

# Untersuchungen zur zentralen Rolle des Surfactant-Proteins B beim extrazellulären Surfactantmetabolismus *in vitro* und beim ARDS

---

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

vorgelegt von            Andreas Gunter Feustel  
aus                            München

Gießen                    2003

édition scientifique  
**WB LAUFERSWEILER VERLAG**

ISBN 3-89687-649-X

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2003

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2003

© 2003 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wetttenberg  
Printed in Germany

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE  
[www.vvb-ips.de](http://www.vvb-ips.de)

Untersuchungen zur zentralen Rolle des Surfactant-Proteins B beim  
extrazellulären Surfactantmetabolismus *in vitro* und beim ARDS

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

vorgelegt von  
Andreas Gunter Feustel  
aus München

Gießen 2003

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

Gutachter: PD Dr. Günther  
Gutachter: Prof. Dr. Gortner

Tag der Disputation: 14.10.2003

Meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Das pulmonale Surfactantsystem	1
1.1.1.	Die Zusammensetzung des pulmonalen Surfactantsystems	1
1.1.1.1.	Lipide	2
1.1.1.2.	Proteine	4
1.1.2.	Der Metabolismus des pulmonalen Surfactants	8
1.1.3.	Die Funktion des pulmonalen Surfactants	13
1.1.4.	Die Pathophysiologie des Surfactantsystems am Beispiel des ARDS	16
<b>2.</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>19</b>
<b>3.</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>20</b>
3.1.	Materialien	20
3.1.1.	Labortechnische Geräte	20
3.1.2.	Chemikalien	20
3.2.	Methoden	21
3.2.1.	Bronchoalveoläre Lavage bei Patienten mit ARDS und bei gesunden Probanden	21
3.2.2.	Bronchoalveoläre Lavage beim Kaninchen	22
3.2.3.	Gewinnung von <i>large surfactant aggregates</i> (LSA)	23
3.2.4.	Biophysikalische Charakterisierung	23
3.2.5.	Durchführung der <i>in vitro</i> Konversion	25
3.2.6.	Separation und Quantifizierung von Surfactantsubklassen	25
3.2.7.	Lipidextraktion nach Bligh und Dyer	26
3.2.8.	Colorimetrische Phosphatbestimmung zur quantitativen Bestimmung des Phospholipidgehaltes	27
3.2.9.	Dünnschichtchromatographische Analyse der Phospholipidklassen	27
3.2.9.1.	Auftrennung der Phospholipide mittels Dünnschichtchromatographie	28

3.2.9.2.	Quantifizierung der Phospholipidklassen	29
3.2.10.	Dünnschichtchromatographische Bestimmung der Neutrallipide	31
3.2.10.1.	Dünnschichtchromatographische Trennung in Neutral- und Phospholipide	31
3.2.10.2.	Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Neutrallipide	32
3.2.10.3.	Detektion und Recovery der Neutrallipide	33
3.2.11.	Gaschromatographische Analyse der Gesamtlipid-Fettsäuren	35
3.2.11.1.	Probenvorbereitung bei der Fettsäureanalyse aus Gesamtlipiden	35
3.2.11.2.	Herstellung des Methylierungsreagenzes (2 N HCl in Methanol)	36
3.2.11.3.	Gaschromatographische Bedingungen	37
3.2.12.	SP-B ELISA	41
3.2.13.	Sekundäre Rekonstitution einer bronchoalveolären Kaninchenlavage mit Surfactantprotein B nach <i>in vitro</i> Konversion	42
3.2.14.	Statistik	43
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
4.1.	Einfluss zyklischer Oberflächenänderungen von bronchoalveolärer Kaninchenlavage auf die biophysikalischen und biochemischen Surfactantparameter	44
4.1.1.	Einfluss der <i>in vitro</i> Konversion auf die Verteilung der Surfactant-subklassen und deren biophysikalische Eigenschaften	44
4.1.2.	Einfluss der <i>in vitro</i> Konversion auf das Phospholipidprofil	49
4.1.3.	Einfluss der <i>in vitro</i> Konversion auf das Fettsäureprofil der Phospholipidklassen	51
4.1.4.	Einfluss der <i>in vitro</i> Konversion auf das Neutrallipidprofil	54
4.1.5.	Einfluss der <i>in vitro</i> Konversion auf den Apoproteingehalt	55
4.1.5.1.	Beeinflussung des SP-B-Gehaltes durch <i>in vitro</i> Konversion	55
4.1.5.2.	Verifizierung der Methode	59
4.1.6.	Einfluss einer sekundären Rekonstitution mit SP-B auf die Oberflächenaktivität der <i>large surfactant aggregates</i> nach <i>in vitro</i> Konversion	60
4.1.7.	Vergleichende Analysen bronchoalveolärer Lavagen gesunder Personen und der von ARDS-Patienten	61

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
5.1.	Methodische Aspekte	62
5.2.	Analyse der Lipidzusammensetzung der Surfactantsubfraktionen nach <i>in vitro</i> Konversion	65
5.3.	Ergebnisse der Surfactantprotein-B-Analysen der Subfraktionen nach <i>in vitro</i> Konversion und sekundäre Rekonstitutionsversuche mit Surfactantprotein B	68
5.4.	Ansätze zur Identifizierung der Surfactant-Konvertase	70
5.5.	Ergebnisse der vergleichenden Analysen bronchoalveolärer Lavagen gesunder Personen mit der von ARDS-Patienten	72
5.6.	Bisherige Therapieansatz und therapeutische Perspektiven beim <i>acute respiratory distress syndrome</i>	74
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>95</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>97</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>98</b>



# 1. Einleitung

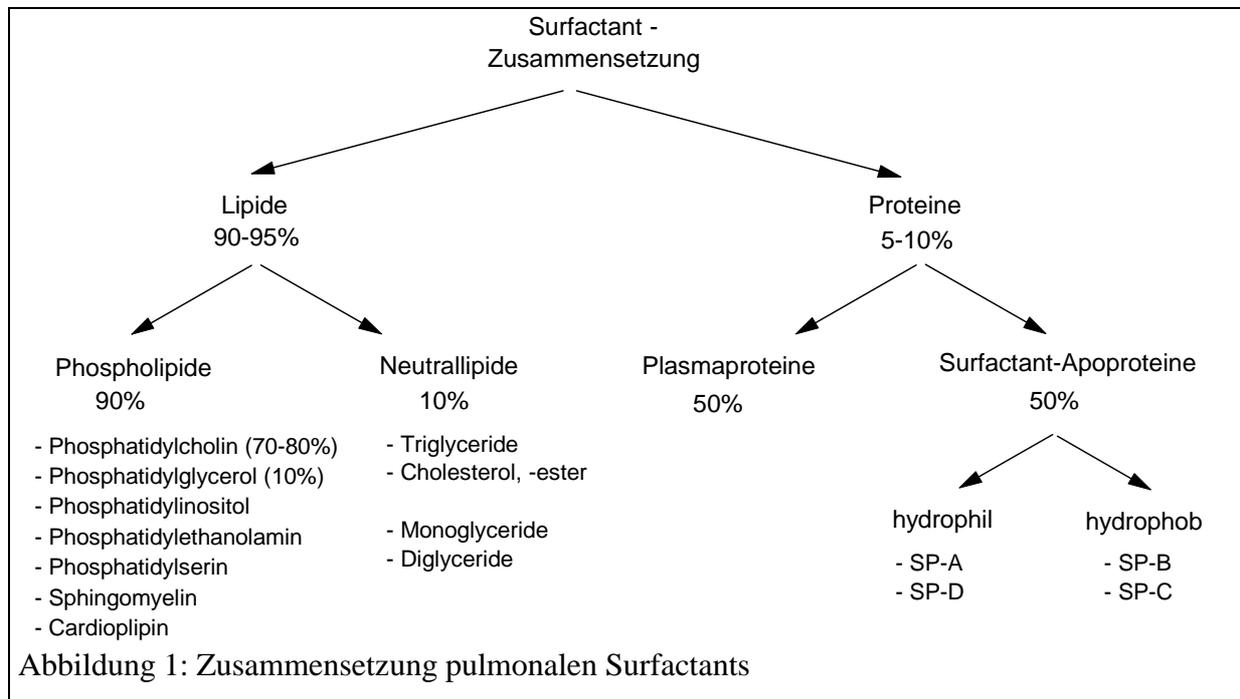
## 1.1. Das pulmonale Surfactantsystem

Bei allen Säugern erfolgt der Austausch der Atemgase über die pulmonale Endstrecke (alveoläres Epithel – Interstitium – vaskuläres Endothel). Die Anzahl der Alveolen wird beim Menschen auf etwa 300 Millionen, ihre Gesamtoberfläche auf etwa 80 m<sup>2</sup> geschätzt. Die Alveolen, deren Durchmesser etwa 0,2-0,3 mm betragen, sind von einem dünnen, oberflächenaktiven Lipoproteingemisch, dem pulmonalen Surfactant, überzogen. Die Gegenwart des Surfactants an der Luft/Wasser Grenzfläche der Alveolen verhindert durch Senkung der alveolären Oberflächenspannung deren Kollaps vor allem in der Endexpirationsphase und ermöglicht somit die Atmung bei normalen transthorakalen Drücken. Ein Mangel an pulmonalem Surfactant verursacht eine Störung des alveolären Gasaustausches, wie es z.B. beim Atemnotsyndrom des Neugeborenen (*infant respiratory distress syndrome*, IRDS) beobachtet werden kann [1]. In der Pathogenese des akuten Lungenversagens des Erwachsenen (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS) hingegen tragen eher Veränderungen der Surfactantkomposition und die Inaktivierung des Surfactants durch Fremdkomponenten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der akuten respiratorischen Insuffizienz.

### 1.1.1. Die Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants

Als Ausgangsmaterial für lipid- und proteinchemische Analysen der Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants dient in der Regel der zellfreie Überstand humaner bzw. tierischer bronchoalveolärer Lavageflüssigkeiten (BALF). Der so gewonnene Surfactant besteht zu etwa 90 % aus Lipiden und zu etwa 10 % aus Proteinen. Den Hauptanteil der Lipidfraktion stellen mit ca. 90 % die Phospholipide dar. Neutrallipide machen etwa 10 % des Lipidanteils aus. Etwa die Hälfte des Proteinanteiles lässt sich den surfactantspezifischen Apoproteinen SP-A, SP-B, SP-C und SP-D (Nomenklatur nach Possmayer et al. [5]) zuordnen. Surfactantunspezifische, plasma-assoziierte Proteine wie Albumin, Immunglobuline und Lysozym ergänzen den Proteinanteil (siehe Abb. 1). Die Lipidzusammensetzung der ultrastrukturell

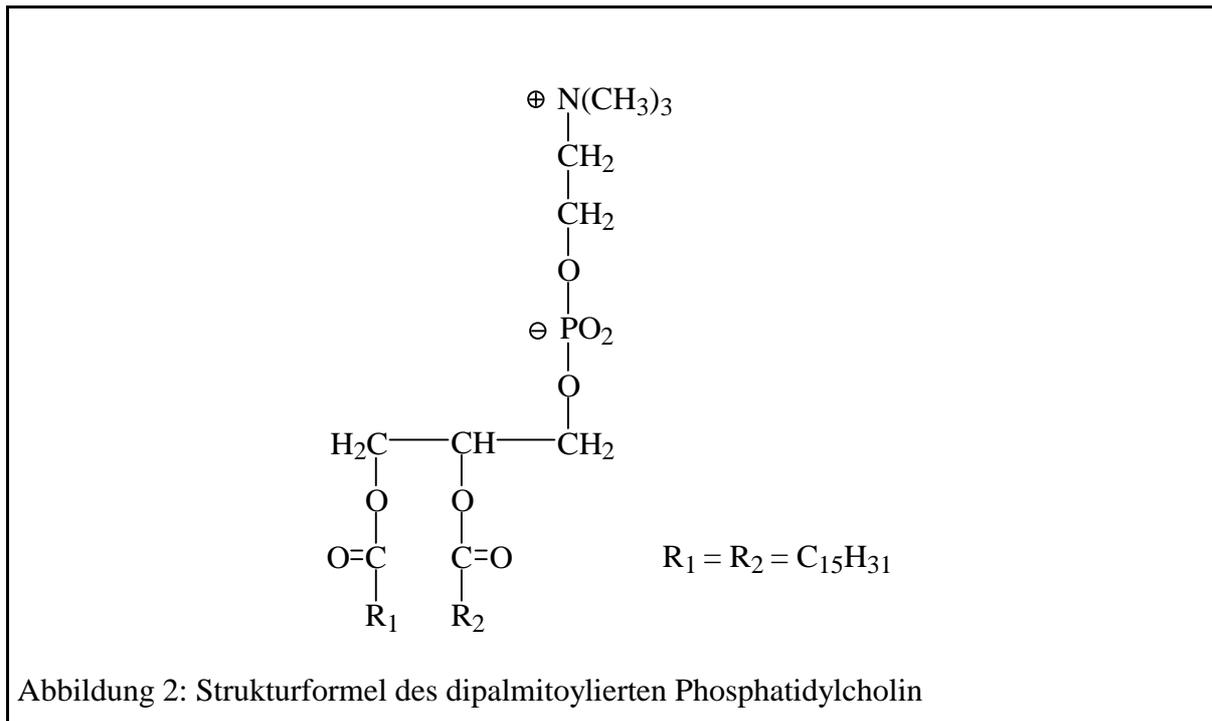
verschiedenen intra- und extrazellulären Erscheinungsformen pulmonalen Surfactants zeigt zum Teil erhebliche Unterschiede auf [6, 7].



Auch der Proteingehalt der verschiedenen Surfactant-Subklassen scheint variabel zu sein [8, 9], was einen besonderen Stellenwert der Apoproteine bezüglich Struktur und Funktion der einzelnen Subklassen vermuten lässt.

### 1.1.1.1. Lipide

Lipide bilden mit ca. 90 % den Hauptbestandteil der Surfactanttrockenmasse. Einen geringen, ca. 10 %igen Anteil, stellen die Neutrallipide mit den Hauptvertretern Cholesterol, freie Fettsäuren und Triglyceride dar [10]. Mit 80-90 % dominiert die Klasse der Phospholipide, unter denen quantitativ Phosphatidylcholin (PC, Lecithin, 80 %, [11, 12, 13, 14]) und Phosphatidylglycerol (PG, 4 - 10 % [11, 12, 13, 14]) vorherrschen. Die charakteristische Struktur der Phospholipide ist ein Glycerol-Grundkörper mit einer polaren Kopfgruppe am C-3-Atom sowie zwei apolare Fettsäureester an den C-Atomen 1 und 2. Schätzungsweise 40-50 % des Phosphatidylcholins (PC) liegt mit zwei gesättigten Fettsäureestern in dipalmitoylierter Form als Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) vor.



Phosphatidylglycerol ist überwiegend mit der Ölsäure substituiert (30–50 %), als weiterer häufiger Fettsäurebestandteil imponiert die Palmitinsäure (20-30 %). Neben Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylglycerol (PG) komplettieren Phosphatidylethanolamin (PE, ca. 2-4 %), Phosphatidylinositol (PI, ca. 2-4 %) und Phosphatidylserin (PS) sowie Lysophosphatidylcholin (LPC) und Sphingomyelin (SPH) mit jeweils weniger als 2 % die Klasse der Phospholipide [15]. Die Synthese der Surfactant-Phospholipide findet ausschließlich in der Typ-II-Alveolarepithelzelle statt [1]. Phosphatidylcholin wird *de novo* aus Phosphatidatpräkursoren synthetisiert. Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym ist hierbei die Phosphocholincytydyltransferase. Für den außergewöhnlich hohen Palmitoylierungsgrad scheint unter anderem auch ein Deacylierungs-Reacylierungsweg verantwortlich zu sein. Obwohl Neutrallipide das biophysikalische Verhalten einer synthetisch hergestellten Phospholipidmischung *in vitro* beeinflussen können, ist deren Rolle für die Surfactantfunktion noch weitgehend unklar. Es bestehen jedoch Hinweise, dass Neutrallipide das Spreizungsverhalten des Surfactants in der Alveole positiv beeinflussen. Daten über mögliche Veränderungen der Phospholipid- und Neutrallipidkomposition sowie des Fettsäureprofils pulmonalen Surfactants unter zyklischen Oberflächenänderungen existieren bislang noch nicht.

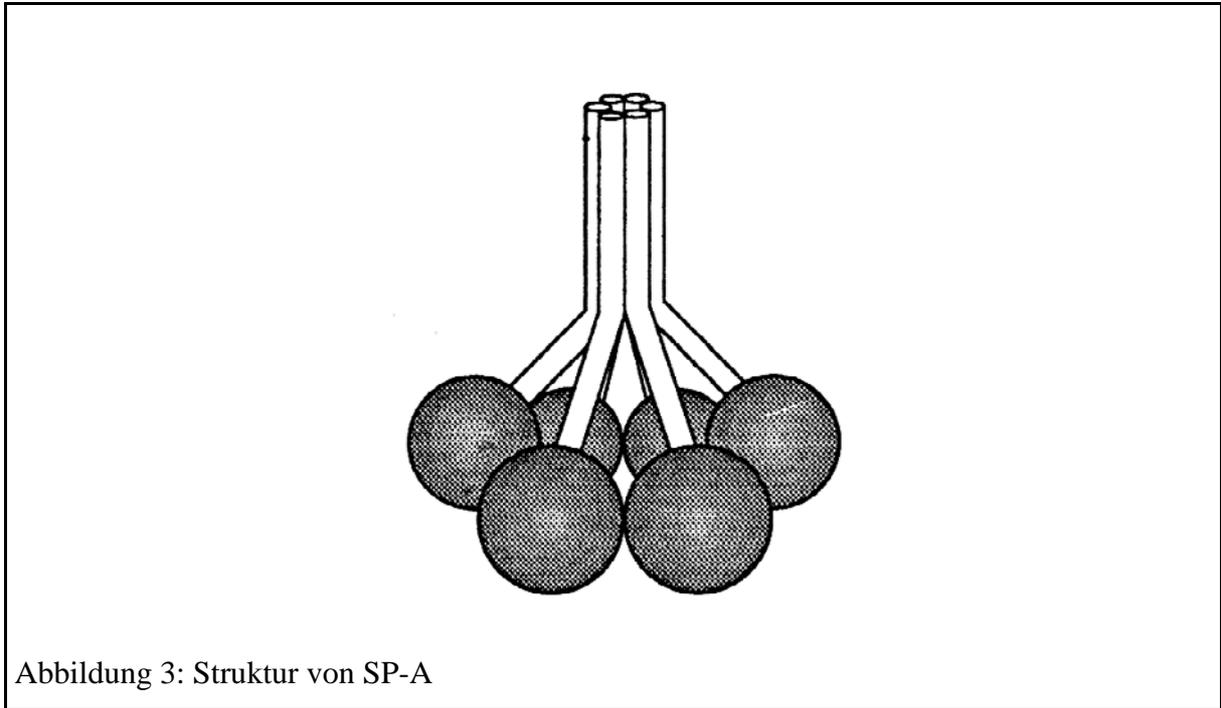
### 1.1.1.2. Proteine

Bisher konnten zwei hydrophile (SP-A und SP-D) und zwei hydrophobe (SP-B und SP-C) Surfactantproteine isoliert werden. Die hydrophilen Apoproteine SP-A und SP-D gehören einer Subgruppe von Lectinen an, welche nur bei Säugern gefunden und als sogenannte Kollektine (C-Typ-Lectine, Gruppe III) bezeichnet werden. Die Beschreibung hydrophober Surfactantproteine gelang zum ersten Mal durch Phizackerley et al. [16]. Durch ihre ausgeprägte Hydrophobizität sind sie nur in organischen Solventien wie z.B. Chloroform/Methanol oder Acetonitril/Wasser-Mischungen löslich. Der relative Anteil der vier Surfactantproteine an der Surfactant-Trockenmasse liegt bei ca. 5-8 %.

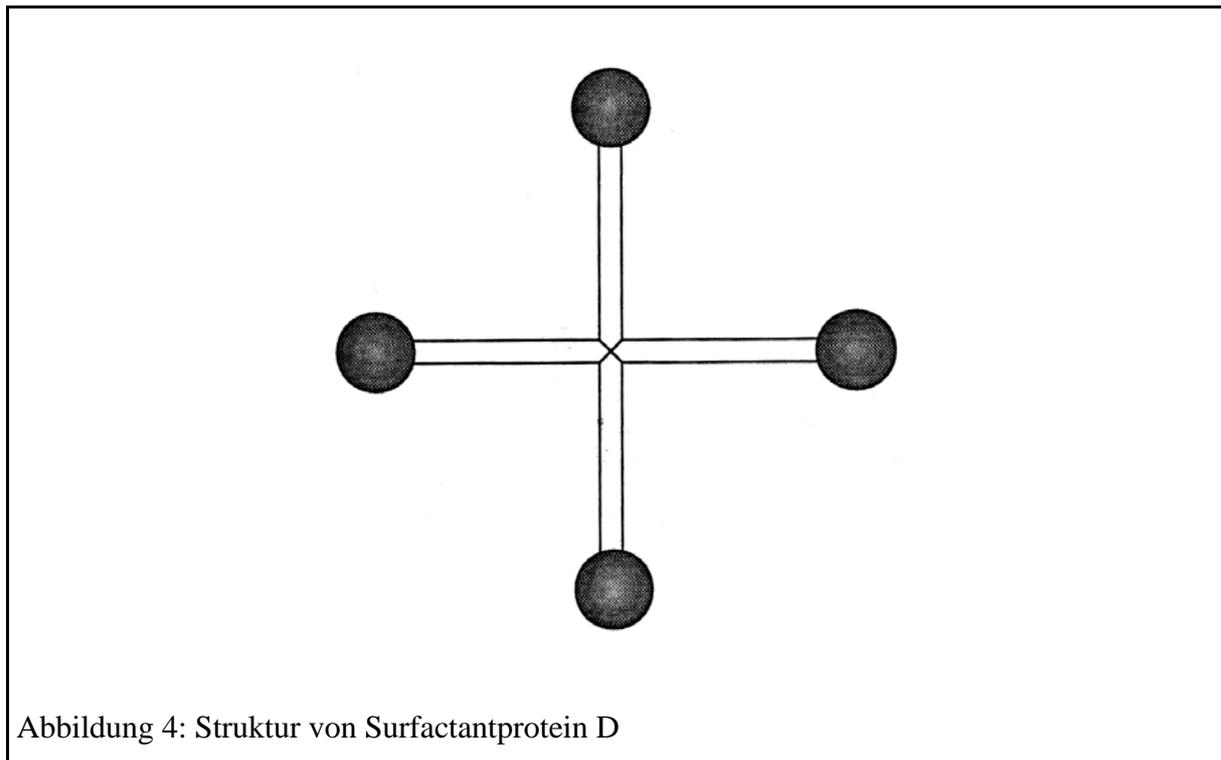
#### SP-A und SP-D

Die zu den Kollektinen gehörenden hydrophilen Apoproteine SP-A und SP-D zählen zu einer Gruppe wasserlöslicher Proteine, welche aus Oligomeren mit einer COOH-terminalen Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne und einer NH<sub>2</sub>-terminalen kollagenähnlichen Domäne bestehen. SP-A besitzt eine sogenannte Bouquet- bzw. "Blumenstraußform" aus 18 Monomeren (siehe Abb. 3), SP-D eine aus 12 Monomeren (siehe Abb. 4) bestehende kreuzförmige Anordnung [17, 18]. Humanes SP-A wird von 2 unterschiedlichen Genen auf Chromosom 10 kodiert [19, 20, 21]. Das primäre Translationsprodukt des humanen SP-A umfasst 248 Aminosäuren und besitzt in seiner monomeren Form eine molekulare Masse von 28-36 kDa [22, 23, 24]. Die Primärstruktur des SP-A umfasst vier Domänen: Eine amino-terminale Domäne, eine kollagenartige Domäne, eine sog. "neck"-Domäne und eine Domäne mit der Fähigkeit Kohlenhydrate zu erkennen (*carbohydrate recognition domain*, CRD). Das amino-terminale Segment besteht aus 7 AS mit einem Cystein in Position 6, über welches wahrscheinlich Disulfidbindungen zu anderen Monomeren für die Ausbildung von Oligomeren hergestellt werden. Es folgt ein sehr wahrscheinlich als Triple-Helix vorliegendes, 73 AS langes, kollagenähnliches Segment mit 23 bis 24 Gly-X-Y-Triplets und eine 148 AS lange carboxyterminale Region (CRD) mit der Fähigkeit, Calcium-abhängig Kohlenhydrate binden zu können. Wie gezeigt werden konnte, handelt es sich bei der Y-Komponente der Gly-X-Y-Triplets häufig um 4-Hydroxyprolin [25, 26]. Zwischen Position 135 und 226 sowie zwischen Position 204 und 218 bestehen zwei intramolekulare

Disulfidbrücken [27]. Die funktionelle Form des SP-A setzt sich aus 18 Monomeren, welche zu 3 x 6 Trimeren zusammengelagert sind, zusammen.



Analog zu SP-A ist auch das SP-D ein hydrophiles, kollagenähnliches Glykoprotein, welches in der Typ-II-Alveolarzelle und den pulmonalen Clarazellen synthetisiert, jedoch nicht ausschließlich dort gefunden wird [28, 29]. SP-D mRNA konnte ebenfalls im Gewebe des Gastrointestinaltraktes verschiedener Spezies gefunden werden [30]. Weniger als 10 % des SP-D sind mit Surfactant-Phospholipiden assoziiert, was dessen Rolle als spezifisches Surfactant-Apoprotein anfänglich in Frage stellte [28]. Die SP-D Polypeptidkette besteht aus 355 Aminosäuren und besitzt unter reduzierten Bedingungen eine molekulare Masse von 43 kDa. Analog zu anderen C-Typ-Lectinen wie SP-A oder Konglutinin, besteht die monomere Untereinheit des SP-D aus vier Regionen. Auf eine kurze, amino-terminale Einheit aus 25 AS mit 2 Cysteinen folgt eine kollagenartige Domäne mit 59 kontinuierlichen Gly-X-Y Triplets entsprechend 177 AS, eine kurze "neck"-Region und C-terminal schließlich eine hydrophile, 153 AS lange Kohlenhydrat-erkennende Domäne (CRD) [31, 32].



### SP-B

Das Surfactant-Apoprotein B (SP-B) gehört zu den stark hydrophoben, basischen Proteinen (siehe Abb. 5). Es besitzt als Monomer eine Molekularmasse von ca. 9 kDa und liegt unter physiologischen Bedingungen zu über 90 % als Dimer vor [33]. Sieben seiner 79 Aminosäuren sind Cysteine, wovon sechs der Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken (Cys-8-Cys-77; Cys-11-Cys-71; Cys-35-Cys-46) dienen. Das siebte Cystein in Position 48 disponiert zur Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbindung zum Homodimer. Das humane SP-B-Gen ist auf dem Chromosom 2 lokalisiert [34] und wird sowohl von den alveolären Typ-II-Zellen als auch den Clara-Zellen exprimiert [35]. In nicht-pulmonalem Gewebe konnte bisher keine SP-B mRNA nachgewiesen werden [36]. Primäres Translationsprodukt ist ein 42 kDa großes, 381 Aminosäuren langes Proprotein [37, 38, 39]. Mittels ausgedehnter posttranslatorischer Modifikationen wie proteolytischer Abspaltung der glycosylierten amino- (200 Aminosäuren) und carboxyterminalen (102 Aminosäuren) Sequenzen entsteht das aktive Protein [39, 37, 40, 41]. Als Protease konnte bisher eine Kathepsin-D-ähnliche Protease [42] nachgewiesen werden. Die Spaltung findet sehr wahrscheinlich im endosomalen oder lysosomalen Zellkompartiment statt [43]. Natives SP-B konnte bisher nur in Lamellar-Körperchen der Typ-II-Zellen identifiziert werden [44].

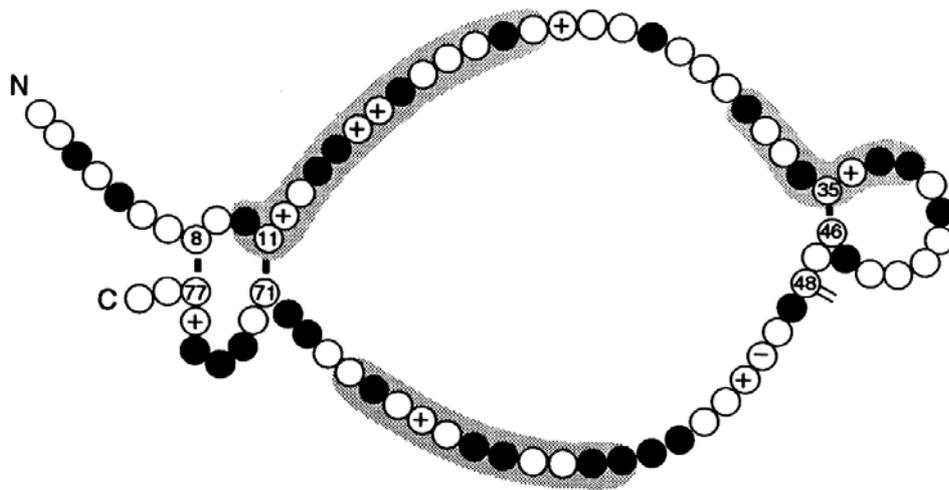


Abbildung 5: Tertiärstruktur von humanem Surfactantprotein B

Beim Menschen findet sich regelmäßig Cys-48, welches für die Ausbildung zum Homodimer verantwortlich ist. Aliphatische Aminosäuren sind durch einen geschlossenen Kreis, die geladenen Aminosäuren durch ihre Ladung gekennzeichnet.

## SP-C

Das nur 33-35 AS große SP-C besitzt eine Molekülmasse von 4-6 kDa und ist somit ein relativ kleines Peptid (siehe Abb. 6). Seine extreme Hydrophobizität ist unter anderem durch eine am carboxyterminalen Ende lokalisierte, kontinuierliche Kette von 23 hydrophoben Aminosäuren gekennzeichnet. Hierunter befindet sich eine Abfolge von 6 aufeinanderfolgenden Valin-Resten. Die Sekundärstruktur dieser hydrophoben Proteindomäne bildet eine  $\alpha$ -Helix [45, 46], welche sich in Verbindung mit einem Phospholipidfilm parallel zu dessen Fettsäureketten ausrichten kann [47]. Die posttranslationale Palmitoylierung eines (beim Kaninchen) oder beider (beim Menschen) Cystein-Reste in Position 5 und 6 über eine Thioesterbindung verstärkt den hydrophoben Charakter des Proteins [48]. Die hydrophilen, positiv geladenen Aminosäuren (Lysin und Arginin in Position 11 bzw. 12) am aminoterminalen Ende ermöglichen die Bindung des Proteins an negativ geladene Phospholipide [49]. SP-C wird aus einem 197 Aminosäuren großen und 21 kDa schweren Translationsprodukt prozessiert [43, 50, 51]. Das Gen für SP-C liegt beim Menschen auf dem Chromosom 8 [40]. Bisher konnten sowohl monomere als auch dimere Formen des SP-C isoliert werden, wobei die monomere Form unter physiologischen Bedingungen vorzuliegen scheint.

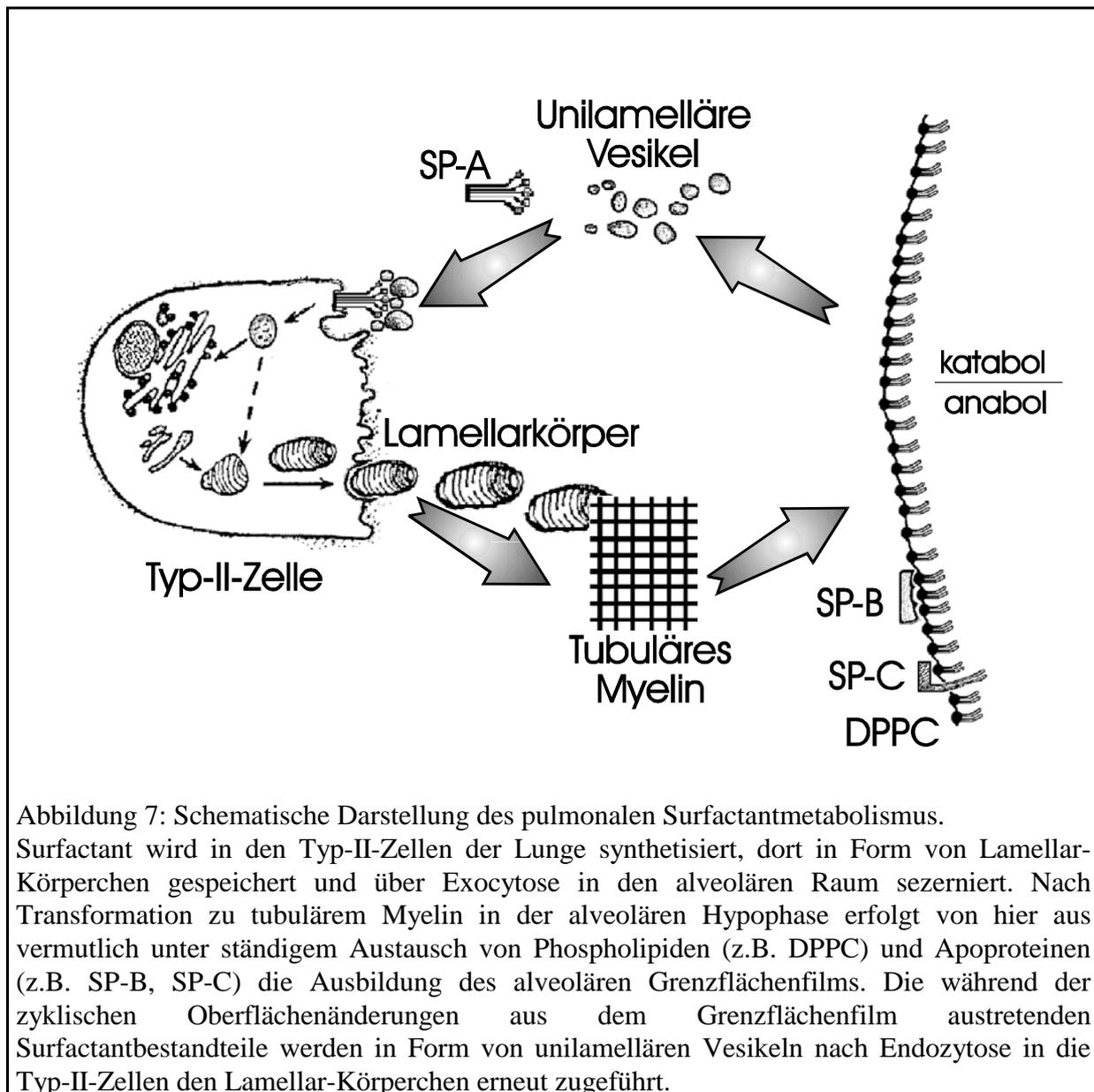


Abbildung 6: Sekundärstruktur von humanem Surfactantprotein C

Die Cystein-Reste in Position 5 und 6 sind über eine Thioesterbindung palmitoyliert. Geladene Aminosäuren in Position 11 und 12 sind durch ihre Ladung gekennzeichnet. Carboxyterminal zeigt sich ein kontinuierliches, hydrophobes Band von 23 Aminosäuren, in welchem sich eine Sequenz von aufeinanderfolgenden Leucin-, Isoleucin- und Valin-Resten (geschlossene Kreise) darstellt. Die hydrophobe Domäne des Proteins bildet eine  $\alpha$ -Helix aus.

