 ± 8,0	168,2 ± 39,5	109,4 ± 30,7
	n	12	16	12
	nach 120h	21,3 ± 5,0	106,6 ± 48,4	43,1 ± 15,5
	n	10	14	7

Tab. 5: Gesamphospholipidgehalt der bronchoalveolären Lavagen. Alle Werte sind dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler. Signifikanzniveau p: * (p < 0,05), ** (p < 0,01) oder *** (p < 0,001)

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

Der Phospholipid-Protein-Quotient war im Vergleich zur gesunden Kontrolle bei allen Gruppen signifikant zum Zeitpunkt -3h erniedrigt, stieg aber in allen untersuchten Therapieformen 48h und 120h nach Administration signifikant an. Bei der *High-dose*-Therapie konnte eine hochsignifikante Anhebung des PPQ 48h nach Applikation, mit signifikanter Erhöhung auch nach 120h, im Vergleich zum Ausgangswert (t = -3h) festgestellt werden. Die *Low-dose*-Therapie zeigte eine drastische (p<0,001) und bleibende Verbesserung des PPQ im Rahmen der nach 48 und 120h durchgeführten BAL's (siehe Abb. 3).



6.2.3. Phospholipid-Profil

Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe konnten 3h vor Surfactant-Gabe leicht reduzierte Werte des prozentualen Anteils des Phosphatidylcholins an den Gesamt-Phospholipiden sowie eine sehr deutliche Verminderung der Werte für Phosphatidylglycerol gemessen werden. Die prozentualen Werte der Phosphatidylinositol-, Phosphatidylethanolamin-, Phosphatidylserin- und Sphingomyelin-Subfraktion wiesen bei manifestem ARDS eine deutliche Erhöhung des prozentualen Anteils im Gegensatz zu den Normalpatienten auf. Innerhalb der Phospholipid-Klassen fand sich ein leichter Anstieg an Phosphatidylcholin im Vergleich zum Ausgangswert (3h vor Gabe) bei allen drei Therapiearmen (Tab. 6) und ein hochsignifikanter Anstieg an Phosphatidylglycerol nach 48h in den beiden Surfactant-Therapiegruppen (Abb. 4). Die nach 120h festgestellte Erhöhung des prozentualen Anteils des Phosphatidylglycerols blieb in der *High-dose*-Therapiegruppe weiterhin als hochsignifikant bestehen, während sich dieser Parameter in der *Low-dose*-Therapiegruppe als signifikant erwies. Der relative Anteil der anderen Phospholipid-Subklassen verringerte sich, verglichen mit dem 3h-Ausgangswert, gleichzeitig in allen Therapiearmen leicht (Tab. 6).

[%] / MW \pm SE		<i>Standard</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>
PC Kontrolle (n=17) 83,1 \pm 0,9	3 h vor Gabe	75,42 \pm 5,71	73,35 \pm 4,49	69,35 \pm 4,18
	n	8	9	8
	nach 48h	78,04 \pm 3,63	78,90 \pm 2,56	77,05 \pm 2,90
	n	5	8	7
	nach 120h	84,39 \pm 2,14	76,38 \pm 2,86	80,41 \pm 5,45
n	4	6	2	
PI Kontrolle (n=17) 3,2 \pm 0,2	3h vor Gabe	5,22 \pm 1,02	4,61 \pm 0,45	5,16 \pm 0,99
	n	8	9	8
	nach 48h	4,98 \pm 1,16	1,91 \pm 0,33	1,35 \pm 0,37
	n	5	8	7
	nach 120h	3,26 \pm 0,83	3,71 \pm 0,57	1,99 \pm 1,99
n	4	6	2	
PE Kontrolle (n=17) 1,7 \pm 0,2	3h vor Gabe	5,16 \pm 1,67	6,03 \pm 1,39	6,15 \pm 1,51
	n	8	9	8
	nach 48h	2,86 \pm 0,87	1,47 \pm 0,36	1,06 \pm 0,51
	n	5	8	7
	nach 120h	3,57 \pm 0,93	2,59 \pm 0,95	2,10 \pm 0,99
n	4	6	2	
PS Kontrolle (n=17) 1,2 \pm 0,3	3h vor Gabe	6,83 \pm 4,21	7,96 \pm 2,99	9,81 \pm 2,04
	n	8	9	8
	nach 48h	5,47 \pm 2,71	2,00 \pm 0,66	1,00 \pm 0,55
	n	5	8	7
	nach 120h	2,63 \pm 1,09	3,67 \pm 1,82	1,77 \pm 1,77
n	4	6	2	
SPH Kontrolle (n=17) 0,8 \pm 0,2	3h vor Gabe	4,14 \pm 0,67	4,49 \pm 0,84	5,83 \pm 1,06
	n	8	9	8
	nach 48h	3,83 \pm 1,32	2,22 \pm 0,72	1,70 \pm 0,27
	n	5	8	7
	nach 120h	2,93 \pm 0,76	3,20 \pm 0,83	3,72 \pm 2,76
n	4	6	2	

Tab. 6: Phospholipidprofil. Die Phospholipid-Klassen sind als prozentualer Anteil der Gesamtpospholipide (%PL) dargestellt. Alle Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler. Signifikanzniveau p: * (p < 0,05), ** (p < 0,01) im Vergleich zum Ausgangswert (t = -3h)

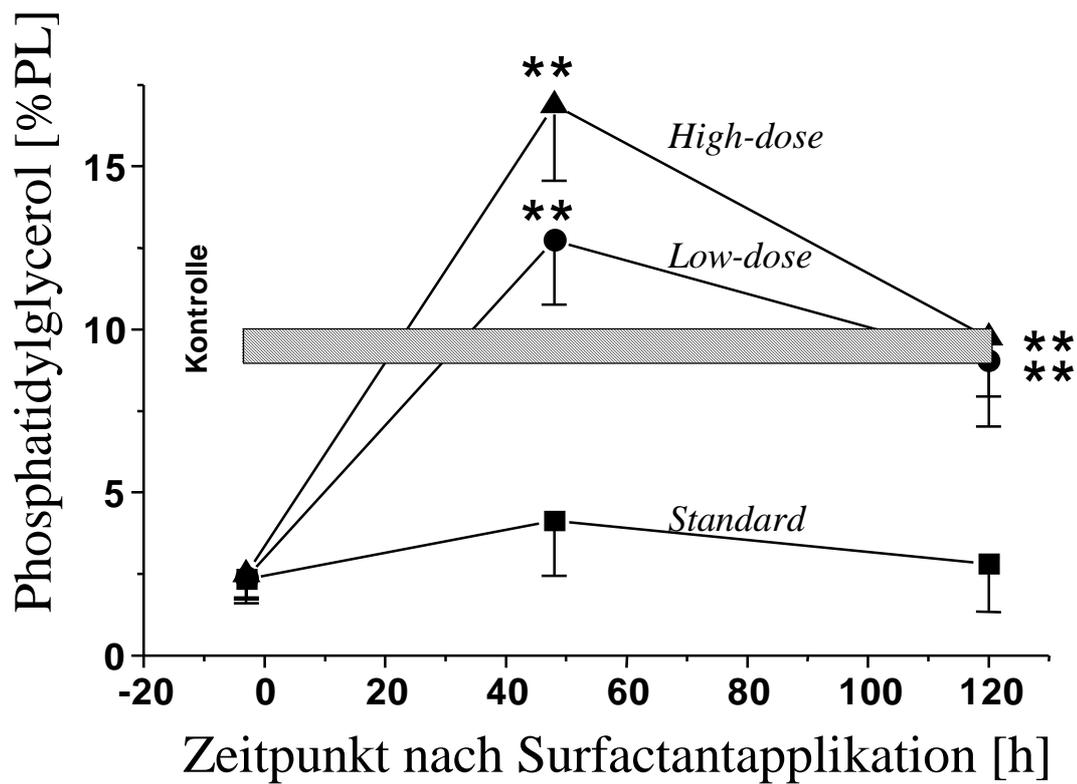


Abb. 4: Relativer Gehalt des Phosphatidylglycerols an den Gesamt-Phospholipiden in der BAL. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. **= $p < 0,01$ im Vergleich zum Ausgangswert ($t = -3h$). Liniertes Rechteck: Normwerte

6.2.4. Surfactant-Protein-Gehalt in der BAL

Der Proteingehalt in der BAL war zum Zeitpunkt $t = -3h$, verglichen mit den gesunden Kontrollen, für alle vier Surfactant-Proteine (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D) erniedrigt. Während sich die Konzentrationen der Surfactant-Proteine SP-A, SP-B und SP-D (Tab. 7, Abb. 5) in der BAL nur wenig veränderten, war ein hochsignifikanter Anstieg an SP-C 48h nach Applikation sowohl in der *Low*- als auch in der *High-dose*-Therapiegruppe feststellbar (Abb. 6). 120h nach Gabe konnte in diesen beiden Therapiearmen noch der doppelte Ausgangswert gemessen werden. Unter der *Standard*-Behandlung zeigte sich lediglich eine ungefähr 20%ige Steigerung des Ausgangswertes nach 120h.

MW \pm SE		<i>Standard</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>
SP-A Kontrolle (n=20) 1533 \pm 175 [ng/ml]	3h vor Gabe	526,1 \pm 173,2	663,5 \pm 268,7	254,0 \pm 43,7
	n	7	7	8
	nach 48h	809,6 \pm 243,9	730,5 \pm 259,1	519,2 \pm 165,5
	n	6	5	8
	nach 120h	769,3 \pm 226,1	593,9 \pm 179,0	295,2 \pm 168,6
	n	5	6	3
SP-D Kontrolle (n=20) 6,19 \pm 2,14 [ng/ml]	3 h vor Gabe	3,48 \pm 2,02	6,46 \pm 11	3,04 \pm 2,79
	n	13	12	13
	nach 48h	5,28 \pm 6,35	4,33 \pm 4,11	2,32 \pm 2,85
	n	10	11	12
	nach 120h	3,68 \pm 2,12	1,89 \pm 1,37	1,61 \pm 1,45
	n	8	10	7

Tab. 7: Konzentrationen der hydrophilen Surfactant-Proteine SP-A und D in der bronchoalveolären Lavage. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler im Vergleich zum Ausgangswert ($t = -3h$) dargestellt

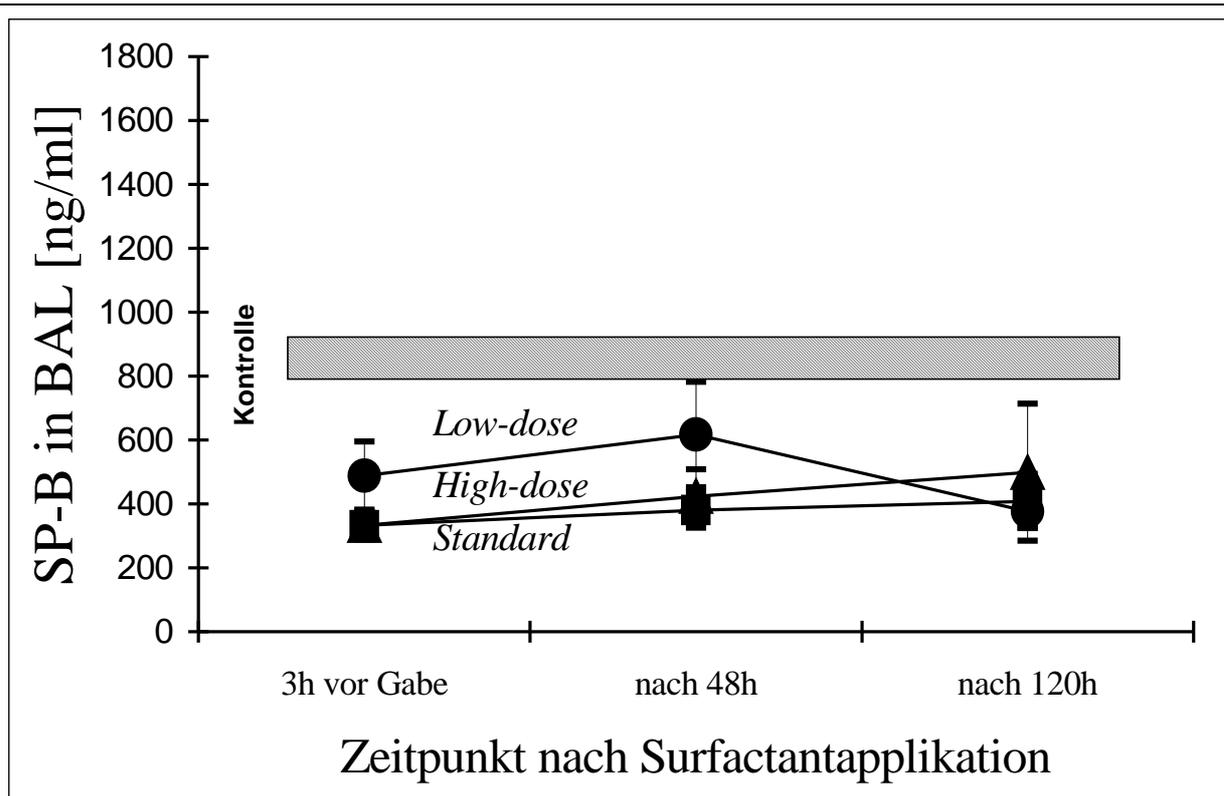


Abb. 5: SP-B-Gehalt in den Lavagen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler

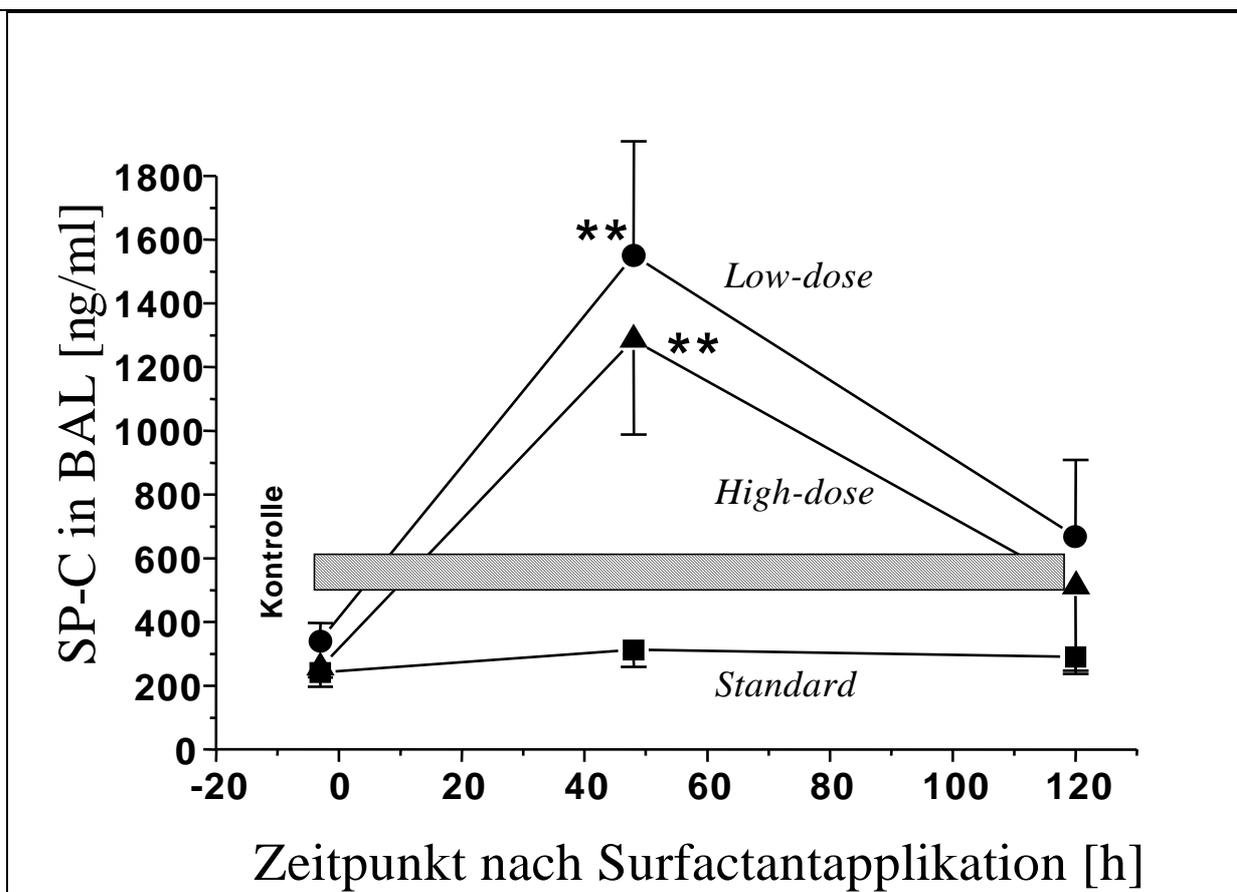


Abb. 6: SP-C-Gehalt in den Lavagen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. ** = $p < 0,01$. Liniertes Rechteck: Normwerte

6.2.5. „Large Surfactant Aggregates“ (LSA)

Wie bereits erwähnt, stellen die LSA, die durch 48.000 x g Ultrazentrifugation im Pellet gewonnen wurden, die Surfactant-Anteile mit der höchsten Oberflächenaktivität dar. Im Vergleich zur gesunden Kontrolle waren die LSA-Werte bei den ARDS-Patienten zum Zeitpunkt $t = -3h$ deutlich vermindert. In Bezug auf den relativen Anteil der LSA an den Gesamtphospholipiden [% PL] konnte in der *Low-dose*-Therapiegruppe eine hochsignifikante Anhebung dieses Parameters auf annähernd physiologische Werte gemessen werden (Abb. 7). Eine statistische Analyse dieses Parameters in der *High-dose*-Therapie ist aufgrund niedriger Fallzahlen als nicht aussagekräftig zu werten. Bei der graphischen Darstellung findet dieser Umstand als ungefüllte Markierung der *High-dose*-Therapiewerte seine Beachtung (siehe Abb. 7).

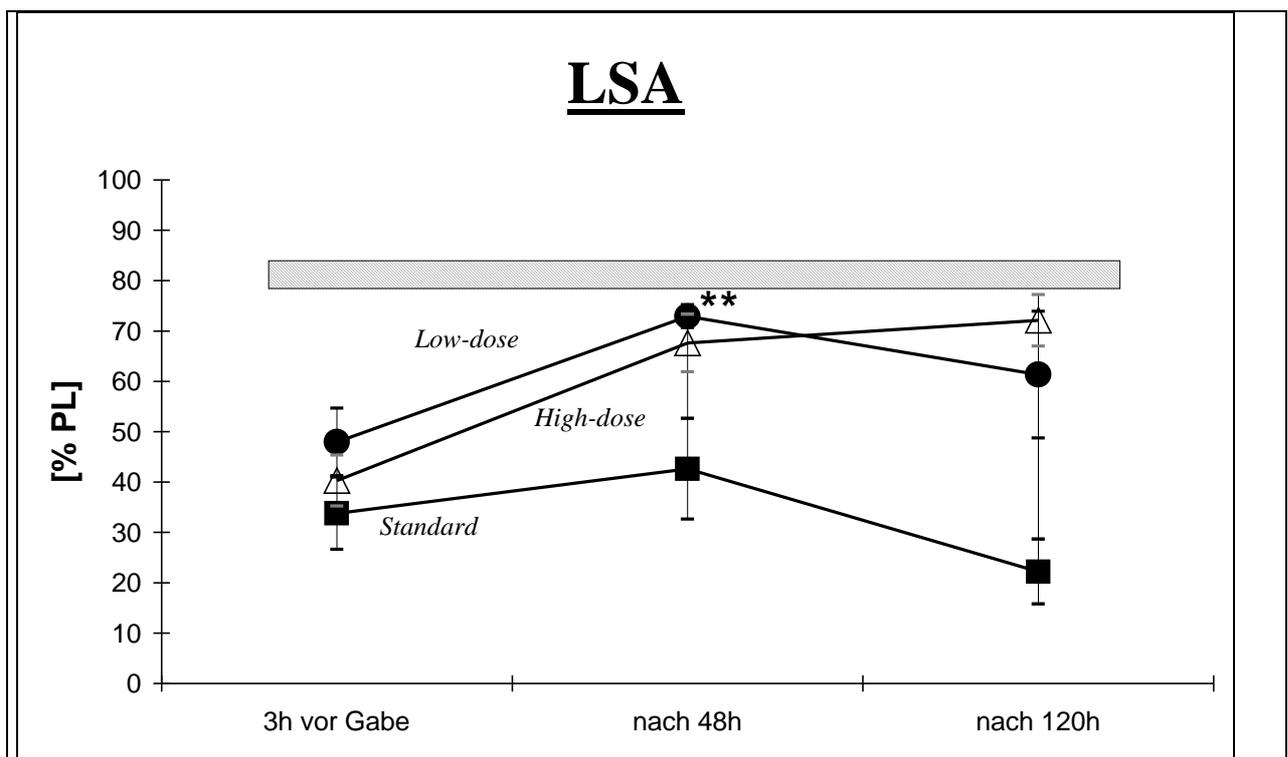


Abb. 7: Relativer Anteil der „Large Surfactant Aggregates“ (LSA) an den Gesamtphospholipiden [% PL] der Therapiearme. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Signifikanzniveau: ** entspricht $p < 0,01$. Liniertes Rechteck: Normwerte

6.2.6. Verteilung der molekularen Spezies des Phosphatidylcholins

Eine aussagekräftige statistische Analyse der Verteilung der Phosphatidylcholin-Fettsäuren sowie der Verteilung der molekularen Spezies aus Phosphatidylcholin konnte aufgrund der kleinen Fallzahlen bedingt durch die Limitiertheit des Probenmaterials nicht vorgenommen werden. Von der Tendenz her ließ sich für die 16:0-Fettsäure (Palmitinsäure) unter der *Standard*-Therapie keine wesentliche Veränderung im Vergleich zum Ausgangswert ($t = -3h$) feststellen, wobei sich in den beiden Surfactant-Therapiegruppen jeweils eine prozentuale Erhöhung dieser Fettsäure abzeichnete (Tab. 8). Ein tendenziell leichter Anstieg hinsichtlich der 18:1-Fettsäure zeigte sich für den *Standard*-Therapiearm, während sich sowohl in der *Low*- als auch in der *High-dose*-Therapiegruppe als Trend eine Reduktion der 18:1-Fettsäure (Ölsäure) feststellen ließ (Tab. 8). Tendenziell ließ sich eine Senkung des relativen Wertes der 18:2-Fettsäure (Linolsäure) für alle drei Therapiearme beobachten (Tab.8). Für die Verteilung der molekularen Spezies aus Phosphatidylcholin ließ sich ein ähnlicher Trend bezüglich der *Standard*-Therapiegruppe und den beiden anderen Therapiegruppen für die 16:0/16:0-Spezies, die 16:0/18:1-Spezies und die 16:0/18:2-Spezies erkennen (Tab. 9). Unter der *Standard*-Therapie fand sich tendenziell keine wesentliche Veränderung der 16:0/16:0-Spezies, wobei hingegen in den beiden anderen Therapiearmen eine prozentuale Erhöhungstendenz dieser für die Senkung der alveolären Oberflächenspannung eminent wichtigen Spezies (Tab. 9) zum Vorschein kam. Bei nahezu konstanten prozentualen Werten des *Standard*-Therapiearmes für die 16:0/18:1-Spezies zeigte sich im *Low*- und *High-dose*-Therapiearm eine Tendenz zur Verkleinerung dieser Werte (Tab. 9). Letztlich konnte eine Reduktionstendenz der prozentualen Werte der 16:0/18:2-Spezies für die beiden Surfactant-Therapiearme und eine Tendenz zur Steigerung dieser Spezies aus Phosphatidylcholin unter der *Standard*-Therapiegruppe verzeichnet werden (Tab. 9).

MW \pm SE		<i>Standard</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>
16:0 Kontrolle (n=12) 72,31 \pm 1,35 [%]	3h vor Gabe	52,66 \pm 5,01	55,28 \pm 4,99	52,65
	n	4	4	1
	nach 48h	55,96 \pm 3,53	84,07 \pm 4,58	91,25 \pm 6,32
	n	3	5	2
	nach 120h	54,85	83,09 \pm 2,42	
n	1	3	0	
18:1 Kontrolle (n=12) 9,66 \pm 0,43 [%]	3h vor Gabe	16,42 \pm 1,34	17,99 \pm 2,09	16,81
	n	4	4	1
	nach 48h	18,72 \pm 1,41	6,48 \pm 2,09	4,53 \pm 3,37
	n	3	5	2
	nach 120h	19,45	5,32 \pm 2,11	
n	1	3	0	
18:2 Kontrolle (n=12) 3,95 \pm 0,29 [%]	3h vor Gabe	12,26 \pm 3,04	9,57 \pm 1,03	11,63
	n	4	4	1
	nach 48h	9,32 \pm 1,73	3,49 \pm 0,82	1,98 \pm 1,39
	n	3	5	2
	nach 120h	5,10	4,88 \pm 0,51	
n	1	3	0	

Tab. 8: Verteilung der Phosphatidylcholin-Fettsäuren als prozentualer Anteil der einzelnen Fettsäuren an den Phosphatidylcholin-Gesamtfettsäuren. Alle Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler. Aufgrund kleiner Fallzahlen konnte keine Statistik durchgeführt werden.

MW \pm SE		<i>Standard</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>
16:0/16:0 Kontrolle (n=12) 52,2 \pm 1,4 [%]	3h vor Gabe	34,35 \pm 2,53	36,77 \pm 2,21	40,07
	n	3	4	1
	nach 48h	36,04 \pm 1,85	80,34 \pm 5,51	91,54 \pm 4,83
	n	3	3	3
	nach 120h		73,16 \pm 12,68	
n	0	2	0	
16:0/18:1 Kontrolle (n=12) 9,6 \pm 0,4 [%]	3h vor Gabe	16,57 \pm 1,98	15,36 \pm 1,01	13,42
	n	3	4	1
	nach 48h	16,64 \pm 2,39	5,52 \pm 1,54	3,14 \pm 1,15
	n	3	3	3
	nach 120h		7,46 \pm 1,52	
n	0	2	0	
16:0/18:2 Kontrolle (n=12) 5,7 \pm 0,3 [%]	3h vor Gabe	9,54 \pm 1,02	10,79 \pm 0,81	10,86
	n	3	4	1
	nach 48h	11,36 \pm 1,42	3,49 \pm 0,86	0,88 \pm 0,60
	n	3	3	3
	nach 120h		5,29 \pm 2,11	
n	0	2	0	

Tab. 9: Verteilung der molekularen Spezies des Phosphatidylcholins, dargestellt als Prozent aller molekularen Spezies. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Aufgrund kleiner Fallzahlen konnte keine Statistik durchgeführt werden.