### 1.1.2. Der Metabolismus des pulmonalen Surfactants

Die Synthese der Surfactantkomponenten findet in den kubischen Typ-II-Zellen der Lunge statt. Sie liegen zwischen den flachen Typ-I-Alveolarepithelzellen und sind mit diesen durch Desmosomen und *tight junctions* verbunden. Zytologisch handelt es sich bei den Typ-II-Zellen um sezernierende Zellen mit einem gut entwickelten Golgi-Apparat, reichlich rauhem endoplasmatischem Retikulum, Ribosomen und Mitochondrien. An ihrer freien apikalen Oberfläche besitzen sie einen Mikrovillisaum. Zwei große Surfactant-Pools können voneinander unterschieden werden: ein intrazelluläres und ein extrazelluläres Surfactant-Kompartiment. Beide Kompartimente stehen in engem bidirektionalem Austausch und gewährleisten somit unter physiologischen Bedingungen ein situativ angepasstes, ökonomisches Biofeedback-System anaboler und kataboler Vorgänge.



### Intrazelluläres Surfactant-Kompartiment

Die Speicherform des intrazellulären Surfactants stellen spezialisierte, sekretorische Zellorganellen der Typ-II-Zelle, sogenannte Lamellar-Körperchen (LK) dar. Lamellar-Körperchen besitzen eine rundlich-ovale Form und haben einen Durchmesser von ca. 0,2-1  $\mu\text{m}$ . Die geschätzte Anzahl pro Typ-II-Zelle beträgt in etwa 100 bis 150 [52]. Neben Phospholipiden (z.B. 85 % des intrazellulären DPPC [53]) enthalten sie die surfactantspezifischen Apoproteine SP-A, SP-B und SP-C sowie Glycosaminoglykane und eine Vielzahl weiterer Proteine und lysosomaler Enzyme. Sowohl Phospholipide als auch Apoproteine werden im endoplasmatischen Retikulum biosynthetisiert [54, 55, 56] und

gelangen direkt oder unter Zwischenschaltung von multivesikulären Körperchen (MV) vom Golgi-Apparat in die Lamellar-Körperchen. In den Lamellar-Körperchen selbst liegen die Phospholipide in Form dicht gepackter, konzentrischer Bilayer vor [57]. Sehr wahrscheinlich ist der hohe Calciumgehalt [58] und der niedrige pH-Wert [59] zusammen mit einer variablen Apoproteinkonzentration verantwortlich für die typische Erscheinungsform dieser zellulären Organellen.

### Extrazelluläres Surfactant-Kompartiment

Die Sekretion des Surfactantmaterials aus der Typ-II-Zelle in die alveoläre Hypophase erfolgt über Exocytose der Lamellar-Körperchen. Unter Ruhebedingungen werden etwa 10 % des DPPC-Gehaltes aller Lamellar-Körperchen pro Stunde sezerniert [52]. Als bedeutenster physiologischer Stimulus der Surfactantsekretion wird die mechanische Dehnung der Typ-II-Zelle während der tiefen Inspiration angesehen [60, 61, 62]. Ergebnisse aus Versuchen mit isolierten Typ-II-Zellen konnten außerdem eine Sekretionsinduktion bzw. -steigerung durch eine weite Palette von extrazellulären Stimuli aufzeigen, ohne deren physiologische Bedeutung mit Sicherheit nachweisen zu können. So stimulieren z.B. Leukotriene und Prostaglandine [63, 64, 65],  $\beta$ -Adrenergika [53, 66] und Adenosinnukleotide [67] die Surfactantsekretion, wohingegen SP-A konzentrationsabhängig ein physiologischer Inhibitor im Sinne einer negativen Rückkopplung zu sein scheint [68, 63, 64, 69, 70]. Einen besonderen Stellenwert haben in diesem Zusammenhang die Glukokortikoide, deren Fähigkeit zur Steigerung der Surfactantsynthese wie auch der Sekretion als etablierte medikamentöse Therapie bei drohender Frühgeburt zwischen der 29. und 36. Schwangerschaftswoche zur Vermeidung eines *infant respiratory distress syndromes* (IRDS) genutzt wird [71, 72].

Ein Großteil des sezernierten Surfactantmaterials bildet in der Hypophase des Alveolarraumes eine dreidimensionale, gitterartige Struktur aus, das sogenannte tubuläre Myelin (TM) [73]. Tubuläres Myelin stellt den Vorläufer des Oberflächenfilms dar und ist morphologisch durch sich in regelmäßigen Abständen von 45-50 nm kreuzende Doppelmembranen gekennzeichnet. An den Kreuzungsecken findet sich das Surfactantapoprotein A [74, 75], welches neben SP-B, Phospholipiden und einer hohen intraluminalen Calciumkonzentration maßgeblich an der Ausbildung dieser Gitterstruktur beteiligt ist. *In vitro* Studien konnten zeigen, dass durch relativ einfaches Mischen von DPPC, PG, SP-A und SP-B bei physiologischem pH-Wert und

einer Calciumkonzentration im Millimolarbereich die Bildung tubulären Myelins induziert werden kann [74].

Studien von Thet et al. [76], später auch von Magoon [77] und Wright [71], lieferten die ersten Hinweise, dass der durch bronchoalveoläre Lavage gewonnene, extrazelluläre Surfactant aus verschiedenen Subklassen besteht, welche sich durch unterschiedliche Sedimentationseigenschaften auszeichnen. Neben der Methode der differentiellen Zentrifugation nach dem Magoon-Schema [77] etablierte sich die Auftrennung und Charakterisierung in kontinuierlichen Gelgradienten [3]. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in Ultrastruktur, Zusammensetzung und biophysikalischen Eigenschaften alveolären Surfactants [77, 78, 71, 3]. Auch innerhalb der einzelnen Subklassen konnte eine deutliche morphologische Heterogenität nachgewiesen werden [77]. Entsprechend den Analysen der verschiedenen Autoren wurden die untersuchten Subklassen mit einer eigenen Nomenklatur belegt. So bestanden die Fraktionen P3 (1000 x g, 20 min) und P4 (60.000 x g, 60 min) nach Magoon et al. [77] zu mehr als 95 % aus tubulärem Myelin und multilamellären Vesikeln und entsprachen damit in etwa der Fraktion "B" nach Baritussio et al. [78] oder der "schweren" Subklasse (*heavy subtype*) nach Gross et al. [3]. Charakteristikum dieser Fraktionen war eine relativ schnelle Sedimentierbarkeit, eine zügige Adsorption an die Luft-Wasser-Interphase [77], ein hoher Anteil an Surfactantapoproteinen [9] sowie eine hervorragende Oberflächenaktivität. Im Gegensatz dazu war die Fraktion P5 nach Magoon et al. [77] nur nach mehreren Stunden Zentrifugation bei 100.000 x g sedimentierbar, wies statt lamellären bzw. tubulären Strukturen kleine Vesikel auf und beinhaltete einen nur geringen Anteil der Surfactantproteine [9]. Die oberflächenaktiven Eigenschaften dieser Subklasse waren darüber hinaus deutlich reduziert [77]. In Analogie zur P3/P4-Subklasse entsprach die P5-Fraktion nach Magoon et al. [77] der Fraktion "C" nach Baritussio et al. [78] bzw. dem "leichten"-Subtyp nach Gross et al. [3]. Die Fraktionen P1 (50 x g, 10 min) und P2 (500 x g, 20 min) nach Magoon et al. [77] zeigten ultrastrukturell vorwiegend zelluläre Bestandteile mit vernachlässigbarem Anteil an extrazellulärem Surfactantmaterial. Mittels Differenzierung in kontinuierlichen Gelgradienten identifizierte Gross et al. [3] eine weitere, sogenannte "ultraschwere"-Subklasse, welche aus Lamellar-Körperchen, tubulärem Myelin und multilamellären Vesikeln bestand und ausgezeichnete Oberflächenaktivität aufwies.

Mittlerweile werden die "ultraschweren" als auch die "schweren" Subfraktionen entsprechend Gross et al. [3] als *large surfactant aggregates* (LSA, [79]) bezeichnet. Sie bestehen in erster Linie aus Lamellar-Körperchen, tubulärem Myelin und großen multilamellären Vesikeln.

Darüber hinaus enthalten sie alle drei surfactant-assoziierten Proteine (SP-A, SP-B, SP-C) und besitzen ausgezeichnete oberflächenspannungsreduzierende Eigenschaften. Die sogenannte "leichte" Subfraktion, als *small surfactant aggregates* (SSA [79]) bezeichnet, imponiert ultramorphologisch ausschließlich in Form kleiner, unilamellärer Vesikel [3] und weist im Gegensatz zu den LSA *in vivo* [80] und *in vitro* [79] eine stark reduzierte Oberflächenaktivität auf.

Entsprechend einem nunmehr akzeptierten Modell des extrazellulären Surfactantmetabolismus stellt der Übergang von frisch sezernierten Lamellar-Körperchen in tubuläres Myelin den ersten metabolischen Schritt dar. Das tubuläre Myelin wird als Präkursor des interfazialen Grenzflächenfilms angesehen. Unter den zyklischen, atmungsbedingten Änderungen der alveolären Oberfläche erfolgt die Einspeisung oberflächenaktiven Materials in den Grenzflächenfilm. Unter diesen Bedingungen findet gleichzeitig ein Austritt nicht mehr aktiver Surfactantkomponenten aus dem Grenzflächenfilm in die Fraktion der *small surfactant aggregates* statt. Diese metabolische Sequenz von "ultraschweren" über "schwere" zu "leichten" Subtypen [4, 86, 78, 77] ließ sich auch *in vitro* bei zyklischen Oberflächenänderungen von Lavagematerial beobachten (siehe Kapitel 4).

#### Abbau und Clearance der Surfactantkomponenten

Im Sinne der alveolären Homöostase unterliegt der Surfactantmetabolismus einem diffizilen, bisher noch nicht vollständig aufgeklärten Balancespiel. Synthese und Sekretion sowie Reutilisation und Abbau sind so aufeinander abgestimmt, dass eine Akkumulation des Surfactantmaterials im alveolären Raum vermieden wird. Drei unterschiedliche Abbauewege sind bisher bekannt: Wiederaufnahme von Surfactantmaterial in die Typ-II-Zelle, Abbau in den Alveolarmakrophagen und Abtransport entlang der Atemwege (*mukoziliäre Clearance*). Die Wiederaufnahme (*recycling*) in die Typ-II-Zelle ist mit 50 - 85 % der vorherrschende Weg [77, 91, 92, 61, 53, 93, 94, 95]. Dabei wird das über Endozytose aufgenommene Surfactantmaterial direkt in die Lamellar-Körperchen eingebaut bzw. nach lysosomalem Abbau für die Synthese neuer Surfactantlipide und -proteine reutilisiert. Studien mit markiertem und intratracheal instilliertem Surfactantmaterial zeigten eine Wiederaufnahme aller Surfactantkomponenten (Phospholipide [92, 96, 71], SP-A [51], SP-B [97], SP-C [98]) in die Lamellar-Körperchen der Typ-II-Zelle. Die Wiederaufnahme von Dipalmitoylphosphatidylcholin in die Typ-II-Zelle wird durch SP-A stimuliert [99]. Eine

Steigerung der Aufnahmeprozesse durch SP-B und SP-C wird derzeit noch kontrovers diskutiert [100, 101]. Der Surfactantabbau über die Aufnahme in Alveolarmakrophagen [102, 99, 103, 104, 71, 105] beträgt je nach Autor zwischen 10 % und 20 % [52, 8, 106]. Der Verlust von Surfactantmaterial durch mukoziliäre Clearance entlang der unteren und oberen Atemwege wird mit etwa 7 % angegeben [107]. Inwieweit Surfactantsekretion und -reutilisation als Biofeedback-System ineinander greifen ist noch ungeklärt.

### **1.1.3. Die Funktion des pulmonalen Surfactant**

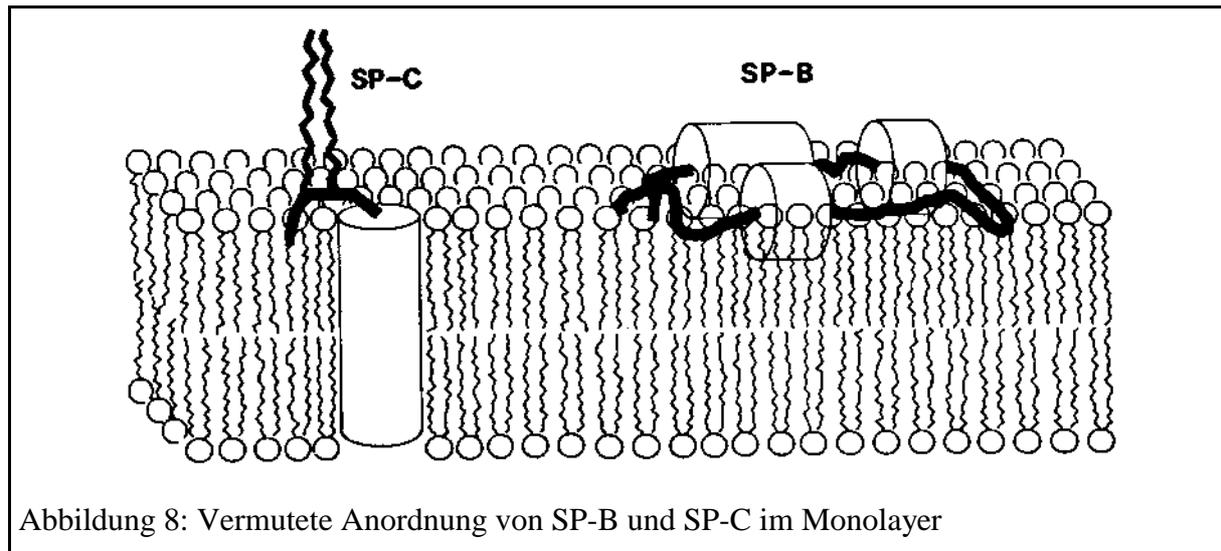
Pulmonaler Surfactant bedeckt als antiadhäsiver Lipoproteinfilm die alveoläre Oberfläche, reduziert vor allem in der Endexpiration die Oberflächenspannung an der Luft-Wasser-Grenzfläche auf Werte nahezu 0 mN/m und verhindert dadurch den alveolären Kollaps bei normalen transthorakalen Drücken. Phospholipide adsorbieren in wässriger Lösung an die Luft-Wasser-Grenzfläche und richten sich dort gemäß ihrem amphiphilen Charakter mit der polaren, hydrophilen Kopfgruppe zur wässrigen Phase und den hydrophoben Fettsäureresten zur Luftphase hin aus. Eine Anreicherung des Lipidfilms mit PL führt zu einer Senkung der Oberflächenspannung und erreicht mit zunehmendem Sättigungsgrad einen Equilibriums-Oberflächenspannungswert. Dieser ist für die einzelnen PL unterschiedlich und liegt für PC bei etwa 25 mN/m [108, 109]. Im Vergleich hierzu liegt der Oberflächenspannungswert von reinem Wasser bei ca. 70 mN/m. Als dynamisches System unterliegt die Alveole und damit der sie bedeckende Surfactantfilm während der Atemexkursion zyklischen Oberflächenänderungen. Auf der Basis des Laplace'schen Gesetzes ( $\Delta p = 2\gamma r^{-1}$ ) führt in Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Surfactantfilmes eine Verkleinerung der Oberfläche während der Expiration durch laterale Kompression zu einer weiteren Reduktion der Oberflächenspannung auf Werte nahe 0 mN/m. Hierdurch wird der Alveolenkollaps in der Endexpirationsphase verhindert. Eine vollständige Aufhebung der Oberflächenspannung ist aus theoretischen Überlegungen heraus nicht möglich. Die für eine maximal mögliche Reduktion der Oberflächenspannung optimalen biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften bietet Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC). Auf Grund der Linearität beider Palmitinsäuregruppen und seiner relativ hohen Phasenübergangstemperatur (fest nach flüssig) von 41° C und der damit verbundenen geringen Fluidität besitzt der dicht gepackte DPPC-Film bei Körpertemperatur maximale Komprimierbarkeit und Stabilität. Ein Entweichen der

DPPC-Moleküle aus dem Grenzflächenfilm während der Kompression wird dadurch weitgehend vermieden. Im Gegensatz dazu zeigen die mit ungesättigten Fettsäuren substituierten PC-Moleküle (20-30 %) eine bei Körpertemperatur größere Mobilität und damit die Voraussetzung für eine schnelle Adsorption und Anreicherung an die Luft-Wasser-Grenze, wenn bei zunehmender Oberfläche während der Inspiration die alveoläre Interphase mit oberflächenaktivem Material erneut angereichert werden muss (*reentry*). Bei der erneuten Kompression werden die mobilen, ungesättigten PC-Moleküle aus dem Filmverband wieder "herausgequetscht" (*squeeze-out*) [110, 108, 109].

Die biophysikalischen Eigenschaften reiner PL-Mixturen mit DPPC als Hauptbestandteil reichen jedoch nicht aus, um die biophysikalischen Eigenschaften natürlicher Surfactantpräparationen *in vitro* zu imitieren [111, 112, 113, 114]. Untersuchungen natürlicher Surfactantpräparationen mit dem Pulsating Bubble Surfactometer [115] wiesen im Gegensatz zu synthetischen PL-Mixturen eine deutlich schnellere Adsorption auf einen Equilibrium-Oberflächenspannungswert ( $\gamma_{ads}$ ) von ca. 25 mN/m auf und erreichten bereits nach wenigen Filmszillationen eine minimale Oberflächenspannung ( $\gamma_{min}$ ) nahe 0 mN/m [116, 113, 114, 112, 117, 118, 119]. Eine Erklärung hierfür lieferten sukzessive Rekonstitutionsversuche synthetischer Phospholipidmixturen mit den Surfactant-spezifischen Apoproteinen, von welchen vor allem SP-B und SP-C die biophysikalischen Eigenschaften deutlich verbessern konnten [117, 112, 113, 118, 114, 119, 116]. SP-A allein besitzt nur einen geringen Effekt auf die Adsorption von Phospholipiden, ein unterstützender Effekt in Kombination mit den hydrophoben Apoproteinen konnte jedoch nachgewiesen werden [120, 39, 121]. Trotz zahlreicher Untersuchungen ist der Wissensstand über die genaueren Zusammenhänge im molekularen Zusammenspiel zwischen Phospholipiden und Apoproteinen unter zyklischen Oberflächenänderungen noch sehr lückenhaft. Untersuchungsergebnisse von Baatz et al., Cochrane et al. und Possmayer et al [122, 31, 123] wiesen darauf hin, dass der Grenzflächenfilm vor allem während der Kompression über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen SP-B-Regionen und anionischen Phospholipiden wie PG oder PI stabilisiert wird. Dem SP-C wird eine Funktion als "Ankerprotein" zugeschrieben, indem es Calcium-abhängig mittels seiner zwei Palmitoylgruppen zwischen Grenzfläche und wässriger Interphase interagiert und somit die Adsorption von Phospholipiden aus der Interphase an die Luft-Wasser-Grenzschicht stimuliert [124, 125]. Die Fähigkeit, Phospholipide Calcium-unabhängig zu binden sowie die hohe Affinität zu DPPC [126] verleiht SP-A sehr wahrscheinlich eine herausragende Rolle bei der

Anreicherung des Oberflächenfilmes mit DPPC. Darüber hinaus hemmt SP-A die Sekretion von Lamellar-Körperchen in den Alveolarraum, trägt entscheidend zur Formation des tubulären Myelin bei [127, 128] und steigert über seine Fähigkeit zur spezifischen Bindung an Typ-II-Alveolarzellen [69, 129, 130, 131] die Wiederaufnahme von Surfactantlipiden in die Typ-II-Zelle [99]. Im Sinne der zellulären Abwehr trägt SP-A zur Aktivierung von Alveolarmakrophagen über eine Stimulation von Superoxid-Radikalen bei [132, 133, 134]. Ein spezifischer SP-A- Rezeptor auf Alveolarmakrophagen wird diskutiert [135, 132]. Abschließend sei noch die Rolle des SP-A bei der Abwehr infiltrierender Bakterien und Viren erwähnt [136, 137, 138, 139, 132, 83]. Analog zu SP-A wird auch für SP-D eine tragende Rolle bei der Immunabwehr diskutiert [140, 141, 142].

Dieses komplex strukturierte und zyklischen Oberflächenänderungen unterworfenen Surfactantsystem ist von essentieller Bedeutung für die Stabilität verschieden großer Alveolen während des respiratorischen Zyklus. Nur durch die effektive Reduktion der Oberflächenspannung an der Alveolaroberfläche wird eine Atelektasebildung vermieden. Durch die weitreichende Absenkung der Oberflächenspannung kleiner Alveolen vor allem in Endexpirationsstellung wird darüber hinaus eine Gasumverteilung zugunsten der großen Alveolen, was in Abwesenheit eines intakten Surfactantsystems zwangsläufig auftreten würde, verhindert. Entsprechend dem Laplace'schen Gesetz trägt ein intaktes Surfactantsystem weiterhin entscheidend zur Aufrechterhaltung der Dehnbarkeit der Lunge (Compliance,  $C = \Delta P / \Delta V$ ) innerhalb physiologischer, transthorakaler Druckverhältnisse bei. Störungen des Surfactantsystems im Sinne einer erhöhten Oberflächenspannung begünstigen demzufolge den alveolären Kollaps bei kleiner werdendem Alveolenradius, hiermit verbunden sind das Auftreten schwerwiegender Gasaustauschstörungen und eine zunehmende Abnahme der Lungen-Compliance. Störungen des Surfactantsystems sind mittlerweile für eine Vielzahl von pneumologischen und intensivmedizinischen Krankheitsbildern bekannt. Exemplarisch hierfür stehen in erster Linie das IRDS (*infant respiratory distress syndrome*) und das ARDS (*acute respiratory distress syndrome*).



#### 1.1.4. Pathophysiologie des Surfactant-Systems am Beispiel des *acute respiratory distress syndrome*

In Anlehnung an einige Gemeinsamkeiten der Symptomatik des von Avery und Mead erstmals beschriebenen Atemnotsyndroms des Kindes (*infant respiratory distress syndrome*, IRDS) führte Ashbaugh 1967 [143] für die akute respiratorische Insuffizienz des Erwachsenen den Begriff des *adult respiratory distress syndrome* (ARDS) in die medizinische Terminologie ein. Beide Krankheitsbilder sind in ihrer pathogenetischen Sequenz eng mit dem alveolären Surfactantsystem verbunden. Während beim IRDS aufgrund der fetalen Lungenunreife ein absoluter Surfactantmangel die Ursache der respiratorischen Insuffizienz darstellt, sind beim ARDS symptomatisch sehr vielschichtige biochemische und biophysikalische Änderungen des Surfactantsystems zu beobachten, welche zu den Störungen des Gasaustausches und der Compliance beitragen.

Beim ARDS führen unterschiedliche Auslöser zu einer akut einsetzenden, inflammatorischen Schädigung der Gasaustauschstrecke der Lunge. Eine spezifische Prädisposition besteht für das ARDS nicht, an dem auch Lungengesunde erkranken können. Im Krankheitsverlauf kann eine exudative Frühphase von einer proliferativ-fibrosierenden Spätphase unterschieden werden [144]. Die die Entwicklung eines ARDS verursachenden Noxen können sowohl über das bronchoalveoläre Kompartiment („direktes ARDS“, z.B. Mendelson Syndrom) wie auch über den Intravasalraum („indirektes ARDS“ z.B. Sepsis) einwirken. In jedem Fall kommt es zu einer sich selbst unterhaltenden und sogar selbst verstärkenden Entzündungsreaktion der

pulmonalen Endstrecke. Beobachtet werden Störungen der endothelialen und epithelialen Permeabilität mit konsekutiver Ödembildung im interstitiellen, später auch alveolären Raum, Störungen der Vasoregulation im Sinne inadäquater vasokonstringierender wie auch vasodilatativer Effekte. In der Summe kommt es zu einer deutlichen Widerstandserhöhung im pulmonalen Kreislauf sowie zu Störungen der alveolären Ventilation mit einem massiv gesteigerten und durch Störungen des Surfactantsystems unterhaltenem Alveolarkollaps [145, 144, 146]. Unter diesen Bedingungen ist der physiologischerweise vorhandene Euler-Liljestrand Reflex (hypoxive Vasokonstriktion) unwirksam. Es kommt zu einer massiven Störung der Adaptation von Perfusion und Ventilation. Die Folge ist ein erheblich (teilweise bis zu 50 %) gesteigerter pulmonaler Shuntfluss und, hiermit verbunden, eine schwere arterielle Hypoxämie.

Laut Übereinkunft der jüngsten amerikanisch-europäischen Konsensus-Konferenz zum Thema ARDS (1992) sind die Kriterien des ARDS erfüllt, wenn ein akuter Krankheitsbeginn, eine massive Beeinträchtigung der Oxygenierung - festgemacht an einem Verhältnis  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200 \text{ mmHg}$  (P/F-Quotient) -, bilaterale Lungeninfiltrate und ein Fehlen einer linksventrikulären Funktionsstörung nachzuweisen sind [147]. Erreicht bei sonst gleicher Definition der P/F-Quotient den geforderten Schwellenwert von  $< 200 \text{ mmHg}$  nicht, sondern liegt zwischen 200 und 300 mmHg, so wird der Begriff ALI (*acute lung injury*) vorgesehen. Ausschlusskriterien eines ARDS sind kardiogen verursachte Lungenödeme, Lungenaffektionen als Folge nephrologischer Erkrankungen und die einseitige Lungenbeteiligung. Der Stellenwert einer schweren, unilateralen Lungenbeteiligung als Einschlusskriterium fand keinen einheitlichen Konsensus. Aus verschiedenen eher pragmatischen Gründen wurde die PEEP-Beatmung als Kriterium in die Definition des ARDS nicht mit eingeschlossen [147].

Die Ursachen der beim ARDS zu beobachtenden Störungen des alveolären Surfactantsystems sind mannigfaltig und auf vielschichtige Veränderungen zurückzuführen [148, 149, 150, 151]. Zum einen scheinen Störungen der Zusammensetzung des Surfactant, zum anderen eine Inhibition des Surfactant durch in den Alveolarraum eintretende Plasmaproteine ("*leakage*"-Phänomen) und durch andere inflammatorische Mediatoren von substanzieller Bedeutung zu sein. Eine Schädigung der Typ-II-Zelle beeinträchtigt den intra- und extrazellulären Surfactantmetabolismus mit Störungen der Syntheseleistung, Sekretion und Surfactantreutilisation [152]. So konnte bei Patienten mit ARDS ein hochsignifikanter Abfall des relativen Anteils an LSA dargestellt werden [153]. Ebenso wurde eine Reduktion des

relativen Anteils der essentiellen Phospholipide PG und PC an den Gesamt-Phospholipiden gefunden [149, 148, 146]. Des Weiteren ist ein Konzentrationsabfall der Apoproteine SP-A [149, 151] und SP-B [148] beschrieben. Konsequenz ist die Zunahme der Oberflächenspannung und damit verbunden eine alveoläre Instabilität mit Kollapsneigung. Der interstitielle Druck wird abgesenkt, was wiederum die alveoläre Ödembildung fördert. Durch proinflammatorische Zytokine wie z.B. *tumor necrosis factor* (TNF), die Interleukine 1, 6 und 8 und durch Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten, welche toxische Radikale und proteolytische Enzyme freisetzen, wird die endotheliale und epitheliale Permeabilität erhöht und hierdurch der Einstrom von Plasmaproteinen in das alveoläre Kompartiment provoziert [156, 144]. Unter den Plasmaproteinen ist es vor allem das Fibrinogen, das aufgrund der präferenziellen Polymerisation zu Fibrin und dem damit verbundenem Einbau von Surfactantkomponenten in das Gerinnsel zu einer weitreichenden Inaktivierung des Surfactant führt.

Trotz umfangreicher Forschungen auf dem Gebiet der akuten respiratorischen Insuffizienz und seiner Therapie stellt das ARDS weltweit immer noch einen entscheidenden Faktor für Morbidität und Mortalität des intensiv-medizinischen Patientenkollektives dar. Alleine amerikanische Schätzungen beziffern für das Jahr 1977 in den USA ca. 150.000 Neuerkrankungen mit einer Mortalität von etwa 50-60 % [157]. Angaben zur Inzidenz des ARDS schwanken zwischen 2/100.000 und 70/100.000. Vereinheitlichung und Definition der Einschlusskriterien sowie ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge dieses komplexen Krankheitsbildes lassen jedoch präzisere, neuere Angaben zu Inzidenz, Morbidität und Mortalität und Therapiefortschritt in der Zukunft erwarten.

## 2. Fragestellung

Unter Berücksichtigung des oben dargestellten Kenntnisstandes über die metabolische Sequenz des extrazellulären Surfactantpools und deren mögliche Bedeutung bei bestimmten pulmonalen Erkrankungsbildern wurden in der vorliegenden Arbeit die Grundlagen der extrazellulären Surfactantkonversion erarbeitet. Mit Hilfe der von N.J. Gross et al. [4] entwickelten Methode der *in vitro* Konversion wurden die biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften verschiedener Surfactantbestandteile unter den Bedingungen zyklischer Oberflächenänderungen untersucht und Parallelen zu den diesbezüglichen Veränderungen des Surfactantsystems beim ARDS aufgezeigt. Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Stellt die in dieser Arbeit durchgeführte, einstündige, 48.000 x g Zentrifugation eine ebenso valide Methode zur Trennung der Surfactantsubklassen dar wie das bereits etablierte sequentielle Trennverfahren nach Magoon et. al [77]?
- Lässt sich der unter den Bedingungen der *in vitro* Konversion gesehene dramatische Abfall der Oberflächenaktivität der jeweils verbleibenden LSA-Fraktion durch Änderungen des Phospholipidprofils, der Fettsäurekomposition der Gesamt-Lipide oder des Neutrallipidprofils einer Kaninchenlavage erklären?
- Welchen Einfluss hat die Durchführung der *in vitro* Konversion auf den Gesamt- bzw. den relativen SP-B Gehalt der jeweiligen Subfraktion? Lassen sich die so gewonnenen Ergebnisse mit dem Verlust des relativen LSA-Gehaltes und dem Verlust der biophysikalischen Eigenschaften dieser Fraktion korrelieren?
- Welchen Einfluss übt in diesem Zusammenhang eine sekundäre Rekonstitution mit SP-B auf die Oberflächenaktivität der LSA nach *in vitro* Konversion aus?
- Können die aus Kaninchen-BALF nach *in vitro* Konversion gewonnenen biophysikalischen und biochemischen Resultate auf Daten aus bronchoalveolären Lavagen gesunder Probanden bzw. ARDS-Patienten übertragen werden?

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Labortechnische Geräte

BAI, Bensheim	UV-Photometer Kratos SF 770
Bakerbond, Deventer, Niederlande	3 ml Glassäulen; PTFE-Fritten
Bandelin, Berlin	Ultraschallgerät Sonopuls HD 60 mit Nadel UW 60
Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA	Falcon Blue Cups 15ml, 17 x 120mm
Camag, Berlin	TLC-Applikator Linomat IV TLC-Scanner II Scannersoftware Vers. 3.17
DuPont, Bad Homburg	Zentrifuge Sorvall RC5C
Electronetics, New York, USA	Pulsating Bubble Surfactometer
Eppendorf, Hamburg	Reaktionsgefäße Safelock 2ml (Polypropylen)
Fisons, Mainz-Kastel	Gaschromatograph Carlo Erba Fractovap 2150 mit Elektrometer Mod. 180 und Temperaturprogrammer Mod. 232
Fröbel Labortechnik, Lindau	Rotor CMVmin
Heraeus, Hanau	Ultrazentrifuge Omega II 70
Hettich, Tuttlingen	Tischzentrifuge Mikroliter Laborzentrifuge Rotanta / RP
Kontron, München	Spektralphotometer Uvicon UV 860
Mettler, Gießen	Laborwaage AJ 100
Olympus, Hamburg	Bronchoskop
Pharmacia, Freiburg	Fraktionssammler RediFrac
Rohde & Schwarz, Köln	Flachbettschreiber
Shimadzu, Duisburg	Integrator C-R6A
SLT, Crailsheim	ELISA-Photometer 400 V. 1.1
Uniequip, Martinsried	Speedvac Univapo 150 H Inkubator Unihood

##### 3.1.2. Chemikalien

Amersham-Buchler, Braunschweig	Anti-Maus-Antikörper (Schaf)
Baker, Groß-Gerau	Methanol p.a.

Boehringer, Mannheim	ABTS
Chrompack, Frankfurt	Kapillarsäule CP-Sil 88 (50 m x 0,25 mm ID)
Dako, Hamburg	AB-Komplex
Fluka, Neu-Ulm	Hexan p.a.; Methanol HPLC-Grade (Burdick & Jackson);
Merck, Darmstadt	Chloroform (Uvasol); Ammoniumheptamolybdat; Ascorbinsäure; Kaliumdihydrogenphosphat; Perchlorsäure 70 %; Essigsäure 100 %; Salzsäure 37 %; Schwefelsäure 98 %; Ameisensäure 100 %; DC-Platten Kieselgel 60; HPTLC-Platten Kieselgel 60; Natriumsulfat; Diethylether p.a.; Wasserstoffperoxid 30 %; 1-Propanol p.a.; Aceton p.a.; 1- Butanol p.a.; Natriumacetat-Trihydrat; Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat; Calciumchlorid; Diisopropylether;
Messer Griesheim, Krefeld	Chlorwasserstoff 5.0; Stickstoff 4.0; Synth. Luft 4.6; Helium 4.6; Wasserstoff 5.0
Nunc, Wiesbaden	Mikrotiterplatten Polysorp®
Paesel & Lorei, Frankfurt	Rinderserumalbumin
Sanofi, München	Nembutal® (Pentobarbital)
Sigma, Deisenhofen	Alle Phospholipid-, Neutrallipid-, FAME - Standards; Molybdän; Molybdäntrioxid; Primulin; Sephadex LH-60; Tween 20;
Y. Suzuki, Department of Bio-chemistry, Sapporo, Japan	Monoklonaler Antikörper 8A5E (Maus) gegen SP-B (Schwein)
Wander Pharma GmbH, Nürnberg	Novesine® (Oxybuprocainhydrochlorid)

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Bronchoalveoläre Lavage bei Patienten mit ARDS und bei gesunden Probanden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten (BALF) wurden bei 10 Patienten mit dem Krankheitsbild des "*acute respiratory distress syndrome*" (ARDS) gewonnen. Die Diagnose ARDS wurde entsprechend den Kriterien der jüngsten amerikanisch-europäischen Consensus Konferenz [147] gestellt. Das Patientenkollektiv besaß ein mittleres Alter von  $48 \pm 5$  Jahren (7 Männer, 3 Frauen). Zu Grunde liegende Erkrankungen waren Sepsis (n=6), schwere Pneumonie (n=2), Schock (n=1) und Pankreatitis

(n=1). Die diagnostische Bronchoskopie wurde 12 - 72 h nach Beginn der mechanischen Beatmung durchgeführt. Ein flexibles, fiberoptisches Bronchoskop (Olympus, Hamburg) wurde unter Lokalanästhesie (Novesine®) durch einen oropharyngeal platzierten Tubus eingeführt und entweder eines der beiden Lingulasegmente oder der rechte Mittellappen aufgesucht. In Okklusionsstellung (*wedge position*) wurde anschließend mit zehn 20 ml Portionen steriler physiologischer Kochsalzlösung lavagiert. Nach jeder Instillation wurde die Flüssigkeit durch schnelle Aspiration wieder entfernt, bei 4°C gepoolt und die Recovery bestimmt. Diese lag bei  $54,3 \pm 1,3$  % (MW  $\pm$  SE). Die so erhaltene Lavageflüssigkeit wurde durch sterile Gaze gefiltert und zur Abtrennung zellulärer Bestandteile bei 200 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde unter sorgfältigem Rühren aliquotiert, mittels Flüssigstickstoff gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -85 °C gelagert. Als Kontrollgruppe dienten 11 gesunde Probanden, bei welchen die Bronchoskopie, Lavage und Behandlung der Lavageflüssigkeit unter identischen Bedingungen abliefen. Die Durchführung dieser Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt.

### **3.2.2. Bronchoalveoläre Lavage beim Kaninchen**

Durch fraktionierte, intravenöse Applikation von 0,3 g Phenobarbital / Ketanest® in eine Ohrvene wurden Kaninchen beiderlei Geschlechtes bis zum Atemstillstand und konsekutivem Herz- Kreislaufstillstand narkotisiert. Dabei wurden nur solche Tiere ausgesucht, bei denen sich keine Anzeichen einer akuten, infektiösen Erkrankung zeigten. Über einen sofortigen Trachealschnitt wurde ein Tubus in die Trachea eingelegt. Mit einer Perfusorspritze wurde sodann die Kaninchenlunge mit 3 x 50 ml steriler, 4°C kalter, physiologischer Kochsalzlösung lavagiert. Nach Filtration der Lavageflüssigkeit durch sterile Gaze und Zellsedimentation bei 200 x g und 4°C für 10 min wurden die Überstände von 15 Tieren an einem Tag gepoolt und unter ständigem Rühren zu je 5 ml Fraktionen in 15 ml-Polypropylenröhrchen (Falcon blue cups, Becton Dickinson, Meylan, Cedex, Frankreich ) aliquotiert. Bis zur späteren Weiterverarbeitung wurden diese bei -85°C aufbewahrt.

### 3.2.3. Gewinnung von *large surfactant aggregates* (LSA)

Die bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF, Phospholipidkonzentration ca. 50-100 µg/ml) wurde 60 min bei 48.000 x g zentrifugiert und die hierbei sedimentierenden "*large surfactant aggregates*" (LSA) in einem kleinen Volumen 0,9 % NaCl- Lösung (+ 3 mM CaCl<sub>2</sub>) unter Ultraschallbehandlung (25 kHz, 50 W, 30 sec) resuspendiert. Nach Bestimmung der Phospholipidkonzentration mittels eines colorimetrischen Phosphatassays (Kap. 3.2.8.) wurde diese LSA-Präparation entweder durch Verdünnen mit NaCl/ CaCl<sub>2</sub> oder durch Konzentrieren über eine Ultrazentrifugation bei 175.000 x g (1h, 4°C) auf eine Phospholipidkonzentration von 2 mg/ml eingestellt und bis zur biophysikalischen Charakterisierung bei -20°C gelagert.

### 3.2.4. Biophysikalische Charakterisierung

Die Untersuchungen zur Bestimmung des Oberflächenspannungsverhaltens von pulmonalem Surfactant wurden mit Hilfe des "Pulsating Bubble Surfactometers" (PBS, Electronics, New York, USA [115]) durchgeführt, welches erstmalig von Enhorning [115] beschrieben wurde. In einer mit etwa 50 µl der Surfactantpräparation (48.000 x g -Pellet; siehe Kap. 3.2.3.) gefüllten Messkammer des Pulsating Bubble Surfactometers wurde bei 37°C eine Luftblase erzeugt und deren Volumen durch einen mit einem Elektromotor betriebenen Kolben zyklischen Veränderungen unterworfen (Pendelvolumen 0,43 µl). Die Pulsationsfrequenz kann über einen Bereich von 1 - 99 x / min beliebig verändert werden. Die Registrierung der Druckveränderungen erfolgt über einen Druckaufnehmer. Unter Kenntnis des Blasenradius und der Veränderung des Druckes kann somit über das Gesetz von Young / Laplace ( $\Delta p = 2 \gamma / r$ ) die an der Grenze zwischen der wässrigen Lösung und der Luftblase bestehende Oberflächenspannung errechnet werden.

Prinzipiell werden jeweils zwei verschiedene Messungen durchgeführt:

**1. Adsorptionsmessung ( $\gamma_{ads}$ ):** Durch die Kapillare der mit Probe gefüllten, blasenfreien Messkammer wurde mittels eines Servos eine Luftblase in die Lösung gesaugt und mit Hilfe eines Okulares auf einen minimalen Blasenradius von 0,4 mm eingestellt. Die Luftblase wurde danach automatisch vom Gerät mit hoher Geschwindigkeit in die Kapillare zurückgedrängt, sofort reaspiriert und verblieb dann für 12 sec bei minimalem Blasenradius. Anhand der kontinuierlichen Registrierung der Oberflächenspannungswerte kann bei oberflächenaktiven

Lösungen ein zeitabhängiger Abfall der Oberflächenspannung als Folge der Adsorption der Moleküle an die Grenzfläche beobachtet werden. Der vorliegenden Arbeit liegt ein Äquilibriumoberflächenspannungswert nach 12 sec Adsorptionszeit ( $\gamma_{ads}$ ) zugrunde.

**2. Dynamische Messung ( $\gamma_{min}$ ,  $\gamma_{max}$ ):** Die Messung der dynamischen Eigenschaften von Surfactantlösungen erfolgte im Anschluss an die Adsorptionsmessung. Die Luftblase wurde dazu zwischen einem Blasenradius von exakt 0,4 mm und 0,55 mm oszilliert. Die Messung erfolgte mit einer Pulsationsfrequenz von 20 x/min über eine Zeitdauer von 5 min. Als funktionell bedeutende Parameter wurden die minimale und maximale Oberflächenspannung ( $\gamma_{min}$ ,  $\gamma_{max}$ ) des letzten Zyklus herangezogen.

Die Validität der biophysikalischen Ergebnisse am Pulsating Bubble Surfactometer wurde in regelmäßigen Abständen mittels Kalibration mit Standardlösungen definierter Oberflächenspannung überprüft (siehe Tabelle 1).

Nach jeder Messung wurde mit destilliertem Wasser aus einem Wasserreservoir des Gerätes sorgfältig gespült. Jeder Messung ging ein Druckausgleich an den Umgebungsdruck voraus. Die Probengefäße wurden nach Verwendung 15 min im Ultraschallbad behandelt, mit 10 % Methanol und Wasser intensiv gespült und anschließend im Luftstrom getrocknet.

Standardlösung	$\gamma_{ads}$ [mN/m]
100 % Aqua dest.	70
20,5 % Ethanol	37,5
40,0 % Ethanol	29,6
Tabelle 1: Standardlösungen zur Kalibration des Pulsating Bubble Surfactometers	

In den Untersuchungen, in denen der Einfluss des Surfactantapoproteins B (SP-B) auf das Oberflächenspannungsverhalten von zyklischen Oberflächenänderungen unterworfenen oder nicht unterworfenen Proben untersucht wurde, wurden die aus Lavageproben von Kaninchen gewonnenen "*large surfactant aggregates*" (LSA), welche bereits zyklischen Oberflächenänderungen ausgesetzt wurden, mit aufgereinigtem, dimeren SP-B rekombiniert. Dazu wurden 18  $\mu\text{g}$  dimeres Kaninchen-SP-B (in Chloroform/Methanol/ $10^{-3}$  N HCl, 47,5/47,5/5, v/v/v, entsprechend dem postulierten 10-fachen Gehalt einer normalen LSA-Probe) in ein Reagenzglas gegeben, im Stichstoffstrom getrocknet und mit der nach zyklischen Oberflächenänderungen ausgesetzten LSA-Probe (600  $\mu\text{g}$  Gesamt-PL) resuspendiert (1 min

Ultraschallbehandlung, 50 W, 25 kHz). Vor Messung der Oberflächenaktivität im Pulsating Bubble Surfactometer wurden die Proben bei 37°C 30 min inkubiert. Den entsprechenden Kontrollen wurde kein dimeres Kaninchen-SP-B zugegeben, ansonsten war die Probenvorbereitung identisch.

### **3.2.5. Durchführung der *in vitro* Konversion**

Es wurden 5 ml Aliquots einer Kaninchenlavage bei Raumtemperatur schonend aufgetaut, an einem Scheibenrotor befestigt und dieser in einem Inkubator bei 37°C platziert. Der Konversionsvorgang der „*large surfactant aggregates*“ (LSA) zu „*small surfactant aggregates*“ (SSA) erfolgte wie bei N.J. Gross et al. [4] beschrieben und dort als „*in vitro cycling*“ bezeichnet mit einer Umdrehungszahl von 32 x/min und einer achtfachen Oberflächenänderung (1,65 cm<sup>2</sup> in vertikaler Position und 13 cm<sup>2</sup> in horizontaler Position). Es wurden verschiedene Zeitspannen als Konversionsdauer gewählt (10, 20, 30, 60, 120, 240 min). Nicht zyklischen Oberflächenänderungen unterworfenen Kontrollen wurden bei 37°C für 240 min inkubiert.

### **3.2.6. Separation und Quantifizierung von Surfactantsubklassen**

Die Trennung der LSA von SSA wurde durch eine Hochgeschwindigkeitszentrifugation (48.000 × g, 4°C, 60 min) in einer Sorvall Zentrifuge (DuPont, Bad Homburg, SS34 Rotor) in Anlehnung an Veldhuizen et al. [79] erzielt.

Die Validität des Verfahrens wurde mit der bereits etablierten Methode der sequenziellen Zentrifugation nach dem Magoon-Schema [77] verglichen (siehe Kap. 4.1.).

Nach der Vorschrift von Magoon wurde zur Trennung der Surfactantsubklassen bei 1.000 x g (20 min, 4°C, Schritt 1) zentrifugiert, anschließend der 1.000 x g Überstand einer 60.000 x g Zentrifugation (60 min, 4°C, Schritt 2) unterzogen und abschließend der 60.000 x g Überstand bei 100.000 x g (16h, 4°C, Schritt 3) zentrifugiert. Sowohl die 60.000 x g als auch die 100.000 x g Zentrifugation wurde in einer Omega 70 Ultrazentrifuge (Heraeus, Hanau, FRG; W60 oder W40 Rotor) durchgeführt, die 1000 x g Zentrifugation in der oben beschriebenen Sorvall Zentrifuge. Die jeweiligen Sedimente wurden mit einem definierten Volumen an 0,9 % NaCl versetzt, mittels Ultraschall (25 kHz, 50 W, 30 sec) resuspendiert und nach organischer Extraktion der Phospholipide (Kap. 3.2.7.) deren Konzentration mittels einer colorimetrischen

Phosphatbestimmung (Kap. 3.2.8.) ermittelt. Der relative Anteil an LSA ergab sich aus dem Quotienten aus sedimentierter PL-Menge und Gesamt-PL in der BALF. Sollten die LSA biophysikalisch untersucht werden, erfolgte die Aufarbeitung nach Kap. 3.2.3.

### 3.2.7. Lipidextraktion nach Bligh und Dyer

Die Separation wässrig gelöster Lipide, wie sie in bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten (BALF) vorliegen, wurde mittels einer Zweiphasenextraktion mit Chloroform und Methanol nach der Methode von Bligh & Dyer [158] durchgeführt. Die Wiederfindungsrate lag bei allen in dieser Arbeit untersuchten Lipiden in einem Bereich zwischen 90 und 100 % [159, 158, 160].

Die bei  $-85^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten (BALF) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend erfolgte die Extraktion je nach Ausgangsvolumen in gläsernen Zentrifugenröhrchen oder Schütteltrichtern. Zu Beginn der Extraktion wurden 0,8 Volumenanteile BALF mit 2 Teilen Methanol und 1 Teil Chloroform versetzt (siehe Tabelle 2). Die entstandene einphasige Lösung wurde in einem Zeitraum von 30 min mehrmals kräftig geschüttelt. Im folgenden zweiten Schritt erzielte man durch die Zugabe von je 1 Teil Chloroform und 1 Teil 0,9 % iger Kochsalz-Lösung nach mehrminütigem Schütteln die Phasentrennung. Zum Erreichen einer optimalen Phasengrenze wurde der Ansatz bei  $2000 \times g$  für 10 min zentrifugiert oder über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  stehen gelassen. Die Chloroformphase wurde mit Pasteurpipetten abgetrennt und unter dem Stickstoffstrom getrocknet.

	<b>Probe / 0,9% NaCl</b>	<b>Methanol</b>	<b>Chloroform</b>
<b>1. Schritt</b>	<b>0,8</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
30 min, Schütteln			
<b>2. Schritt</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>1</b>
2 min Schütteln, $2000 \times g$			
<b>Summe Volumina</b>	<b>1,8</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
Tabelle 2: Volumenanteile bei der Lipidextraktion nach Bligh & Dyer.			

### **3.2.8. Colorimetrische Phosphatbestimmung zur quantitativen Bestimmung des Phospholipidgehaltes**

Der PL-Gehalt von BALF-Proben sowie der relative LSA-Gehalt von Proben nach *in vitro* Konversion wurde nach der Methode von Rouser et al. [161] ermittelt. Eine Modifizierung dieses Verfahrens [193] erbrachte eine größere Sensitivität, womit die Detektionsgrenze nun bei ca. 2 µg Phospholipid entsprechend 100 ng Phosphor lag. Als Standard wurde in wässriger Lösung vorliegendes Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) in 5 aufsteigenden Konzentrationen von 0,2 µg – 5 µg Phosphor (M<sub>r</sub> = 31) entsprechend 4,7 µg – 120 µg Phospholipid verwendet. Alle Proben lagen in organischem Medium (Chloroform/MeOH 2/1 (v/v)) vor. Proben und Standards wurden mit 200 µl 70% Perchlorsäure versetzt und 60 min bei 200°C in einem Thermoblock zur Freisetzung der Phosphatgruppe verkocht. Nach dem Abkühlen der Proben erfolgte die Zugabe von 1 ml 4,6 mM Ammoniumheptamolybdat und anschließend die Reduktion zum Farbkomplex durch Zugabe von 20 µl 650 mM Ascorbinsäure. Die vollständige Farbentwicklung wurde durch 45 minütige Inkubation bei 60°C erzielt. Die Messung der Proben und Standards erfolgte mit einem Spektralphotometer (Uvikon 860, Kontron Instruments) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 698$  nm. Nach Abzug des Leerwertes konnten die Proben über eine lineare Regression aus den Werten der ermittelten Standards ausgewertet werden. Zur Berechnung des Phospholipidgehaltes wurde eine gemittelte relative Molekularmasse von M(r)= 734 eingesetzt.

### **3.2.9. Dünnschichtchromatographische Analyse der Phospholipidklassen**

Die zu untersuchenden Phospholipidklassen wurden aus der organischen Phase der Lipidextraktion (Kap 3.2.7.) gewonnen, dünnschichtchromatographisch getrennt, nach einer Modifizierung der Methode von Gustavsson [162] mit Molybdänblau-Reagenz visualisiert und über einen TLC-Scanner II (Camag, Berlin) densitometrisch ausgewertet. Die Detektionsgrenze lag bei 100 ng/Lipid.

### 3.2.9.1. Auftrennung der Phospholipide mittels Dünnschichtchromatographie

Als stationäre Phase wurden Kieselgel 60 HPTLC-Fertigplatten (10 x 20 cm, Merck, Darmstadt) verwendet. Die Probenauftragung erfolgte halbautomatisiert mit einem TLC-Applikator (Linomat IV, Camag, Berlin). Zur Kammersättigung wurde die Entwicklungskammer 20 min vor Beginn der Chromatographie in Gegenwart eines Filterpapiers mit dem Laufmittel (Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser 50/37,5/3,5/2 v/v/v/v) äquilibriert und die Chromatographie bei 4°C durchgeführt. Somit konnten reproduzierbare Bedingungen geschaffen werden. Nach ca. 25 min wurden die entwickelten Kieselgelplatten der Laufkammer entnommen und mit einem Fön getrocknet. Es wurden jeweils folgende 8 Phospholipidklassen analysiert (siehe Tabelle 3):

<b>Phospholipid</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>R<sub>f</sub></b>
Lysophosphatidylcholin	LPC	0,05
Sphingomyelin	SPH	0,12
Phosphatidylcholin	PC	0,18
Phosphatidylserin	PS	0,35
Phosphatidylinositol	PI	0,46
Phosphatidylethanolamin	PE	0,60
Phosphatidylglycerol	PG	0,68
Cardiolipin	CL	0,74

Tabelle 3: Relative Retentionsfaktoren der 8 mittels HPTLC separierten Phospholipide.

Aufgrund verschiedener Anfärbereigenschaften der einzelnen Phospholipidklassen musste für jedes Lipid eine eigene Regressionskurve erstellt werden. Dazu wurde ein Mix aus 8 verschiedenen Lipiden auf 7 Standardbahnen in steigender Konzentration appliziert (siehe Tabelle 4). Auf weiteren 7 Bahnen wurden Proben (Phospholipidmenge 25-35 µg, gelöst in Chloroform/Methanol 2/1 v/v) aufgetragen.

Bahn Nr.	Phosphatidylcholin [ $\mu\text{g}$ ]	Andere PL [ $\mu\text{g}$ ]
1	0,833	0,167
2	2,5	0,5
3	5,833	1,167
4	12,5	2,5
5	25	5
6	41,665	8,333
7	62,5	12,5
Tabelle 4: Verteilung der mitgeführten Standards auf der DC-Platte.		

### 3.2.9.2. Quantifizierung der Phospholipidklassen

Der **Detektionsmethode** lag eine Modifizierung der Färbeverfahren nach Gustavsson [162] und Masella [163] zugrunde. Die Phospholipide wurden mit Molybdänblau-Reagenz (Dittmer - Lester - Reagenz, [164]) direkt auf den DC-Platten detektiert. Die Herstellung des Molybdänblau-Reagenzes wurde wie folgt durchgeführt:

*Lösung 1:* 10,03 g  $\text{MoO}_3$  wurden in 250 ml 98 %iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  20 min unter Rühren und Rückfluss erhitzt, bis sich eine klare Lösung bildete.

*Lösung 2:* 125 ml der Lösung 1 wurden mit 0,445 g Molybdänpulver 1 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde Lösung 2 mit dem restlichen Volumen der Lösung 1 vereinigt, bei Gegenwart von unlöslichen Partikeln gegebenenfalls durch eine Porzellanfritte filtriert, der Ansatz mit dem zweifachen Volumen (500 ml) Wasser versetzt und mit konzentrierter Essigsäure bis zu einem Verhältnis Reagenz/Essigsäure 4/1 v/v gemischt. Vor der Nutzung des Reagenzes musste dieses mindestens eine Woche bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

Die **Färbung** der trockenen DC-Platte erfolgte in einer mit Molybdänblau-Reagenz gefüllten Tauchkammer. Hierzu wurde die Platte vertikal für 10 sec. in die Tauchkammer gestellt und im Anschluss für 15 min in einem abgedunkelten Raum bis zum vollständigen Eindringen des Färbereagenzes in die Kieselgelschicht aufbewahrt. Überschüssiges Reagenz wurde durch

Eintauchen der Platte in eine mit Wasser gefüllte Wanne (30 sec) entfernt. Nach weiteren 20 min Dunkellagerung wurde die Platte mit kalter Luft getrocknet. Zu intensives Trocknen und Lichteinwirkung hatten eine zunehmende Blaufärbung des Hintergrundes zur Folge. Die mit Molybdänblau-Reagenz behandelten Platten wurden mit einem TLC-Scanner II (Camag, Berlin) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 700 \text{ nm}$  densitometrisch ausgewertet. Die Integration der Peaks, Erstellung der Regressionskurven und Kalibration wurden mit einem Auswertungsprogramm (Cats, Vers. 3.17, Camag, Berlin) durchgeführt (siehe Abb. 9 und 10).

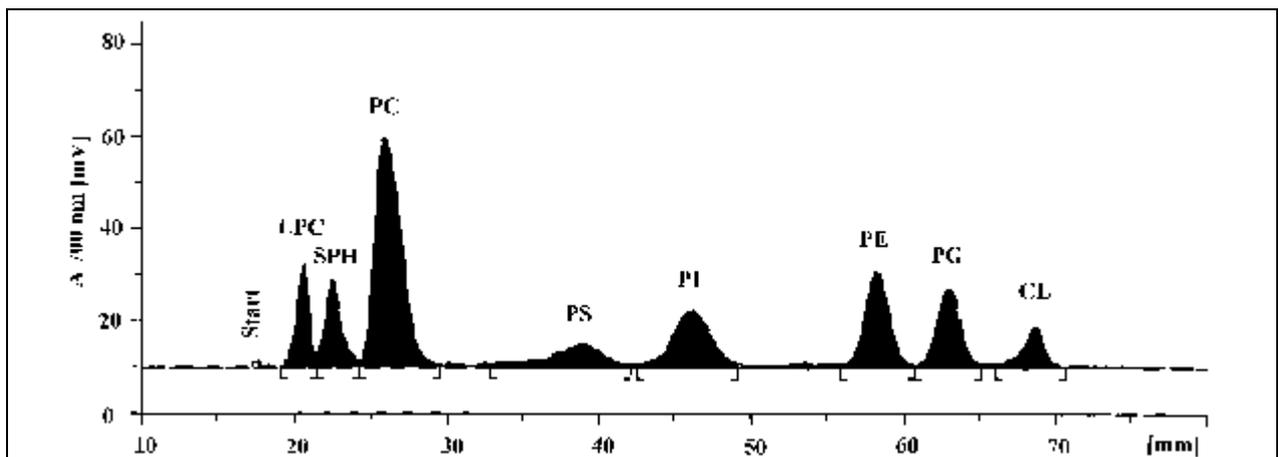


Abbildung 9: Scannerplot einer Bahn mit synthetischen Standards.

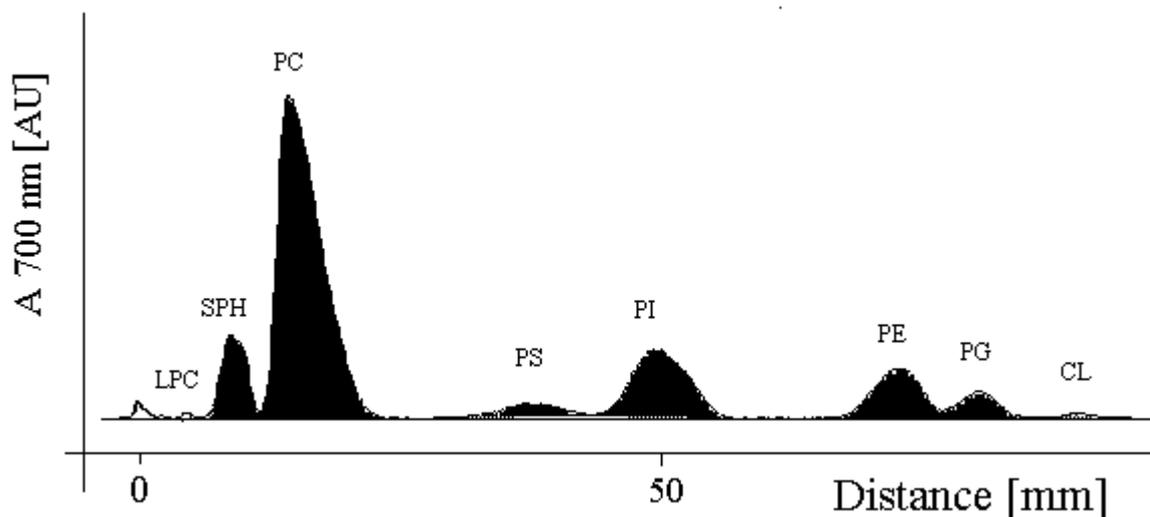


Abbildung 10: Scannerplot einer Bahn mit pulmonalem Surfactant aus bronchoalveolärer Lavage eines ARDS-Patienten.

### **3.2.10. Dünnschichtchromatographische Bestimmung der Neutrallipide**

Die zu untersuchenden Neutrallipide wurden in einem ersten Schritt dünnschichtchromatographisch von interferierenden Phospholipiden getrennt, isoliert und nach einem zweiten DC-Schritt densitometrisch quantifiziert.

#### **3.2.10.1. Dünnschichtchromatographische Trennung in Neutral- und Phospholipide**

Vor Benutzung der DC- Platten (Merck Kieselgel 60, 20 x 20 cm) wurden diese zu Reinigungszwecken über Nacht in eine mit Chloroform/Methanol 2/1 (v/v) gefüllte Laufkammer gestellt und anschließend getrocknet.

Zur Separierung von Neutrallipiden (NL) von Phospholipiden (PL) wurden Kieselgel 60 DC-Platten (20 x 20 cm, Merck, Darmstadt) als stationäre Phase und Chloroform/Methanol/H<sub>2</sub>O 65/35/6 v/v/v als mobile Phase verwendet. Proben (durch Extraktion aus BALF, LSA oder SSA gewonnene Surfactantlipidfraktionen, 100 µg PL in CHCl<sub>3</sub>/MeOH 2/1 v/v) und Standards wurden mit einem TLC-Applikator (Linomat II, Camag, Berlin) aufgetragen. In die Laufmittelkammer wurde ca. 45 min vor der Trennung zusammen mit dem Laufmittel ein 20 x 20 cm großes Filterpapier gegeben, um einen Äquilibriumszustand in der Kammer zu erreichen. Die Trennungsdauer betrug im Mittel 75 Minuten. Nach dem Trocknen der Platte konnte durch Aufsprühen von Primulinlösung [165] (Stocklösung: 1 mg/ml in Methanol; Spraylösung: 1:10 Verdünnung mit Aceton) die sich von den PL getrennten NL mittels einer UV- Lampe ( $\lambda = 254$  nm) sichtbar gemacht und markiert werden.

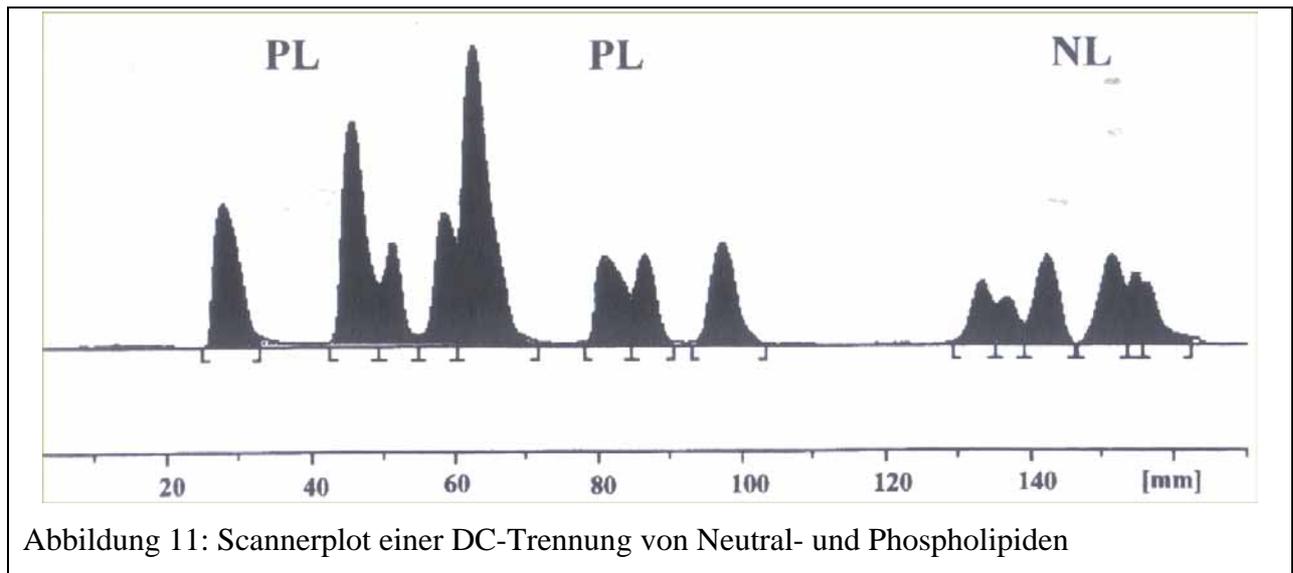


Abbildung 11: Scannerplot einer DC-Trennung von Neutral- und Phospholipiden

Unter den gegebenen Laufbedingungen eluierten die Neutrallipide mit relativen Retentionsfaktoren von 0,8 - 0,95, Phospholipide hatten  $R_f$ -Werte von 0,1 - 0,6 (siehe Abb. 11). Die markierte NL-Fraktion wurde von der Platte gelöst, in mit Teflonfritten bestückte Extraktionssäulchen aus Glas gegeben und mit jeweils 10 x 1 ml Chloroform (HPLC-Grade, Merck, Darmstadt) eluiert. Nach Trocknen im Stickstoffstrom wurden die Proben in je 50  $\mu$ l  $\text{CHCl}_3$  resuspendiert.

### 3.2.10.2. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Neutrallipide

Vor Benutzung der HPTLC-Platten (Kieselgel 60, 10 x 20 cm, Merck, Darmstadt) zur Auftrennung der Neutrallipide wurden diese zu Reinigungszwecken über Nacht in eine mit Chloroform/Methanol 2/1 v/v gefüllte Laufkammer gestellt und anschließend mit heißer Luft getrocknet. Die Neutrallipid-Fractionen sowie die Neutrallipid-Standards wurden mit einem TLC-Applikator aufgetragen. Zum Erreichen reproduzierbarer Bedingungen wurde die Entwicklungskammer 20 min vor Beginn der Chromatographie mittels eines Filterpapiers mit dem Laufmittel (Hexan / DEE / Ameisensäure 80/20/2 v/v) äquilibriert und die Trennung bei 4°C durchgeführt.

Insgesamt konnten 7 Klassen von Neutrallipiden chromatographisch getrennt werden:

Monoglyceride	(MG)
Diglyceride	(DG)
Cholesterol	(CH)
Freie Fettsäuren	(FA)
Triglyceride	(TG)
Fettsäureester	(FE)
Cholesterolester	(CE)

In Analogie zu den Phospholipiden besitzen auch die Neutrallipidklassen unterschiedliche Anfärbeeigenschaften. Für jede Lipidklasse musste deshalb eine separate Regressionskurve erstellt werden. Auf 7 Standardbahnen wurde ein Mix aus 7 verschiedenen Neutrallipiden in aufsteigenden Konzentrationen aufgetragen (siehe Tabelle 5). Fettsäurehaltige Lipide wurden im Lipidmix als Ölsäurederivat (18:1) eingesetzt. Sieben weitere Bahnen wurden mit Proben belegt.

Bahn	Menge pro Neutrallipid [ $\mu\text{g}$ ]
1	0,143
2	0,429
3	1
4	2,143
5	4,286
6	6,429
7	10
Tabelle 5: Eingesetzte Substanzmenge pro Standardbahn und Neutrallipidklasse	

### 3.2.10.3. Detektion und Recovery der Neutrallipide

Nach 20 min Entwicklungsdauer wurde die Platte der Laufkammer entnommen, mit kalter Luft getrocknet und zur Detektion 60 sec. in oben beschriebene Primulinlösung getaucht. Nach kurzem Trocknen mit kalter Luft wurde die Platte sofort mit einem Scanner (TLC-Scanner II, Camag, Berlin) densitometrisch im Fluoreszenzmodus bei 254 nm gemessen.

Die Integration, Erstellung der Regressionskurven und Kalibration wurde wie im Kap. 3.2.9.2. beschrieben mit dem scannereigenen Auswertungsprogramm Cats 3.17. (Camag, Berlin)

durchgeführt. Tabelle 6 zeigt die relativen Retentionsfaktoren einzelner Neutrallipidklassen, Abbildung 12 einen Scannerplot eines NL-Standardmixes, Abbildung 13 Neutrallipide aus physiologischer Kaninchenlavage.

Ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit der densitometrischen Quantifizierung der Neutrallipide konnte in bereits vorbestehenden Untersuchungen [193] gezeigt werden. Verwendet wurden hierzu Neutrallipidfraktionen aus je 1 ml Kaninchen-BALF mit einer Phospholipidkonzentration von 72 µg/ml.