6.3. Ergebnisse der biophysikalischen Untersuchungen

Oberflächenaktivität in Abwesenheit von BAL-Protein

Im Vergleich zur gesunden Kontrolle waren sowohl der Oberflächenspannungswert nach 12 sec. Filmadsorption (γ_{ads}) wie auch nach 5 min. Filmoszillation (γ_{min}) zum Zeitpunkt ($t = -3h$) in allen drei Gruppen deutlich erhöht. Im zeitlichen Verlauf konnte vor allem in der Gruppe „*Low-dose*“ eine signifikante und anhaltende Besserung beider Parameter erzielt werden, ohne dass physiologische Werte erreicht wurden (Abb. 8, Abb. 9). Im Einzelnen fand sich eine hochsignifikante Verbesserung der minimalen Oberflächenspannung bei der *Low-dose*-Therapiegruppe 48h nach der Surfactantapplikation im Vergleich zum Ausgangswert ($t = -3h$), die sich 120h nach Gabe noch als signifikant herausstellte (Abb. 8). Bezüglich der Oberflächenspannung nach 12 sec. Adsorptionszeit (γ_{ads} ; Abb. 9) zeigte sich in der ersten Kontrolle nach Applikation („nach 48h“) ebenfalls für den Therapiearm „*Low-dose*“ eine signifikante Senkung im Vergleich zum Ausgangswert (3h vor Gabe). Für die beiden anderen Therapiearme ließen sich keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum Ausgangswert (3h vor Gabe) nachweisen.

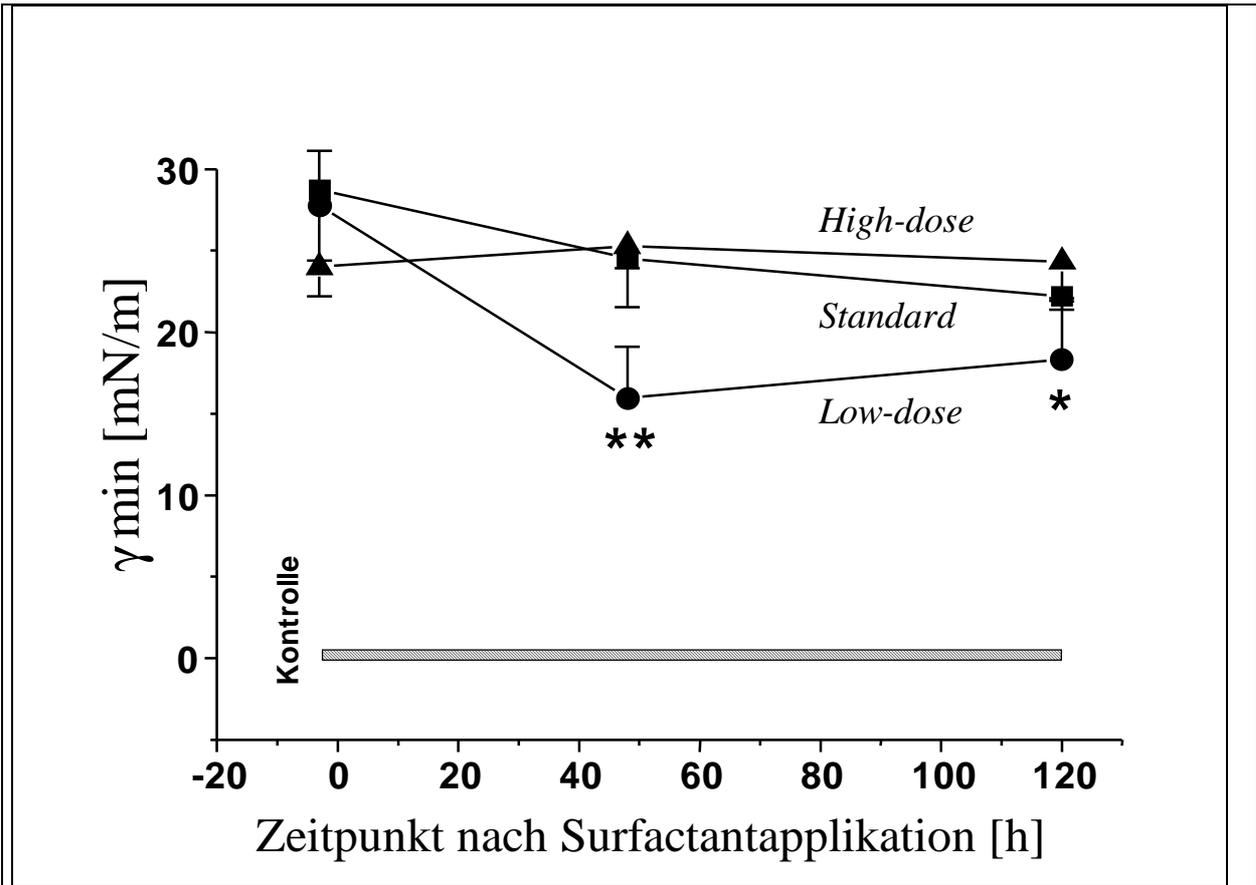


Abb. 8: Minimale Oberflächenspannung (γ_{\min}) der Surfactant-Isolate. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Der Normwerte-Bereich ist durch das linierte Rechteck gekennzeichnet. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zu $t = -3h$

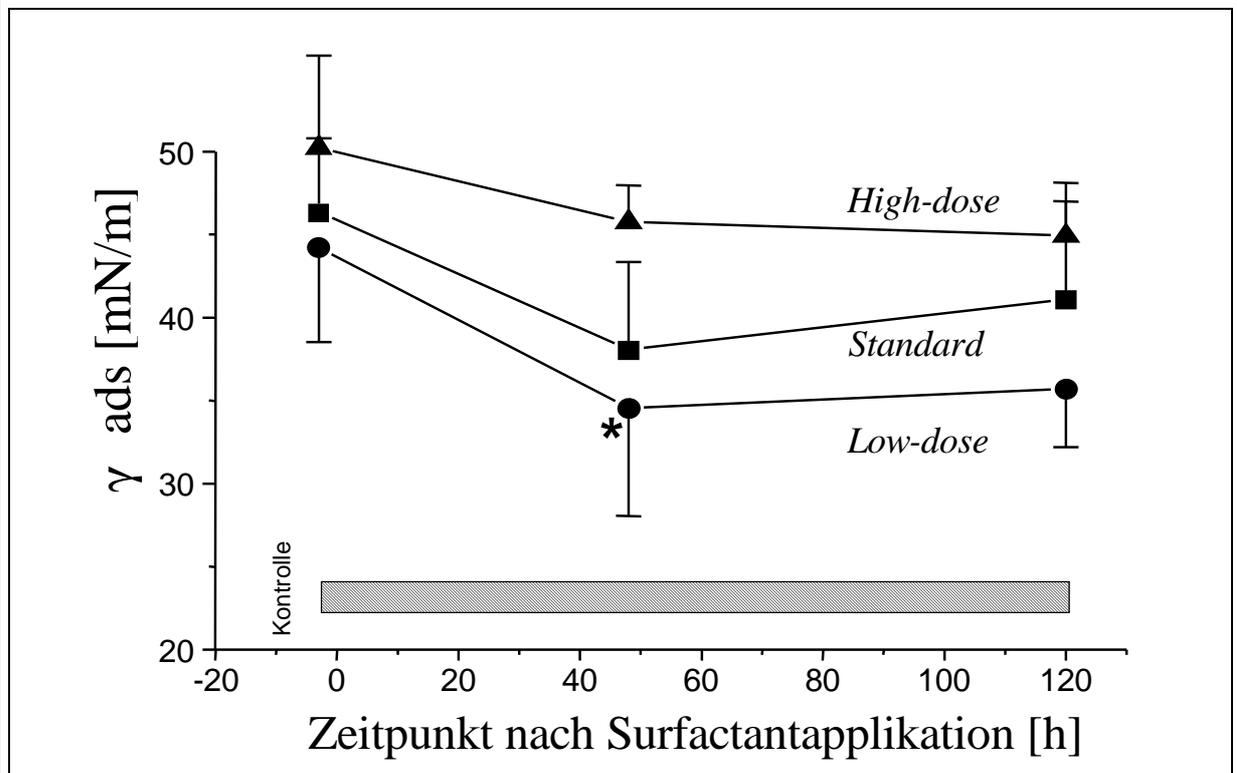


Abb. 9: Adsorption (γ_{ads}) der Surfactant-Isolate. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Der Normwerte-Bereich ist durch das linierte Rechteck gekennzeichnet. * = $p < 0,05$ im Vergleich zu $t = -3h$

6.4. Korrelationen des Oxygenierungsindex ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) mit biophysikalischen und biochemischen Parametern

Die nachfolgenden Korrelationen wurden für alle surfactanttherapierten Patienten (*Low-dose*- und *High-dose*-Therapiearm) durchgeführt, um den Zusammenhang der Auswirkung des applizierten Surfactants zwischen Oxygenierungsindex ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$), minimaler Oberflächenspannung (γ_{min}), Adsorption (γ_{ads}), relativem Gehalt an Palmitinsäure (16:0) in Phosphatidylcholin, „*Large Surfactant Aggregates*“ und Phosphatidylglycerol an den Gesamt-Phospholipiden zu verdeutlichen. Der Zeitraum der Korrelationen erstreckt sich nur von der „*Baseline*“ ($t = -3\text{h}$) bis zur ersten Kontroll-BAL ($t = 48\text{h}$), da sich keine fassbaren Korrelationen für den Zeitraum bis zur zweiten Kontroll-BAL ($t = -3\text{h}$ bis $t = 120\text{h}$) für diese Parameter feststellen ließen:

6.4.1. Korrelation zwischen minimaler Oberflächenspannung (γ_{\min}) und $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$

Die beiden Gruppen der surfactanttherapierten Patienten weisen eine leicht negative Korrelation zwischen der minimalen Oberflächenspannung und dem Oxygenierungsindex auf (Pearson'scher Korrelationskoeffizient $r=-0,45$; Abb. 10).

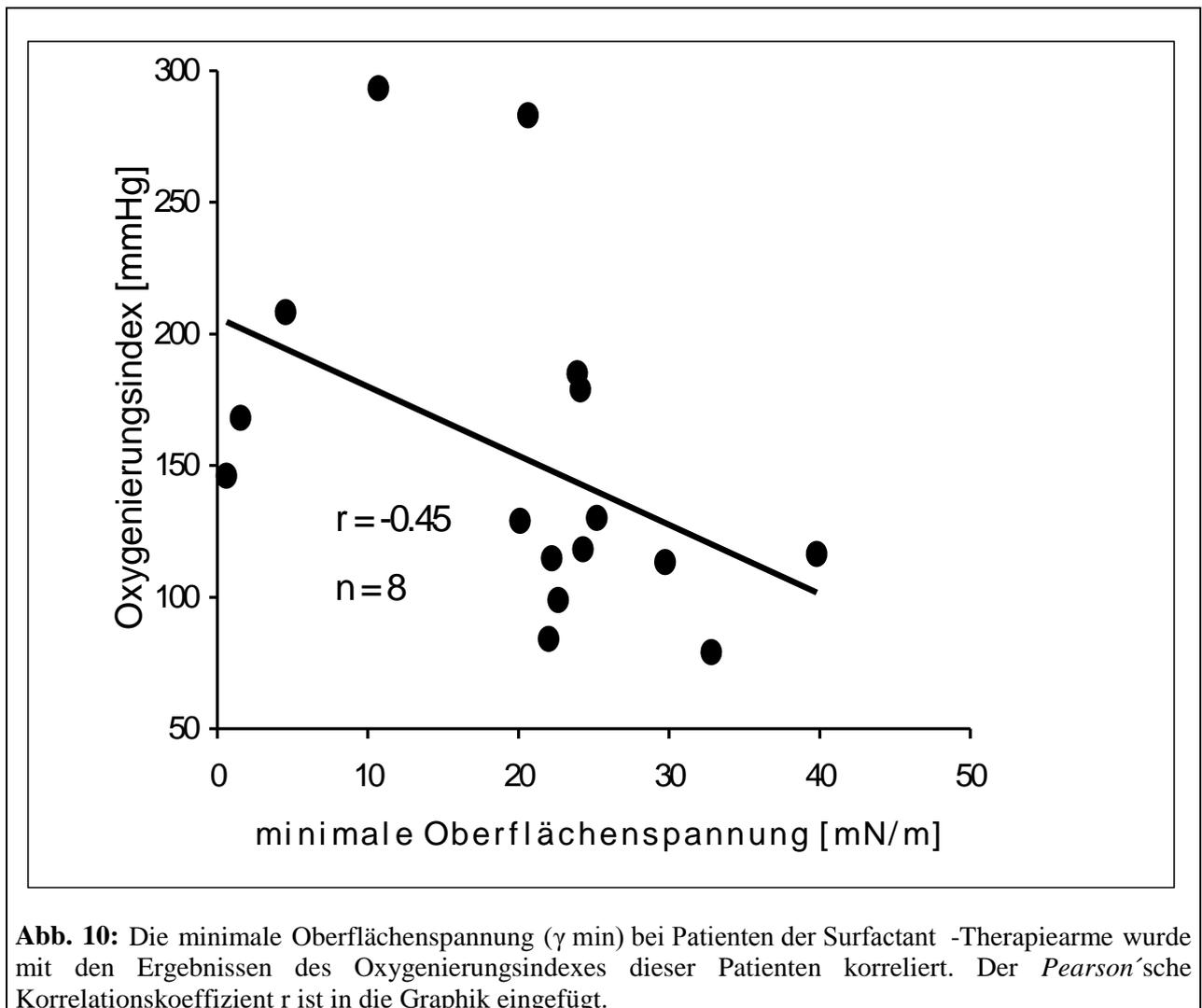


Abb. 10: Die minimale Oberflächenspannung (γ_{\min}) bei Patienten der Surfactant -Therapiearme wurde mit den Ergebnissen des Oxygenierungsindex dieser Patienten korreliert. Der *Pearson'sche* Korrelationskoeffizient r ist in die Graphik eingefügt.