Neutrallipid	Rf-Wert
Monoglyceride (MG)	0,03
Diglyceride (DG)	0,08
Cholesterol (CH)	0,11
Freie Fettsäuren (FA)	0,24
Triglyceride (TG)	0,36
Fettsäureester (FE)	0,56
Cholesterolester (CE)	0,80

Tabelle 6: Relative Retentionsfaktoren der aufgetrennten Neutrallipide

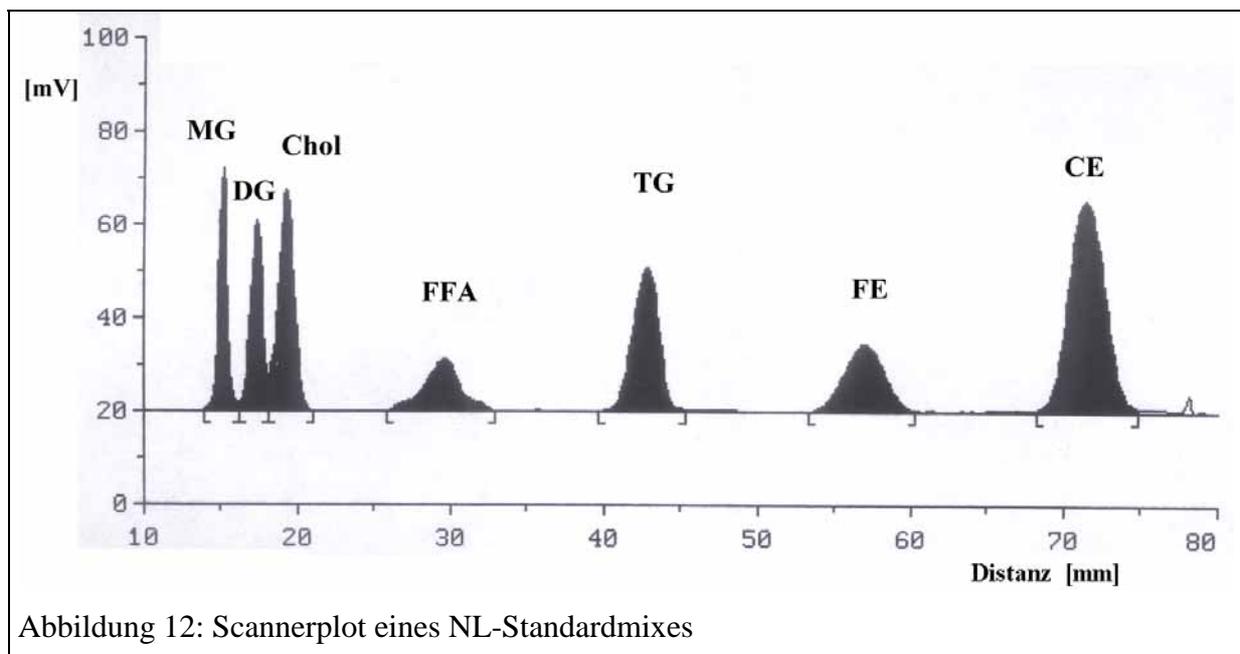
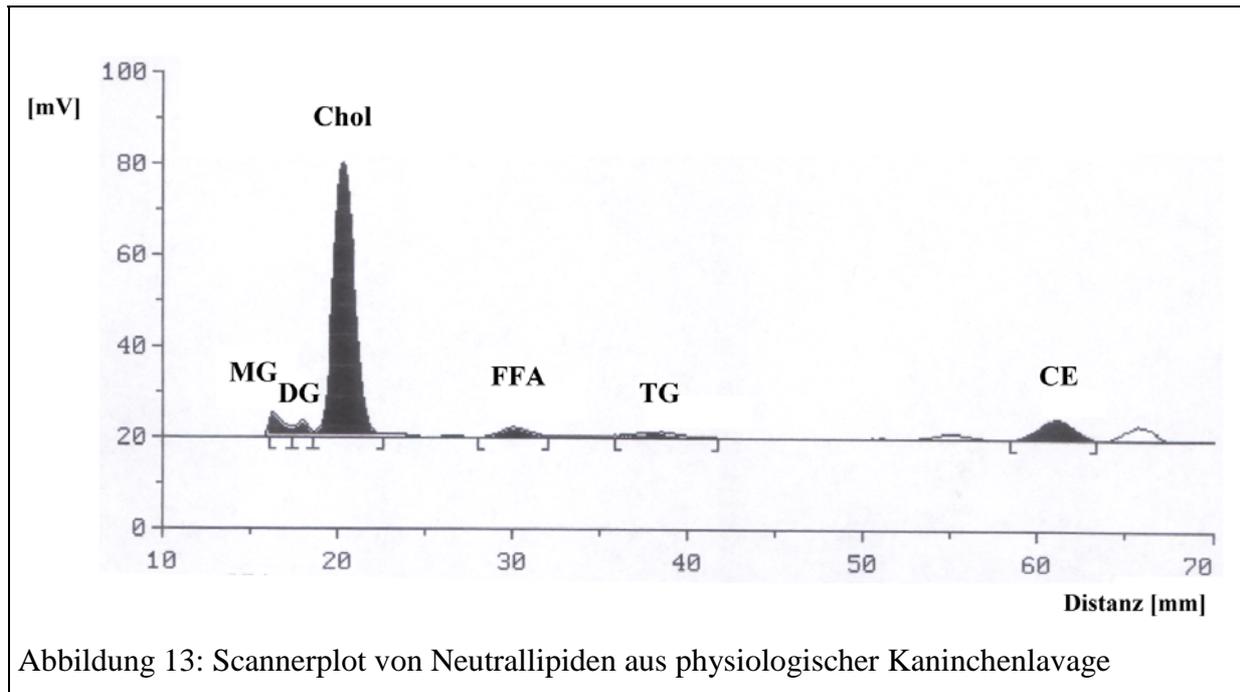


Abbildung 12: Scannerplot eines NL-Standardmixes



### 3.2.11. Gaschromatographische Analyse der Gesamtlipid-Fettsäuren

Freie, wie auch als Glycerolester gebundene Fettsäuren wurden mit 2 N HCl in Methanol in Fettsäuremethylester umgewandelt, gaschromatographisch separiert und über Flammenionisationsdetektion quantifiziert.

#### 3.2.11.1. Probenvorbereitung bei der Fettsäureanalyse aus Gesamtlipiden

Nach der Lipidextraktion (siehe Kap 3.2.7.) wurde zur Analyse der Fettsäureverteilung von Gesamtlipiden der Lipidextrakt direkt in gasdichte Glasgefäße mit Teflondeckel überführt, unter einem Stickstoffstrom getrocknet und mit 1 ml Methylierungsreagenz (2 N HCl/MeOH) 12 h bei 100°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Hexan und kräftigem Schütteln erfolgte die Separierung der entstandenen Fettsäuremethylester (FAME) mit Hilfe von Pasteurpipetten aus der Hexanphase. Anschließend wurde die Hexanphase im Stickstoffstrom getrocknet und die Fettsäuremethylester von kontaminierenden Neutrallipiden mittels Dünnschichtchromatographie getrennt. Die Proben und 50 µg eines FAME-Standards (Marker) wurden zu diesem Zweck auf eine Dünnschichtplatte (Kieselgel 60, 20 x 20 cm, Merck, Darmstadt) aufgetragen und bei 4°C mit 100 % Toluol als mobile Phase entwickelt. 45 min später wurde die Platte mit kalter Luft

(Fön) getrocknet und die FAME durch Besprühen mit Primulin-Lösung bei 254 nm detektiert (siehe Kap. 3.2.10.1.). Die entsprechenden Gelabschnitte wurden von der DC-Platte entfernt und nach Zugabe von 10 µg 15:0-FAME als interner Standard in 3 ml-Glassäulen, die mit Teflonfritten bestückt waren, mit 10 x 1 ml Chloroform (UVASOL, Merck, Darmstadt) extrahiert. Die Proben wurden im Stickstoffstrom konzentriert, in 1,1 ml Glasvials überführt, im Stickstoffstrom getrocknet und, je nach Probenmenge, in 10-50 µl CHCl<sub>3</sub> gelöst und unter Stickstoff bei -18°C bis zur weiteren Analytik dunkel gelagert.

### **3.2.11.2. Herstellung des Methylierungsreagenzes (2 N HCl in Methanol)**

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

Dazu wurden 13,51 µg DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin, entsprechend 10 µg 16:0-FAME) sowie 10 µg 16:0-FAME mit dem neu hergestellten Reagenz behandelt (Verfahren siehe oben). Beide Ansätze wurden mit je 10 µg 15:0-FAME versetzt. Mittels Gaschromatographie wurde dann der Wirkungsgrad aus dem Quotienten der Integratorflächen von 16:0-FAME aus DPPC/16:0-FAME berechnet. Der ermittelte Wirkungsgrad des Reagenzes betrug  $97,07 \pm 4,88$  % (MW  $\pm$  SD, n = 5 Reagenzansätze). Das Reagenz ist unter Feuchtigkeitsabschluss bei 4°C mindestens 6 Monate haltbar.

### 3.2.11.3. Gaschromatographische Bedingungen

Die Fettsäureanalytik wurde mit einem Fractovap 2150 Gaschromatographen mit Temperaturprogrammer Mod. 232 und Elektrometer Mod. 180 (Carlo Erba/Fisons, Mainz - Kastel) durchgeführt. Als inertes Trägergas wurde Helium verwendet. Der Gaschromatograph war mit einer Kapillarsäule (CP - Sil 88, 50 m x 0,25 mm Innendurchmesser, Chrompack, Frankfurt/Main) bestückt. Die stationäre Phase der polaren Säule bestand aus 100 % Cyanopropylsilikon (225.000 theoretische Böden). Vor die 50 m lange Kapillarsäule wurde eine 2,5 m lange unpolare desaktivierte Vorsäule installiert.

Der Trägergasfluss betrug 1 ml/min. Die Detektorgase hatten einen Flow von 300 ml pro min (synthetische Luft), bzw. 30 ml pro min (Wasserstoff, siehe Tabelle 7). Die beiden Detektorgase wurden mit Aktivkohlefilter, das Trägergas mit je einem Feuchtigkeits- und Sauerstofffilter (Messer Griesheim, Krefeld) gereinigt. Die Proben wurden mit einem Split von 1:15 aufgegeben.

Gas	Reinheitsgrad	Gasfluß [ml/min]	Gasvordruck [kg/cm <sup>2</sup> ]
Trägergas/Helium	4.6	1	1,4
Detektorgas/Synth.Luft	4.6	300	1,3
Detektorgas/Wasserstoff	5.0	30	0,7
Tabelle 7: Verwendete Gase, Flows und Gasvordrücke.			

Die Trennung der Fettsäuren erfolgte isokratisch bei 198°C und wurde täglich mit Hilfe eines FAME-Mixes, bestehend aus 24 Fettsäuremethylester, kontrolliert (siehe Abb. 14 und Tabelle 8). Über einen Flammenionisationsdetektor (FID) erfolgte die Detektion der zu analysierenden FAME. Die Signale wurden mit einem Integrator (C-R6A, Shimadzu, Duisburg) ausgewertet. Das Detektionslimit betrug bei einem Split von 1:15 ca. 500 pg/µl Probe. Die resultierenden Chromatogramme lieferten die zeitliche Abfolge von Detektorsignalen sowie Aussagen über die qualitative und quantitative Fettsäurezusammensetzung der jeweiligen Probe.

Die Auswertung der Fettsäureprofile wurde mit Microsoft EXEL vorgenommen. Auf jeder DC-Platte wurde eine Leerkontrolle mituntersucht, da es sich nicht vermeiden ließ, dass geringe Mengen an verunreinigenden Fettsäuren eingeschleppt wurden. Die Integratorfläche des internen

Standards der Proben wurde mit der der Kontrollen korreliert und in den Kontrollen der DC-Platten aufgetretene FAME-Peaks wurden von denen der Probe subtrahiert. Die korrigierten Fettsäuremethylester-Flächen wurden durch für jede Fettsäure separat ermittelte Responsefaktoren dividiert. Der durchschnittliche Responsefaktor lag bei den 24 analysierten Fettsäuren bei einer Integratorfläche von  $19,94 \pm 3,71$  (MW  $\pm$  SD) pro pg Fettsäuremethylester.

Die Abb. 14 zeigt den Plot eines Standard-Gemisches, welches gaschromatographisch analysiert wurde. Mit einem solchen Plot wurde jeden Tag die Probenanalytik begonnen, um eine Identifikation der Fettsäuremethylester über die Retentionszeiten der Standards zu ermöglichen. Tab. 8 gibt außerdem die exakte Bezeichnung sowie die relativen Retentionszeiten aller eingesetzten FAME wieder.

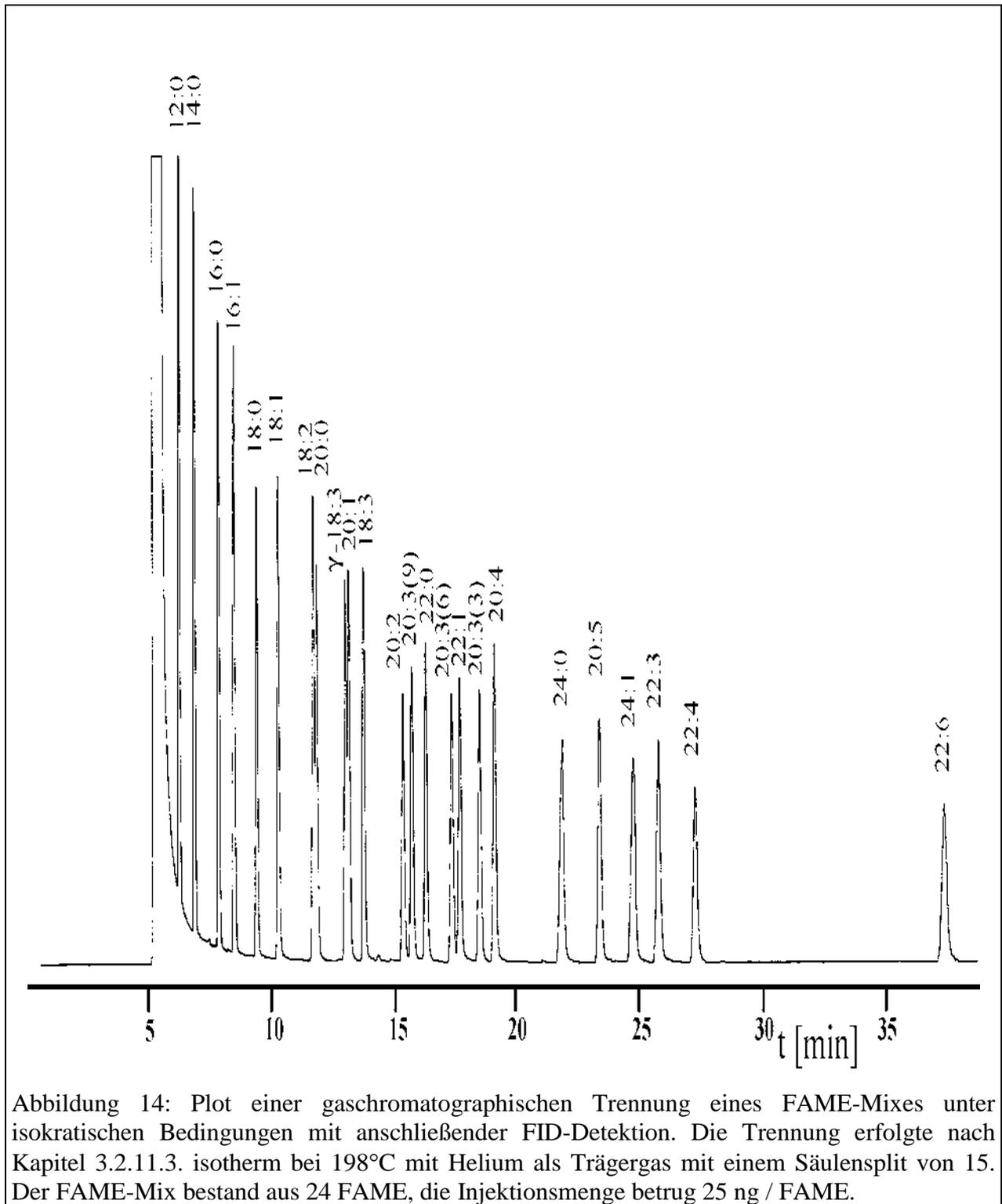


Abbildung 14: Plot einer gaschromatographischen Trennung eines FAME-Mixes unter isokratischen Bedingungen mit anschließender FID-Detektion. Die Trennung erfolgte nach Kapitel 3.2.11.3. isotherm bei 198°C mit Helium als Trägergas mit einem Säulensplit von 15. Der FAME-Mix bestand aus 24 FAME, die Injektionsmenge betrug 25 ng / FAME.

FAME aus	Abkürzung	Retentionszeit [min]
Laurinsäure	12:0	6,4
Myristinsäure	14:0	7,0
Palmitinsäure	16:0	8,0
Palmitoleinsäure	16:1	8,5
Stearinsäure	18:0	9,1
Ölsäure	18:1	9,8
Linolsäure	18:2	11,6
Arachidinsäure	20:0	11,8
$\gamma$ -Linolensäure	$\gamma$ -18:3	12,9
Cis-11-Eicosaensäure	20:1	13,1
Linolensäure	18:3	13,6
cis-11,14-Eicosadiensäure	20:2	15,1
cis-5, 8, 11-Eicosatriensäure	20:3(9)	15,5
Behensäure	22:0	16,0
cis-8,11,14-Eicosatriensäure	20:3(6)	17,0
Erucinsäure (cis-13)	22:1	17,4
cis-11,14,17-Eicosatriensäure	20:3(3)	18,1
Arachidonsäure	20:4	18,7
Lignocerinsäure	24:0	21,4
Eicosapentaensäure	20:5	22,8
Nervensäure	24:1	24,1
cis-13,16,19-Docosatriensäure	22:3	25,1
cis-7,10,13,16-Docosatetraensäure	22:4	26,5
Cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure	22:6	36,3
Pentadecansäure	15:0	7,5
Margarinsäure	17:0	8,4

Tabelle 8: Komposition des bei der GC-Analytik verwendeten FAME-Mixes sowie die Retentionszeiten der einzelnen Komponenten bei isokratischer Elution (198°C)

### 3.2.12. SP-B- ELISA

Das hydrophobe Apoprotein SP-B wurde mit Hilfe eines ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay) nach Krämer et al. [166] bestimmt.

Als Trägermaterial für den ELISA wurden Mikrotiterplatten mit 96 Wells (Näpfchen) aus Polystyrol (Polysorp® F96 mit Zertifikat, Nunc, Wiesbaden) verwendet. Der Standard (SP-B Dimer aus Lavage von Menschen oder Kaninchen) 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 zu messenden Proben (bronchoalveoläre Lavagen von Menschen und Kaninchen nach *in vitro* Konversion bzw. ohne *in vitro* Konversion) wurden mit 1-Propanol und PBS auf ein Mischungsverhältnis von 1-Propanol/wässrig von 50/50 (v/v) eingestellt. Üblicherweise wurden 20 µl BAL auf ein Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt und in die Wells pipettiert. Angereichertes Surfactantmaterial (z.B. über 48.000 x g Zentrifugation) wurde mit 1-Propanol/PBS auf eine Phospholipidkonzentration von 1 µg/Well verdünnt. SP-B-Standards (Kaninchen-SP-B Dimer bei Kaninchen-BALF, humanes SP-B Dimer bei humaner BALF) wurden ebenfalls mit 1-Propanol/wässrig 50:50 (v/v) seriell in Konzentrationen von 40 ng/Well bis 312,5 pg/Well verdünnt. 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 6 h bis zur Trocknung gelagert. Die durch Inhomogenitäten der biologischen Proben bedingte variable Adsorption des SP-B an die Plattenoberfläche wurde durch Aufnehmen in 100 µl Trifluorethanol minimiert. Nach einem weiteren Trocknungsschritt (37°C, 3h) wurden die in ca. 50-fachem Überschuss zu SP-B vorliegenden Phospholipide durch zwei aufeinanderfolgende Waschschrte selektiv entfernt. Im ersten Schritt erfolgte die Zugabe von 200 µl Diisopropylether/1-Butanol 3:2 (v/v) und Inkubation unter Schütteln (20 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 PBS/ 0,5 Tween 20 dreimal gewaschen.

Das nun folgende ELISA-System wurde nach der Methode von Reinke et al. [168] entwickelt. Zum Blockieren überschüssiger Bindungsstellen wurde 2h mit PBS/1% Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS/0,5% Tween 20 erfolgte der Auftrag des SP-B-Antikörpers (8B5E, monoklonaler Antikörper (Maus) gegen porcines SP-B [169]). Dazu wurde eine Antikörper-Stammlösung (1 mg/ml) in PBS mit BSA 1/500 (v/v) verdünnt, 200 µl

dieser Lösung pro Well pipettiert und 12 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (dreimal, siehe oben) wurden 200 µl einer 1:1000-Verdünnung von biotinyliertem Schaf-Anti-Maus-Antikörper (Amersham-Buchler) in PBS/1% BSA aufgetragen und 3 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem Antikörper wurde dreimal gewaschen. Anschließend erfolgte eine Verstärkung der Empfindlichkeit des Testes mit der Avidin/Biotin-Peroxidase-Technik (AB-Komplex, Dako). Dazu wurden ein Tropfen Avidinlösung und ein Tropfen biotinylierte Meerrettich-Peroxidaselösung in 5 ml PBS gegeben und 30 min stehen gelassen. 200 µl einer Verdünnung aus einem Tropfen dieser Stammlösung mit 12 ml PBS/ 1% BSA wurden 2 h auf den Platten inkubiert und anschließend wieder dreimal gewaschen. Die enzymatische Farbentwicklung wurde durch Zugabe von 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat (6)] (ABTS) [170] als Substrat eingeleitet. Dazu wurden 20 mg ABTS und 10 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 30 ml Substratpuffer (60 mM Natriumacetat-Trihydrat, 50 mM Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat pH 4,2) [171] gelöst und 200 µl dieser Lösung in die Wells pipettiert. Nach der Farbentwicklung (30 min) 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.

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

### **3.2.13. Sekundäre Rekonstitution einer bronchoalveolären Kaninchenlavage mit Surfactant-Protein B nach *in vitro* Konversion**

Nach 240 min *in vitro* Konversion (siehe Kap. 3.2.5.) einer Kaninchen-BALF und anschließender Separation der Surfactantsubklassen nach Kapitel 3.2.6. wurde die LSA-Subklasse mit aufgereinigtem, dimeren Surfactant-Protein B (SP-B) rekombiniert. Zu diesem Zweck wurden 18 µg in CHCl<sub>3</sub>/MeOH gelöstes, dimeres Kaninchen-SP-B entsprechend der 10-fachen Menge SP-B im Vergleich zur normalen LSA-Kontrolle in ein Glasgefäß gegeben, unter kontinuierlichem Stickstoffstrom getrocknet und mit der LSA-Probe nach *in vitro* Konversion (600 µg Gesamt-Phospholipid) resuspendiert. Zum Erreichen eines optimalen Resuspensionsergebnisses wurde die Probe 1 min mit Ultraschall (50 W, 25 kHz) behandelt. Vor

der Messung der biophysikalischen Oberflächeneigenschaften mit dem Pulsating-Bubble-Surfactometer nach Kapitel 3.2.4. wurde die Probe bei 37° C 30 min inkubiert.

### **3.2.16. Statistik**

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (MW  $\pm$  SE) angegeben. Die statistische Analyse von Unterschieden zwischen Kontrollpersonen und ARDS-Patienten wurde mittels eines nonparametrischen Testes für nicht verbundene Proben (Mann-Whitney-U-Test) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgesetzt, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Dargestellt sind die Signifikanzniveaus im Text und in den Graphiken jeweils mit \*( $p < 0,05$ ); \*\*( $p < 0,01$ ); \*\*\*( $p < 0,001$ ).

## **4. Ergebnisse**

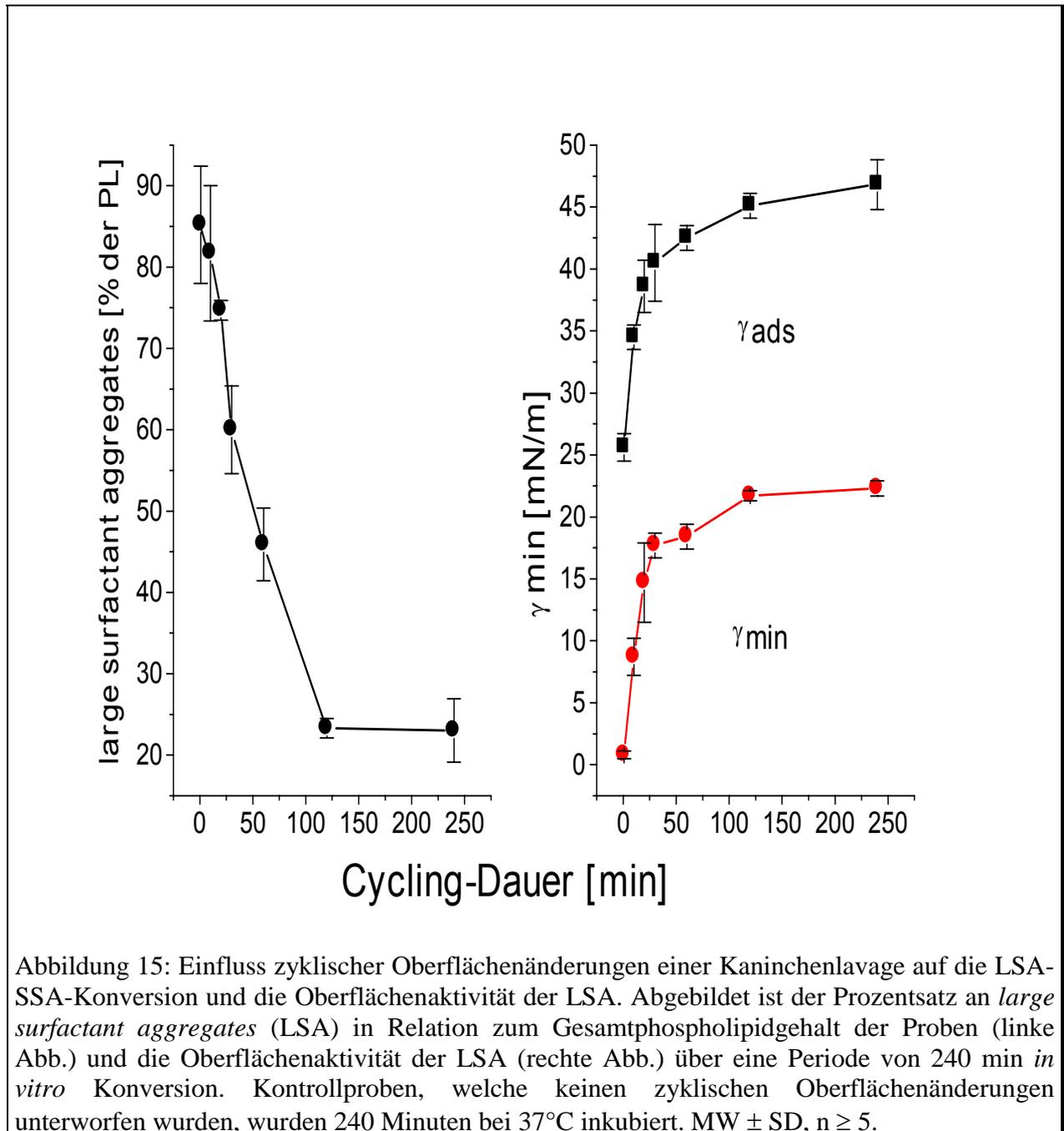
### **4.1. Einfluss zyklischer Oberflächenveränderungen von bronchoalveolärer Kaninchenlavage auf die biochemischen und biophysikalischen Surfactantparameter**

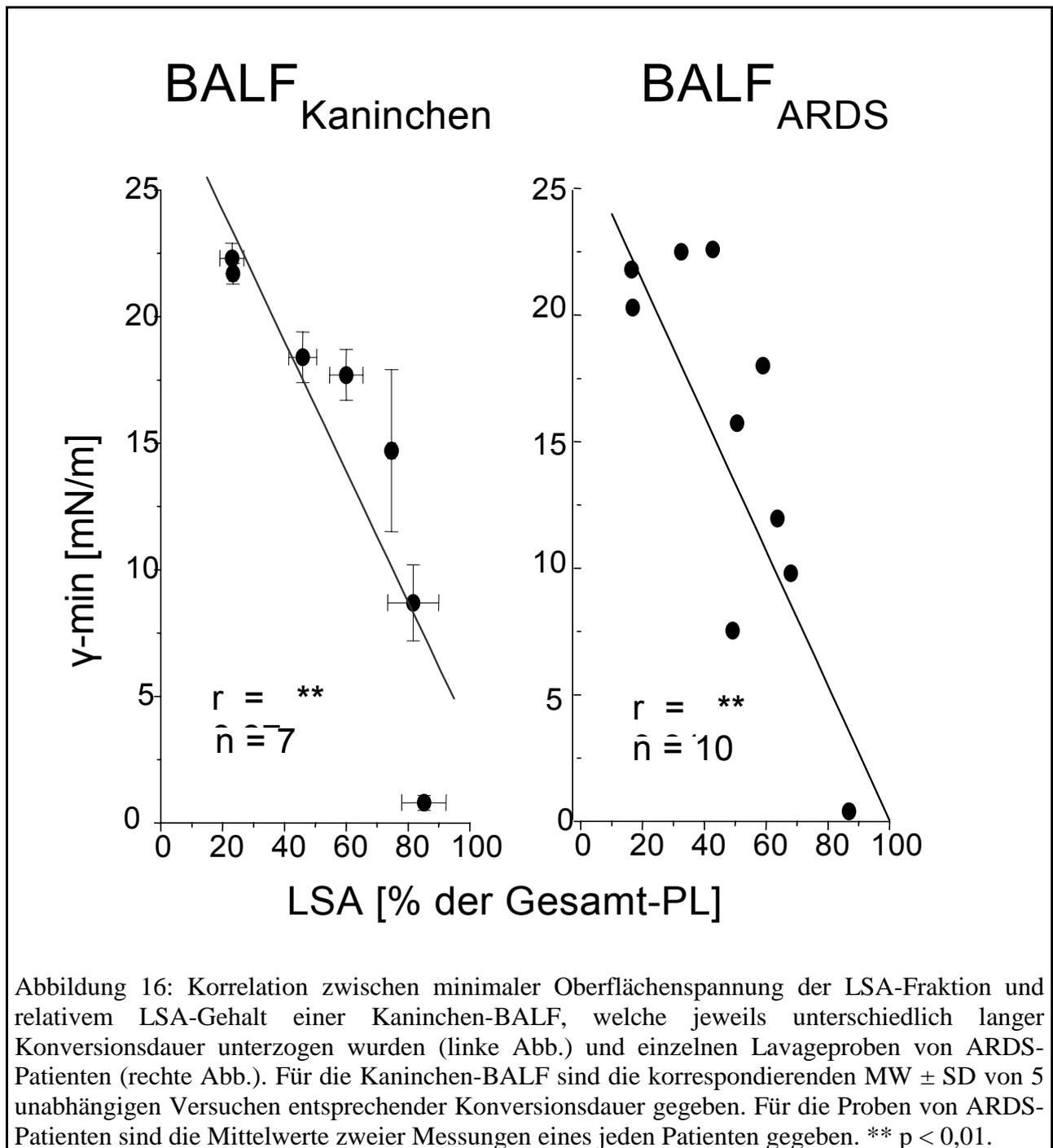
#### **4.1.1 Einfluss zyklischer Oberflächenänderungen auf die Verteilung der Surfactantsubklassen und die biophysikalischen Eigenschaften der LSA Fraktion**

Der durchschnittliche Gesamtphospholipidgehalt der untersuchten Kaninchenlavagen (BALF) lag zwischen 60 und 100 µg/ml. Der relative Anteil an *large surfactant aggregates* (LSA) einer frischen BALF und in nicht zyklischen Oberflächenänderungen unterworfenen Kontrollproben betrug im Mittel 85 % des Gesamtphospholipidgehaltes (siehe Abb. 15). Die Durchführung der *in vitro* Konversion resultierte in einer raschen, zeitabhängigen Umwandlung der *large surfactant aggregates* zu *small surfactant aggregates* (SSA). Innerhalb von 120 min konnte ein Abfall des relativen LSA-Gehaltes auf Werte um 23 % beobachtet werden. Im Anschluss folgte eine Plateauphase mit nahezu konstanten Werten (siehe Abb. 15).

Mit der Verminderung des relativen LSA-Anteiles war gleichzeitig ein deutlicher Abfall der Oberflächenaktivität der verbliebenen LSA-Fraktion zu erkennen. Dies erschien zunächst erstaunlich, wurden doch alle Proben auf eine standardisierte Phospholipidkonzentration von 2 mg/ml eingestellt und direkt im Anschluss auf ihre Oberflächenaktivität untersucht. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass LSA aus Kontrollproben minimale Oberflächenspannungswerte ( $\gamma_{\min}$ ; nach 5 min Pulsation) nahe 0 mN/m mit Äquilibriumoberflächenspannungswerten ( $\gamma_{\text{ads}}$ ; nach 12 sec Adsorptionszeit) von ca. 25 mN/m erreichten (siehe Abb. 15). Die LSA-Fraktion von Proben, welche zyklischen Oberflächenänderung unterworfen waren, zeigte hingegen ein von der Prozedurdauer abhängiges Ansteigen der  $\gamma_{\min}$  auf Werte bis zu 22 mN/m innerhalb von 120 min. Die Adsorption ( $\gamma_{\text{ads}}$ ) stieg im gleichen Zeitraum auf Werte bis 45 mN/m.

Der Abfall des relativen LSA-Gehaltes unter Bedingungen der *in vitro* Konversion konnte mit dem Verlust der Oberflächenaktivität in der verbliebenen LSA-Fraktion signifikant korreliert werden (siehe Abb. 16)





Wie bereits von Magoon et al. [77] beschrieben, lagen die  $\gamma$  min-Werte von SSA-Fraktionen nativer Kaninchen BALF bzw. von Proben nach *in vitro* Konversion niemals unterhalb 20 mN/m.

Um noch detaillierter die *in vitro* Konversion verfolgen zu können, wurde alternativ eine Auftrennung über das differentielle Zentrifugationsschema nach Magoon et al. [77] durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass in BALF-Proben welche keiner *in vitro* Konversion ausgesetzt waren mit dem 48.000 x g Zentrifugationsschritt ein ähnlich hoher relativer Gehalt an LSA (81,8 %) im Sediment erzielt werden konnte wie nach sequenzieller Zentrifugation

entsprechend dem Magoon-Schema (81,7 %; Summe aus 1000 x g und 60.000 x g Sediment). Proben des 1000 x g und 60.000 x g Sediments wiesen jeweils eine ausgezeichnete Oberflächenaktivität mit  $\gamma$  min-Werten nahe 0 mN/m und  $\gamma$  ads-Werten von 25-30 mN/m auf und waren mit den biophysikalischen Eigenschaften des 48.000 x g Sediments ( $\gamma$  min: 0,1 mN/m;  $\gamma$  ads: 25,2 mN/m) nahezu identisch (siehe Tabelle 9). Die biophysikalischen Eigenschaften des 100.000 x g Sediments nach dem Magoon-Schema war mit  $\gamma$  min-Werten um 20 mN/m deutlich vermindert, erreichte  $\gamma$  ads-Werte von nur noch 46,7 mN/m und entsprach somit biophysikalisch dem 48.000 x g Überstand.

Durch *in vitro* Konversion war ein erstaunlich hoher Verlust des relativen PL-Gehaltes sowohl im 1000 x g als auch im 60.000 x g Sediment zu erkennen. Als Folge fand sich ein deutlich höherer relativer Phospholipidgehalt des 100.000 x g Sediments und Überstandes. So zeigte sich nach 240 min *in vitro* Konversion ein Abfall des relativen PL-Gehaltes im 1000 x g Sediment um ca. 80 % auf 2,8 % (Kontrolle: 13,9 %) und im 60.000 x g Sediment um ca. 55 % auf 30,3 % (Kontrolle: 67,8 %). Demgegenüber stieg der relative PL-Gehalt im 100.000 x g Sediment auf 19,2 % (Kontrolle: 4,2 %) und im Überstand auf 47,0 % (Kontrolle: 12,3 %).

Wie bei dem 48.000 x g Zentrifugationsschritt war die Reduktion des relativen PL-Anteils von Proben nach *in vitro* Konversion von einem massiven Verlust der Oberflächenaktivität des auf 2 mg/ml PL eingestellten 1.000 x g und 60.000 x g Sediments begleitet. Während im 1000 x g Sediment der nativen BALF  $\gamma$  min und  $\gamma$  ads 0,1 mN/m bzw. 25,1 mN/m betragen, war die Oberflächenaktivität nach 240 min *in vitro* Konversion im 1000 x g Sediment auf 22,6 mN/m ( $\gamma$  min) bzw. 46,9 mN/m ( $\gamma$  ads) gestiegen. Entsprechendes galt auch für das 60.000 x g Sediment (siehe Tabelle 9). Unterschiede in den biophysikalischen Eigenschaften der LSA-Subfraktion des 48.000 x g Sediments zum jeweiligen Sediment nach sequenzieller Zentrifugation (1000 x g und 60.000 x g) unter *in vitro* Konversion konnten nicht festgestellt werden (siehe Tabelle 9).

Probe	PL-Verteilung (% der Gesamt-PL)		$\gamma$ ads [mN/m]		$\gamma$ min [mN/m]	
	nativ	konvertiert	nativ	konvertiert	nativ	konvertiert
1000 x g LSA	13,9 ± 0,8	2,8 ± 0,4	25,1 ± 1,2	46,9 ± 3,7	0,1 ± 0,04	22,6 ± 0,5
60.000 x g LSA	67,8 ± 3,4	30,3 ± 4,2	30,9 ± 3,3	43,9 ± 4,5	1,9 ± 0,6	19,3 ± 4,5
100.000 x g LSA	4,2 ± 0,5	19,2 ± 2,1	46,7 ± 2,0	45,1 ± 4,8	20,7 ± 0,3	21,1 ± 0,4
100.000 x g SSA	12,3 ± 0,6	47,0 ± 3,1				
48.000 x g LSA	81,8 ± 2,9		25,2 ± 0,0		0,1 ± 0,2	

Tabelle 9: Native bzw. *in vitro* konvertierte (240 min) BALF vom Kaninchen wurde nach dem Schema der sequenziellen Zentrifugation nach Magoon in ihre beiden Subfraktionen LSA und SSA separiert und die Verteilung des relativen Phospholipidgehaltes innerhalb jeder Subklasse (gegeben in Prozent Gesamtphospholipid) analysiert. Gegeben sind weiterhin die bei einem Phospholipidgehalt von jeweils 2 mg/ml gemessenen Oberflächenspannungswerte nach 12 sec Adsorption ( $\gamma$  ads) sowie die minimale Oberflächenspannung nach 5 min dynamischer Filmoszillation ( $\gamma$  min). Ein Vergleich zur einstufigen 48.000 x g Zentrifugation über 1 h wurde durchgeführt. Dargestellt sind die MW ± SE aus fünf unabhängigen Experimenten.

#### 4.1.2. Einfluss der *in vitro* Konversion auf das Phospholipidprofil

Native BALF und Proben nach *in vitro* Konversion (0/30/120/240 min) wurden einer 48.000 x g Zentrifugation unterzogen und im Anschluss das Phospholipidprofil der jeweiligen LSA- und SSA-Fraktion gemäß Kapitel 3.2.9. dünnschichtchromatographisch und densitometrisch analysiert. Es wurden die sechs dominierenden Surfactant-Phospholipidklassen LPC, SPH, PC, PI, PE und PG untersucht. Zusätzlich wurde die relative Verteilung der einzelnen Subklassen bestimmt. Tabelle 10 illustriert die gewonnenen Daten.

Modus	Probe	LPC %	SPH %	PC %	PI %	PE %	PG %	Subklassen- verteilung
Nativ	BALF	2,2 ± 0,4	0,9 ± 0,1	89,6 ± 1,2	1,9 ± 0,3	2,0 ± 0,4	3,4 ± 0,7	--
0 min Konversion	LSA	3,8 ± 1,6	0,7 ± 0,1	87,6 ± 1,1	2,6 ± 0,4	2,0 ± 0,4	3,6 ± 0,3	93,7 %
	SSA	10,1 ± 0,9	5,8 ± 0,6	75,4 ± 1,1	3,9 ± 0,9	1,6 ± 0,5	3,2 ± 0,2	6,3 %
30min Konversion	LSA	2,0 ± 0,4	0,5 ± 0,3	92,1 ± 0,4	1,0 ± 0,4	1,5 ± 0,0	2,9 ± 0,2	75,6 %
	SSA	2,5 ± 0,3	0,4 ± 0,2	91,5 ± 1,4	1,5 ± 0,3	1,6 ± 0,1	3,2 ± 0,4	24,4 %
120min Konversion	LSA	2,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	87,4 ± 1,0	2,6 ± 0,8	2,3 ± 0,2	4,7 ± 0,0	58,6 %
	SSA	3,2 ± 0,4	0,8 ± 0,0	84,9 ± 1,0	2,8 ± 0,3	3,1 ± 0,5	5,4 ± 0,4	41,4 %
240min Konversion	LSA	3,5 ± 0,5	0,9 ± 0,4	90,1 ± 1,6	1,5 ± 0,5	1,6 ± 0,1	2,4 ± 0,2	40,0 %
	SSA	3,9 ± 0,6	1,1 ± 0,2	87,8 ± 0,9	2,3 ± 0,4	1,9 ± 0,1	3,0 ± 0,2	60,0 %

Tabelle 10: Phospholipidprofil der Surfactant-Subklassen einer Kaninchenlavage unter *in vitro* Konversion. Abgebildet sind die 6 dominierenden PL-Klassen Lysophosphatidylcholin (LPC), Sphingomyelin (SPH), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerol (PG) in Prozent der Gesamt-PL jeder Subklasse nach 0/30/120/240 min *in vitro* Konversion. Null min Konversion entspricht der bei 37°C 240 min inkubierten Kontrolle. Als Referenz ist das Phospholipidprofil einer nativen BALF vom Kaninchen gegeben. Die dargestellten Werte sind als Mittelwert ± SD dreier unabhängiger Versuche beschrieben.

Wie in der Literatur vorbeschrieben, waren auch in der vorliegenden Untersuchung Phosphatidylcholin (PC, ca. 89 %) und Phosphatidylglycerol (PG, 3-4 %) die vorherrschenden

Phospholipidklassen nativen, pulmonalen Surfactants aus originaler Lavageflüssigkeit vom Kaninchen. Lysophosphatidylcholin (LPC, 2,2 %), Sphingomyelin (SPH, 0,9 %), Phosphatidylinositol (PI, 1,9 %) und Phosphatidylethanolamin (PE, 2,0 %) stellten Minorkomponenten dar. Durch 48.000 x g Zentrifugation der nativen Kaninchenlavage konnten LSA von SSA getrennt und das Phospholipidprofil der jeweiligen Subfraktion analysiert werden. Der Vergleich zwischen dem Phospholipidprofil der nativen Kaninchenlavage und dem Phospholipidprofil der LSA-Fraktion erbrachte mit PC (native BALF: 89,6 %; LSA: 87,6 %) und PG (native BALF: 3,4 %; LSA: 3,6 %) als jeweils vorherrschende Komponenten ein nahezu identisches PL-Muster. Die Phospholipidklassen SPH, PI und PE waren mit relativen Anteilen  $\leq 2$  % in beiden Gruppen annähernd identisch vertreten (siehe Tabelle 10).

Im Vergleich zur nativen Kaninchenlavage und LSA-Fraktion zeigte die SSA-Subklasse ein leicht verändertes Phospholipidprofil vor allem zu Gunsten der Minorkomponenten LPC und SPH. LPC lag mit 10,1 % gegenüber 3,8 % in der LSA-Fraktion und 2,2 % in der originalen Kaninchenlavage ca. 2,6 bzw. 4,6-fach erhöht vor. Ebenso auffällig war der deutlich erhöhte Anteil an SPH mit 5,8 % gegenüber 0,7 % in der LSA-Subklasse und 0,9 % in der originalen Lavage vom Kaninchen. Dies kam einem 8,3- bzw. 6,4-fachen relativem Anteil gleich. Bedeutende Unterschiede im relativen Anteil der Minorkomponenten PI und PE zwischen der nativen Kaninchenlavage und den beiden Surfactantsubtypen waren nicht zu erkennen (siehe Tabelle 10). Der relative Anteil der LSA aus den Gesamt-Phospholipiden lag bei 93,7 %, der der SSA bei 6,3 %.

Die Betrachtung der PL-Profile der LSA- und SSA-Subklasse nach Durchführung einer *in vitro* Konversion zeigte folgende Ergebnisse:

In der LSA-Fraktion blieb der relative Anteil der Majorkomponenten PC und PG über die Konversionsdauer von 240 min annähernd gleich. Für PC bedeutete dies 87,6 % relativer PL-Anteil nach 0 min Konversion und 90,1 % nach 240 min Konversion. Der relative Anteil nach 0 min Konversion betrug für PG 3,6 %, nach 240 min Konversion 2,4 %. Entsprechendes galt auch für die Minorkomponenten LPC, SPH, PI und PE, deren relative Anteile sich in der LSA-Fraktion über die Dauer von 240 min *in vitro* Konversion nicht signifikant veränderten (siehe Tabelle 10).

Die Veränderungen in der Phospholipidzusammensetzung der *small surfactant aggregates* unter *in vitro* Konversionsbedingungen waren ebenfalls nur gering. Bereits nach 30 min waren die PL-Profile von LSA und SSA nahezu identisch, womit sich die nach *in vitro* Konversion isolierten Subklassen deutlich von Subklassen aus Kontrollproben unterschieden. Dieses Bild zeigte sich auch bei zunehmender Konversionsdauer (120, 240 min). Analog zu den *large surfactant*

*aggregates* blieb der relative Anteil der Major Komponenten PC und PG auch in der SSA-Subklasse über die gesamte Konversionsdauer nahezu gleich und war in etwa mit dem der LSA-Subklasse zu vergleichen. Entsprechend ergab sich für PC in der SSA-Subklasse ein relativer Anteil von 91,5 % (30 min) und 87,8 % (240 min), was in etwa 92,1 % (30 min) bzw. 90,1 % (240 min) korrespondierender LSA-Subklassen entsprach. Ähnliches konnte auch für PG in der SSA-Subklasse mit 3,2 % (30 min) und 3,0 % (240 min) im Vergleich zu 2,9 % (30 min) und 2,4 % (240 min) in der LSA-Subklasse ermittelt werden. Der relative Gehalt an LPC und SPH in den SSA unbehandelte BALF glich sich schon nach kurzer Konversionsdauer dem der LSA-Fraktion an. So betrug der relative Anteil an LPC und SPH in der SSA-Subklasse nach 120 min 3,2 % bzw. 0,8 %, in der LSA-Subklasse 2,2 % bzw. 0,8 %. Ein signifikanter Einfluss durch die Durchführung einer *in vitro* Konversion auf den relativen Anteil von PI und PE in der SSA-Subklasse war nicht zu erkennen. Beide Phospholipidklassen waren sowohl in der LSA- als auch SSA-Subklasse als Minor Komponenten mit jeweils relativen Anteilen um etwa 2 % vertreten.

#### **4.1.3. Einfluss der *in vitro* Konversion auf das Fettsäureprofil der Phospholipidklassen**

Um mögliche Veränderungen des Fettsäureprofils der Surfactantsubgruppen durch den Prozess der *in vitro* Konversion evaluieren zu können, wurden Fettsäuren aus den Gesamtlipiden, also als Glycerolester gebundene Fettsäuren aus Phospholipiden und Neutrallipiden sowie freie Fettsäuren nach Kapitel 3.2.11. mit 2 N HCl in Methanol in ihre Methylester umgewandelt, gaschromatographisch aufgetrennt und über Flammenionisationsdetektion quantifiziert. Als Kontrolle diente native Lavage vom Kaninchen. Untersucht wurden die Fettsäuremethylester (FAME) aus Palmitinsäure (16 : 0), Palmitoleinsäure (16:1), Stearinsäure (18:0), Ölsäure (18:1), Linolsäure (18:2), Linolensäure (18:3) und Arachidonsäure (20:4).

Wie in Tabelle 11 dargestellt, zeigte die quantitative Analyse der Fettsäuremethylester aus den Gesamtlipiden der untersuchten nativen Kaninchenlavage bei allen Proben einen hohen Anteil an Palmitinsäure (16:0; 60,50 %) und Ölsäure (18:1; 17,10 %). An dritter Stelle war Linolsäure (18:2; 10,58 %) zu finden. Palmitoleinsäure (16:1; 3,81 %), Stearinsäure (18:0; 4,86 %), Linolensäure (18:3; 1,45 %) und Arachidonsäure (20:4; 0,40%) waren als Minor Komponenten detektierbar. Des Weiteren konnte als Voraussetzung für das spätere *in vitro* Konversions-Modell gezeigt werden, dass Proben, welche 240 min bei 37°C inkubiert wurden, eine nahezu identische Verteilung an Fettsäuren aufwiesen wie die der nativen Kaninchenlavage. Ein Vergleich des FA-

Profils der Gesamtlipide zwischen der nativen Lavage und der LSA-Subklasse nach 48.000 x g Zentrifugation (0 min Konversion, 240 min Inkubation) zeigte keine Differenzen (siehe Tabelle 11).

Im analogen Vergleich nativer Kaninchenlavage und SSA-Subklasse war ein signifikant höherer relativer Anteil an den ungesättigten Fettsäuren 16:1 (5,50 %), 18:1 (23,72 %), 18:2 (19,44 %), 18:3 (2,62 %) und 20:4 (1,00 %) in der SSA-Subklasse zu erkennen. Der relative Anteil der gesättigten, quantitativ dominierenden Palmitinsäure (16:0) der SSA-Subklasse betrug im Gegensatz zur nativen Lavage (60,50 %) und zur LSA-Subklasse (60,76 %) nur 39,50 % und lag damit deutlich niedriger.

Die Durchführung der *in vitro* Konversion bis zu 240 min beeinflusste das Fettsäureprofil der LSA-Subfraktion nachweislich nicht. Die relativen Mengen aller 7 analysierten Fettsäuren blieben über die gesamte Konversionsdauer nahezu konstant (siehe Tabelle 11). Im Unterschied dazu konnten in der SSA-Subklasse ausgeprägte Veränderungen durch den Vorgang der *in vitro* Konversion beobachtet werden. Lagen, wie oben beschrieben, die 0 min Werte von 16:1, 18:1, 18:2, 18:3 und 20:4 im Vergleich zur LSA-Subklasse signifikant höher, beobachtete man jetzt, über die Konversionsdauer hinweg, ein kontinuierliches Angleichen an die prozentualen Anteile der LSA-Subklasse. So war nach 240 min *in vitro* Konversion das Fettsäureprofil der LSA mit dem der SSA identisch. Am Beispiel der Linolsäure (18:2) bedeutete dies eine relative Abnahme von 19,44 % (0 min), 13,03 % (30 min), 12,14 % (60 min), 11,99 % (120 min) auf 11,09 % (240 min), was letztendlich dem relativen Anteil der Linolsäure in der LSA-Fraktion gleichkam. Auf der anderen Seite war durch den Prozess der *in vitro* Konversion ein stetiges Ansteigen der 16:0 von 39,50 % (0 min) auf 58,40 % (240 min) zu erkennen. Auch hier wurde nach 240 min Konversionsdauer ein dem LSA-Subtyp äquivalenter Endwert erreicht. Die 18:0 der SSA-Subklasse schien durch *in vitro* Konversion nicht beeinflusst zu werden und hielt sich im Mittel bei  $5,82 \pm 0,9$  % ( $4,57 \pm 0,5$  % in der LSA-Subklasse).

Probe	Modus	16:0 [ % ]	16:1 [ % ]	18:0 [ % ]	18:1 [ % ]	18:2 [ % ]	18:3 [ % ]	20:4 [ % ]	Subklassen verteilung [ % ]
BALF	nativ	60,50 ± 0,87	3,81 ± 0,09	4,86 ± 0,11	17,10 ± 0,53	10,58 ± 0,43	1,45 ± 0,17	0,40 ± 0,05	
LSA	0 min Konversion	60,76 ± 0,18	4,07 ± 0,01	3,99 ± 0,05	18,05 ± 0,25	9,72 ± 0,24	1,33 ± 0,04	0,35 ± 0,03	94,64
	30min Konversion	59,87 ± 0,41	3,87 ± 0,19	4,30 ± 0,06	18,54 ± 0,24	9,81 ± 0,15	1,43 ± 0,17	0,39 ± 0,00	75,61
	60min Konversion	59,05 ± 1,20	4,11 ± 0,15	4,56 ± 0,34	18,89 ± 0,73	9,78 ± 0,11	1,34 ± 0,07	0,36 ± 0,02	62,26
	120 min Konversion	59,29 ± 0,48	3,80 ± 0,07	4,73 ± 0,17	18,74 ± 0,36	9,98 ± 0,22	1,51 ± 0,06	0,40 ± 0,01	58,59
	240 min Konversion	58,83 ± 0,68	3,58 ± 0,13	5,25 ± 0,09	19,26 ± 0,37	10,11 ± 0,10	1,47 ± 0,06	0,40 ± 0,02	39,97
SSA	0 min Konversion	39,50 ± 0,69	5,50 ± 0,80	7,38 ± 2,05	23,72 ± 3,14	19,44 ± 2,36	2,62 ± 0,19	1,00 ± 0,25	5,36
	30 min Konversion	47,12 ± 0,31	3,99 ± 0,21	4,99 ± 0,20	27,66 ± 0,20	13,03 ± 0,65	2,06 ± 0,29	0,45 ± 0,09	24,39
	60 min Konversion	50,82 ± 1,59	3,69 ± 0,49	5,48 ± 0,78	25,12 ± 1,59	12,14 ± 0,56	1,62 ± 0,10	0,40 ± 0,02	37,74
	120 min Konversion	57,35 ± 1,88	4,15 ± 0,37	5,47 ± 0,85	17,73 ± 0,15	11,99 ± 0,54	1,49 ± 0,12	0,43 ± 0,05	41,41
	240 min Konversion	58,40 ± 1,58	3,89 ± 0,15	5,76 ± 0,14	17,84 ± 0,94	11,09 ± 0,56	1,47 ± 0,13	0,39 ± 0,06	60,03

Tabelle 11: Fettsäureverteilung der Gesamtphospholipide (in Prozent aller Fettsäuren) einer Kaninchen-BALF in Abhängigkeit der Subfraktion vor und nach Durchführung einer *in vitro* Konversion. MW ± SD aus drei unabhängigen Versuchen.

#### 4.1.4. Einfluss der *in vitro* Konversion auf das Neutrallipidprofil

Bei der dünn-schichtchromatographischen Auftrennung von Surfactantmaterial nach der Vorschrift für Phospholipide (Kap. 3.2.9.) eluieren Neutrallipide (NL) in der Nähe der Laufmittelfront ( $R_f = 0,9-1,0$ ). Da unter diesen Bedingungen eine Trennung der Neutrallipide in ihre Einzelkomponenten mit anschließender Quantifizierung nicht praktikabel war, wurde gemäß Kap. 3.2.10. die Neutrallipidfraktion in einem ersten Schritt dünn-schichtchromatographisch von Phospholipiden getrennt, der Neutrallipidanteil isoliert und in einem zweiten Schritt aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte nach Visualisierung der Lipide die densitometrische Quantifizierung mittels Scannertechnik.

Sowohl das Neutrallipidprofil als auch das Verhältnis von Neutrallipid- zu Gesamtphospholipidgehalt (NL/PL) Lavagen wiesen bedeutende Unterschiede zwischen den LSA und den SSA auf. Innerhalb der Neutrallipide der LSA-Subklasse waren Cholesterol (CH;  $37,1 \pm 4,2$  %) und freie Fettsäuren (FA;  $30,5 \pm 3,9$  %) als Majorkomponenten vertreten. Monoglyceride (MG;  $9,8 \pm 2,1$  %), Diglyceride (DG;  $14,4 \pm 1,2$  %) und Triglyceride (TG;  $8,1 \pm 2,0$  %) stellten Minorkomponenten dar. Das Neutrallipidprofil der SSA-Subklasse zeigte Triglyceride (TG;  $38,7 \pm 5,1$  %) und freie Fettsäuren (FA;  $27,2 \pm 8,0$  %) als am stärksten vertretene Neutrallipidkomponenten, wohingegen Cholesterol (CH;  $5,9 \pm 1,4$  %) in erheblich geringerem Umfang vorlag. Insgesamt wurden etwa 67 % aller Neutrallipide innerhalb der LSA-Fraktion und nur ca. 33 % aller Neutrallipide in der SSA-Fraktion wiedergefunden. Der Quotient aus NL/PL von nativer Lavageflüssigkeit betrug 0,5 bei den LSA und 0,4 bei den SSA. Somit ließ sich in nativer Lavage ein etwa 10-fach höherer, relativer Anteil an Neutrallipiden in den SSA im Vergleich zu den LSA feststellen.

Entsprechend dem Transit der Phospholipide (siehe Kap. 4.1.2.) und der Fettsäuren (siehe Kap. 4.1.3.) aus der LSA- in die SSA-Fraktion nach *in vitro* Konversion konnte auch ein analoges Verhalten der Neutrallipide beobachtet werden. Parallel zum Anstieg des relativen Anteiles der *small surfactant aggregates* näherte sich das Neutrallipidprofil dieser Fraktion zunehmend der der LSA an. Der relative Gehalt an Neutrallipiden der LSA-Subklasse betrug 240 min nach *in vitro* Konversion zwar nur noch  $17,6 \pm 1,5$  % im Vergleich zu  $81,7 \pm 1,2$  % in der SSA-Subklasse, die NL/PL Ratio war hingegen mit  $8,8 \pm 0,2$  % (LSA) bzw.  $7,2 \pm 0,6$  % (SSA) annähernd identisch (siehe Tabelle 12).

Modus	Probe	Mono-glyceride	Di-glyceride	Choles-terol	Freie Fettsäure	Tri-glyceride	Relativer Gehalt der NL	NL / PL
Nativ	LSA	9,8 ± 2,1	14,4 ± 1,2	37,1 ± 4,2	30,5 ± 3,9	8,1 ± 2,0	66,9 ± 3,9	4,3 ± 0,0
	SSA	12,8 ± 5,7	14,9 ± 3,4	5,9 ± 1,4	27,2 ± 8,0	38,7 ± 5,1	33,1 ± 3,8	40,4 ± 7,0
60 min Konvers.	LSA	16,6 ± 3,5	15,5 ± 2,2	35,3 ± 4,7	21,0 ± 6,2	11,5 ± 3,5	38,0 ± 5,3	2,7 ± 0,0
	SSA	9,2 ± 2,4	14,4 ± 5,7	27,8 ± 2,8	39,8 ± 5,8	24,1 ± 11,6	62,1 ± 5,3	5,9 ± 0,6
240 min Konvers.	LSA	18,9 ± 6,2	12,8 ± 2,8	27,9 ± 4,1	27,6 ± 7,2	13,2 ± 5,3	17,6 ± 1,5	8,8 ± 0,2
	SSA	8,1 ± 3,4	8,3 ± 1,2	24,6 ± 0,9	36,2 ± 5,7	22,6 ± 8,1	81,7 ± 1,2	7,2 ± 0,6

Tabelle 12: Neutrallipidprofil der Surfactantsubtypen einer Lavage vom Kaninchen. Die jeweiligen Neutrallipide der Surfactant-Subtypen LSA und SSA sind in Prozent des Gesamtneutrallipidgehaltes (NL) nativer Proben bzw. von Proben nach *in vitro* Konversion (Konvers.) angegeben. Zusätzlich ist die relative Verteilung des Gesamtneutrallipidanteils zwischen der LSA- und SSA-Fraktion und die NL/PL-Ratio dargestellt. MW ± SD; n = 3.

#### 4.1.5. Einfluss der *in vitro* Konversion auf den Apoproteingehalt

##### 4.1.5.1. Beeinflussung des SP-B-Gehaltes durch *in vitro* Konversion

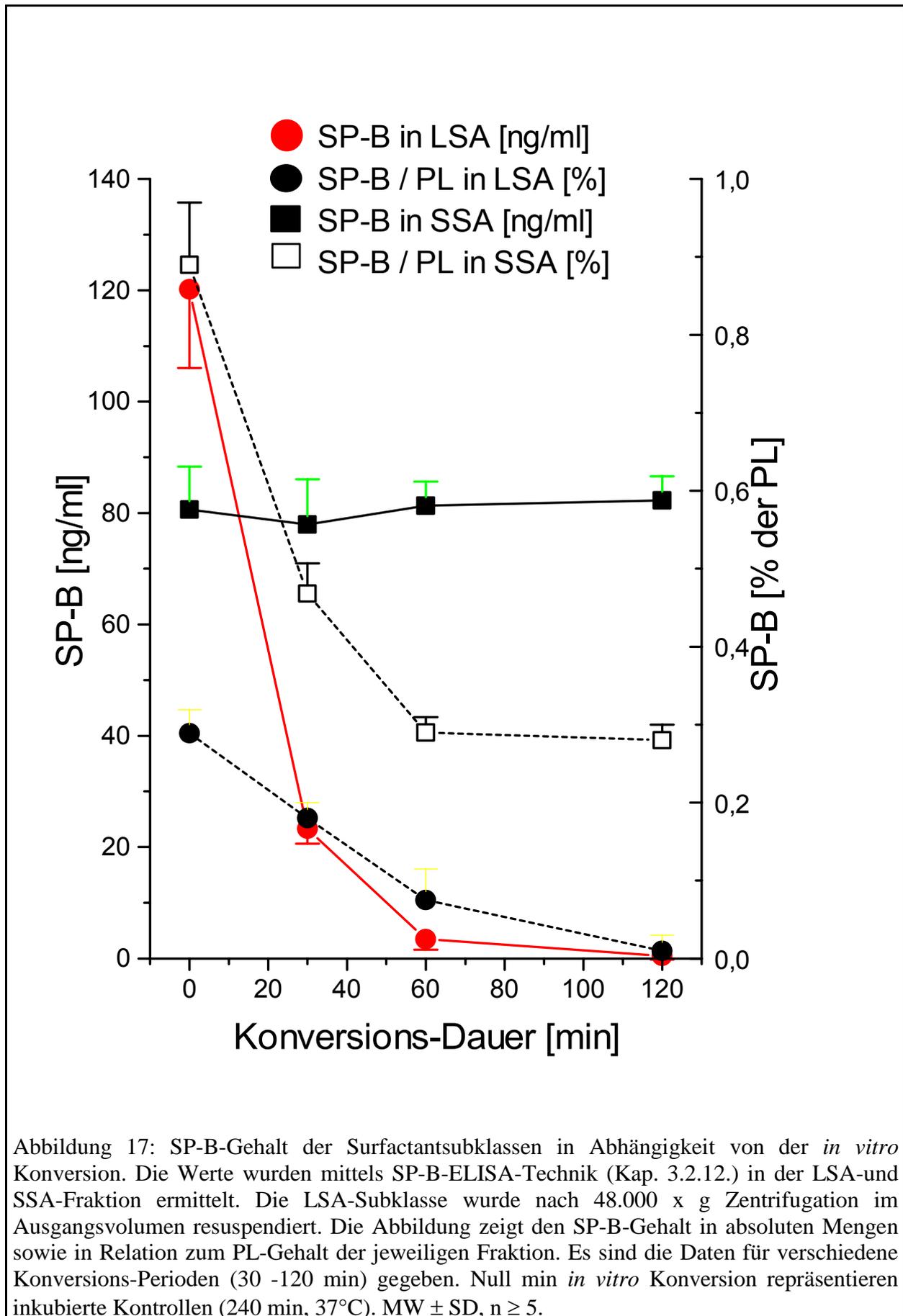
Das hydrophobe Surfactantapoprotein SP-B wurde mit dem in Kapitel 3.2.12. beschriebenen Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) [166] analysiert. Als Erstantikörper stand ein gegen dimeres SP-B vom Schwein gerichteter Antikörper (8B5E) zur Verfügung. Eine Kreuzreaktivität zum monomeren SP-B von nur ca. 10 % war bekannt, bei einem geringen Gesamtanteil des monomeren SP-B von nur etwa 10 % [172] jedoch vernachlässigbar gering. Die Kreuzreaktivität des SPB-Antikörpers 8B5E gegen unterschiedliche Spezies war ebenfalls bekannt. Im Falle des Kaninchens fand sich eine dem Schwein vergleichbare Reaktivität [173]. Die *in vitro* Konversion führte zu einer signifikanten, zeitabhängigen Abnahme des SPB-Gesamtgehaltes in nativer Lavage. Innerhalb von 120 min war die initiale SP-B-Konzentration der Lavage von 211,7 ng/ml (in Tabelle 13 als Summe aus LSA + SSA-Subklasse gegeben) auf etwa 41 %, entsprechend 86,8 ng/ml, gefallen. Die vergleichende Analyse der absoluten SP-B-Konzentrationen in beiden Surfactantsubklassen zeigte, dass dies in erster Linie als Konsequenz eines massiven SP-B-Verlustes in der LSA-Fraktion zu werten war.

Unter *in vitro* Konversion war die SP-B-Konzentration in der LSA-Subklasse von anfänglich 126,1 ng/ml bereits nach 30 min auf 24,5 ng/ml und nach 60 min auf 3,6 ng/ml gefallen. Nach 120 min konnte das SP-B bei Werten < 1 ng/ml kaum noch detektiert werden. In der SSA-Subklasse veränderte sich der absolute SP-B-Gehalt kaum und hielt sich im Mittel bei 80 ng/ml (siehe Tab. 13).

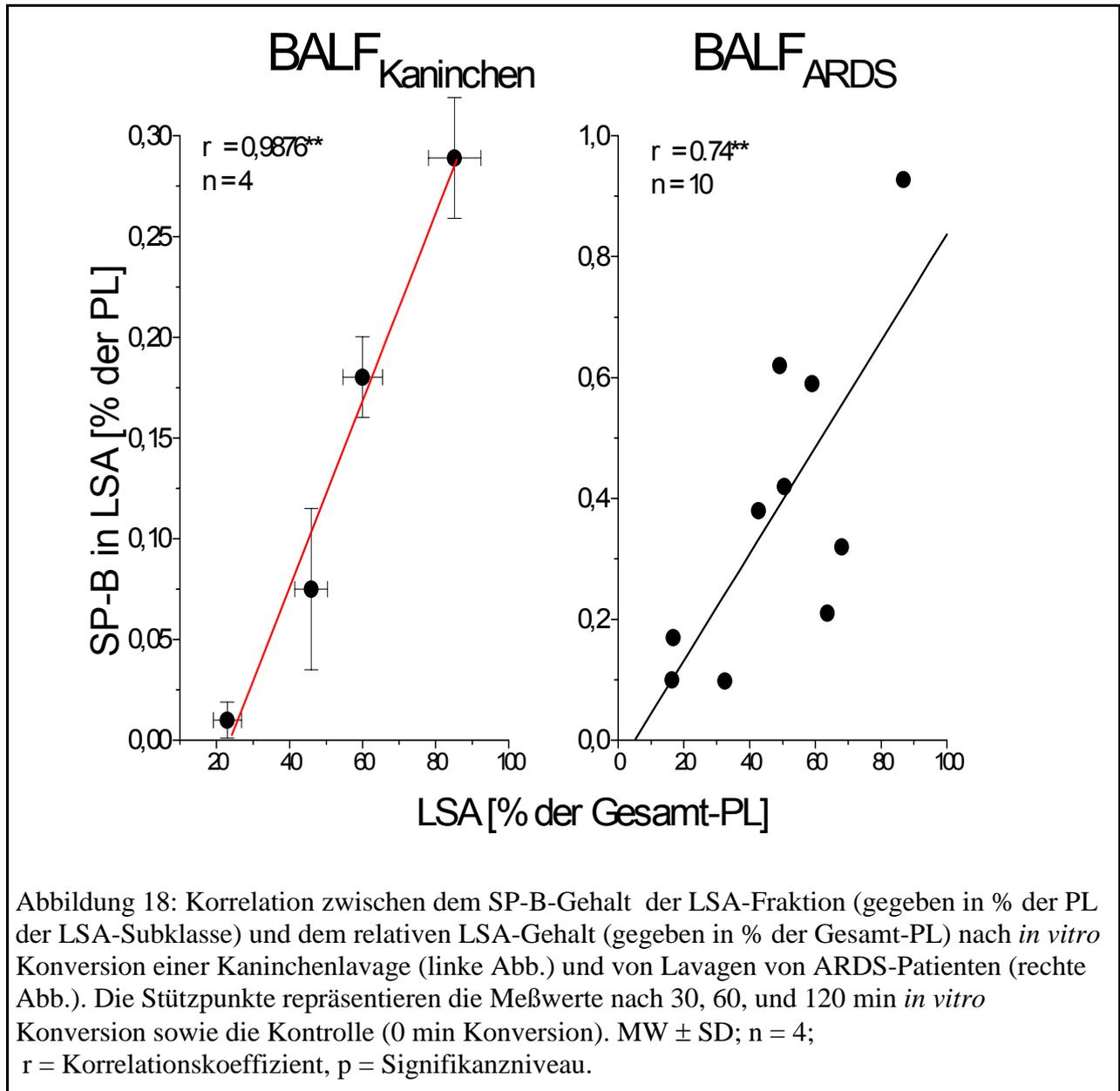
	<b>SP-B nativ</b> [ng/ml]	<b>SP-B in LSA</b> [ng/ml]	<b>SP-B in SSA</b> [n/ml]
0 min Konversion	194,7 ± 31,0	126,1 ± 14,8	85,6 ± 8,2
30 min Konversion	136,1 ± 8,8	24,5 ± 2,8	92,9 ± 6,6
60 min Konversion	102,4 ± 21,0	3,6 ± 1,9	85,4 ± 4,6
120 min Konversion	80,1 ± 20,0	< 1	86,4 ± 4,6
Tabelle 13: Absolute Konzentration von SP-B in nativer Lavage vom Kaninchen (BALF) sowie in LSA und SSA nach <i>in vitro</i> Konversion. Die durch Zentrifugation der BALF bei 48.000 x g gewonnenen LSA wurden entsprechend dem Ausgangsvolumen mit 0,9 % NaCl rekonstituiert. MW ± SE aus 5 unabhängigen Experimenten.			

Im Verhältnis zu den Phospholipiden war auch innerhalb der SSA-Fraktion ein zeitabhängiger Abfall des (relativen) SB-B Gehaltes unter der *in vitro* Konversion zu beobachten (siehe Tabelle 14 und Abb. 17). Bei nahezu konstantem absoluten SP-B-Gehalt der SSA-Fraktion läßt sich dies als Folge der durch die *in vitro* Konversion induzierten Lipidverschiebung aus der LSA- in die SSA-Fraktion erklären.