6.4.2. Korrelation zwischen der Oberflächenspannung nach Adsorption (γ_{ads}) und PaO_2/FiO_2

Das Adsorptionsverhalten wurde mit den Ergebnissen des Oxygenierungsindex verglichen, und es zeigte sich hier entsprechend der Werte der minimalen Oberflächenspannung eine ebenfalls schwach negative Korrelation ($r=-0,45$; Abb. 11).

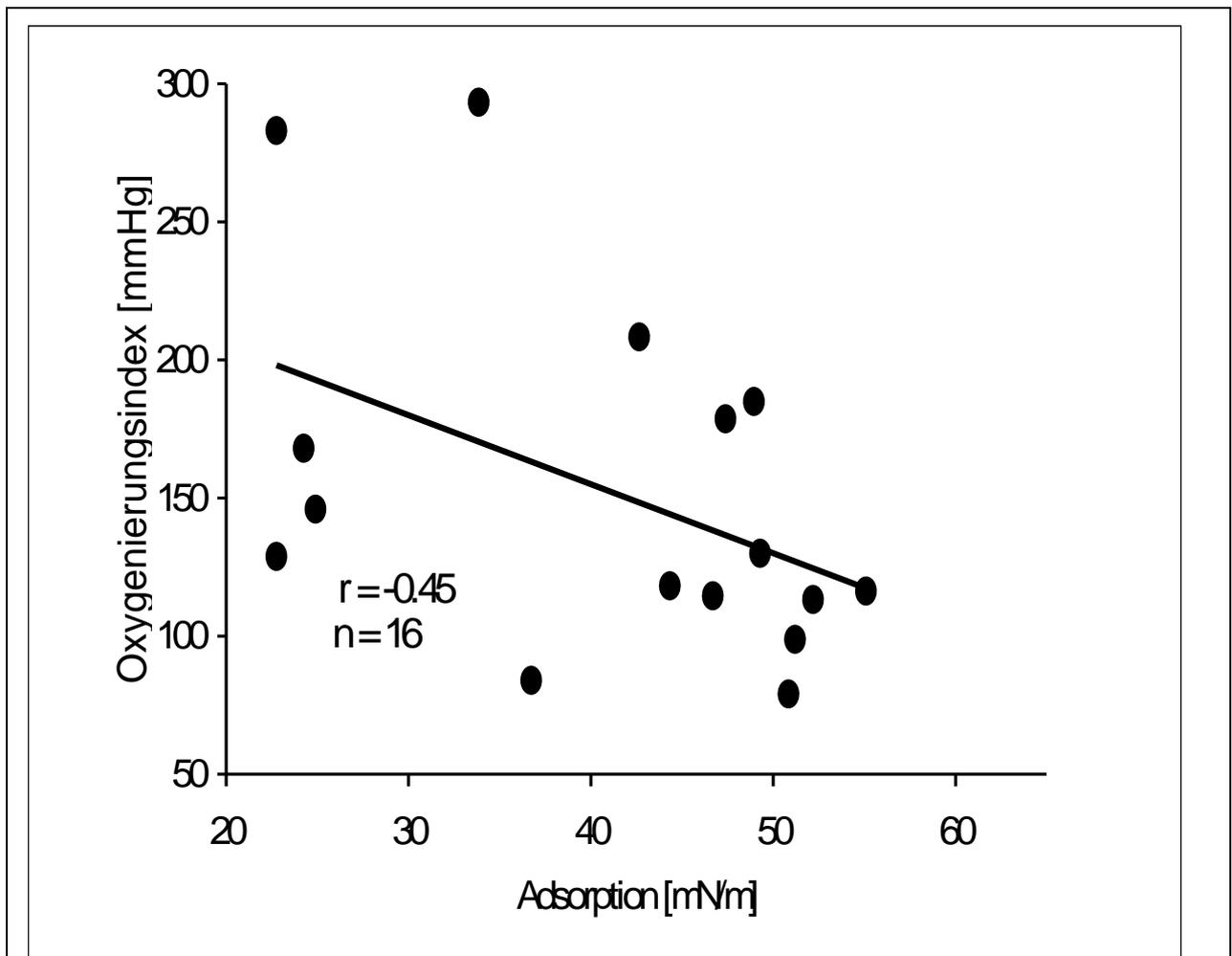


Abb. 11: Die Oberflächenspannung nach Filmadsorption (γ_{ads}) bei Patienten der Surfactant - Therapiearme wurde mit den Ergebnissen des Oxygenierungsindex dieser Patienten korreliert. Der *Pearson*'sche Korrelationskoeffizient r ist in die Graphik eingefügt.

6.4.3. Korrelation zwischen der 16:0 PC-Fettsäure und $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$

Die Korrelation der 16:0 PC-Fettsäure und dem Oxygenierungsindex konnte nur für den *Low-dose*-Therapiearm durchgeführt werden. Es zeigte sich eine schwach positive Korrelation ($r=0,33$; Abb. 12).

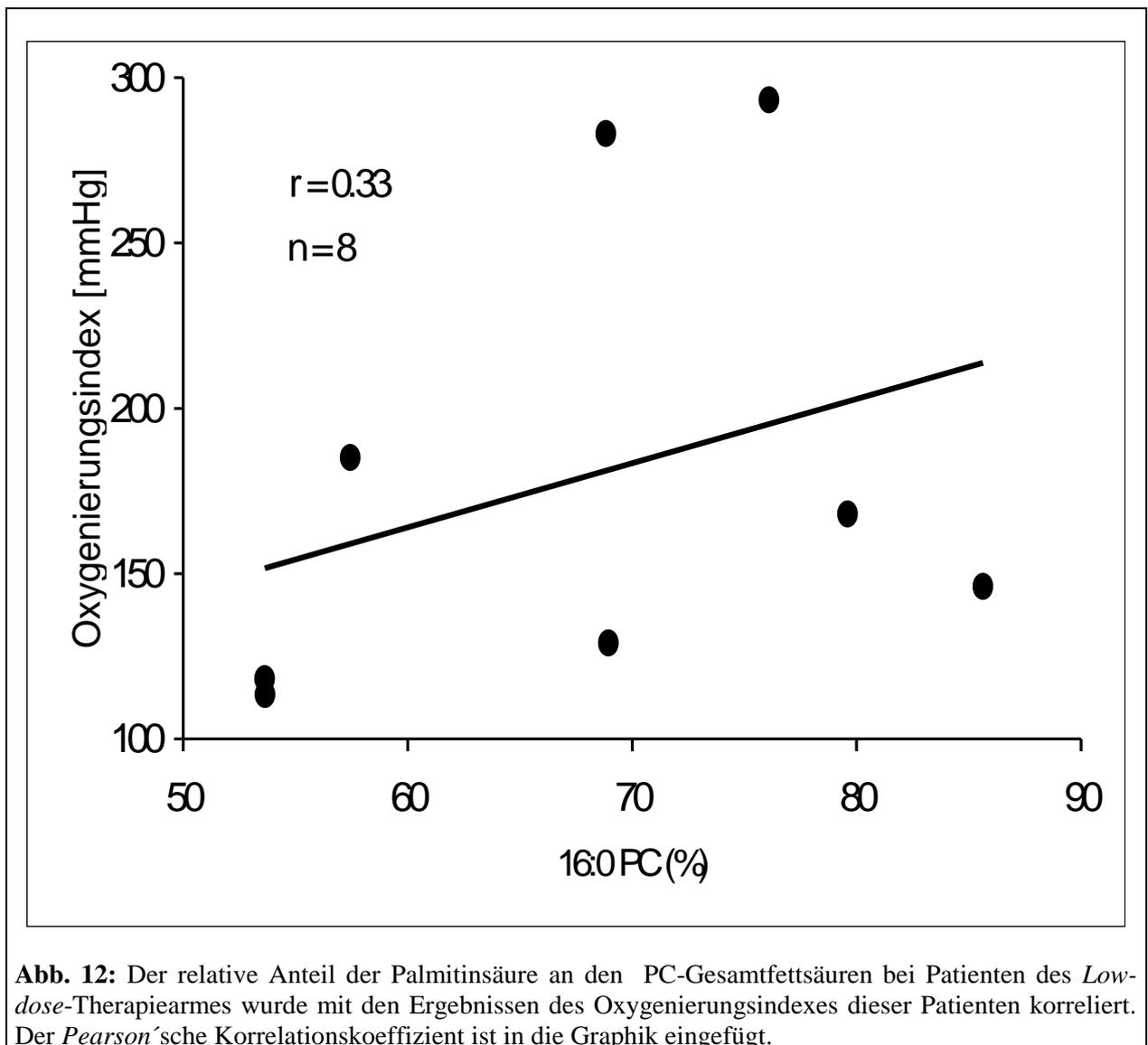


Abb. 12: Der relative Anteil der Palmitinsäure an den PC-Gesamtfettsäuren bei Patienten des *Low-dose*-Therapiearmes wurde mit den Ergebnissen des Oxygenierungsindex dieser Patienten korreliert. Der *Pearson*'sche Korrelationskoeffizient ist in die Graphik eingefügt.

6.4.4. Korrelation zwischen LSA (% PL) und $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$

Es ergab sich für den relativen Anteil der „Large Surfactant Aggregates“ an den Gesamtpospholipiden (% PL) für Patienten beider Surfactant-Therapiearme und dem Oxygenierungsindex eine schwach positive Korrelation ($r=0,36$; Abb. 13).

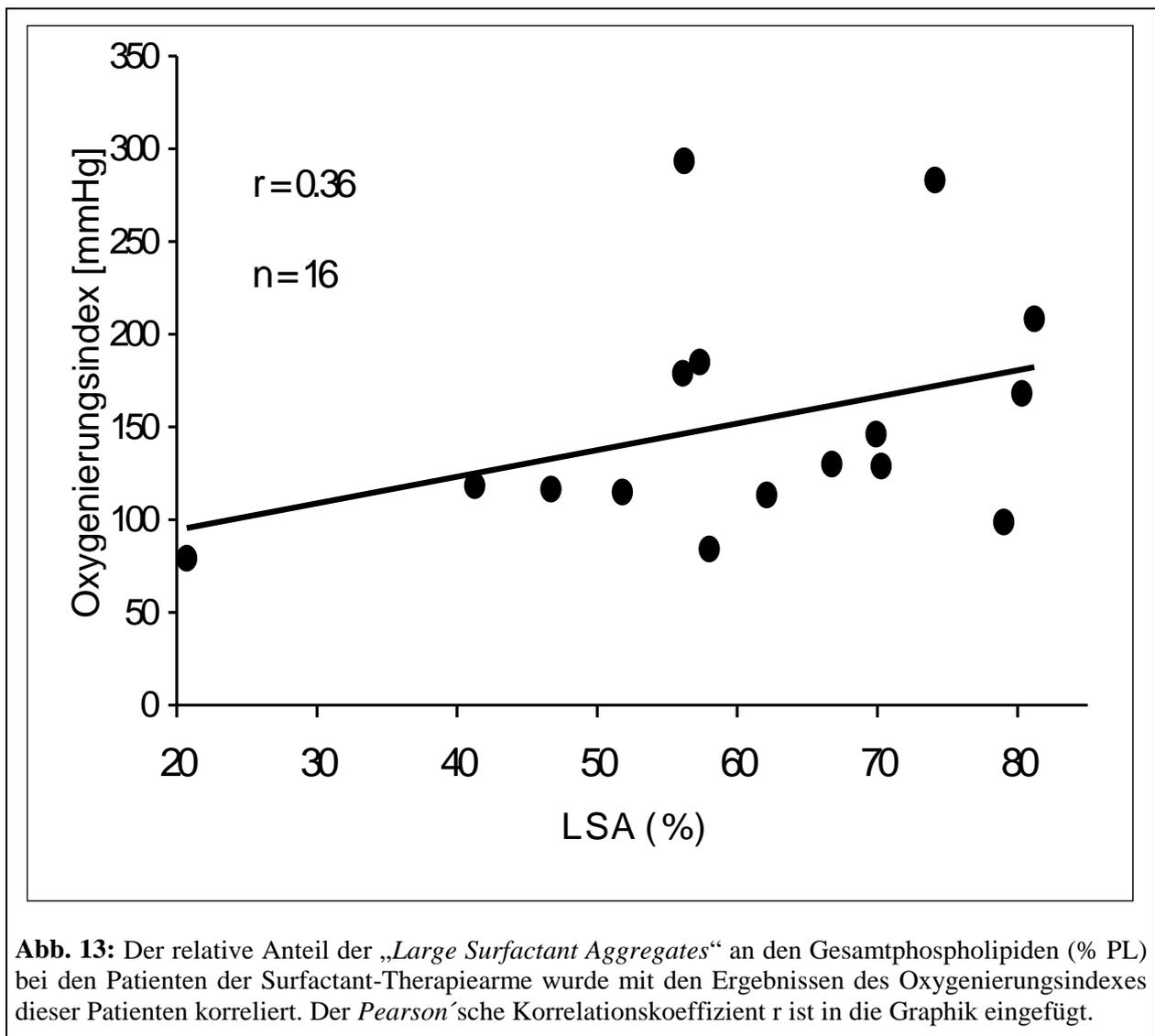


Abb. 13: Der relative Anteil der „Large Surfactant Aggregates“ an den Gesamtpospholipiden (% PL) bei den Patienten der Surfactant-Therapiearme wurde mit den Ergebnissen des Oxygenierungsindex dieser Patienten korreliert. Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient r ist in die Graphik eingefügt.

6.4.5. Korrelation zwischen Phosphatidylglycerol (% PL) und PaO₂/FiO₂

Es trat bei der Korrelation des relativen Anteils des PG an den Gesamtphospholipiden, welches wie oben erwähnt im Rahmen eines ARDS einer Reduktion unterliegt, und des Oxygenierungsindex eine schwach positiv-korrelierte Beziehung ($r=0,41$; Abb. 14) für die *Low-dose*- und *High-dose*-Patienten in Erscheinung.

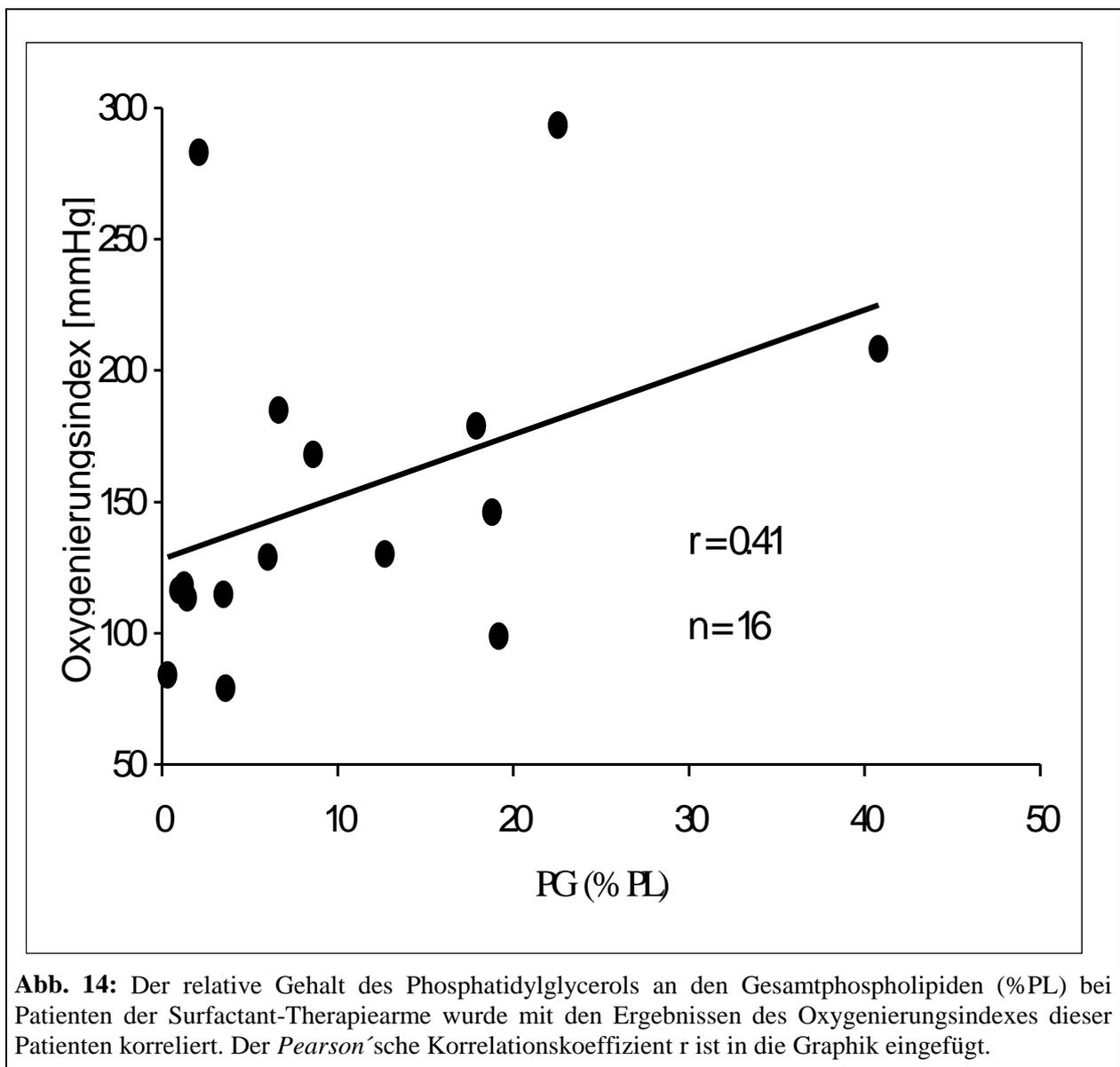


Abb. 14: Der relative Gehalt des Phosphatidylglycerols an den Gesamtphospholipiden (%PL) bei Patienten der Surfactant-Therapiearme wurde mit den Ergebnissen des Oxygenierungsindex dieser Patienten korreliert. Der *Pearson*'sche Korrelationskoeffizient r ist in die Graphik eingefügt.

7. Diskussion

In der vorliegenden Dissertation sollte an einem Kollektiv von ARDS-Patienten zunächst die Fragestellung untersucht werden, ob eine intratracheale Applikation eines auf rekombinant hergestellten SP-C basierendem Surfactant-Präparates (rSP-C), in Form einer *Low-dose-* (4 x 1 mg rSP-C /kg Körpergewicht (KG)) bzw. *High-dose-*Therapie (4 mg rSP-C /kg KG + 2 mg rSP-C /kgKG bis zu dreimal in 24h), einen Vorteil hinsichtlich der Mortalität nach 28 Tagen und Ventilator-freie Tage erbringen kann. Eine deutliche Verbesserung der Oxygenierung konnte in den ersten 24h nach rSP-C-Applikation für surfactanttherapierte Patienten in der Tat beobachtet werden. Für die „*Area under the curve*“ des Oxygenierungsindex der Surfactant-Therapiegruppen fand sich eine Verbesserung von 21-29 % im Vergleich mit der Standardbehandlung (Kontrolle) nach 120h. Die Entwöhnungsrate vom Respirator war in der *Low-dose-*Therapiegruppe mit 55 %, verglichen mit der Standardbehandlung (33 %), am Tag 28 ebenfalls erhöht. Auch die Letalität konnte in der *Low-dose-*Therapiegruppe mit 29 % im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit 33 % tendenziell herabgesetzt werden. Im Gegensatz hierzu war in der *High-dose-*Gruppe keine positive Beeinflussung der Mortalität und der Ventilator-freien Tage zu beobachten.

Vorrangiges Ziel der hier vorgelegten Arbeit war allerdings im Lichte dieser klinischen Beobachtungen die Frage, ob das ARDS-Kollektiv 3h vor Surfactant-Therapie gravierende Veränderungen des Surfactant-Systems aufwies, und ob diese Veränderungen durch die nachgeschaltete Surfactant-Therapie positiv beeinflusst werden konnten. Die zum Zeitpunkt $t = -3h$ gewonnenen biochemischen und biophysikalischen Daten bei den drei Patientenkollektiven (Standardtherapie-Gruppe, *Low-dose-*Gruppe, *High-dose-*Gruppe) bestätigen einige frühere Beobachtungen beim ARDS. So wurde von *Hallman et al.* [1] erstmals im Jahre 1982 eine deutliche Erhöhung der minimalen Oberflächenspannung bei ARDS-Patienten im Vergleich zu freiwilligen Probanden veröffentlicht. Dieses wurde später von anderen Autoren für Patienten mit ARDS bestätigt (*Pison et al.* [2] 1989, *Gregory et al.* [3] 1991, *Günther et al.* [4] 1996). Weiterhin wurde von *Günther et al.* [4] eine Umkehrung des Verhältnisses der „großen“ zu den „kleinen Surfactant-Aggregaten“ im Rahmen eines ARDS beschrieben; eine Beobachtung, die auch in der vorliegenden Arbeit gemacht wurde. Bei den untersuchten ARDS-Patienten fand sich ebenfalls im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine drastische Erhöhung des Gesamtproteingehaltes in der BAL, ein Faktum, welches aufgrund der vorherigen Studien zu erwarten war. Ferner konnte im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ein verminderter Surfactant-Protein-A-Gehalt im Rahmen eines

ARDS, der schon 1992 von *Pison* [67] für polytraumatisierte Patienten mit ARDS beschrieben worden war, detektiert werden. Der jeweilige Gehalt an den hydrophoben Surfactant-Proteinen (SP-B und -C) lag 3h vor Surfactant-Substitution deutlich unter dem der gesunden Kontrolle. Weiterhin konnten eindrucksvoll die Beobachtungen der bislang veröffentlichten Studien bezüglich des Phospholipid-Profiles bei ARDS-Patienten, verglichen mit gesunden Probanden, bestätigt werden. Im Einzelnen fand sich bei den untersuchten ARDS-Patienten eine leichte Reduktion des prozentualen Anteils des Phosphatidylcholins sowie ein sehr deutlicher Abfall des prozentualen Anteils des Phosphatidylglycerols. Gleichzeitig zeigte sich für die anderen Surfactant-Lipidsubfraktionen (Phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Sphingomyelin) ein deutlicher Anstieg der prozentualen Verteilung sowie für die dipalmitoylierten molekularen Spezies des Phosphatidylcholins (DPPC) eine massive Reduktion bei manifestem ARDS. Die biophysikalische Charakterisierung des Surfactants bei den untersuchten ARDS-Patienten zeigte für den minimalen Oberflächenspannungswert (γ_{\min}) und den Equilibrium - Oberflächenspannungswert nach Adsorption (γ_{ads}), verglichen mit gesunden Probanden, eine erwartete drastische Erhöhung dieser beiden Parameter, wie es schon in den vorherigen klinischen Studien beschrieben worden war.

Nach transbronchialer Surfactant-Therapie konnte eine bemerkenswerte „Normalisierung“ der Surfactant-Zusammensetzung des lavagierbaren Surfactantpools festgestellt werden. Erwartungsgemäß zeigte sich nach Durchführung der Verabreichung des rSP-C-Surfactants eine deutliche Anhebung der SP-C-Werte in der BAL, eine Wiederherstellung eines physiologischen Phospholipid-Pools und ein Anstieg des Palmitoylierungsgrades des Phosphatidylcholins. Weniger ausgeprägt waren diese Änderungen hinsichtlich der nicht verabreichten Komponenten SP-A und SP-B, für die keine signifikante Besserung zu beobachten war. Auch der Phospholipid-Protein-Quotient, als Ausdruck der inhibitorischen Last von Plasmaproteinen auf die Surfactant-Funktion, konnte durch die Therapie positiv beeinflusst werden und der relative Gehalt an „*Large Surfactant Aggregates*“ war in beiden Therapiearmen erhöht. Dieser deutliche, im Fall der *Low-dose*-Therapiegruppe auch signifikante Anstieg des LSA-Gehaltes ist erstaunlich, scheint doch die Bildung von „*Tubular myelin*“ SP-A und SP-B abhängig zu sein [12]. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung mag sein, dass eine Art von „Rekombination“ aus endogenem SP-B und Phospholipiden stattgefunden haben könnte. Eine alternative Erklärung mag in dem möglichen Auftreten anderer, dichter bzw. größerer Surfactant-Aggregate liegen, die in der Gegenwart hoher Mengen an SP-C entstehen können und von den natürlichen

Erscheinungsformen divergieren (große, uni-multilamelläre Vesikel) [12]. Hervorzuheben ist, dass in der vorliegenden Studie lediglich das Sedimentationsverhalten, nicht jedoch die ultrastrukturellen Eigenschaften analysiert wurden. Als Ausdruck dieser vielschichtigen Verbesserungen der Surfactant-Zusammensetzung konnte auch eine entsprechende Besserung der Oberflächenspannungssenkenden Funktion der Surfactantisolate nach Durchführung einer transbronchialen Surfactant-Therapie in der *Low-dose*-Gruppe beobachtet werden. Diese Verbesserung der Oberflächenaktivität war aber inkomplett – so betragen die minimalen Oberflächenspannungswerte der „*Large Surfactant Aggregates*“ dieser Patientengruppe etwa 10 mN/m im Vergleich zu ~ 0 mN/m in den Kontrollen und ~ 24 mN/m vor Therapiebeginn. Die Gründe für diese inkomplette „Normalisierung“ der Oberflächenspannung sind komplex. Sie umfassen zunächst Inhibitionsphänomene auch in dem zur Ultrazentrifugation genommenem LSA-Pellet. So ist nicht auszuschließen, dass inhibitorisch wirksame hochmolekulare Plasmaproteine (Fibrinmonomere und -oligomere), Proteasen, Phospholipasen mit den LSA komplettieren und inhibitorisch wirksam werden. Weiterhin wurde von unserer Arbeitsgruppe jüngst die Beobachtung gemacht, dass in der LSA-Fraktion von ARDS-Patienten der relative Anteil der Neutrallipide deutlich erhöht ist, und dann diese Erhöhung der Neutrallipide auch nach Durchführung einer transbronchialen Surfactant-Therapie weiterhin in unverändertem Umfang vorlag. Rekonstitution von therapeutischen Surfactants wie auch natürlichem Surfactant mit steigenden Mengen an Neutrallipiden bewirkte eine dosisabhängige Beeinträchtigung der minimalen Oberflächenspannung, nicht jedoch der Adsorptionseigenschaften. Die hierfür kritische Schwellendosis lag bei etwa 10 % Neutrallipiden (bezogen auf die Phospholipide), also eine Menge, die bei ARDS-Patienten auch nach Surfactant-Therapie regelmäßig überschritten wurde.