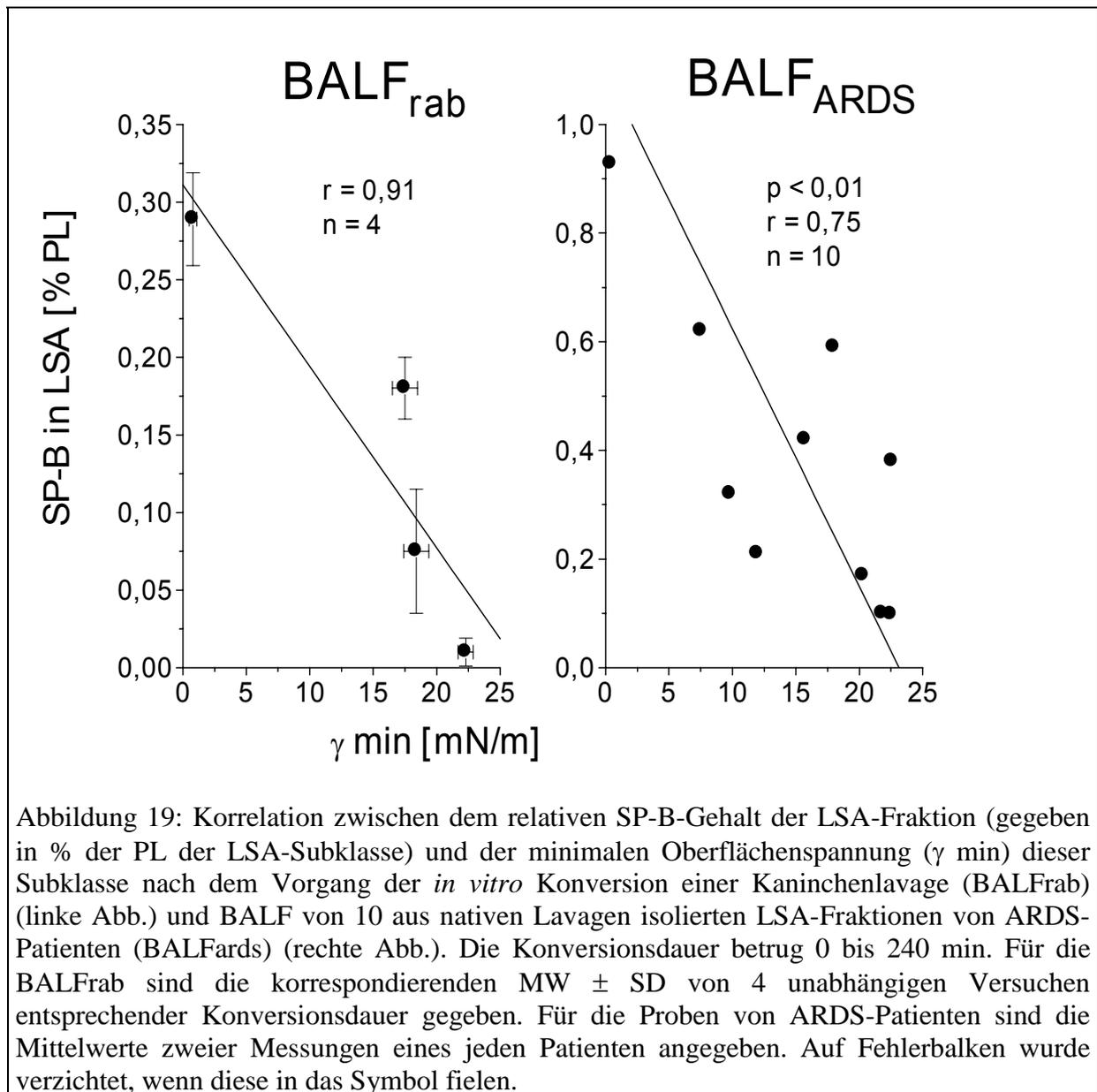
	<b>SP-B in LSA</b> [% PL]	<b>SP-B in SSA</b> [% PL]
0 min Konversion	0,31 +- 0,03	0,90 +- 0,07
30 min Konversion	0,19 +- 0,02	0,48 +- 0,03
60 min Konversion	0,08 +- 0,03	0,31 +- 0,01
120 min Konversion	n.n	0,30 +- 0,01
Tabelle 14: Relative Konzentration von SP-B in Relation zu den Phospholipiden in LSA und SSA nach <i>in vitro</i> Konversion. MW ± SE aus 5 unabhängigen Experimenten.		



Es konnte somit unter den Bedingungen der *in vitro* Konversion eine enge Korrelation zwischen der Abnahme des relativen LSA-Gehaltes und dem Verlust der SP-B-Konzentration (absolut und in % PL) dieses Subtypes nachgewiesen werden (siehe Abb. 18).



Weiterhin wurden die nach *in vitro* Konversion von nativer Kaninchenlavage isolierten LSA biophysikalisch charakterisiert. Der bereits in Kap. 4.1.1. gefundene Verlust der Surfactantisolate an Oberflächenaktivität, hier dargestellt durch eine drastische Zunahme der minimalen Oberflächenspannung ( $\gamma$  min), korreliert ausgezeichnet mit der oben beschriebenen Abnahme des SP-B in den LSA (siehe Abb. 19).



#### 4.1.5.2. Verifizierung der Methode

Die Möglichkeit eines Artefaktes bei der SP-B-Bestimmung durch Adsorption von SP-B an die verwendeten Probengefäße (Falcon) im Zuge des *in vitro* Konversionsvorganges über 240 min sollte ausgeschlossen werden. Hierzu wurden nach der *in vitro* Konversion die Proben aus den Plastikröhrchen geleert, mit A) 1-Propanol und B) Chloroform/MeOH/ $10^{-3}$  N HCl 47,5/47,5/5 v/v/v gründlich ausgewaschen und das Suspensat mittels ELISA-Technik auf SP-B untersucht. Weniger als 1 % des initialen SP-B-Gehaltes der jeweiligen Probe konnte detektiert werden. Damit konnte eine nennenswerte Adsorption von SP-B an die Kunststoffwand im Zuge der Konversions-Prozedur ausgeschlossen werden.

#### 4.1.6. Einfluss einer sekundären Rekonstitution mit SP-B auf die Oberflächenaktivität der *large surfactant aggregates* nach *in vitro* Konversion

Die postulierte Bedeutung des Surfactantapoproteins B (SP-B) für den Abfall der relativen LSA Menge und deren Oberflächenaktivität sollte näher untersucht werden. Hierzu wurde native Kaninchenlavage nach 240 min *in vitro* Konversion bei 48.000 x g eine Stunde lang zentrifugiert und das gewonnene Sediment (LSA-Subfraktion) mit aufgereinigtem, dimeren SP-B vom Kaninchen rekonstituiert. Als Rekonstitutionsmenge wurde die 10-fache SP-B- Konzentration (gemessen mit dem SP-B-ELISA) einer nativen, 240 min bei 37° C inkubierten Kontrolle eingesetzt. Wie oben bereits beschrieben, wies der LSA-Subtyp dieser Kontrollen ausgezeichnete minimale Oberflächenspannungswerte ( $\gamma$  min) von 1,8 mN/m auf, wohingegen die  $\gamma$  min-Werte LSA-Proben nach *in vitro* Konversion eine deutliche Reduktion auf ca. 16 mN/m zeigten. Die sekundäre Rekonstitution einer bereits *in vitro* konvertierten LSA-Fraktion mit SP-B führte zu einer eindrucksvollen, vollkommenen Wiederherstellung der Oberflächenaktivität mit  $\gamma$  min-Werten von 1,1 mN/m (siehe Tabelle 15).

Probe	minimale Oberflächenspannung der LSA-Fraktion [mN/m]
<b>A:</b> native BALF, 240 min bei 37°C inkubiert	1,8 ± 1,8
<b>B:</b> BALF nach 240 min Konversion	16,0 ± 1,5
<b>C:</b> BALF nach 240 min Konversion + SP-B-Addition	1,1 ± 0,1

Tabelle 15: Kaninchenlavage (BALF) wurde entweder für 240 min inkubiert (A) oder für 240 min einer *in vitro* Konversion unterzogen (B) und die Oberflächenaktivität der LSA-Fraktion im Pulsating Bubble Surfactometer analysiert. In einem zusätzlichen Experiment wurde ein Aliquot einer *in vitro* konvertierten LSA-Fraktion nach Kapitel 3.2.13. nachträglich mit der 10-fachen Menge an SP-B (gemessen am SP-B-Gehalt einer 240 min bei 37°C inkubierten, nativen Kontrolle) angereichert und die Oberflächenaktivität erneut überprüft (C). MW ± SE, n = 4.

#### **4.1.7. Vergleichende Analysen bronchoalveolärer Lavagen gesunder Personen und der von ARDS-Patienten**

Gesunde Personen und ARDS-Patienten wurden fiberbronchoskopisch lavagiert, die Lavageflüssigkeit nach Kap. 3.2.1. gewonnen und aufbereitet, für eine Stunde  $48.000 \times g$  zentrifugiert und im Anschluss biochemisch und biophysikalisch analysiert. Die Diagnose eines ARDS wurde entsprechend der jüngsten amerikanisch-europäischen Konsensus Konferenz [147] gestellt. Die zu Grunde liegenden Erkrankungen in dem hier betrachteten Patientenkollektiv waren Sepsis ( $n = 6$ ), schwere Pneumonie ( $n = 2$ ), Schock ( $n = 1$ ) und Pankreatitis ( $n = 1$ ). Das mittlere Alter der ARDS-Patienten lag bei  $48 \pm 5$  Jahren (7 männlich, 3 weiblich). In der Kontrollgruppe waren 11 freiwillige, gesunde Personen.

Bei gesunden Personen entfielen  $65,7 \pm 4,8$  % des Gesamtphospholipidgehaltes der originalen BALF auf die LSA-Fraktion (MW  $\pm$  SE,  $n = 11$ ). Der relative Gehalt der LSA-Fraktion in der ARDS-Gruppe war hingegen mit  $46,6 \pm 7,1$  % signifikant geringer (MW  $\pm$  SE,  $n = 10$ ,  $p < 0,05$ ). Die unter standardisierten Bedingungen durchgeführte biophysikalische Analyse der LSA-Proben mit dem Pulsating Bubble Surfactometer ergab für die Kontrollgruppe  $\gamma$  min-Werte von  $0,45 \pm 0,22$  mN/m. In der ARDS-Gruppe stieg dieser Wert jedoch hochsignifikant auf  $14,43 \pm 2,59$  mN/m ( $p < 0,001$ ) an. Entsprechend war ein Anstieg der  $\gamma$  ads-Werte von  $22,24 \pm 0,55$  mN/m auf  $35,85 \pm 2,63$  mN/m ( $p < 0,01$ ) zu beobachten. Wie bereits oben für native Lavagen von Kaninchen nach *in vitro* Konversion beschrieben, konnte auch der prozentuale LSA-Gehalt in BALF-Proben von ARDS-Patienten mit den entsprechenden  $\gamma$  min-Werten der gleichen Subklasse signifikant korreliert werden (siehe Abb. 16).

Der relative SP-B-Gehalt (bezogen auf PL) der LSA-Fraktion betrug in der Kontrollgruppe  $4,94 \pm 1,03$  % aber lediglich  $0,38 \pm 0,15$  % bei den Patienten mit ARDS ( $p < 0,001$ ).

Bei den ARDS Patienten wurde abschließend der relative Prozentsatz der LSA-Fraktion und auch die gemessenen Oberflächenspannungswerte mit dem relativen SP-B Gehalt in Beziehung gestellt. Es ergab sich in voller Übereinstimmung mit den weiter oben dargestellten Ergebnissen eine enge positive Korrelation zwischen relativem SP-B Gehalt und relativem LSA Gehalt (Abb. 18) so wie eine inverse Korrelation zwischen SP-B Gehalt und Oberflächenaktivität (Abb.19).

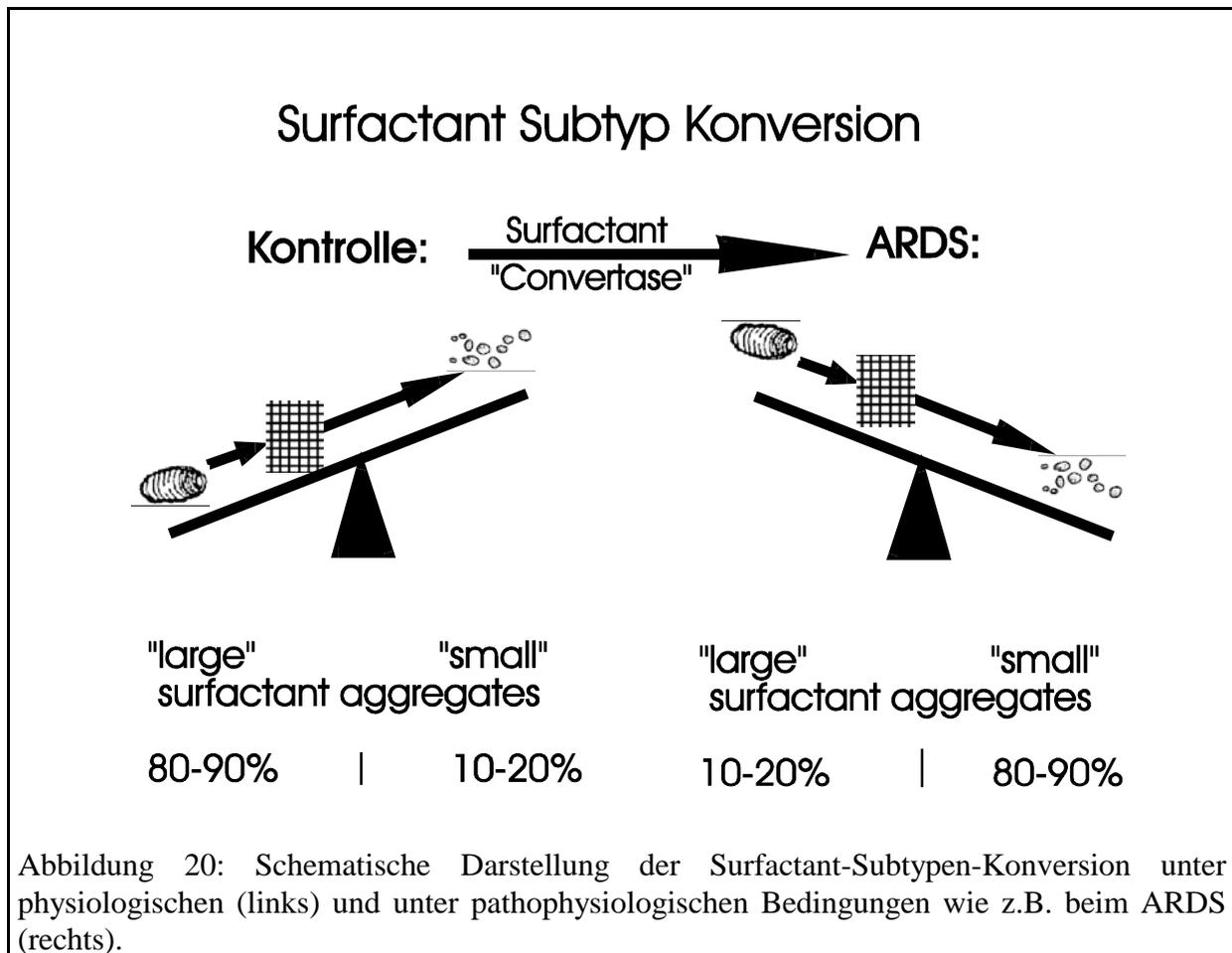
## 5. Diskussion

### 5.1. Methodische Aspekte

Auf der Basis des von Gross und Narine [4, 3] entwickelten und im Folgenden als *in vitro* Konversion bezeichneten Modells des extrazellulären Surfactantmetabolismus wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Grundlagen und Zusammenhänge der Konversion von *large surfactant aggregates* (LSA) zu *small surfactant aggregates* (SSA) näher untersucht. Wie in Kapitel 1.1.2. beschrieben konnte mit dieser Technik die metabolische Sequenz von Lamellar-Körperchen in tubuläres Myelin, multilamelläre Körperchen und schließlich in kleine, oberflächeninaktive Vesikel reproduziert werden [4, 86]. Wesentliche Grundlage der Surfactantkonversion scheinen sich zyklisch wiederholende Adsorptions- und Kompressionsprozesse des Surfactantmaterials an einer Luft-Wasser-Interphase zu sein. Hierdurch können die durch den Atemzyklus bedingten Oberflächenänderungen des alveolären Grenzflächenfilms imitiert werden. Eine Analyse der durch *in vitro* Konversion generierten Abbauprodukte zeigte hinsichtlich ihrer Ultrastruktur, Dichteigenschaften, Phospholipidkomposition und Oberflächenaktivität identische Eigenschaften mit den als Endprodukte des alveolären Surfactantpools anzusehende SSA [4]. Bezüglich der von Gross und Narine [4] entwickelten Methodik des *surface area cycling* seien einige kritische Anmerkungen angebracht. So liegt die Atemfrequenz von Mäusen und Kaninchen mit 150-250 Atemzyklen/min wesentlich höher, die des Menschen mit 15-18/min deutlich niedriger, als die 64 Zyklen/min des hier angewendeten Modells. Darüber hinaus besteht mit einem 8-fachen Größenunterschied zwischen minimaler und maximaler Oberfläche der Luft-Wasser-Grenzphase im Modell eine deutliche Diskrepanz zur Situation in *in vivo*, wo unter physiologischen Bedingungen etwa 1,5-fach größere alveoläre Oberflächenänderungen auftreten. Ein Umstand, der in diesem Zusammenhang erwähnenswert erscheint, ist die Tatsache, dass jedoch gerade unter den Bedingungen des ARDS ein massiver Verlust von Gasaustauschfläche verzeichnet werden kann und der restliche für die Ventilation zur Verfügung stehende alveoläre Raum einer erheblichen Überdehnung und Überblähung ausgesetzt ist ("baby lung" Konzept [175]). Unter diesen Bedingungen erscheinen 8-fache Oberflächenveränderungen durchaus realistisch und kommen somit dem hier verwendeten Modell nahe.

Im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchungen konnte extrazellulärer Surfactant mittels einer einstündigen, einstufigen Zentrifugation bei 48.000 x g in die Subklasse der biophysikalisch aktiven *large surfactant aggregates* (LSA), bestehend aus Lamellar-Körperchen (LK), tubulärem Myelin (TM) und multilamellären Vesikeln (MV), und die in ihrer biophysikalischen Aktivität deutlich reduzierten *small surfactant aggregates* (SSA), bestehend aus kleinen unilamellären Vesikeln (UV), aufgetrennt werden. Die Anwendung dieses Trennverfahrens erfolgte auf der Basis früherer Arbeiten von Gregory et al. [148] und in Anlehnung an die von Veldhuizen et al. [79] beschriebene 40.000 x g Zentrifugation. Als Validierung diente zusätzlich ein methodischer Vergleich zwischen dem etablierten Modell der sequentiellen Zentrifugation nach Magoon [77] und der hier eingesetzten 48.000 x g Zentrifugation (siehe Kap. 3.2.6.). Charakteristika, die als Zuordnungskriterien zu den verschiedenen Subklassen dienten, waren der relative Phospholipidgehalt und die biophysikalischen Eigenschaften. Sowohl für die differentielle (externe Arbeitsgruppen) als auch für die in dieser Arbeit angewendete einstufige Zentrifugation bei 48.000 x g liegt eine ultramorphologische Charakterisierung vor [193]. Es fand sich bei beiden Verfahren in der LSA-Fraktion das oben beschriebene Bild der gemischten Zusammensetzung aus LK, TM und MV. Wie aus Tabelle 9 zu entnehmen ist, imponierte sowohl das aus der nativen Kaninchenlavage nach dem Magoon-Schema gewonnene 1000 x g als auch das 60.000 x g Sediment durch seine hervorragende Oberflächenaktivität wie dies auch aus *in vivo* Studien abgeleitet werden kann. Beide Fraktionen repräsentierten in ihrer Summe ca. 82 % des Gesamt-Phospholipidgehaltes der BALF. Analog hierzu wies das 48.000 x g Sediment der gleichen BALF vergleichsweise identische biophysikalische Eigenschaften und einen Gesamtphospholipidgehalt von ebenfalls ca. 82 % auf. Unter zyklischen Oberflächenänderungen (*in vitro* Konversion) reduzierte sich der relative Phospholipidgehalt des 1000 x g und 60.000 x g Sediments zu Gunsten des 100.000 x g Sediments und des Überstandes. Erstmals konnte ein drastischer Verlust der biophysikalischen Oberflächenaktivität beider Sedimente nach *in vitro* Konversion nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu bisherigen Daten [79], die den Verlust der biophysikalischen Aktivität bronchoalveolärer Lavagen nach *in vitro* Konversion als direkte Folge der SSA-Generation und der damit verbundenen prozentualen Verschiebung des LSA-SSA-Verhältnisses ansahen und sowohl für native als auch für konvertierte LSA ausgezeichnete oberflächenreduzierende Eigenschaften vermuteten, wiesen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten auf einen,

parallel zum LSA-SSA-Transit einhergehenden, massiven Verlust der Oberflächenaktivität in der verbleibenden LSA-Subklasse auf.



Wie in der Abbildung 20 illustriert, zeigen interessanterweise die LSA Präparationen von Patienten mit ARDS ähnlich stark beeinträchtigte biophysikalische Eigenschaften wie die LSA-Fractionen von Kaninchenlavagen nach Durchführung der *in vitro* Konversion. Sowohl der Verlust der Oberflächenaktivität als auch der unter *in vitro* Konversion zu beobachtende, zeitabhängige Transit von Phospholipiden aus der LSA in die SSA Fraktion konnte mit Hilfe der einstündigen 48.000 x g Zentrifugation verzeichnet werden. Darüber hinaus hat sich vor dem Hintergrund pathologischer Veränderungen der Lavageflüssigkeit bei pulmonalen Krankheitsbildern die Hochgeschwindigkeitszentrifugation als valide Methode zur Separation der Surfactantsubklassen etabliert. Verfälschte Ergebnisse wie sie z. B. durch interagierende und dichte-alterierende Substanzen ("*vascular leakage*") bei der Separation mit Gelgradienten auftreten, sind hier nahezu vernachlässigbar [176]. Während die LSA aus der nativen Lavage vom Kaninchen als Zeichen der exzellenten Oberflächenaktivität minimale

Oberflächenspannungswerte nahe Null mN/m und eine schnelle Adsorption an die Luft-Wasser-Grenzfläche aufzeigten, waren in strikter Abhängigkeit von der Konversionsdauer sowohl die oberflächenreduzierenden Eigenschaften als auch die Adsorptionsfähigkeit der verbleibenden LSA-Subklasse dramatisch reduziert. Bei der Betrachtung der diesem massiven Funktionsverlust der LSA-Fraktion unter den Bedingungen der *in vitro* Konversion zu Grunde liegenden Ursachen sind folgende Aspekte zu diskutieren:

## **5.2. Analyse der Lipidzusammensetzung der Surfactantsubfraktionen nach *in vitro* Konversion**

Die Frage, inwieweit funktionelle und morphologische Unterschiede der Surfactant-Subklassen als Folge qualitativ und quantitativ divergierender Lipidzusammensetzungen gewertet werden müssen, wurde in der Literatur bereits mehrfach aufgegriffen und zum Teil detailliert beschrieben [77, 177]. Veränderungen der Lipidfraktion unter zyklischen Oberflächenänderungen (*in vitro* Konversion) wurden bislang allerdings nicht untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden somit erstmals lipidchemische Analysen der verschiedenen Surfactantsubklassen vor und nach *in vitro* Konversion analysiert und umfassten das Phospholipid-, Fettsäure- und Neutrallipidprofil.

Der durchschnittliche Gesamtpospholipidgehalt der untersuchten Kaninchenlavagen lag zwischen 60 und 100 µg/ml. Wie in der Literatur vorbeschrieben, ließen sich gemäß Kap. 3.2.9. nach einer modifizierten Methode von Gustavsson [162] die sechs dominierenden Phospholipid-Klassen des Surfactants lipidchemisch auftrennen und quantifizieren. In Übereinstimmung mit Studien von M. Magoon et al. [77] unterschied sich das Phospholipidprofil nativer Lavagen nicht von dem der LSA-Subklasse. In beiden Gruppen lagen Phosphatidylcholin (PC, ~89 %) und Phosphatidylglycerol (PG, 3-4 %) als die bedeutendsten PL-Klassen nativen Surfactants vor. Lysophosphatidylcholin (LPC, 2,2 %), Sphingomyelin (SPH, 0,9 %), Phosphatidylinositol (PI, 1,9 %) und Phosphatidylethanolamin (PE, 2,0 %) stellten Minorkomponenten dar. Die hier ermittelten relativen Anteile der jeweiligen PL-Klassen der LSA-Subklasse decken sich weitgehend mit den Angaben für die P3 und P4 Fraktion entsprechend der differenziellen Zentrifugation nach Magoon et al. [77]. Divergierend zu den hier ermittelten Daten gaben Magoon et al. [77] allerdings einen etwa 3-fach erhöhten Prozentsatz für PG (9 %) in den Fraktionen P3 und P4 an, während in den

gleichen Fraktionen LPC mit ca 1 % gegenüber 3,8 % in den hier analysierten LSA deutlich erniedrigt vorlag. Mögliche Gründe für diese diskrepanten Befunde könnten in Speziesunterschieden (Ratten (Magoon)/ Kaninchen (vorliegende Arbeit)) zu suchen sein. In anderen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte entsprechend auch ein deutlich erniedrigter relativer Anteil von PG aus Kaninchenlavagen (3 - 6 %) im Vergleich zu Lavagen anderer Spezies (Mensch, Rind, Hund, Ratte; jeweils 7 - 10 %) nachgewiesen werden. Die Auswertung der SSA-Subklasse zeigte im Vergleich zur nativen BALF und LSA-Subklasse ein merklich verändertes PL-Profil vor allem zu Gunsten der Minorkomponenten LPC und SPH. Das LPC lag mit ca. 10,1 % etwa 3-4-fach höher vor als in der nativen BALF bzw. der LSA-Subklasse. Dieser Befund lässt auf die Anwesenheit von Phospholipasen - und hier insbesondere der Phospholipase A2 - in der nativen BALF schließen, welche die Hydrolyse von Esterbindungen aus der Position 2 des Glycerol-Grundkörpers katalysieren. Unterschiede im relativen Anteil der Minorkomponenten PI und PE zwischen der nativen BALF und den beiden Subklassen waren nicht zu erkennen.

Ein signifikanter Einfluss einer *in vitro* Konversion auf das PL-Profil der LSA-Subklasse war nicht zu ermitteln, allerdings glich das PL-Profil der SSA-Fraktion bereits nach 30 min *in vitro* Konversion dem der LSA-Fraktion. Ein Vergleich der hier gewonnenen Daten mit früheren Studien war nur für das Gesamtprofil der Fettsäuren nativer BALF möglich und zeigte bis auf geringe, Spezies-bedingte Abweichungen keine größeren Unterschiede [77, 177]. Hervorzuheben ist die übereinstimmend gefundene Prädominanz der Palmitinsäure mit einem Anteil von 60-70 % aller Fettsäuren. In Analogie zu den hier gewonnenen Daten konnte Magoon et al. [77] einen mit 10-15 % ebenfalls relativ hohen Anteil der Ölsäure im sedimentierten Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol nativer Lavagen nachweisen. Übereinstimmende Ergebnisse ergaben sich auch für die prozentualen Anteile polyungesättigter Fettsäuren mit einem nahezu konstanten Anteil im Sediment (LSA, P3, P4, P5) und dem größten relativen Anteil in den SSA bzw. der S-Fraktion (entspricht 100.000 x g Überstand). Daten bezüglich der Fettsäure-Zusammensetzung von Surfactantsubklassen nach *in vitro* Konversion lagen in der Literatur bislang nicht vor. In Analogie zu den Ergebnissen der PL-Analyse war auch bezüglich des Fettsäureprofils der LSA-Subklasse kein Einfluss einer *in vitro* Konversion zu verzeichnen. Die relative Verteilung aller 7 nach Kap. 3.2.11. analysierten Fettsäuren blieb über die gesamte Dauer von 240 min *in vitro* Konversion nahezu unverändert und zeigte eine beinahe identische Verteilung in Bezug auf die native BALF. Bei einer deutlichen Abnahme des absoluten LSA-Gehaltes über die Konversionsdauer blieb die

Zusammensetzung des Fettsäureprofils der LSA-Subklasse also unverändert und bot somit keinen ursächlichen Anhalt für die beobachtete massive Verschlechterung der biophysikalischen Eigenschaften der LSA-Fraktion. Im Unterschied zu den LSA wiesen die Fettsäuren der SSA-Subklasse einer nativen BAL signifikant höhere Anteile an ungesättigten Fettsäuren (16:1, 18:1, 18:2, 18:3 und 20:4) bei gleichzeitig deutlich niedrigerem Ausgangswert für die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure (16:0) auf. Nach *in vitro* Konversion über 240 min beobachtete man ein stetiges Angleichen des FA-Profiles der SSA an die prozentualen Anteile der LSA-Subklasse. Dies konnte als Ergebnis des LSA-SSA-Transits während des Konversionsprozesses gewertet werden.

Sowohl bezüglich des Neutrallipid-Profiles als auch bezüglich der NL/PL-Ratio nativer Kaninchenlavage konnten substantielle Unterschiede zwischen den Subklassen LSA und SSA aufgedeckt werden. Dieser Befund ergänzt Daten von Guthmann et al. [177], welche ebenfalls eine deutlich unterschiedliche Verteilung der Neutrallipide innerhalb der Subklassen von nativen, alveolären Surfactant belegen. Der relative Anteil der Neutrallipide an der Gesamtneutrallipidmenge der nativen BALF betrug in der vorliegenden Arbeit in der LSA-Subklasse  $66,9 \pm 3,9 \%$ , in der SSA-Subklasse  $33,1 \pm 3,8 \%$ . Cholesterin und freie Fettsäuren lagen als dominierende Neutrallipide der LSA-Subklasse vor. Die SSA-Subklasse zeigte ein Übergewicht für Diglyceride, Triglyceride und freie Fettsäuren. Sowohl die hier vorgestellten Ergebnisse wie auch die Daten von Guthmann et al. [177] weisen auf Cholesterin als das herausragende Neutrallipid bronchoalveolärer Lavagen. Laut Vorstellungen früherer Studien [10, 178] könnte Cholesterin quasi als "Verflüssiger" des DPPC dienen und die Ausspreizung des Oberflächenfilms an der Luft-Wasser-Interphase unterstützen. Über die nähere Funktion von Diglyceriden, Triglyceriden und freien Fettsäuren in den SSA ist man sich bis heute noch weitgehend im Unklaren. Es existieren allerdings experimentelle Daten, nach denen freie Fettsäuren, welche ebenfalls an eine Luft-Wasser-Grenzfläche adsorbieren, einen ungünstigen Effekt auf die Oberflächenspannungsregulation vor allem unter zyklischen Oberflächenänderungen ausüben. In Verbindung mit älteren Beobachtungen, die die SSA als nahezu frei von Surfactant-Proteinen identifizierten [77, 9], liegt die Vorstellung nahe, dass es sich hier um zur Wiederaufnahme in die Typ-II-Alveolarzelle bestimmte Abbauprodukte des Surfactants handeln könnte. Quantitative Unterschiede zwischen den hier vorgestellten Ergebnissen und denen der Arbeitsgruppe um Guthmann et al. [177], wie sie vor allem für Diglyceride (42,3 %, Summe aus P3 u. P4 Fraktion versus 14,4 %, LSA) und zum Teil auch für Triglyceride zu finden waren, sind unter anderem sicherlich auf speziesspezifische

Unterschiede zurückzuführen. Erstaunlich waren die Befunde der NL/PL-Ratio im Vergleich der Subklassen. Relativ zum Phospholipidgehalt ließ sich ein etwa 10-fach höherer Anteil an Neutrallipiden in den SSA nativer Lavagen im Vergleich zu den LSA feststellen. Parallel zur Zunahme des relativen Anteils der *small surfactant aggregates* führte die *in vitro* Konversion zu einem deutlichen Anstieg des relativen Neutrallipidgehaltes der SSA an den Gesamt-NL, gleichzeitig aber auch zu einem Abfall des NL/PL-Quotienten innerhalb der SSA-Fraktion. Die Analyse der Neutrallipide von LSA und SSA nach *in vitro* Konversion zeigte ein zeitabhängiges Angleichen des Neutrallipid-Musters von SSA und LSA. Das Neutrallipid-Profil der SSA nach 240 min *in vitro* Konversion ähnelte letztendlich dem der LSA-Subklasse und spiegelte somit den Transit von LSA-Neutrallipiden (v.a. Cholesterol und freie Fettsäuren) in die SSA-Subklasse wieder.

Die Interpretation der oben diskutierten Befunde der lipidanalytischen Daten lässt in der Zusammenschau keine wesentlichen Änderungen der Lipidzusammensetzung der *large surfactant aggregates* nach *in vitro* Konversion erkennen. Der massive Verlust der biophysikalischen Oberflächenaktivität der LSA nach *in vitro* Konversion ist daher insgesamt betrachtet nicht über lipidchemische Veränderungen zu erklären.

### **5.3. Ergebnisse der Surfactantprotein-B-Analysen der Subfraktionen nach *in vitro* Konversion und sekundäre Rekonstitutionsversuche mit Surfactantprotein B**

Der Vorgang der *in vitro* Konversion einer Kaninchenlavage bei 37°C resultierte in einem zeitabhängigen Abfall des mittels ELISA-Technik immunologisch detektierten Gesamt-SP-B-Gehaltes. Die vergleichende Analyse der absoluten SP-B-Konzentrationen der LSA- und SSA-Subklassen zeigte, dass dies in erster Linie einem massiven SP-B-Verlust in der LSA-Fraktion zuzuschreiben war. Innerhalb einer Zeitspanne von 60-120 min sank der SP-B-Gehalt der LSA-Fraktion auf nahezu nicht mehr detektierbare Werte. Der SP-B-Gehalt nativer, bei 37°C inkubierter LSA-Kontrollen blieb hingegen unverändert. In der SSA-Subklasse wurden nach entsprechenden Konversions-Zeiten konstante SP-B-Konzentrationen gefunden. Setzte man die absoluten SP-B-Konzentrationen der beiden Subklassen ins Verhältnis zur jeweiligen PL-Konzentration der Subklasse, so konnte auch hier eine Abnahme des SP-B-Gehaltes beobachtet werden. Bei nahezu konstantem SP-B-Gehalt der SSA-Fraktion

ließ sich dies sehr wahrscheinlich als Folge des durch die *in vitro* Konversion bedingten Transits von Lipiden in die *small surfactant aggregates* erklären.

Der durch zyklische Oberflächenänderungen bedingte, zeitabhängige Abfall des SP-B-Gehaltes der LSA-Fraktion ließ sich signifikant sowohl mit der Abnahme des relativen LSA-Gehaltes als auch mit dem massiven Verlust der Oberflächenaktivität der verbleibenden LSA-Fraktion korrelieren. Analoge Verhältnisse konnten auch für native, bronchoalveoläre Lavagen von ARDS-Patienten aufgezeigt werden. Der hier beobachtete Abfall des Gesamt-SP-B-Gehaltes einer zyklischen Oberflächenänderungen unterworfenen BALF steht in Übereinstimmung mit ersten Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Veldhuizen et al. [79], welche nach 180 min *in vitro* Konversion einer Hunde-BALF eine Reduktion der Intensität der 17 kDa SP-B-Bande mittels SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nachweisen konnten. Eine detaillierte und quantitative Analyse des SP-B-Gehaltes der LSA- und SSA-Fraktion wurde von Veldhuizen et al. [79] jedoch nicht vorgenommen. In Gegensatz zu den hier gewonnenen Daten detektierten Veldhuizen et al. [79] mit dem oben genannten Verfahren nach 40.000 x g Zentrifugation einer nativen Hunde-BALF kein SP-B in der SSA-Subklasse.

Die Interpretation der Untersuchungsergebnisse der vorliegenden SP-B-Analysen legen nahe, dass der durch *in vitro* Konversion bedingte Abfall des SP-B-Gehaltes der LSA-Subklasse sowohl für die Degradation von LSA zu SSA als auch für den Verlust der oberflächenspannungsreduzierenden Eigenschaften der verbleibenden LSA-Fraktion verantwortlich gemacht werden kann. Diese Annahme wird unterstützt durch frühere Untersuchungen, in denen die Bedeutung der hydrophoben Apoproteine für die Integrität und Funktionalität des oberflächenaktiven Lipidfilms herausgearbeitet wurde. So wird dem SP-B beispielsweise eine entscheidende Rolle für die Reduktion der Oberflächenspannung pulmonalen Surfactants durch Beschleunigung der Oberflächenadsorption der Surfactant-Phospholipide an die Luft-Wasser-Interphase und durch die Stabilisierung des Grenzflächenfilms bei lateraler Kompression zugesprochen [116, 123, 179, 180, 119]. Darüber hinaus liegen detaillierte *in vitro* Studien vor, die die Präsenz von sowohl SP-B als auch SP-A als Grundvoraussetzung für die Ausbildung und Stabilität des tubulären Myelins (TM) nahe legen [74, 128].