Die Rationale für eine Surfactant-Therapievariante des ARDS ist leicht nachzuvollziehen. Zunächst sind hier die Erfahrungen der Surfactantbehandlung des „*Infant Respiratory Distress Syndrome*“ (IRDS) [104] zu nennen. In mehreren Studien konnte ein deutlicher Überlebensvorteil durch Verabreichung natürlicher Surfactant-Präparate beobachtet werden [57, 104]. Nun liegt dem IRDS primär ein Mangel an Surfactant zu Grunde und nicht – wie beim ARDS – ein komplexes und vielschichtiges Zusammenspiel von gestörter Zusammensetzung, verändertem Metabolismus und Inhibition durch Proteasen, Phospholipasen, Sauerstoffradikalen und Plasmaproteinen. Ein erster wegweisender Befund für eine mögliche Wirksamkeit einer exogenen Surfactant-Therapie war die Beobachtung, dass *in vitro* die Hemmung der Surfactant-Fraktion durch z.B. Plasmaproteine durch Zugabe weiterer Mengen eines exogenen Surfactant-Präparates prinzipiell „überspülbar“ war.

Desgleichen konnte in tierexperimentellen Modellen, bei denen die ARDS-spezifischen Veränderungen mittels Aspiration von Salzsäure [97, 98], viral- und bakteriell induzierten Pneumonien [99, 100] und durch wiederholte Ölsäure-Injektionen [101] hervorgerufen wurden, eine Verbesserung des Gasaustausches in der exsudativen Phase des ARDS durch eine Surfactant-Therapie nachgewiesen werden. Die hier regelmäßig beobachtete Besserung des Gasaustausches konnte in wenigen Studien durch Anwendung der MIGET-Technik tatsächlich auf eine Wiedereröffnung atelektatischer Lungenbezirke und somit einer Reduktion des pulmonalen Shuntflusses zurückgeführt werden.

Nun sind in der Vergangenheit beim ARDS bereits mehrere Studien mit natürlichen (porcines Curosurf[®], bovines Alveofact[®], bovines Survanta[®]) oder synthetischen (vollsynthetisches Exosurf[®] ohne hydrophobe Surfactant-Proteine, rSP-C-haltiges Venticute[®]) Präparaten durchgeführt worden. Hinsichtlich der natürlichen Präparate existieren grundsätzliche Probleme bzgl. der Reproduzierbarkeit der pharmakologischen Zusammensetzung des Wirkstoffes von Charge zu Charge, obgleich die Oberflächenaktivität vergleichbar gut ist. Diese Präparate werden durch Lavage oder Homogenisierung aus tierischen Lungengeweben gewonnen. Außerdem wurde immer die Frage über eine mögliche Kontamination mit pathogenen Prionen geäußert, auch wenn dies sicherlich eher unwahrscheinlich ist. Es wurden verschiedene Applikationsformen, wie die bronchoskopisch-gesteuerte Applikation (Curosurf[®], Alveofact[®]), die Applikation als Aerosol (Exosurf[®]) bzw. die intratracheale Instillation (Survanta[®], Venticute[®]) entwickelt und angewendet, um die signifikante Störung der Surfactant-Homöostase im Verlauf eines ARDS zu behandeln [92, 93, 94, 95, 96, 102]. In Übereinstimmung mit den tierexperimentellen Daten, die eine deutlich höhere Konzentration von Surfactant für die Behandlung des ARDS im Vergleich zum IRDS nahe legt, betrug die Dosierung dieser Präparate 50 mg/kg Körpergewicht (KG) (Curosurf[®]), 5 mg/kgKG/h (Exosurf[®], inhalative Therapie bis zu 5d), 300-500 mg/kgKG (Alveofact[®]), 8 x 50, 4 x 100 bzw. 8 x 100 mg/kgKG (Survanta[®]) bzw. wie bereits mehrfach erwähnt 4 x 1 mg rSP-C/kgKG (Venticute[®]) bzw. 4 mg rSP-C/kgKG (Venticute[®]) + 2 mg rSP-C/kgKG bis zu dreimal in 24h.

In der von *Anzueto* et al. 1996 [93] mit aerosolisiertem Exosurf[®] durchgeführten randomisierten, placebo-kontrollierten Studie wurden 725 Patienten, die ein sekundäres ARDS bei Sepsis aufwiesen, behandelt. Es konnte kein Nutzen des vollsynthetischen Präparates für ARDS-Patienten nachgewiesen werden. Die Gründe hierfür lagen wohl erstens in einer unzureichend niedrigen pulmonalen Deposition des Surfactant (nur 4,5% der 5mg/kgKG/h) und zweitens in der ausgesprochen hohen Inkompatibilität dieses SP-B- und

SP-C-freien Präparates, das entsprechend leicht durch Plasma-Proteine inhibiert werden kann. Die bereits mehrfach zitierte prospektive, multizentrische, unkontrollierte Pilotstudie zur Sicherheit und Wirksamkeit von bronchoskopisch appliziertem Alveofact® (Walmrath et al. 1996, [92]), die an zehn ARDS-Patienten infolge Sepsis durchgeführt wurde, konnte eine weitreichende, aber inkomplette Rekonstitution physiologischer Surfactant-Eigenschaften und – in der Folge – eine drastische Verbesserung des Oxygenierungsindex, einen drastisch verminderten Shuntfluss und eine deutliche Besserung des gestörten Ventilations-Perfusionsverhältnisses darlegen. Unter Verwendung des ebenfalls bovinen Surfactant-Präparates Survanta® konnte nach intratrachealer Instillation bei 43 ARDS-Patienten eine tendenziell reduzierte Mortalität der Patienten (außer bei der Dosis von 8x 50 mg/kgKG) und ein signifikant gebesserter Gasaustausch sowie eine teilweise Verbesserung der Surfactant-Funktion festgestellt werden. In einer weiteren kürzlich veröffentlichten Studie beschreiben Spragg et al. [102], dass es bei einer heterogenen Gruppe von 448 Patienten mit ARDS – also eine Population mit primären und sekundären ARDS-Ursachen – keinen Überlebensvorteil durch den rSP-C-basierenden Surfactant bei den damit behandelten Patienten gab. Es konnte aber gezeigt werden, dass in den ersten 24h der Behandlung eine deutliche Verbesserung der Oxygenierung bei den mit rSP-C-basierendem surfactantbehandelten Patienten verglichen mit den mittels standardtherapiebehandelten Patienten zu beobachten war; diese Beobachtung konnte auch in der vorliegenden Studie gemacht werden.

In der dieser Dissertation zugrundeliegenden prospektiven, kontrollierten, randomisierten, multizentrischen, einfachblinden Phase-II-Studie zur Sicherheit intratracheal verabreichten Venticute® wurden ebenfalls Patienten mit den unterschiedlichsten ARDS-Ursachen eingeschlossen. Es konnte gezeigt werden (s.o.), dass intratracheal instilliertes Venticute® in der *Low-dose*-Therapie geeignet ist, den Oxygenierungsindex in den ersten 4h nach Applikation um mehr als 40 % und dauerhaft anzuheben. Zugleich wurde in dieser Dosierung eine Erhöhung der Anzahl beatmungsfreier Tage wie auch eine reduzierte Mortalität beobachtet. Interessanterweise, und gegenwärtig nicht weiter erklärbar, waren in der *High-dose*-Gruppe solche klinischen Verbesserungen nicht zu beobachten und parallel hierzu konnte in den BAL-Analysen auch eine nur geringgradige Beeinflussung der Surfactant-Eigenschaften festgestellt werden.

In der Folge stellen sich natürlich noch eine Menge unbeantworteter Fragen, wie z.B. die der effektivsten Applikationsform (intratracheal, bronchoskopisch, per inhalationem), die der effektivsten Therapiedosis (Einzelgabe versus repetitiven Gaben) und die, ob eine exogene Surfactant-Therapie im Rahmen eines fortgeschrittenen ARDS in der Lage ist, auf

die hierbei stattfindende fibroproliferative Reorganisation positiv einzuwirken. Die Frage, ob das Kollektiv der Patienten mit einem primären ARDS durch eine rSP-C-basierende Surfactant-Therapie einen eindeutigen Benefit bzgl. des Krankheitsverlaufes erhalten, ist z.Zt. in Form einer weiteren großen Studie Gegenstand der klinischen Forschung.

8. Zusammenfassung

Das „*Acute Respiratory Distress Syndrome*“ (ARDS) stellt eine häufige und aufgrund der noch immer hohen Mortalität (30-40 %) gefürchtete intensivmedizinische Erkrankung dar. Störungen des pulmonalen Surfactant-Systems, mit einer Erhöhung der alveolären Oberflächenspannung und einer konsekutiv verschlechterten Gasaustauschfunktion, wurden für das ARDS in der Vergangenheit mehrfach diskutiert.

In der vorliegenden Dissertation wurde im Rahmen einer Phase-II-Studie bei Patienten mit ARDS eine umfassende Charakterisierung der Surfactant-Eigenschaften in Abhängigkeit einer intratrachealen Applikation eines auf rekombinantem Surfactant-Protein-C basierenden Surfactant durchgeführt. Die Untersuchungen wurden in den Gruppen a) nur Standardtherapie (n=15), b) Standardtherapie plus *High-dose*-Therapie (n=13; 4 mg rSP-C + 2 mg rSP-C/kgKG bis zu dreimal in 24h), c) Standardtherapie plus *Low-dose*-Therapie (n=18; 4 x 1 mg rSP-C /kgKG) und d) gesunde Probanden (n=20) über das diagnostische Fenster der bronchoaveolären Lavage vorgenommen.

Das hier verwendete Methodenspektrum beinhaltete proteinchemische (Proteingehalt, Konzentration der Surfactant-Proteine (SP)-A, -B, -C und -D), lipidchemische (Phospholipidgehalt, Phospholipidklassen, Fettsäure-Profil, molekulare Spezies des Phosphatidylcholins) und biophysikalische (minimaler Oberflächenspannungswert (γ min), Equilibrium-Oberflächenspannungswert nach Adsorption (γ ads)) Verfahren.

Bei den untersuchten ARDS-Patienten fand sich vor Surfactant-Therapie im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine drastische Erhöhung der minimalen Oberflächenspannung ($p < 0,001$; γ min 24-29 mN/m in den ARDS-Gruppen versus 0-1 mN/m in den Kontrollen). Dieser erheblichen Verschlechterung der Surfactant-Funktion konnten folgende biochemische Veränderungen gegenüber gestellt werden: signifikant erhöhter Gesamtproteingehalt der BAL), signifikant verminderter Gehalt an den Surfactant-Proteinen (SP)-A, -B und -C, signifikanter Abfall der als Präkursorfraktion geltenden „großen Surfactant-Aggregate“, Veränderungen des Phospholipidprofils mit einer leichten Reduktion des prozentualen Anteils des Phosphatidylcholins ($p < 0,05$) sowie einem deutlichen Abfall des prozentualen Anteils des Phosphatidylglycerol ($p < 0,01$) bei gleichzeitigem Anstieg des relativen Anteils an Phosphatidylinositol ($p < 0,05$), Phosphatidylethanolamin ($p < 0,05$), Phosphatidylserin ($p < 0,05$) und Sphingomyelin ($p < 0,05$) sowie einem massiven Abfall der dipalmitoylierten molekularen Spezies des Phosphatidylcholins (DPPC; $p < 0,001$). Nach der Durchführung der Surfactant-Therapie wurde in der *Low-dose*-Gruppe eine signifikante ($p < 0,05$) Verbesserung des Oxygenierungsindex (AUC 808 ± 1397) in den ersten 4h nach Applikation im Vergleich

zur Standard-Therapiegruppe (AUC 419±980) und zur *High-dose*-Gruppe (AUC 369±900) beobachtet. In Übereinstimmung mit diesen klinischen Daten wurde bei der biochemischen und biophysikalischen Analytik des Surfactant-Systems bei der *Low-dose*-Gruppe im Vergleich zur Standardgruppe eine weitreichende Verbesserung der biochemischen Surfactant-Eigenschaften, verbunden mit einer Verbesserung der Oberflächenaktivität (γ ads, *Low-dose*: 34,3±6,1 mN/m; *Standard*: 37,7±5,7 mN/m; $p < 0,05$; und für γ min, *Low-dose*: 15,9±3 mN/m; *Standard*: 24,1±2,7 mN/m; $p < 0,01$), beobachtet. Zugleich wurde nach Verabreichung dieser Surfactant-Dosis eine Erhöhung der Anzahl beatmungsfreier Tage ($p < 0,05$) wie auch eine reduzierte Mortalität beobachtet.

Summary

The acute respiratory distress syndrome (ARDS) is known as a frequently observed and because of its still high mortality (30-40 %) feared disease in the intensive care medicine. Interferences of the pulmonale surfactant system including an increase of the alveolar surface tension and following a decrease of the function of gas exchange were multiple discussed in the past.

In this dissertation an extensive characterisation of the surfactant characteristics depending from an intratracheal application of a recombinant surfactant protein C based surfactant in patients with ARDS is shown. The investigations are carried out for the groups i) only standard therapy (n=15), ii) standard therapy and high-dose therapy (n=13; 4 mg rSP-C + 2 mg rSP-C/kg bw up to threetimes in 24 hours), iii) standard therapy and low-dose therapy (n=18; 4 x 1 mg rSP-C/kg bw) and iv) healthy volunteers by means of bronchoalveolar lavage (BAL).

The used methodic spectrum included proteinchemical (concentration of protein, concentration of surfactant proteins A, B, C and D), lipidchemical (concentration of phospholipids, subtypes of phospholipids, fatty acid profile, molecular species of phosphatidyl choline) and biophysical (minimal surface tension (γ min), surface tension after adsorption (γ ads)) procedures.

For the studied patients it was found a drastic increase of the minimal surface tension (γ min: 24-29 mN/m for patients with ARDS versus 0-1 mN/m for the controls; $p < 0,001$) before surfactant application compared with healthy volunteers. This considerable decline could be opposed to following biochemical changes: significantly decreased concentration of all proteins in the BAL fluid, significantly decreased concentration of surfactant protein A, B and C, significant decrease of the as precursor fraction known large surfactant aggregates, changes

of the phospholipid profile with a slight reduction of the percentage of phosphatidyl glycerol ($p < 0,05$) coherent with an increase of the percentage of phosphatidyl inositol ($p < 0,05$), phosphatidyl ethanolamine ($p < 0,05$), phosphatidyl serine ($p < 0,05$) and sphingomyeline as well as a massive loss of dipalmitoyl molecular specie of phosphatidyl choline (DPPC; $p < 0,001$).

After surfactant therapy it was found an significant ($p < 0,05$) improvement for $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ in the low-dose treated group (AUC 808 ± 1397) in the first four hours after application in comparison with the standard treated group (AUC 419 ± 980) and the high-dose treated group (AUC 369 ± 900). In correspondence with this clinical data it was observed a nearly complete correction of the biochemical surfactant characteristics attached with an increase of the surface tension lowering activity (γ ads, low-dose: $34,3 \pm 6,1$ mN/m; standard: $37,7 \pm 5,7$ mN/m; $p < 0,05$; and γ min, low-dose: $15,9 \pm 3$ mN/m; standard: $24,1 \pm 2,7$ mN/m; $p < 0,01$) for the surfactant system for the low-dose treated group compared with the standard treated group. An increase in ventilator-free days ($p < 0,05$) as well as a reduced mortality for this surfactant dose was also observed.

9. Literaturverzeichnis

1. Hallman M, Spragg RG, Harrell JH, Moser M, Gluck L. Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure: study of bronchoalveolar lavage phospholipids, surface activity, phospholipase activity, and plasma myoinositol. *J Clin. Invest.* 1982;70:673-683.
2. Pison U, Seeger W, Buchhorn R, Joka T, Brand M, Obertacke U, Neuhof H, Schmitt-Neuenburg KP (1989) Surfactant abnormalities in patients with respiratory failure after multiple trauma. *Am Rev Respir Dis.* 140:1033-1039.
3. Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AAI, Hudson LD, Maunder RJ, Crim C, Hyers TM. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest.* 1991;88:1976-1981.
4. Günther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, Temmesfeld B, Walmrath D, Morr H, Seeger W. Surfactant alterations in severe pneumonia, ARDS and cardiogenic lung edema. *Am J Resp Crit Care Med.* 1996;153:176-184.
5. Batenburg JJ. Surfactant Phospholipids: synthesis and storage. *Am J Physiol.* 1992;267:L753-L760.
6. Harwood JL. Lung surfactant. *Prog Lipid Res.* 1987;26:211-256.
7. Crystal RG, West JB(eds.) (1991). *The Lung.* Raven Press, New York.
8. Hamm H, Bartsch W, Fabel H. The surfactant system of the adult lung: physiology and clinical perspectives. *Clin Invest.* 1992;70:637-657.
9. Oosterlaken-Dijksterhuis MA, van Eijk M, van Golde LM, Haagsman HP. Lipid mixing is mediated by the hydrophobic surfactant protein SP-B but not by SP-C. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1110:45-50
10. Van Golde LMG, Batenburg JJ, Robertson B. Metabolism of Phospholipids in the lung. *Physiol Rev.* 1988; 68: 374-455.
11. Possmayer F. A proposed nomenclature of pulmonary surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis.* 1988;138:990-998.
12. Hawgood S. Pulmonary surfactant apoproteins: a review of protein and genomic structure. *Am J Physiol.* 1989;257:L13-L22.
13. Beers MF, Wali A, Eckenhoff MJ, Feinstein SI, Fisher JH, Fisher AB. An antibody with specificity for surfactant protein C precursor: identification of pro-SP-C in rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992;7:368-378.
14. Kuan S-F, Rust K, Crouch E. Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides: surfactant protein D is an *Escherichia coli*-binding protein in bronchoalveolar lavage. *J Clin Invest.* 1992;90:97-106.
15. Korfhagen TR, Sheftelyevich V, Burhans MS, Bruno MD, Ross GF, Wert SE, Stahlman MT, Jobe H, Ikegami M, Whitsett JA, Fisher JH. Surfactant protein-D regulates surfactant phospholipid homeostasis *in vivo.* *J Biol Chem.* 1998;273:28438-28443.
16. Seeger W, Thede C, Günther A, Grube C. Surface properties and sensitivity to protein-inhibiting of a recombinant apoprotein C-based phospholipid mixture *in vitro*: comparison to natural surfactant. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1081:45-52.
17. Seeger W, Elssner A, Günther A, Krämer H-J, Kalinowski HO. Lung surfactant phospholipids associate with polymerising fibrin: loss of surface activity. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;9:213-220.
18. Shiffer K, et al. Interactions of the low molecular weight group of surfactant-associated proteins (SP 5-18) with pulmonary surfactant lipids. *Biochemistry* 1988;27:2689
19. Warr RG, Hawgood S, Buckley DI, Crisp TM, Schilling J, Benson BJ, Ballard PL, Clements JA, White RT: Low molecular weight human surfactant protein (SP5): Isolation, characterization and cDNA and amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:7915-9.
20. Whitsett JA, et al. Hydrophobic 6,000 kilodalton protein and its importance for biophysical activity in lung surfactant extracts. *Pediatr Res.* 1986;20:460.
21. Yu SH, Possmayer F. Comparative studies on the biophysical activities of the low molecular weight hydrophobic proteins purified from bovine pulmonary surfactant. *Biochim Biophys Acta.*

- 1988;961:337,1988.
22. Baatz JE, Elledge B, Whitsett JA. Surfactant protein SP-B induces ordering at the surface of model membrane bilayers. *Biochemistry* 1990;29:6714-6720.
 23. Cochrane CG, Revak SD. Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships. *Science* 1991;254:566-568.
 24. Yu SH, Possmayer F. Studies on surfactant-associated protein B-mediated adsorption of surfactant phospholipids. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145:874 (abstr).
 25. Pastrana B, Mautone AJ, Mendelsohn R. Fourier transform infrared studies of secondary structure and orientation of pulmonary surfactant SP-C and its effects on the dynamic surface properties of phospholipids. *Biochemistry* 1991;30:10058-10064.
 26. Takahashi A, Fujiwara T. Proteolipid in bovine lung surfactant: its role in surfactant function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;135:527-532.
 27. Yu SH, Possmayer F. Role of bovine pulmonary surfactant-associated proteins in the surface-active property of phospholipid mixtures. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1046:233-242.
 28. Cockshutt AM, Weitz J, Possmayer F. Pulmonary surfactant-associated protein A enhances the surface activity of lipid extract surfactant and reverses inhibition by blood proteins in vitro. *Biochemistry* 1990;29:8424-8429.
 29. Ross GF, et al. Phospholipid binding and biophysical activity of pulmonary surfactant-associated protein (SAP)-35 and its non-collagenous COOH-terminal domains. *J Biol Chem.* 1986;261:14283, 1986.
 30. Kuroki Y, Akino T. Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoyl phosphatidylcholine. *J Biol Chem.* 1991;266:3068-3073.
 31. Rice WR, Ross GF, Singleton FM, Dingle S, Whitsett JA. Surfactant-associated protein inhibits phospholipid secretion from type II cells. *J Appl Physiol.* 1987;63:692-698.
 32. Hallman M, Feldman B, Gluck. The absence of phosphatidylglycerol in surfactant. *Pediatr Res.* 1975;9:396.
 33. Wright JR, Wager RE, Hawgood S, Dobbs L, Clements JA. Surfactant apoprotein M_r = 26,000-36,000 enhances uptake of liposomes by type II cells. *J Biol Chem.* 1987;262:2888-2894.
 34. Lewis JF, Jobe AH. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1993;328:861-868.
 35. Young SL, Wright JR, Clements JA. Cellular uptake and processing of surfactant lipids and apoprotein SP-A by rat lung. *J Appl Physiol.* 1989;66:1336-1342.
 36. Griese M, Gobran LI, Rooney SA. Surfactant lipid uptake and secretion in type II cells in response to lecithins and secretagogues. *Am J Physiol.* 1991;261:L434-442.
 37. Bates SR, Dodia C, Fisher AB. Surfactant protein A regulates uptake of pulmonary surfactant by lung type II cells in microporous membranes. *Am J Physiol.* 1994;267:L753-L160.
 38. Baritussio A, et al. SP-A, SP-B and SP-C in surfactant subtypes around birth: reexamination of alveolar life cycle of surfactant. *Am J Physiol.* 1994;266:L436-L447.
 39. Rider ED, Jobe A. (1992) Catabolism and recycling of surfactant. In: Robertson B, van Golde LMG and Batenburg JJ, editors. Pulmonary surfactant, Elsevier, Amsterdam. pp. 313-338
 40. Pettenazzo A, Ikegami M, Seidner S, Jobe A. Clearance of surfactant phosphatidylcholine from adult rabbit lungs. *J Appl Physiol.* 1988;64:120-127.
 41. Hawgood S (1992) The hydrophilic surfactant protein SP-A: Molecular biology, structure and function. In: Robertson B, van Golde LMG and Batenburg JJ, editors. Pulmonary surfactant, Elsevier, Amsterdam. pp. 33-54
 42. Baybutt RC, Smith JE, Yeh YY. The effect of dietary fish oil on alveolar type II cell fatty acids and lung surfactant phospholipids. *Lipids.* 1993;28:167-172.
 43. Palombo JD, Lydon EE, Chen P-L, Bistrrian BR, Forse RA. Fatty acid composition of lung, macrophage and surfactant phospholipids after short-term enteral feeding with n-3 lipids. *Lipids* 1994;29:643-649.
 44. Ohashi T, Pinkerton K, Ikegami M, Jobe AH. Changes in alveolar surface area, surfactant protein A and saturated phosphatidylcholine with postnatal rat lung growth. *Pediatr Res.* 1994;35:685-689.

45. Doyle IR, Jones ME, Barr HA, et al. Composition of human pulmonary surfactant varies with exercise and level of fitness. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149:1619-1627.
46. Orgeig S, Barr HA, Nicholas TE. Effect of hyperpnea on the cholesterol to disaturated phospholipid ratio in alveolar surfactant in rats. *Exp Lung Res.* 1995;21:157-174.
47. Venkitaraman AR, Baatz JE, Whitsett JA, Hall SB, Notter RH. Biophysical inhibition of synthetic phospholipid-lung surfactant apoprotein admixtures by plasma proteins. *Chem Phys Lipids.* 1991;57:49-57.
48. Notter RH, et al. (1987). Biophysical activity of synthetic phospholipids combined with purified lung surfactant.
49. Revak SD, et al. Use of human surfactant low molecular weight (LMV) apoproteins in the reconstitution of surfactant biological activity. *J Clin Invest.* 1988;81:826.
50. Possmayer F. The role of surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142:749-752.
51. Possmayer F (1991). Biophysical activities of pulmonary surfactant *Fet Neonat Physiol.* 1991;459-962.
52. Goerke J, Clements JA (1986). Alveolar surface tension and Lung surfactant *In Handbook of Physiology, Section 3. The respirators system, Vol III, Part 1* (Fishman AP, et al., eds). Bethesda MD, American Physiological Society pp. 247-261.
53. Schürch S, Bachofen J, Goerke J, Possmayer F. A captive bubble method reproduces the in situ behavior of lung surfactant monolayers. *J Appl Physiol.* 1989;67:2389-2396.
54. Schürch S, Possmayer F, Chen S, Cockshutt AM (1992) Pulmonary SP-A enhances adsorption and appears to induce surface sorting of lipid extract surfactant. *Am J Physiol*263 (Lung Cell Mol Physiol 7): L210-L218.
55. Ebert JP, Grimes B, Niemann KM. Respiratory failure secondary to homologous blood transfusion. *Anesthesiology* 1985;63:104-6.
56. Morley C, Robertson B, Lachmann B, Nilsson R, Bangham A, Grossmann G, Miller N. Artificial surfactant and natural surfactant. Comparative study of the effects on premature rabbit lungs. *Arch Dis Child.* 1980;55:758-65.
57. Collaborative European Multicenter Study Group. Surfactant replacement therapy for severe neonatal respiratory distress syndrome: An international randomized clinical trial. *Pediatr.* 1988;82:683-691.
58. Hennes HM, Lee MB, Rimm AA, Shapiro DL (1991). Surfactant replacement therapy in respiratory distress syndrome. Meta-analysis of clinical trials of single-dose surfactant extracts. *Am J Dis Child* 145:102-4, Erratum in: *Am J Dis Child.* 1992;146:534.
59. Lewis JF, Ikegami M, Jobe AH, Tabor B. Aerosolized surfactant treatment of preterm lambs. *J Appl Physiol.* 1991;70:869-876.
60. Hamm H, Kroegel C, Hohlfeld J. Surfactant: a review of its functions and relevance in adult respiratory disorders. *Respir Med.* 1996;90:251-270.
61. Matalon S, Holm BA, Baker RR, Whitfield MK, Freeman BA. Characterization of antioxidant activities of pulmonary surfactant mixtures. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1035:121-127.
62. Wright JR. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev.* 1997;77:931-962.
63. Crouch E, Wright JR. Surfactant apoproteins A and D and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:521-554.
64. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet.* 1967;2:319-23.
65. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, LeGall JR, Morris A, Spragg R. The American-European Consensus Conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149:818-824.
66. Ware LB, Matthay MM. The Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med.* 2000;18:1334-1349.
67. Pison, U, Obertacke U, Seeger W, Hawgood S. Surfactant protein A (SP-A) is decreased in acute parenchymal lung injury associated with polytrauma. *Eur J Clin Invest.* 1992;22:712-718.
68. Fishman AP. Hypoxia on the pulmonary circulation. How and where it acts. *Circ Res.* 1976;38:221-31.
69. Bell RC, Coalson JJ, Smith JD, Johanson WG Jr. Multiple organ system failure and infection in adult respiratory distress syndrome. *ANN Intern Med.* 1983;99:293-8.