Entsprechend bewirkt die Zugabe von SP-B-Antikörpern zu natürlichem Surfactantmaterial und die damit verbundene funktionelle Inhibition des SP-B eine Reduktion der Oberflächeneigenschaften der verwendeten Surfactantpräparationen sowohl *in vitro* [181] als auch *in vivo* [182]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Rekonstitutionsversuche, bei

denen einer LSA-Fraktion nach 120 min *in vitro* Konversion einer Kaninchenlavage aufgereinigtes Kaninchen-SP-B in 10-facher Konzentration im Vergleich zum Normwert zugesetzt wurde und bei denen in Folge dessen eine „optimale“ Oberflächenaktivität wiederhergestellt werden konnte, belegen den Stellenwert des SP-B für den Konversions-abhängigen Abfall der Oberflächenaktivität der LSA. Sie lassen dieses Apoprotein als Dreh- und Angelpunkt des exogenen Surfactantmetabolismus während zyklischer Oberflächenänderungen erscheinen.

Einschränkend muss hier allerdings angemerkt werden, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausschließlich SP-B untersucht wurde. Die Apoproteine SP-C und SP-A wurden aufgrund des Mangels an Spezies-spezifischen Antikörpern gegen die beiden Surfactant-Proteine nicht analysiert. In der Literatur beschriebene *in vitro* Konversions-Versuche mit Hundelavage wiesen keine Veränderungen des SP-A durch zyklische Oberflächenänderungen auf [79]. Studien zu möglichen quantitativen Änderung des SP-C unter *in vitro* Konversion liegen bislang nicht vor. Inwieweit der Verlust des immunologisch detektierbaren SP-B als Folge einer proteolytischen Spaltung (möglicherweise durch eine postulierte "Surfactantkonvertase") oder als Konsequenz einer Konformationsänderung des Epitopes durch den verwendeten Antikörper selbst gewertet werden muss, ist zur Zeit nicht sicher beurteilbar. Die oben diskutierten Ergebnisse der SP-B-Analysen nach *in vitro* Konversion machen dieses Apoprotein als mögliches Substrat der "Konvertase" für weitere Untersuchungen jedoch durchaus attraktiv.

#### **5.4. Ansätze zur Identifizierung der Surfactant-Konvertase**

Die partielle Hemmbarkeit des unter *in vitro* Konversion beobachteten Übergangs von LSA zu SSA durch den Protease-Inhibitor  $\alpha$ 1-Antitrypsin ( $\alpha$ 1-AT) legt einen enzymatischen Prozess bei der Generation von *small surfactant aggregates* im Rahmen des Surfactantmetabolismus nahe [86]. Die bereits früh erkannte Temperaturabhängigkeit der Konversionsreaktion scheint ein weiteres Indiz für einen enzymatischen Prozess zu sein [4]. Eine Reihe von Untersuchungen zur Charakterisierung und Identifizierung des bei der Konversion beteiligten Enzyms bzw. Enzymsystems lieferten zunächst Hinweise auf die Beteiligung eines Serin-aktiven Enzyms [86, 88]. Die Zugabe von typischen Metalloproteinase-, Cystein-Proteinase- oder sauren Proteinase-Inhibitoren blieb ohne Effekt auf den Konversionsprozess [86]. Unter

den verschiedenen Serin-Proteinase-Inhibitoren kristallisierte sich  $\alpha$ -1-AT als effektivster, dosisabhängiger Konversionsinhibitor heraus [86, 89]. Neuere Veröffentlichungen, welche nach Abschluss der experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit erschienen, erbrachten erste Hinweise auf ein aus Mäuse-BALF [90] bzw. aus Ratten-BALF [183] isoliertes Serin-aktives Enzym, welches von dem unspezifischen und irreversiblen Serin-Proteinase-Inhibitor Diisopropyl-Fluorophosphat (DFP) inhibiert wurde [86]. Weiterführende Untersuchungen an bronchoalveolären Lavagen von Mäusen identifizierten dieses Protein als ein 72 kDa großes, DFP-bindendes Protein, welches nach partieller Aufreinigung in der Lage war, die Konversion von LSA in SSA *in vitro* zu vermitteln [88]. Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Gross et al. [90] konnten bislang jedoch weder eine eindeutige Proteinase-Aktivität des DFP-bindenden-Proteins auf Surfactantkomponenten nachweisen, noch war man in der Lage die biologische Aktivität der Surfactantkonvertase mittels anderer, typischer Serin-aktiver-Proteasen (Trypsin, Urokinase, Elastase) zu reproduzieren. Aminosäure-Sequenzuntersuchungen des aus Mäuse-BALF [90] und Ratten-BALF [183] gewonnenen DFP-bindenden Proteins lieferten auf Grund hoher Sequenzhomologie mit einer aus Mäuseleber [184] bzw. aus Ratten-Leber [183] isolierten ES-2-Carboxylesterase erste Hinweise auf die Identität dieses Enzyms. Analog zu den „klassischen“ Serin-Proteasen besitzt auch die Familie der Carboxylesterasen in ihrer Tertiärstruktur ein aktiviertes Serin in Form einer Serin-katalytischen Triade [184]. Carboxylesterasen stellen eine heterogene Gruppe von Enzymen dar, welche sich entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt in verschiedene Isoenzyme unterteilen lassen. Mit einer monomeren Molekülmasse von ca. 60 kDa liegen Carboxylesterasen vorwiegend als Trimere (ca. 180 kDa) vor [185, 186]. Charakteristisch für diese Enzymgruppe ist eine weitläufige Verteilung in verschiedenen Geweben sowie eine breite Substratspezifität, unter anderem für Ester und Amide. Das oben erwähnte, DFP-bindende Protein zeigte in *in vitro* sowohl Esterase-Aktivität, welche durch DFP inhibierbar war, als auch die Fähigkeit, die Funktion der Surfactant-Konvertase in *in vitro* zu vermitteln [90]. Entsprechend konnte auch durch Einsatz einer aus Schweineleber isolierten und durch DFP inhibierbaren Esterase die Konversion von LSA in SSA dosisabhängig reproduziert werden [90]. Vergleiche mit in der Literatur vorbeschriebenen Carboxylesterasen aus humanen Alveolarmakrophagen [185] und Rattenlungen [186] zeigten einen geringen Grad an Sequenzhomologie mit dem von den Autoren in Folge als *Surfactant-Konvertase* bezeichneten Enzym. In der Tat einzigartig erscheint die Abhängigkeit der Enzymaktivität von zyklischen Oberflächenänderungen. Einen spekulativen Erklärungsansatz

hierfür bieten Gross und Schultz [88]. Die entscheidende Rolle des *surface area cycling* (*in vitro* Konversion) liegt demnach in einer Konditionierung des Substrates für die darauf eingehende Enzymaktivität. Der Konditionierungsvorgang könnte aus einer Oberflächenänderungs-bedingten Präsentation des Substrates an der Luft-Wasser-Interphase bestehen. Für eine derartige Annahme spricht der in dieser Arbeit beschriebene Befund, dass unter zyklischen Oberflächenänderungen sowohl der Abfall des relativen LSA Gehaltes als auch der Abfall der Oberflächenaktivität einem asymptotischen Kurvenverlauf folgen. Eine Erniedrigung des Kompressionsgrades des Grenzflächenfilms, spiegelbildlich reflektiert durch die minimal zu erzielende Oberflächenspannung, könnte sich demnach in einer verminderten Präsentation des Substrates und somit in einem verminderten Zugriff des Enzyms auf das Substrat auswirken. Ob SP-B tatsächlich das Substrat der Surfactant-"Konvertase" darstellt, muss im Rahmen weiterer Studien allerdings noch definitiv geklärt werden.

### **5.5. Ergebnisse der vergleichenden Analysen bronchoalveolärer Lavagen gesunder Personen mit der von ARDS-Patienten**

Veränderungen der biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften humanen Surfactants unter pathophysiologischen Bedingungen sind bisher in erster Linie für das ARDS beschrieben worden [148, 149, 150]. Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden, vergleichenden Analysen bronchoalveolärer Lavagen gesunder Patienten mit denen von ARDS-Patienten unterstützen und erweitern frühere Beobachtungen [148, 149, 151], welche ausgeprägte Veränderungen des Surfactantsystems nachweisen konnten. Ausgehend von einem per se deutlich geringeren, relativen Anteil der LSA an den Gesamt-PL in der ARDS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $46,6 \pm 7,7$  % versus  $65,7 \pm 4,8$  %) war in der hier vorliegenden Untersuchung der relative SP-B-Gehalt (bezogen auf PL) der LSA-Fraktion der Kontrollgruppe mit  $4,94 \pm 1,03$  % signifikant höher als in der Vergleichsgruppe der ARDS-Patienten ( $0,38 \pm 0,15$  %,  $p < 0,001$ ). Darüber hinaus ergaben die biophysikalischen Analysen der LSA-Proben von ARDS-Patienten hochsignifikant schlechtere biophysikalische Ergebnisse als die der Kontrollgruppe (siehe Kap. 4.1.7.). Diese Beobachtungen gehen mit einer Reihe von Daten früherer Studien konform [176, 188], in welchen ebenfalls eine verminderte LSA/SSA-Ratio und eine reduzierte Oberflächenaktivität unter den Bedingungen eines ARDS festgestellt werden konnte. Die Erklärungsansätze, welche mögliche Gründe für

den verminderten LSA-Gehalt liefern, sind sicherlich vielfältig. Ein beschleunigter extrazellulärer Metabolismus oder die Eröffnung neuer Stoffwechselwege unter pathophysiologischen Bedingungen wären ebenso denkbar wie eine negative Beeinträchtigung der intrazellulären Recycling- und Synthese-Prozesse der Typ-II-Alveolarzelle. Beides konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht werden, ebenso wenig wie eine mögliche gesteigerte Phagozytose von LSA durch inflammatorisch aktivierte Leukozyten und Makrophagen [189]. Ein weiterer, alternativer Erklärungsansatz könnte in diesem Zusammenhang die Möglichkeit einer durch die verschiedenen Noxen provozierten, gesteigerten "Konvertase"-Aktivität sein. Ein durch das "vascular leakage" begünstigter Influx zirkulierender Esterasen neben Plasmabestandteilen und inflammatorischen Mediatoren wie Proteasen, Lipasen oder reaktiven Radikalen ist vorstellbar, allerdings bislang nicht untersucht. Dargestellt werden konnte in Lavage-Proben von ARDS-Patienten aber eine deutlich erhöhte proteolytische Aktivität [190, 191]. Ein Abfall der Konzentrationen der Surfactantproteine SP-A [151, 149] und SP-B [148] ist ebenfalls beschrieben worden. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene, weitgehende Übereinstimmung in der Korrelation von relativem SP-B-Gehalt, relativem LSA-Gehalt und Oberflächenaktivität sowohl in Lavagen gesunder Kaninchen, die einer *in vitro* Konversion unterzogen wurden, als auch in unbehandelten Lavagen von ARDS-Patienten sprechen für eine Beteiligung metabolischer Prozesse bei der Einschränkung der Oberflächenaktivität der LSA-Fraktion bei Patienten mit ARDS. Ergänzend sei angemerkt, dass für Patienten mit ARDS auch andere Ursachen für eine reduzierte Oberflächenaktivität existieren, die nicht Gegenstand der hier vorgelegten Untersuchung waren. So konnte für ARDS-Patienten auch ein Abfall des Palmitoylierungsgrades des Phosphatidylcholins dokumentiert werden [194]. Möglich erscheint auch ein Abfall des SP-C. Zusammenfassend könnte der mit der Degradation von SP-B einhergehende Verlust der LSA-Integrität und die damit verbundene Reduktion der biophysikalischen Eigenschaften zur alveolären Instabilität und den konsekutiven Gasaustauschstörungen bei Patienten mit ARDS beitragen.

## **5.6. Bisherige Therapieansätze und therapeutische Perspektiven beim ARDS**

Das Atemnotsyndrom des Neugeborenen (IRDS) ist durch einen primären Mangel an alveolärem Surfactantmaterial charakterisiert. Eine gezielte transbronchiale Therapie mit natürlichen Surfactantpräparaten hat sich als effizientes Therapiekonzept zur Senkung der Morbidität und Mortalität bei frühreifen Neugeborenen mit IRDS herausgestellt [192]. Die Störungen der Surfactantfunktion beim ARDS sind hingegen äußerst komplex [144] und sind auf die im alveolären, vaskulären und interstitiellen Kompartiment der Lunge ablaufenden inflammatorischen Prozesse zurückzuführen. Experimentelle Ansätze zur Inhibition plasmatischer und inflammatorischer Mediatorsysteme und Suppression inflammatorisch kompetenter Zellen erschienen reizvoll und wurden bereits zum Teil in klinischen Studien überprüft. Leider hat sich bislang kein einziger dieser Ansätze unter klinischen Bedingungen bewährt. Als ein Symptom-orientiertes, alternatives Konzept hat sich die transbronchiale Applikation großer Mengen an natürlichem Surfactant erwiesen [191]. In Pilotstudien konnte eine beeindruckende, akute Verbesserung der arteriellen Oxygenierung als Folge einer Rekrutierung kollaptischer Lungenbezirke und einer hierdurch bedingten Reduktion des Shuntflusses erreicht werden [191]. Allerdings musste in dieser Studie auch ein erneuter Abfall der klinischen Wirksamkeit, verbunden mit einem erneuten Anstieg der minimalen Oberflächenspannung der LSA-Fraktion innerhalb von 2-3 Tagen nach Applikation bei ca. der Hälfte der Patienten zur Kenntnis genommen werden. Vor diesem Hintergrund stellen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit folgende therapeutischen Perspektiven als theoretische Option in Aussicht:

Die herausragende Rolle des SP-B für die Integrität und Funktionalität der LSA sowie der massive Verlust des SP-B-Gehaltes unter pathophysiologischen Konditionen (z.B. ARDS) lässt eine Substitution hoher Mengen an SP-B als denkbare Konzept erscheinen. Hierbei bleibt zu klären, welches die optimale Applikationsform (natürliches SP-B in aufgereinigter Form, synthetisiertes oder rekombinantes Material, Monotherapie oder in Verbindung mit Trägerlipiden), die optimale Applikationsart (bronchoskopische Administration oder Aerosol-Applikation), die optimale Applikationszeit und die optimale Dosis darstellt. Sollte sich in zukünftigen Untersuchungen das SP-B darüber hinaus tatsächlich als das Substrat der Surfactant-"Konvertase" herausstellen, würde sich der gezielte Einsatz von Konvertase-Inhibitoren geradezu aufdrängen. Durch spezifische Inhibition des oder der beteiligten

Enzyme könnte die Konversionskinetik verzögert bzw. gehemmt und somit ein positiver Effekt auf die LSA/SSA-Ratio und die damit verbundenen biophysikalischen Eigenschaften erzielt werden. Parallel hierzu wäre eine Verlängerung der klinischen Wirksamkeit einer transbronchialen Surfactanttherapie zu erwarten. Interessanterweise konnte in neueren *in vitro* Studien unserer Gruppe [Günther et al., submitted] ein Bis-Benzamidinderivat mit ausgeprägt niedrigem  $K_i$ -Wert für Mastzelltryptase als potenter Inhibitor der Surfactant-Konversion und der Carboxylesterase/Amidase-Aktivität dargestellt werden. Inwieweit diese Befunde auf die Situation beim ARDS übertragen werden können muss in künftigen Studien geklärt werden.

## 6. Zusammenfassung

Die metabolische Sequenz des intra- und extrazellulären Surfactants ist weitgehend bekannt. Mittels eines von N. Gross et al. etablierten *in vitro* Modells war es gelungen, die Konversion von *large surfactant aggregates* (LSA) zu *small surfactant aggregates* (SSA) unter Laborbedingungen zu reproduzieren. Die der Surfactantkonversion zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen und deren Konsequenz für die Surfactantzusammensetzung und Surfactantfunktion waren jedoch großteils noch unklar. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit ein Lavagepool von Kaninchen auf mögliche biochemische und biophysikalische Änderungen der verschiedenen Surfactantbestandteile unter den Bedingungen zyklischer Oberflächenänderungen (*in vitro* Konversion) untersucht und ein Vergleich mit Surfactanteigenschaften von ARDS-Patienten unternommen.

Die Durchführung der *in vitro* Konversion führte zu einem raschen, zeitabhängigen Abfall des relativen LSA-Gehaltes, vergesellschaftet mit einem drastischen Abfall der Oberflächenspannungs-reduzierenden Eigenschaften der LSA-Fraktion selbst. Ähnliche Korrelationen ließen sich auch für Proben von ARDS-Patienten finden. Als mögliche zu Grunde liegende Mechanismen kamen sowohl lipidchemische als auch proteinchemische Veränderungen des Surfactants in Frage. Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Veränderungen des Phospholipid-, Fettsäure- und Neutrallipidprofils unterstrichen die Annahme, dass wesentliche Teile der LSA-Fraktion unter den Bedingungen der *in vitro* Konversion in die SSA-Fraktion übertreten. Lipidchemisch konnte allerdings keine Erklärung für den weitreichenden Funktionsverlust der LSA-Fraktion gefunden werden. Folgerichtig rückten die Surfactantproteine und hier insbesondere das Surfactantprotein B ins Zentrum des Interesses. Auch hier zeigte sich mit einem deutlichen Abfall des SP-B-Gehaltes eine Analogie zwischen *in vitro* konvertierten Proben aus Kaninchen-BALF und ARDS-Patienten. Darüber hinaus ließ sich der Abfall des SP-B-Gehaltes eng mit dem Verlust des relativen LSA-Gehaltes und dem Verlust der biophysikalischen Eigenschaften der behandelten Lavagen korrelieren. Die hier vorliegenden Befunde lassen zwar keinen direkten Beweis zu, aber die vielfachen Anhaltspunkte deuten darauf hin, dass SP-B eine Schlüsselstellung bei der Kontrolle des extrazellulären Surfactantmetabolismus ausübt und möglicherweise als Ziel einer proteolytischen Aktivität dienen könnte.

Die hier gewonnenen Ergebnisse führen zu folgendem Fazit:

Unter den Bedingungen der *in vitro* Konversion lässt sich der extrazelluläre Surfactantmetabolismus imitieren. An diesem Vorgang scheint das Surfactantprotein B

zentral beteiligt und möglicherweise Substrat eines bislang nicht sicher identifizierten enzymatischen Prozesses zu sein. Die Entwicklung potenter Konversions-Inhibitoren stellt unter Umständen einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt dar, dem Konversionsvorgang und dem damit einhergehenden massiven Abfall der biophysikalischen Eigenschaften entgegenzuwirken.

## 7. Literaturverzeichnis

1. BATENBURG, J. J.: Surfactant phospholipids: synthesis and storage. In: *Am. J. Physiol.* 262 (1992), S. L367-385
2. BAKEWELL, W. E.; VIVIANO, C. J.; DIXON, D.; SMITH, G. J.; HOOK, G. E.: Confocal laser scanning immunofluorescence microscopy of lamellar bodies and pulmonary surfactant protein A in isolated alveolar type II cells. In: *Laboratory Investigation* 65 (1991), S. 87-95
3. GROSS, N. J.; NARINE, K. R.: Surfactant subtypes in mice: characterization and quantitation. In: *Journal of applied Physiology* 66 (1) (1989), S. 342-349
4. GROSS, N. J.; NARINE, K. R.: Surfactant subtypes of mice: metabolic relationships and conversion in vitro. In: *Journal of applied Physiology* 67 (1) (1989), S. 414-21
5. POSSMAYER, F.: A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. In: *Am. Rev. Respir. Dis.* 138 (1988), S. 990-998
6. KING, R. J.: Isolation and chemical composition of pulmonary surfactant. In: ROBERTSON, B. et al.: *Pulmonary Surfactant*. Amsterdam (NL): Elsevier, 1984, S. 1-15
7. ADACHI, H.; HAYASHI, H.; SATO, H.; DEMPO, K.; AKINO, T.: Characterization of phospholipids accumulated in pulmonary-surfactant compartments of rats intratracheally exposed to silica. In: *Biochem. J.* 262 (1989), S. 781-786
8. HAAGSMAN, H. P.; VAN GOLDE, L. M.: Synthesis and assembly of lung surfactant. In: *Annual Review of Physiologie* 53 (1991), S. 441-64
9. WRIGHT, J. R.; BENSON, B. J.; WILLIAMS, M. C.; GOERKE, J.; CLEMENTS, J. A.: Protein composition of rabbit alveolar surfactant subfractions. In: *Biochemica et Biophysica Acta* 791 (1984), S. 320-32
10. KING, R. J.; CLEMENTS, J. A.: Surface active materials from dog lung. In: *Am. J. Physiol.* 223 (1972), S. 707-733
11. SHELLEY, S. A.; BALIS, J. U.; PACIGA, J. E.; ESPINOZA, C. G.; RICHMAN, A. V.: Biochemical composition of adult human lung surfactant. In: *Lung* 160 (1982), S. 195-206
12. HARWOOD, J. L.: Lung surfactant. In: *Progress in Lipid Research* 26 (1987), S. 211-56
13. VAN GOLDE, L. M.; BATENBURG, J. J.; ROBERTSON, B.: The pulmonary surfactant system: biochemical aspects and functional significance. In: *Physiol. Rev.* 68 (1988), S. 374-455

14. HAMM, H.; FABEL, H.; BARTSCH, W.: The surfactant system of the adult lung: physiology and clinical perspectives. In: *Clinical Investigator* 70 (1992), S. 637-657
15. COCKSHUTT, A. M.; POSSMAYER, F.: Metabolism of surfactant lipids and proteins in the developing lung. In: ROBERTSON, B.; VAN GOLDE, L. M. G. und BATENBURG, J. J.: Pulmonary surfactant: From molecular biology to clinical practice. Amsterdam: Elsevier (1992), S. 339-378
16. PHIZACKERLEY, P. J. R.; TOWN, M-H.; NEWMAN, G. E.: Hydrophobic proteins of lamellated osmiophilic bodies isolated from pig lung. In: *Biochem. J.* 183 (1976), S. 731-736
17. DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E.: Biology of animal lectins. In: *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9 (1993), S. 237-264
18. HOLMSKOV, U.; MALHORTA, R.; SINN, R. B.; JENSENIUS, J. C.: Collectins: collagenous C-type lectins in innate immune defense system. In: *Immunol. Today* 15 (1994), S. 67-74
19. HAWGOOD, S.: Pulmonary surfactant apoproteins: a review of protein and genomic structure. In: *Am. J. Physiol.* 257 (1989), S. L13-L22
20. FLOROS, J.; STEINBRINK, R.; JACOBS, K.; PHELPS, D.; KRIZ, R.; RECNY, M.; SULTZMAN, L.; JONES, S.; TAEUSCH, H. W.; FRANK, H. A.; FRITSCH, E. F.: Isolation and characterization of cDNA clones for the 35-kDa pulmonary surfactant-associated protein. In: *J. Biol. Chem.* 261 (1986), S. 9029-9033
21. WHITE, R. T.; DAMM, D.; MILLER, J.; SPRATT, K.; SCHILLING, J.; HAWGOOD, S.; BENSON, B.; CORDELL, B.: Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene. In: *Nature* 317 (1985), S. 361-363
22. PHELPS, D. S.; FLOROS, J.; TAEUSCH, J. R.: Post-translational modification of the major human surfactant-associated proteins. In: *Biochem. J.* 237 (1986), S. 373-377
23. PHELPS, D. S.; TAEUSCH, H. W.; BENSON, B.; HAWGOOD, S.: An electrophoretic and immunochemical characterization of human surfactant-associated proteins. In: *Biochim. Biophys. Acta* 791 (1984), S. 226-238
24. WEAVER, T. E.; WHITSETT, J. A.: Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins. In: *Biochemical Journal* 273 (1991), S. 249-64
25. HAWGOOD, S.; EFRATI, H.; SCHILLING, J.; BENSON, B. J.: Chemical characterization of lung surfactant apoproteins: Amino acid composition, N-terminal sequence and enzymic digestion. In: *Biochem. Soc. Trans.* 13 (1985), S. 1092-1096

26. PHELPS, D. S.; FLOROS, J.: Proline hydroxylation alters the electrophoretic mobility of pulmonary surfactant-associated protein A. In: *Electrophoresis* 9 (1988), S. 231-233
27. HAAGSMAN, H. P.; WHITE, R. T.; SCHILLING, J.; LAU, K.; BENSON, B. J.; GOLDEN, J.; HAWGOOD, S.; CLEMENTS, J. A.: Studies of the structure of lung surfactant protein SP-A. In: *Am. J. Physiol.* 257 (1989), S. L421-L429
28. PERSSON, A.; CHANG, D.; RUST, K.; MOXLEY, M.; LONGMORE, W.; CROUCH, E.: Purification and biochemical characterization of CP4 (SP-D), a collagenous surfactant-associated protein. In: *Biochemistry* 28 (1989), S. 6361-6367
29. KUROKI, Y.; SHIRATORI, M.; OGASAWARA, Y.; TSUZUKI, A.; AKINO, T.: Characterization of pulmonary surfactant protein D: its copurification with lipids. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1086 (1991), S. 185-190
30. FISHER, J. H.; MASON, R.: Expression of pulmonary surfactant protein D in rat gastric mucosa. In: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12 (1995), S. 13-18
31. RUST, K.; GROSSO, L.; ZHANG, V.; CHANG, D.; PERSSON, A.; LONGMORE, W.; CAI, G. Z.; CROUCH, E.: Human surfactant protein D: SP-D contains a C-type lectin carbohydrate recognition domain. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 290 (1991), S. 116-126
32. PERSSON, A.; CHANG, D.; CROUCH, E.: Surfactant protein D is a divalent cation-dependent carbohydrate-binding protein. In: *J. Biol. Chem.* 265 (1990), S. 5755-5760
33. REVAK, S. D.; MERRITT, T. A.; HALLMAN, M.; HELDT, G.; LA POLLA, R. J.; HOEY, K.; HOUGHTEN, R. A.; COCHRANE, C. G.: The use of synthetic peptides in the formation of biophysically and biologically active pulmonary surfactants. In: *Pediatr. Res.* 29 (1991), S. 460-465
34. PILOT-MATIAS, T. J.; KISTER, S. E.; FOX, J. L.; KROPP, K.; GLASSER, S. W.; WHITSETT, J. A.: Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B. In: *DNA* 8 (1989), S. 75-86
35. PHELPS, D. S.; FLOROS, J.: Localization of surfactant protein synthesis in human lung by in situ hybridization. In: *American Review of Respiratory Disease* 137 (1988), S. 939-942
36. LILEY, H. G.; WHITE, R. T.; WARR, R. G.; BENSON, B. J.; HAWGOOD, S.; BALLARD, P. L.: Regulation of messenger RNAs for the hydrophobic surfactant proteins in human lung. In: *J. Clin. Invest.* 83 (1989), S. 1191-1197

37. JACOBS, K. A.; PHELPS, D. S.; STEINBRINK, R.; FISCH, J.; KRIZ, R.; MITSOCK, L.; DOUGHERTY, J. P.; TAEUSCH, H. W.; FLOROS, J.: Isolation of a cDNA clone encoding a high molecular weight precursor to a 6-kDa pulmonary surfactant-associated protein. In: *J. Biol. Chem.* 262 (1987), S. 9808-9811
38. GLASSER, S. W.; KORFHAGEN, T. R.; WEAVER, T.; PILOT-MATIAS, T.; FOX, J. L.; WHITSETT, J. A.: cDNA and deduced amino acid sequence of human pulmonary surfactant-associated proteolipid SPL(Phe). In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), S. 4007-4011
39. HAWGOOD, S.; BENSON, B. J.; SCHILLING, J.; DAMM, D.; CLEMENTS, J. A.; WHITE, R. T.: Nucleotide and amino acid sequences of pulmonary surfactant protein SP 18 and evidence for cooperation between SP 18 and SP 28-36 in surfactant lipid adsorption. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), S. 66-70
40. GLASSER, S. W.; KORFHAGEN, T. R.; WEAVER, T. E.; CLARK, J. C.; PILOT-MATIAS, T.; MEUTH, J.; FOX, J. L.; WHITSETT, J. A.: cDNA, deduced polypeptide structure and chromosomal assignment of human pulmonary surfactant proteolipid, SPL(pVal). In: *J. Biol. Chem.* 263 (1988), S. 9-12
41. CURSTEDT, T.; JOHANSSON, J.; BARROS-SOEDERLING, J.; ROBERTSON, B.; NILSSON, G.; WESTBERG, M.; JOERNVALL, H.: Low-molecular-mass surfactant protein type 1. The primary structure of a hydrophobic 8-kDa polypeptide with eight half-cystine residues. In: *Eur. J. Biochem.* 172 (1988), S. 521-525
42. WEAVER, T. E.; LIN, S.; BOGUCKI, B.; DEY, C.: Processing of surfactant protein B proprotein by a cathepsin D-like protease. In: *American Journal of Physiology* 263 (1992), S. L95-103
43. VOORHOUT, W. F.; VEENENDAAL, T.; HAAGSMAN, H. P.; WEAVER, T. E.; WHITSETT, J. A.; VAN GOLDE, L. M. G.; GEUZE, H. J.: Intracellular processing of pulmonary surfactant protein B in an endosomal/lysosomal compartment. In: *Am. J. Physiol.* 263 (1992), S. L479-L486
44. WEAVER, T. E.; WHITSETT, J. A.: Processing of hydrophobic pulmonary surfactant protein B in rat type II cells. In: *American Journal of Physiology* 257 (1989), S. L100-8
45. PASTRANA, B.; MAUTONE, A. J.; MENDELSON, R.: Fourier transform infrared studies of secondary structure and orientation of pulmonary surfactant SP-C and its effect on the dynamic surface properties of phospholipids. In: *Biochemistry* 30 (1991), S. 10058-10064

46. JOHANSSON, J.; SZYPERSKI, T.; CURSTEDT, T.; WÜTHRICH, K.: The NMR structure of the pulmonary surfactant-associated polypeptide SP-C in an apolar solvent contains a valyl-rich  $\alpha$ -helix. In: *Biochemistry* 33 (1994), S. 6015-6023
47. VANDENBUSSCHE, G.; CLERCX, A.; CURSTED, T.; JOHANSSON, J.; JÖRNVALL, H.; RUYSSCHAERT, J-M.: Structure and orientation of the surfactant-associated protein C in a lipid bilayer. In: *Eur. J. Biochem* 203 (1992), S. 201-209
48. STULTS, J. T.; GRIFFIN, P. R.; LESIKAR, D. D.; NAIDU, A.; MOFFAT, B.; BENSON, B. J.: Lung surfactant protein SP-C from human, bovine, and canine sources contains palmityl cysteine thioester linkages [published erratum appears in *Am J Physiol* 1992 Mar;262(3 Pt 1):L242]. In: *American Journal of Physiology* 261 (1991), S. L118-25
49. CREUWELS, LAJM; BOER, EH.; DEMEL, RA.; VAN GOLDE, LMG.; HAAGSMAN, HP.: Neutralization of the positive charges of surfactant protein C: Effects on structure and function. In: *J. Biol. Chem.* 270 (1995), S. 16225-16229
50. FISHER, J. H.; SHANNON, J. M.; HOFMANN, T.; MASON, R. J.: Nucleotide and deduced amino acid sequence of the hydrophobic surfactant protein SP-C from rat: expression in alveolar type II cells and homology with SP-C from other species. In: *Biochim. Biophys. Acta* 995 (1989), S. 225-230
51. YOUNG, S. L.; WRIGHT, J. R.; CLEMENTS, J. A.: Cellular uptake and processing of surfactant lipids and apoprotein SP-A by rat lung. In: *J. Appl. Physiol.* 66 (1989), S. 1336-1342
52. CRYSTAL, R. G.; WEST, J. B. et al.: *The Lung* Bd. 3.1.10. Ltd. New York: Raven Press, 1991, S. 247-261
53. WRIGHT, J. R.; WAGER, R. E.; HAMILTON, R. L.; HUANG, M.; CLEMENTS, J. A.: Uptake of lung surfactant subfractions into lamellar bodies of adult rabbit lungs. In: *J. Appl. Physiol.: Respir. Environ. Exercise Physiol.* E60 (1986), S. 817-825
54. CHEVALIER, G.; COLLET, A. J.: In vivo incorporation of choline-3H, leucine-3H and galactose-3H in alveolar type II pneumocytes in relation to surfactant synthesis. A quantitative radioautographic study in mouse by electron microscopy. In: *Anat. Rec.* 174 (1972), S. 289-310
55. ROONEY, S. A.; PAGE-ROBERTS, B. A.; MOTOYAMA, E. K.: Role of lamellar inclusions in surfactant production: studies on phospholipid composition and biosynthesis in rat and rabbit lung subcellular fractions. In: *Journal of Lipid Research* 16 (1975), S. 418-425

56. MASSARO, G. D.; MASSARO, D.: Granular pneumocytes. Electron microscopic radioautographic evidence of intracellular protein transport. In: *American Review of Respiratory Disease* 105 (1972), S. 927-931
57. WILLIAMS, M. C.: Ultrastructure of tubular myelin and lamellar bodies in fast-frozen adult rat lung. In: *Exp. Lung Res.* 4 (1982), S. 37-46
58. HAWGOOD, S.; CLEMENTS, J. A.: Pulmonary surfactant and its apoproteins. In: *Journal of Clinical Investigation* 86 (1990), S. 1-6
59. CHANDER, A.; JOHNSON, R. G.; REICHERTER, J.; FISHER, A. B.: Lung lamellar bodies maintain an acidic internal pH. In: *Journal of Biological Chemistry* 261 (1986), S. 6126-6131
60. NICHOLAS, T. E.; BARR, H. A.: The release of surfactant in rat lung by brief periods of hyperventilation. In: *Respir. Physiol.* 52 (1983), S. 69-83
61. OYARZUN, M. J.; CLEMENTS, J. A.; BARITUSSIO, A.: Ventilation enhances pulmonary alveolar clearance of radioactive dipalmitoylphosphatidylcholine in liposomes. In: *Am. Rev. Respir. Dis.* 121 (1980), S. 709-721
62. OYARZUN, M. J.; CLEMENTS, J. A.: Control of lung surfactant by ventilation, adrenergic mediators, and prostaglandins in the rabbit. In: *Am. Rev. Respir. Dis.* 117 (1978), S. 879-891
63. GILFILLAN, A. M.; ROONEY, S. A.: Arachidonic acid metabolites stimulate phosphatidylcholine secretion in primary cultures of type II pneumocytes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 833 (1985), S. 336-341
64. ROONEY, S. A.; GOBRAN, L. I.: Adenosine and leukotrienes have a regulatory role in lung surfactant secretion in the newborn rabbit. In: *Biochim. Biophys. Acta* 960 (1988), S. 98-106
65. OYARZUN, M. J.; CLEMENTS, J. A.: Ventilatory and cholinergic control of pulmonary surfactant in the rabbit. In: *J. Appl. Physiol.* 43 (1977), S. 39-45
66. ROONEY, S. A.: The surfactant system and lung phospholipid biochemistry. In: *Am. Rev. Respir. Dis.* 131 (1985), S. 439-460
67. GILFILLAN, A. M.; ROONEY, S. A.: Functional evidence for adenosine A2 receptor regulation of phosphatidylcholine secretion in cultured type II pneumocytes. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241 (1987), S. 907-914

68. DOBBS, L. G.; WRIGHT, J. R.; HAWGOOD, S.; GONZALEZ, R.; VENSTROM, K.; NELLENBOGEN, J.: Pulmonary surfactant and its components inhibit secretion of phosphatidylcholine from cultured rat alveolar type II cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), S. 1010-1014
69. KUROKI, Y.; MASON, R. J.; VOELKER, D. R.: Pulmonary surfactant apoprotein A structure and modulation of surfactant secretion by rat alveolar type II cells. In: *J. Biol. Chem.* 263 (1988), S. 3388-3394
70. RICE, W. R.; ROSS, G. F.; SINGLETON, F. M.; DINGLE, S.; WHITSETT, J. A.: Surfactant-associated protein inhibits phospholipid secretion from type II cells. In: *J. Appl. Physiol.: Respir. Environ. Exercise Physiol.* 63 (1987), S. 692-698
71. WRIGHT, J. R.; CLEMENTS, J. A.: Metabolism and turnover of lung surfactant. In: *Am. Rev. Respir. Dis.* 136 (1987), S. 426-444
72. COSMI, E. V.; DI RENZO, G. C.: Prevention and treatment of fetal lung immaturity. In: *Fetal Therapy* 4 (Suppl. 1) (1989), S. 52-62
73. WILLIAMS, M. C.: Conversion of lamellar body membranes into tubular myelin in alveoli of fetal rat lungs. In: *J. Cell Biol.* 72 (1977), S. 260-277
74. SUZUKI, Y.; FUJITA, Y.; KOGISHI, K.: Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. In: *Am. Rev. Respir. Dis.* 140 (1989), S. 75-81
75. VOORHOUT, W. F.; VEENENDAAL, T.; HAAGSMAN, H. P.; VERKLEIJ, A. J.; VAN GOLDE, L. M.; GEUZE, H. J.: Surfactant protein A is localized at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice. In: *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 39 (1991), S. 1331-1336
76. THET, L. A.; CLERCH, L.; MASSARO, G. D.; MASSARO, D.: Changes in sedimentation of surfactant in ventilated excised rat lungs. Physical alterations in surfactant associated with the development and reversal of atelectasis. In: *J. Clin. Invest.* 64 (1979), S. 600-608
77. MAGOON, M. W.; WRIGHT, J. R.; BARITUSSIO, A.; WILLIAMS, M. C.; GOERKE, J.; BENSON, B. J.; HAMILTON, R. L.; CLEMENTS, J. A.: Subfractionation of lung surfactant: Implications for Metabolism and Surface Activity. In: *Biochim. Biophys. Acta* 750 (1983), S. 18-31

78. BARITUSSIO, A.; BELLINA, L.; CARRARO, R.; ROSSI, A.; ENZI, G.; MAGOON, M. W.; MUSSINI, I.: Heterogeneity of alveolar surfactant in the rabbit: composition, morphology, and labelling of subfractions isolated by centrifugation of lung lavage. In: *European Journal of Clinical Investigation* 14 (1984), S. 24-9
79. VELDHUIZEN, R.; INCHLEY, K.; HEARN, S. A.; LEWIS, J. F.; POSSMAYER, F.: Degradation of surfactant-associated protein B (SP-B) during in vitro conversion of large to small surfactant aggregates. In: *Biochem. J.* 295 (1993), S. 141-147
80. LEWIS, J. F.; IKEGAMI, M.; JOBE, A. H.: Metabolism of exogenously administered surfactant in the acutely injured lungs of adult rabbits. In: *American Review of Respiratory Disease* 145 (1992), S. 19-23
81. SPAIN, C. L.; SILBAJORIS, R.; YOUNG, S. L.: Alterations of surfactant pools in fetal and newborn rat lungs. In: *Pediatric Research* 21 (1987), S. 5-9
82. STEVENS, P. A.; WRIGHT, J. R.; CLEMENTS, J. A.: Changes in quantity, composition, and surface activity of alveolar surfactant at birth. In: *Journal of Applied Physiology* 63 (3) (1987), S. 1049-57
83. MALHOTRA, R.; HAURUM, J. S.; THIEL, S.; SIM, R. B.: Binding of human collectins (SP-A and MBP) to influenza virus. In: *Biochem. J.* 304 (1994), S. 455-461
84. OULTON, M.; MACDONALD, J.; JANIGAN, D. T.; FAULKNER, G. T.: Mouse Alveolar Surfactant: Characterization of Subtypes Prepared by Differential Centrifugation. In: *Lipids* 28 (1993), S. 715-720
85. GROSS, N. J.: Inhibition of surfactant subtype convertase in radiation model of adult respiratory distress syndrome. In: *American Journal of Physiology* 260 (1991), S. 311-7
86. GROSS, N. J.; SCHULTZ, R. M.: Serine proteinase requirement for the extra-cellular metabolism of pulmonary surfactant. In: *Biochemica et Biophysica Acta* 1044 (1990), S. 222-230
87. VELDHUIZEN, R. A. W.; HEARN, S. A.; LEWIS, J. F.; POSSMAYER, F.: Surface-area cycling of different surfactant preparations: SP-A and SP-B are essential for large-aggregate integrity. In: *Biochem. J.* 300 (1994), S. 514-524
88. GROSS, N. J.; SCHULTZ, R. M.: Requirements for extracellular metabolism of pulmonary surfactant: tentative identification of serine protease. In: *Am. J. Physiol.* 262 (1992), S. L446-453
89. GROSS, N. J.; BUBLYS, V.; D'ANZA, J.; BROWN, C. L.: The role of  $\alpha$ 1-antitrypsin in the control of extracellular surfactant metabolism. In: *Am. J. Physiol.* 268 (1995), S. L438-L445

90. KRISHNASAMY, S.; GROSS, N. J.; TENG, A. L.; SCHULTZ, R. M.; DHAND, R.: Lung "Surfactant Convertase" Is a Member of the Carboxylesterase Family. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235 (1997), S. 180-184
91. STEVENS, P. A.; WRIGHT, J. R.; CLEMENTS, J. A.: Surfactant secretion and clearance in the newborn. In: *J. Appl. Physiol.* 67 (1989), S. 1597-605
92. JACOBS, H. C.; JOBE, A. H.; IKEGAMI, M.; JONES, S.: Reutilization of phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamine by the pulmonary surfactant system in 3-day-old rabbits. In: *Biochim. Biophys. Acta* 834 (1985), S. 172-179
93. HALLMAN, M.; EPSTEIN, B. L.; GLUCK, L.: Analysis of labeling and clearance of lung surfactant phospholipids in rabbit. Evidence of bidirectional surfactant flux between lamellar bodies and alveolar lavage. In: *J. Clin. Invest.* 68 (1981), S. 742-751
94. JACOBS, H.; JOBE, A.; IKEGAMI, M.; JONES, S.: Surfactant phosphatidylcholine source, fluxes, and turnover times in 3-day-old, 10-day-old, and adult rabbits. In: *J. Biol. Chem.* 257 (1982), S. 1805-1810
95. GEIGER, K.; GALLAGHER, M. L.; HEDLEY-WHYTE, J.: Cellular distribution and clearance of aerosolized dipalmitoyl lecithin. In: *J. Appl. Physiol.* 39 (1975), S. 759-766
96. JACOBS, H. C.; IKEGAMI, M.; JOBE, A. H.; BERRY, D. D.; JONES, S.: Reutilization of surfactant phosphatidylcholine in adult rabbits. In: *Biochim. Biophys. Acta* 837 (1985), S. 77-84
97. BRESLIN, J. S.; WEAVER, T. E.: Binding, uptake, and localization of surfactant protein B in isolated rat alveolar type II cells. In: *American Journal of Physiology* 262 (1992), S. L699-707
98. BARITUSSIO, A.; PETTENAZZO, A.; BENEVENTO, M.; ALBERTI, A.; GAMBA, P.: Surfactant protein C is recycled from the alveoli to the lamellar bodies. In: *American Journal of Physiology* 263 (1992), S. L607-11
99. WRIGHT, J. R.; WAGER, R. E.; HAWGOOD, S.; DOBBS, L.; CLEMENTS, J. A.: Surfactant apoprotein Mr = 26,000-36,000 enhances uptake of liposomes by type II cells. In: *J. Biol. Chem.* 262 (1987), S. 2888-2894
100. BATES, S. R.; IBACH, P. B.; FISHER, A. B.: Phospholipids co-isolated with rat surfactant protein C account for the apparent protein-enhanced uptake of liposomes into lung granular pneumocytes. In: *Experimental Lung Research* 15 (1989), S. 695-708
101. RICE, W. R.; SARIN, V. K.; FOX, J. L.; BAATZ, J.; WERT, S.; WHITSETT, J. A.: Surfactant peptides stimulate uptake of phosphatidylcholine by isolated cells. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1006 (1989), S. 237-245

102. NICHOLS, B. A.: Normal rabbit alveolar macrophages. I. The phagocytosis of tubular myelin. In: *J. Exp. Med.* 144 (1976), S. 906-919
103. DESAI, R.; TETLEY, T. D.; CURTIS, C. G.; POWELL, G. M.; RICHARDS, R. J.: Studies on the fate of pulmonary surfactant in the lung. In: *Biochem. J.* 176 (1978), S. 455-462
104. MILES, P. R.; MA, J. Y.; BOWMAN, L.: Degradation of pulmonary surfactant disaturated phosphatidylcholines by alveolar macrophages. In: *Journal of Applied Physiology: Respiratory Environmental and Exercise Physiologie*, 64 (6) (1988), S. 2474-81
105. WALKER, S. R.; WILLIAMS, M. C.; BENSON, B.: Immunocytochemical localization of the major surfactant apoproteins in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung. In: *J. Histochem. Cytochem.* 34 (1986), S. 1137-1148
106. RIDER, E. D.; IKEGAMI, M.; JOBE, A. H.: Localization of alveolar surfactant clearance in rabbit lung cells. In: *Am J Physiol* 263 (1992), S. L201-9
107. BENSON, B. J.; KITTERMAN, J. A.; CLEMENTS, J. A.; MESCHER, E. J.; TOOLEY, W. H.: Changes in phospholipid composition of lung surfactant during development in the fetal lamb. In: *Biochemica et Biophysica Acta* 753 (1983), S. 83-8
108. POSSMAYER, F.: Biophysical activity of pulmonary surfactant. In: POLIN, R. A. und FOX, W. W.: *Fetal and Neonatal Physiology*. Bd. 90. Philadelphia: W. B. Sanders Co, 1991, S. 459-962
109. POSSMAYER, F.: The role of surfactant-associated proteins. In: *Am. Rev. Respir. Dis.* 142 (1990), S. 749-752
110. HARWOOD, J. L.: Lung surfactant. In: *Biochem. Soc. Transact.* 15 (1987), S. 80S-89S
111. CURSTEDT, T.; JOERNVALL, H.; ROBERTSON, B.; BERGMAN, T.; BERGGREN, P.: Two hydrophobic low-molecular-mass protein fractions of pulmonary surfactant. Characterization and biophysical activity. In: *Eur. J. Biochem.* 168 (1987), S. 255-262
112. EGAN, E. A.; NOTTER, R. H.; KWONG, M. S.; SHAPIRO, D. L.: Natural and artificial lung surfactant replacement therapy in premature lambs. In: *J. Appl. Physiol.* 55 (1983), S. 875-883
113. REVAK, S. D.; MERRITT, T. A.; DEGRYSE, E.; STEFANI, L.; COURTNEY, M.; HALLMAN, M.; COCHRANE, C. G.: Use of human surfactant low molecular weight apoproteins in the reconstitution of surfactant biologic activity. In: *J. Clin. Invest.* 81 (1988), S. 826-833
114. YU, S. H.; POSSMAYER, F.: Comparative studies on the biophysical activities of the low-molecular-weight hydrophobic proteins purified from bovine pulmonary surfactant. In: *Biochim. Biophys. Acta* 961 (1988), S. 337-350

115. ENHORNING, G.: Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. In: *J. Appl. Physiol.* 43 (1977), S. 198-203
116. YU, S. H.; POSSMAYER, F.: Role of bovine pulmonary surfactant-associated proteins in the surface-active property of phospholipid mixtures. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1046 (1990), S. 233-241
117. VENKITARAMAN, A. R.; BAATZ, J. E.; WHITSETT, J. A.; HALL, S. B.; NOTTER, R. H.: Biophysical inhibition of synthetic phospholipid-lung surfactant apoprotein admixtures by plasma proteins. In: *Chem. Phys. Lipids* 57 (1991), S. 49-57
118. WHITSETT, J. A.; OHNING, B. L.; ROSS, G.; MEUTH, J.; WEAVER, T.; HOLM, B. A.; SHAPIRO, D. L.; NOTTER, R. H.: Hydrophobic surfactant-associated protein in whole lung surfactant and its importance for biophysical activity in lung surfactant extracts used for replacement therapy. In: *Pediatr. Res.* 20 (1986), S. 460-467
119. YU, S. H.; POSSMAYER, F.: Reconstitution of surfactant activity by using the 6 kDa apoprotein associated with pulmonary surfactant. In: *Biochem. J.* 236 (1986), S. 85-89
120. CHUNG, J.; YU, S. H.; WHITSETT, J. A.; HARDING, P. G.; POSSMAYER, F.: Effect of surfactant-associated protein-A (SP-A) on the activity of lipid extract surfactant. In: *Biochemica et Biophysica Acta* 1002 (1989), S. 348-58
121. SCHÜRCH, S.; POSSMAYER, F.; CHENG, S.; COCKSHUTT, A. M.: Pulmonary SP-A enhances adsorption and appears to induce surface sorting of lipid extract surfactant. In: *Am.J. Physiol.* 263 (1992), S. L210-L218
122. BAATZ, J. E.; ELLEDGE, B.; WHITSETT, J. A.: Surfactant protein SP-B induces ordering at the surface of model membrane bilayers. In: *Biochemistry* 29 (1990), S. 6714-6720
123. YU, S. H.; POSSMAYER, F.: Effect of pulmonary surfactant protein B (SP-B) and calcium on phospholipid adsorption and squeeze-out of phosphatidylglycerol from binary phospholipid monolayers containing dipalmitoylphosphatidylcholine. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1126 (1992), S. 26-34
124. OOSTERLAKEN-DIJKSTERHUIS, M. A.; HAAGSMAN, H. P.; VAN GOLDE, L. M.; DEMEL, R. A.: Interaction of lipid vesicles with monomolecular layers containing lung surfactant proteins SP-B or SP-C. In: *Biochemistry* 30 (1991), S. 8276-81
125. TAKAHASHI, A.; FUJIWARA, T.: Proteolipid in bovine lung surfactant: its role in surfactant function. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 135 (1986), S. 527-32
126. KUROKI, Y.; AKINO, T.: Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. In: *J. Biol. Chem.* 266 (1991), S. 3068-3073

127. POULAIN, F. R.; ALLEN, L.; WILLIAMS, M. C.; HAMILTON, R. L.; HAWGOOD, S.: Effects of surfactant apolipoproteins on liposome structure: implications for tubular myelin formation. In: *American Journal of Physiology* 262 (1992), S. L730-9
128. WILLIAMS, M. C.; HAWGOOD, S.; HAMILTON, R. L.: Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B, and SP-C. In: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5 (1991), S. 41-50
129. KUROKI, Y.; MASON, R. J.; VOELKER, D. R.: Alveolar type II cells express a high-affinity receptor for pulmonary surfactant protein A. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), S. 5566-5570
130. WRIGHT, J. R.; BORCHELT, J. D.; HAWGOOD, S.: Lung surfactant apoprotein SP-A (26-36 kDa) binds with high affinity to isolated alveolar type II cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989), S. 5410-5414
131. RYAN, R. M.; MORRIS, R. E.; RICE, W. R.; CIRAOLO, G.; WHITSETT, J. A.: Binding and uptake of pulmonary surfactant protein (SP-A) by pulmonary type II epithelial cells. In: *J. Histochem. Cytochem.* 37 (1989), S. 429-440
132. VAN IWAARDEN, J. F.; WELMERS, B.; VERHOEF, J.; HAAGSMAN, H. P.; VAN GOLDE, L. M. G.: Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. In: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2 (1990), S. 91-98
133. WEISSBACH, S.; NEUENDANK, A.; PETTERSSON, M.; SCHABERG, T.; PISON, U.: Surfactant protein A modulates release of reactive oxygen species from alveolar macrophages. In: *Am. J. Physiol.* 267 (1994), S. L660-L666
134. WRIGHT, J. R.; YOUMANS, D. C.: Pulmonary surfactant protein A stimulates chemotaxis of alveolar macrophage. In: *Am. J. Physiol.* 264 (1995), S. L338-L344
135. TENNER, A. J.; ROBINSON, S. L.; BORCHELT, J.; WRIGHT, J. R.: Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis. In: *J. Biol. Chem.* 264 (1989), S. 13923-13928
136. PISON, U.; MAX, M.; NEUENDANK, A.; WEISSBACH, S.; PIETSCHMANN, S.: Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence for 'non-surfactant' functions of the surfactant system. In: *Eur. J. Clin. Invest.* 24 (1994), S. 586-599
137. REID, K.: Structure / function relationships in the collectins (mammalian lectins containing collagen-like regions). In: *Biochem. Soc. Trans.* 21 (1993), S. 460-464

138. VAN IWAARDEN, J. F.; VAN STRIJP, J. A.; EBSKAMP, M. J.; WELMERS, A. C.; VERHOEF, J.; VAN GOLDE, L. M.: Surfactant protein A is opsonin in phagocytosis of herpes simplex virus type 1 by rat alveolar macrophages. In: *Am. J. Physiol.* 261 (1991), S. L204-L209
139. VAN IWAARDEN, J. F.; VAN STRIJP, J. A.; VISSER, H.; HAAGSMANN, H. P.; VERHOEF, J.; VAN GOLDE, L. M.: Binding of surfactant protein A (SP-A) to herpes simplex virus type 1 - infected cells is mediated by the carbohydrate moiety of SP-A. In: *Journal of Biological Chemistry* 267 (1992), S. 25039-43
140. ESCAMILLA, R.; PREVOST, M. C.; HERMANT, C.; CARATERO, A.; CARIVEN, C.; KREMPF, M.: Surfactant analysis during *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients. In: *Chest* 101 (1992), S. 1551-1562
141. LIMPER, A. H.; O'RIORDAN, D. M.; VULK-PAVLOVIC, Z.; E.C.CROUCH,: Accumulation of surfactant protein D in the lung during *Pneumocystis carinii* pneumonia. In: *J. Eukaryot. Microbiol* 41 (1994), S. 98
142. HARTSHORN, K. L.; CROUCH, E. C.; WHITE, M. R.; EGGLETON,, P.: Evidence for a protective role of pulmonary surfactant protein D (SP-D) against influenza A virus. In: *J. Clin. Invest.* 94 (1994), S. 311-319
143. ASHBAUGH, D. G.; BIGELOW, D. B.; PETTY, T. L.; LEVINE, B. E.: Acute respiratory distress in adults. In: *Lancet* 2 (1967), S. 319-323
144. SEEGER, W.; WALMRATH, D.; GRIMMINGER, F.: ARDS. Intensivtherapie des akuten Lungenversagens. In: *Internist* 36 (1995), S. 785-801
145. SEEGER, W.; GÜNTHER, A.; WALMRATH, H. D.; GRIMMINGER, F.; LASCH, H. G.: Alveolar Surfactant and adult respiratory distress syndrome - pathogenetic role and therapeutic perspectives. In: *The Clinical Investigator* 71 (1993), S. 177-190
146. GÜNTHER, A.; SIEBERT, C.; SCHMIDT, R.; ZIEGLER, S.; GRIMMINGER, F.; YABUT, M.; TEMMESFELD, B.; WALMRATH, D.; MORR, H.; SEEGER, W.: Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153 (1996), S. 176-184
147. BERNARD, G. R.; ARTIGAS, A.; BRIGHAM, K. L.; CARLET, J.; FALKE, K.; HUDSON, L.; LAMY, M.; LEGALL, J. R.; MORRIS, A.; SPRAGG, R.: The american-european consensus conference on ARDS. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153 (1994), S. 818-824

148. GREGORY, T. J.; LONGMORE, W. J.; MOXLEY, M. A.; WHITSETT, J. A.; REED, C. R.; FOWLER III, A. A.; HUDSON, L. D.; MAUNDER, R. J.; CRIM, C.; HYERS, T. M.: Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. In: *J. Clin. Invest.* 88 (1991), S. 1976-1981
149. HALLMAN, M.; SPRAGG, R.; HARRELL, J. H.; MOSER, K. M.; GLUCK, L.: Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. In: *J. Clin. Invest.* 70 (1982), S. 673-683
150. PISON, U.; OBERTACKE, U.; BRAND, M.; SEEGER, W.; JOKA, T.; BRUCH, J.; SCHMIT-NEUERBURG, K. P.: Altered pulmonary surfactant in uncomplicated and septicemia-complicated courses of acute respiratory failure. In: *J. Trauma* 30 (1990), S. 19-26
151. PISON, U.; SEEGER, W.; BUCHHORN, R.; JOKA, T.; BRAND, M.; OBERTACKE, U.; NEUHOF, H.; SCHMIT-NEUERBURG, K. P.: Surfactant abnormalities in patients with respiratory failure after multiple trauma. In: *Am. Rev. Respir. Dis.* 140 (1989), S. 1033-1039
152. BACHOFEN, M.; WEIBEL, E. R.: Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. In: *Am. Rev. Respir. Dis.* 116 (1977), S. 589-615
153. WALMRATH, D.; GÜNTHER, A.; GHOFRANI, H. A.; SCHERMULY, R.; SCHNEIDER, T.; GRIMMINGER, F.; SEEGER, W.: Bronchoscopic surfactant administration in patients with severe adult respiratory distress syndrome and sepsis. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154 (1996), S. 57-62
154. FATONE, J. C.; WARD, P. A.: Role of oxygen derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reactions. In: *Am. J. Pathol.* 107 (1982), S. 397-418
155. TATE, R. M.; REPINE, J. E.: Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. In: *Am. Rev. Respir. Dis.* 128 (1983), S. 552-558
156. SEEGER, W.; GRUBE, C.; GÜNTHER, A.; SCHMIDT, R.: Surfactant inhibition by plasma proteins: differential sensitivity of various surfactant preparations. In: *Eur. Respir. J.* 6 (1993), S. 971-977
157. MURRAY, J. F.: Mechanism of acute respiratory failure. In: *Am. Rev. Respir. Dis.* 115 (1977), S. 1071-1078
158. BLIGH, E. G.; DYER, W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. In: *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959), S. 911-917

159. FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. In: *J. Biol. Chem.* 226 (1957), S. 497-509
160. KOLAROVIC, L.; FOURNIER, N. C.: A comparison of extraction methods for the isolation of phospholipids from biological sources. In: *Anal. Biochem.* 156 (1986), S. 244-250
161. ROUSER, G.; FLEISCHER, S.; YAMAMOTO, A.: Two-dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. In: *Lipids* 5 (1970), S. 494-496
162. GUSTAVSSON, L.: Densitometric quantification of individual phospholipids. Improvement and evaluation of a method using molybdenum blue reagent for detection. In: *J. Chromatogr.* 375 (1986), S. 255-266
163. MASELLA, R.; CANTAFORA, A.: Determination of phospholipids in biological samples by an improved densitometric method on thin-layer chromatograms. In: *Clin. Chim. Acta* 176 (1988), S. 63-70
164. DITTMER, J. C.; LESTER, R. L.: A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. In: *J. Lipid Res.* 5 (1964), S. 126-127
165. VAN GOLDE, L. M. G.; BATENBURG, J. J.; ROBERTSON, B.: The pulmonary surfactant system. In: *NIPS* 9 (1994), S. 13-20
166. KRÄMER, H. J.; SCHMIDT, R.; GÜNTHER, A.; BECKER, G.; SUZUKI, Y.; SEEGER, W.: ELISA technique for quantification of surfactant protein B (SP-B) in bronchoalveolar lavage fluid. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152 (1995), S. 1540-1544
167. NAVE, R.: Persönliche Mitteilung. In: *Fa. Byk Gulden, Konstanz* (1993)
168. REINKE, M.; PILLER, M.; BRUNE, K.: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay of thromboxane b2 using a monoclonal antibody. In: *Prostaglandins* 37 (1989), S. 577-586
169. SUZUKI, Y.; KOGISHI, K.; FUJITA, Y.; KINA, T.; NISHIKAWA, S.: A monoclonal antibody to the 15,000 dalton protein associated with porcine pulmonary surfactant. In: *Exp. Lung Res.* 11 (1986), S. 61-73
170. NGO, T. T.: *Chromogenic substrates for enzyme immunoassay in nonisotopic immunoassay* New York: Plenum Publishing Corporation, 1988, S. 57-84
171. PETERS, H. J.; BAUMGARTEN, H.; SCHULZE, M.: *Monoklonale Antikörper-Herstellung und Charakterisierung* Berlin: Springer Verlag, 1985

172. JOHANSSON, J.; JOERNVALL, H.; CURSTEDT, T.: Human surfactant polypeptide SP-B. Disulfide bridges, C-terminal end, and peptide analysis of the airway form. In: *FEBS Lett.* 301 (1992), S. 165-167
173. SCHMIDT, R.: *Entwicklung von Methoden zur biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung des pulmonalen Surfactants* Wettenberg: VVB Laufersweiler Verlag, 1996. - 3-89687-509-4
174. BARITUSSIO, A.; ALBERTI, A.; QUAGLINO, D.; PETTENAZZO, A.; DALZOPPO, D.; SARTORI, L.; PASQUALI-RONCHETTI, I.: SP-A, SP-B, SP-C in surfactant subtypes around birth: reexamination of alveolar life cycle of surfactant. In: *Am. J. Physiol.* 266 (1994), S. L436-L447
175. GATTINONI, L.; BOMBINO, M.; PELOSI, P.; LISSONI, A.; PESENTI, A.; FUMAGALLI, R.; TAGLIABUE, M.: Lung structure and function in different stages of severe adult respiratory distress syndrome. In: *J.A.M.A.* 271 (1994), S. 1772-1779
176. HALL, S. B.; HYDE, R. W.; NOTTER, R. H.: Changes in Subphase Aggregates in Rabbits Injured by Free Fatty Acid. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149 (1994), S. 1099-1106
177. GUTHMANN, F.; HAUPT, R.; SCHLAME, M.; STEVENS, P. A.; RÜSTOW, B.: Alveolar Surfactant Subfractions Differ in Their Lipid Composition. In: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27 (1995), S. 1021-1026
178. FLEMING, B. D.; KEOUGH, K. M. W.: Surface respreading after collapse of monolayers containing major lipids of pulmonary surfactant. In: *Chem. Phys. Lipids* 49 (1988), S. 81-86
179. SUZUKI, Y.; CURSTEDT, T.; GROSSMANN, G.; KOBAYASHI, T.; NILSSON, R.; NOHARA, K.; ROBERTSON, B.: The role of the low-molecular weight (less than or equal to 15,000 daltons) apoproteins of pulmonary surfactant. In: *Eur. J. Respir. Dis.* 69 (1986), S. 336-345
180. TANAKA, Y.; TAKEI, T.; AIBA, T.; MASUDA, K.; KIUCHI, A.; FUJIWARA, T.: Development of synthetic lung surfactants. In: *J. Lipid Res.* 27 (1986), S. 475-485
181. SEEGER, W.; GÜNTHER, A.; THEDE, C.: Differential sensitivity to fibrinogen-inhibition of SP-C versus SP-B based surfactants. In: *Am. J. Physiol.* 262 (1992), S. L285-L291
182. SUZUKI, Y.; ROBERTSON, B.; FUJITA, Y.; GROSSMANN, G.; KOGISHI, K.; CURSTEDT, T.: Lung protein leakage in respiratory failure induced by a hybridoma making monoclonal antibody to the hydrophobic surfactant-associated polypeptide SP-B. In: *International Journal of Experimental Pathology* 73 (1992), S. 325-33

183. BARR, F.; CLARK, H.; HAWGOOD, S.: Identification of a putative surfactant convertase in rat lung as a secreted serine carboxylesterase. In: *Am. J. Physiol.* 274 (1998), S. L404-L410
184. OVNIC, M.; TEPPERMAN, K.; MEDDA, S.; ELLIOTT, R. W.; STEPHENSON, D. A.; GRANT, S. G.; GANSCHOW, R. E.: In: *Genomics* 9 (1991), S. 344-354
185. MUNGER, J. S.; SHI, G. P.; MARK, E. A.; CHIN, D. T.; GERARD, C.; CHAPMAN, H. A.: A Serine Esterase Released by Human Alveolar Macrophages Is Closely Related to Liver Microsomal Carboxylesterases. In: *The Journal of Biological Chemistry* 266 (1991), Nr. 28, S. 18832-18838
186. GAUSTAD, R.; SLETTEN, K.; LOVHAUG, D.; FONNUM, F.: Purification and characterization of carboxylesterases from rat lung. In: *Biochem. J.* 274 (1991), S. 693-697
187. GROSS, N. J.; NICKEL, S.; SCHULTZ, R. M.; DHAND, R.: In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153 (1996), S. A109
188. LEWIS, J. F.; IKEGAMI, M.; JOBE, A. H.: Altered surfactant function and metabolism in rabbits with acute lung injury. In: *J. Appl. Physiol.* 69 (1990), S. 2303-2310
189. WRIGHT, J. R.: Clearance and recycling of pulmonary surfactant. In: *Am. J. Physiol.* 259 (1990), S. L1-12
190. SUTER, P. M.; SUTER, S.; GIRARDIN, E.; LOMBARD-ROUX, P.; GRAU, G. E.; DAYER, J. M.: High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors interleukin-1, interferon and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. In: *Am. Rev. Respir. Dis.* 145 (1992), S. 1016-1022
191. KONDOH, Y.; TANIGUCHI, H.; TAKI, F.; TAKAGI, K.; SAKATE, T.: 7S collagen in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. In: *Chest* 101 (1992), S. 1091-1094
192. JOBE, A. H.: Pulmonary surfactant therapy. In: *N. Engl. J. Med.* 328 (1993), S. 861-86
193. GÜNTHER, A.; SCHMIDT, R.; FEUSTEL, A.; MEIER, U.; PUCKER, C.; ERMERT, M.; and SEEGER, W.: Surfactant Subtype Conversion is related to loss of Surfactant Apoprotein B and Surface Activity in Large Surfactant Aggregates. In: *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 159 (1999), S. 244-251
194. SCHMIDT, R.; MEIER, U.; YABUT-PEREZ, M.; WALMRATH, D.; GRIMMINGER, F.; SEEGER, W.; and GÜNTHER, A.: Alteration of fatty Acid Profiles in Different Pulmonary Surfactant Phospholipids in Acute Respiratory Distress Syndrome and Severe Pneumonia. In: *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 163 (2001), S.95-100

## 8. Abkürzungen

$\gamma$	- Oberflächenspannung
$\gamma$ ads	- Oberflächenspannung nach 12 Sekunden Adsorption
$\gamma$ min	- minimale Oberflächenspannung nach 5 min Filmoszillation
ABTS	- 2,2'-Azino-Di-[3-Ethyl-Benzthiazolinsulfonat-(6)]
ARDS	- Akutes Lungenversagen des Erwachsenen
BALF	- Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
CE	- Cholesterolester
CH	- Cholesterol
CHCl <sub>3</sub>	- Chloroform
DC	- Dünnschichtchromatographie
DG	- Diglyceride
DPPC	- Dipalmitoylphosphatidylcholin
ELISA	- Enzyme-linked immunosorbent assay
FA	- Fettsäure
FA	- Freie Fettsäuren
FAME	- Fettsäuremethylester
FE	- Fettsäureester
IRDS	- Kindliches Atemnotsyndrom
HPLC	- High Performance Liquid Chromatographie
HPTLC	- High Performance Thin-Layer Chromatographie
kDa	- Kilo-Dalton
LK	- Lamellar-Körperchen
LPC	- 1-Lyso-Phosphatidylcholin
LSA	- Large Surfactant Aggregates: bei 48.000 x g sedimentierbares Surfactantmaterial aus bronchoalveolärer Lavage
MeOH	- Methanol
MG	- Monoglyceride
MV	- Multilamelläre Vesikel
PBS	- Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PC	- Phosphatidylcholin
PE	- Phosphatidylethanolamin
PG	- Phosphatidylglycerol

PI	- Phosphatidylinositol
PL	- Phospholipide
PS	- Phosphatidylserin
R <sub>f</sub>	- Relativer Retentionsfaktor
SD	- Standardabweichung
SE	- Standardfehler
SP-A	- Surfactant-Protein A
SP-B	- Surfactant-Protein B
SP-C	- Surfactant-Protein C
SP-D	- Surfactant-Protein D
SPH	- Sphingomyelin
SSA	- Small Surfactant Aggregates
SV	- Kleine, oberflächeninaktive Vesikel
TG	- Triglyceride
TM	- Tubuläres Myelin
UV	- Unilamelläre Vesikel

## 9. Danksagung

Danken möchte ich in erster Linie meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. A. Günther, dessen vorbildliche wissenschaftliche Leitung und Kompetenz sowie gesunde, kollegiale Menschenführung Grundvoraussetzung für das Gelingen dieser Arbeit war.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Reinhold Schmidt für die tatkräftige Unterstützung und angenehme Zusammenarbeit vor allem bei der Bewältigung biochemischer Fragestellungen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. C. Ruppert und allen ungenannten Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe „Respiratorische Insuffizienz“ für eine produktive und freundliche Atmosphäre im Team.

Weiterhin gebührt ein großer Dank Herrn Prof. Dr. W. Seeger, der als geschäftsführender Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik II und langjähriger Leiter des Sonderforschungsbereiches „Respiratorische Insuffizienz“ mir den Einstieg in eine wissenschaftliche Aufgabe und im weiteren in die klinische Ausbildung ermöglichte.

In Erinnerung an eine erlebnisreiche Studienzeit danke ich meinen Kommilitonen Lars Niewöhner, Hans-Henrik Odland, Jan Schlaudraff und Matthias Wündisch.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken - meiner Frau Dania, unseren Söhnen Finn und Ben, meinen lieben Eltern und meinem Bruder Stephan, die mir fest zur Seite stehen und mit deren Unterstützung ich immer rechnen kann.

## 10. Lebenslauf

Am 12.06.1969 wurde ich als Sohn des Tierarztes Dr. Gunter Feustel und seiner Ehefrau Helga Feustel, geb. Friedrich, in München-Schwabing geboren. Nach dem Besuch der Grundschule in Bad Feilnbach wechselte ich 1980 an das Gymnasium in Bad Aibling, an dem ich 1989 mein Abitur ablegte.

Nach sechsmonatigem Sprachaufenthalt in Spanien, Salamanca und Ableistung eines Freiwilligen Sozialen Jahres beim Deutschen Paritätischen Wohlfahrtsverband in München nahm ich zum Wintersemester 1991/92 das Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Giessen auf. Im Frühjahr 1995 begann ich unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. W. Seeger und Herrn PD Dr. A. Günther die hier vorliegende Arbeit. Im Juni 1998 schloss ich mein Studium mit dem III. Staatsexamen erfolgreich ab.

Seit dem 15.06.1998 bin ich als Arzt am Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen tätig.