70. Milberg JA, Davis DR, Steinberg KP, Hudson LD. Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): 1983-1993 *JAMA*. 1995;273:306-9.
71. McHugh LG, Milberg JA, Whitcomb ME, Schoene RB, Maunder RJ, Hudson LD. Recovery of function in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150:90-4.
72. Pugin J, Verghese G, Widmer MC, Matthay MA. The alveolar space in the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 1999;27:304-12.
73. Spragg RG, Smith RM, Harris K, Lewis J, Häfner D, Germann P. Effect of recombinant SP-C surfactant in a porcine lavage model of acute lung injury. *J Appl Physiol*. 1999;88:674-681.
74. Lewis J, McCaig L, Häfner D, Spragg R, Veldhuizen R, Kerr C. Dosing and delivery of a recombinant surfactant in lung-injured adult sheep. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:741-747.
75. Häfner D, Beume R, Kilian U, Krasznai G, Lachmann B. Dose-response comparisons of five lung surfactant factor (LSF) preparations in an animal model of adult respiratory distress syndrome (ARDS). *Br J Pharmacol*. 1995;115:451-458.
76. Rooney SA, Young SL, Mendelson CR. Molecular and cellular processing of lung surfactant. *Faseb J*. 1994;8: 957-967.
77. Schmidt R, Steinhilber W, Ruppert C, Daum C, Grimminger F, Seeger W, Günther A. An ELISA technique for quantification of surfactant apoprotein (SP)-C in bronchoalveolar lavage fluids. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:470-474.
78. Schmidt R, Meier U, Yabut-Perez M, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W, Günther A. Alteration of fatty acid profiles in different pulmonary surfactant phospholipids in acute respiratory distress syndrome and severe pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:95-100.
79. Seeger W, Pison U, Buchhorn R, Obertacke U, Joka T. Surfactant abnormalities and adult respiratory failure. *Lung*. 1990;168:891-902.
80. Euler US, Liljestrang G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand*. 1946;12:301-20.
81. Pratt JF, Vollmer RT, Shelburne JD, Crapo JD. Pulmonary morphology in a multihospital collaborative extracorporeal membrane oxygenation projekt. I. Light microscopy. *Am J Pathol*. 1979;95:191-214.
82. Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures: protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*. 1974;110:556-65.
83. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema: respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137:1159-64.
84. Parker JC, Townsley MI, Rippe B, Taylor AE, Thigpen J. Increased microvascular permeability in dog lungs due to high peak airway pressures. *J Appl Physiol* 1984;57:1809-16.
85. Corbridge TC, Wood LDH, Crawford GP, Chudoba MJ, Yanos J, Sznajder JJ. Adverse effects of large tidal volumes and low PEEP in canine acid aspiration. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142:311-5.
86. Slutsky AS, Tremblay LN. Multiple system organ failure: is mechanical ventilation a contributing factor? *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1721-5.
87. Ranieri VM, Sutter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Slutsky AS. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA*. 1999;282:54-61.
88. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000;342:1301-1308.
89. Petty TL, Ashbaugh DG. The adult respiratory distress syndrome: clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. *Chest*. 1971;60:233-9.
90. Falke KJ, Pontoppidan H, Kumar A, Leith DE, Geffin B, Laver MB. Ventilation with end-expiratory pressure in acute lung disease. *J Clin Invest*. 1972;51:2315-23.

91. Kopp R, Rossaint R. EBM in ARDS: Was ist wirklich gesichert? *Intensivmed.* 2003;40:34-41.
92. Walmrath D, Günther A, Ghofrani HA, Schermuly R, Schneider T, Grimminger F, Seeger W. Bronchoscopic surfactant administration in patients with severe adult respiratory distress syndrome and sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:57-62.
93. Anzueto A, Baughman R, Guntupalli KK, Weg JG, Wiedemann HP, Raventos AA, Lemaire F, Long W, Zaccardelli DS, Pattishall EN. Aerosolized surfactants in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 1996;334:1417-1421.
94. Gregory TJ, Steinberg KP, Spragg R, Gadek JE, Hyers TM, Longmore WJ, Moxley MA, Cai GZ, Hite RD, Smith RM, Hudson LD, Crim C, Newton P, Mitchell BR, Gold AJ. Bovine surfactant therapy for patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155:1309-1315.
95. Walmrath D, De Vaal JB, Bruining HA, Kilian JG, Papazian L, Hohlfeld J, Vogelmeier C, Wurst W, Schaffer P, Rathgeb F, Grimminger F, Seeger W. Treatment of ARDS with a recombinant SP-C (rSP-C) based synthetic surfactant [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:A 379.
96. Spragg RG, Gilliard N, Richman P, Smith RM, Hite RD, Pappert D, Robertson B, Curstedt T, Strayer D. Acute effects of a single dose of porcine surfactant on patients with the adult respiratory distress syndrome. *Chest.* 1994;105:195-202.
97. Lamm WJ, Albert RK. Surfactant replacement improves lung recoil in rabbit lungs after acid aspiration. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142:1279-1283.
98. Strohmaier W, Redl H, Schlag G. Studies of the potential role of a semisynthetic surfactant preparation in an experimental aspiration trauma in rabbits. *Exp Lung Res.* 1990;16:101-110.
99. Van Daal GJ, Bos JA, Eijking EP, Gommers D, Hannappel E, Lachmann B. Surfactant replacement therapy improves pulmonary mechanics in end-stage influenza A pneumonia in mice. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145:859-863.
100. Song GW, Robertson B, Curstedt T, Gan XZ, Huang WX. Surfactant treatment in experimental Escherichia coli pneumonia. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1996;40:1154-1160.
101. Zelter M, Escudier BJ, Hoeffel JM, Murray JF. Effects of aerosolized artificial surfactant on repeated oleic acid injury in sheep. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141:1014-1019.
102. Spragg RJ, Lewis JF, Walmrath HD, Johannigman J, Bellingan G, Laterre PF, Witte MC, Richards GA, Rippin G, Rathgeb F, Häfner D, Taut FJ, Seeger W. Effect of recombinant surfactant protein C-based surfactant on the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2004;351:884-92.
103. Levy MM. PEEP in ARDS- How much is enough? *N Eng J Med.* 2004;351;4: 389-391.
104. Gortner L, Bernsau U, Hellwege HH, Hieronimi G, Jorch G, Reiter HL. A multicenter randomized controlled clinical trial of bovine surfactant for prevention of respiratory distress syndrome. *Lung.* 1990;168:864-869.
105. Honda Y, Tsunematsu K, Suzuki A, Akino T. Changes in phospholipids in bronchoalveolar lavage fluids of patients with interstitial diseases. *Lung.* 1988;166:293-301.
106. Fujita Y, Kogishi K, Suzuki Y. Pulmonary damage induced in mice by a monoclonal antibody to proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Exp Lung Res.* 1988;14:247-60.
107. Strong P, Kishore U, Morgan C, Lopez Bernal A, Singh M, Reid KB. A novel method of purifying lung surfactant proteins A and D from the lung lavage of alveolar proteinosis patients and from pooled amniotic fluid. *J Immunol Methods.* 1998; 220:139-49.
108. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37: 911-917.
109. 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.
110. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;19:265-275.
111. Gustavsson L. Densitometric quantification of individual phospholipids. Improvement and evaluation of a method using molybdenum blue reagent for detection. *J Chromatogr.* 1986;375:255-266.
112. Wright RS. A reagent for the non-destructive location of steroids and some other lipophilic materials on silica gel thin-layer chromatograms. *J Chromatogr.* 1971;59:220-221.

113. Ruestow B, Schlame M, Haupt R, Wilhelm D, Kunze D. Studies on the formation of dipalmitoyl species of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in pulmonary type II cells. *Biochem J.* 1992;282: 453-458.
114. Rabe H, Reichmann G, Nakagawa Y, Rüstow B, Kunze D. Separation of alkylacyl and diacyl glycerophospholipids and their molecular species as naphthylurethanes by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1989;493: 353-360.
115. Enhorning G. Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. *J Appl Physiol.* 1977;43:198-203.

10. Danksagung

Mein Dank gilt in besonderer Weise Herrn Professor Dr. med. Werner Seeger für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und Überlassung dieses Themas sowie für das entgegengebrachte Vertrauen.

Insbesondere danke ich meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Andreas Günther für die ausgesprochen gute Betreuung und Hilfestellung bei der Realisierung dieser Dissertation. Seine Professionalität, seine menschlichen Qualitäten und sein stetiges Engagement haben ihn für mich zu einem unschätzbaren Ratgeber und Vorbild werden lassen.

Besonders danken möchte ich Frau Sabine Heinemann, die mir stets eine freundliche, kompetente und ermutigende Hilfe bei der Durchführung von Laborarbeiten war. In diesem Rahmen geht mein Dank ebenfalls an Dr. rer.nat. Reinhold Schmidt für seine freundliche und kompetente Unterstützung der Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. med. Simon Little für seine Unterstützung bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Gießen und speziell der Medizinischen Intensivstation für die freundliche Unterstützung und das rege Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Insbesondere herzlich danke ich meiner Frau Silke für ihre Geduld und ihre stete liebevolle Unterstützung sowie ihr gütiges Verständnis zu jeder Zeit und in allen Bereichen.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Mutter, ohne deren Hilfe ein Studium der Medizin und somit auch die Durchführung dieser Arbeit nur unter erschwerten Bedingungen möglich gewesen wäre.

11. Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

- Name: Thorsten Colaris
- Familienstand: verheiratet, eine Tochter
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsdatum/-ort: 22.12.1976 in Würselen/Kreis Aachen

SCHULBILDUNG

1983 - 1987 Grundschule in Alsdorf-Ofden/Kreis Aachen
1987 - 1993 Realschule der Stadt Alsdorf
1993 - 1996 Gymnasium der Stadt Alsdorf
1996 Abitur

GESETZLICHER WEHRDIENST

1996 - 1997: Als Sanitätssoldat im internationalen Truppenteil der „Medical Squadron“ der NATO-Airbase/ Geilenkirchen mit zwei Auslandseinsätzen

STUDIUM

Vom WS 1997/98 bis WS 2003/2004 an der Justus-Liebig-Universität Giessen

- Physikum im September 1999
- 1. Staatsexamen im August 2000
- 2. Staatsexamen im September 2002
- Praktisches Jahr 10/02 -10/03
- 3. Staatsexamen im November 2003

FAMULATUREN

- zwei Monate an der Medizinischen Klinik (Pulmologie) des Uniklinikums Giessen
- einen Monat in der Praxis für Anaesthesiologie Dr. Kappel/Ferenczy-Kappel in Herzogenrath
- einen Monat am St.-Josefs-Krankenhaus in Giessen/Abteilung für Anaesthesiologie

TÄTIGKEITEN NEBEN DEM STUDIUM

- Nebentätigkeit als „Sitzwache“ (09/98-09/03) auf der Intensivstation der Medizinischen Klinik der JLU-Giessen.
- Tätigkeit als studentischer Studienassistent (1999-2001) der klinischen Phase III- Studie BYK 2001 Venticute®)
- 1999-2001: Praktischer Abschnitt zu dieser Doktorarbeit

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

- 12/03-09/04 als Arzt im Praktikum am Universitätsklinikum Giessen in der Abteilung Anaesthesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie
- Seit 10/04 als Assistenzarzt der o.g. Abteilung

SPRACHKENNTNISSE

Englisch (fließend), Französisch (Schulkenntnisse), Spanisch (zwei Intensivsprachkurse)

HOBBIES

Handball, Bergwandern, Reisen und Kochen