

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. D. Reinhardt

**Die Surfactantproteine SP-A und SP-D in der Lunge
von Kindern mit chronischem Husten**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Manuela Steinecker
aus München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Griese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Schulz
Prof. Dr. J. Behr

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2004

Lea, Emily, Ulf

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Surfactant	6
1.2	Struktur, Synthese und Organisation der Surfactantproteine A und D	7
1.3	Funktion der Surfactantproteine A und D	9
1.4	Surfactant und Atemwegsobstruktion	10
1.5	Surfactantproteine A und D bei verschiedenen Lungenerkrankungen	11
1.6	Fragestellung	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Patienten und Kontrollgruppe	15
2.2	Probengewinnung, bronchoalveoläre Lavagen	23
2.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	24
2.4	Gesamtproteinbestimmung	29
2.5	Eindimensionale SDS Elektrophorese und Western Blot	30
2.6	Statistik	36
3	ERGEBNISSE	37
3.1	Klinische Daten	37
3.2	Zytologische Ergebnisse	55
3.3	Bakteriologische Ergebnisse	59
3.4	Quantitative Untersuchung der Surfactantproteine	63
3.5	Qualitative Untersuchung der Surfactantproteine	72

4	DISKUSSION	137
4.1	Patienten	137
4.2	Zytologische und bakteriologische Veränderungen	138
4.3	Veränderungen von SP-A	140
4.4	Veränderungen von SP-D	145
5	ZUSAMMENFASSUNG	151
6	ANHANG	152
7	LITERATUR	179
	DANKSAGUNG	188
	LEBENS LAUF	189

1 Einleitung

1.1 Surfactant

Surfactant ist ein komplexes Gemisch, das aus Phospholipiden, neutralen Lipiden und Proteinen besteht. Es wird von Typ II Pneumozyten gebildet und in die Lungenalveolen sezerniert, wo es die Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht auf ein Minimum senkt und somit das Kollabieren der Alveolen während der Expiration verhindert.

Die Lipide haben einen Anteil von ca. 90% am Surfactant, wobei Phospholipide am stärksten vertreten sind. Den Hauptanteil an den Phospholipiden macht Phosphatidylcholin aus, das zu 65% in gesättigter Form (Dipalmitoylphosphatidylcholin) vorliegt. Insbesondere diese gesättigte Form ist sehr wichtig zur Herstellung einer niedrigen Oberflächenspannung.

Die Proteine machen ca. 10% des Surfactant aus. Es werden zwei Typen von Surfactantproteinen unterschieden: die hydrophilen Surfactantproteine SP-A und SP-D und die hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C. Insbesondere den Surfactantproteinen SP-A und SP-D wird eine wichtige Bedeutung im Immunsystem der Lunge zugeschrieben [31, 32, 59, 36].

1.2 Struktur, Synthese und Organisation der Surfactantproteine A und D

Die beiden hydrophilen Glykoproteine SP-A und SP-D gehören zur Familie der Collectine. Dazu zählen auch das Mannan-bindende Lectin (MBL), das bovine Conglutinin und das Collectin 43 (CL-43). Diese Moleküle hat man Collectine genannt, da sie in ihrer Struktur sowohl einen kollagenartigen Anteil aufweisen als auch einen Lektinanteil haben, mit dem sie kalziumabhängig Kohlenhydratsequenzen erkennen und binden können (carbohydrate recognition domain, CRD). Collectine spielen eine Rolle in der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr [19, 18, 72].

Die einzelne Polypeptidkette der Collectine besitzt am C-terminalen Ende die Kohlenhydratbindungsstelle (CRD), anschließend eine kurze Verbindungsdomäne (neck region), dann eine kollagenähnliche Region (collagen-like domain) und schließlich eine kurze N-terminale, glycinreiche Disulfid-Domäne (N-terminal domain). Jeweils drei solcher Monomere sind zu einem Trimer vereint.

SP-A besteht aus 18 einzelnen monomeren SP-A-Molekülen, wobei das SP-A-Monomer ein Molekulargewicht von ungefähr 26-35 kDa hat. Sechs Trimere sind über die Kollagendomäne wie ein Blumenstrauß organisiert und bilden das polymere SP-A (siehe Abbildung 1).

Ein einzelnes SP-D-Monomer hat ein Molekulargewicht von ca. 43 kDa. SP-D ist aus 12 SP-D-Molekülen zusammengesetzt, wobei auch hier wieder drei Monomere zu einem Trimer angeordnet sind und vier Trimere das kreuzartige SP-D-Polymer bilden (siehe Abbildung 1). Die kollagenähnliche Region des SP-D ist viel länger als die von SP-A [36, 19, 72].

Weiterhin wurde ein SP-D-Monomer mit einem Molekulargewicht von 50 kDa beschrieben. Diese Form entsteht durch posttranslationale Glykosylierung und wird nicht zu höhermolekularen Oligomeren organisiert [71].

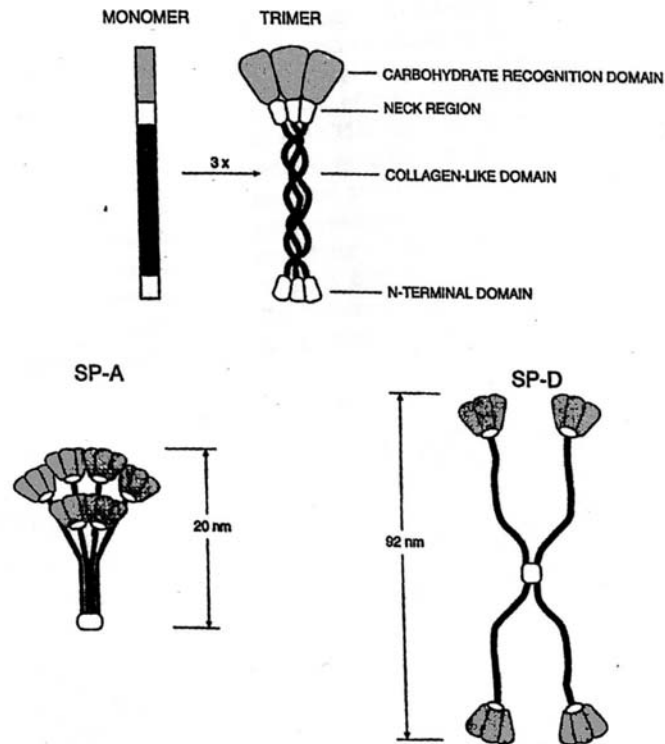


Abbildung 1: Struktur von SP-A und SP-D

Eine Trimer-Untereinheit besteht aus der Kohlenhydratbindungsstelle (CRD, carbohydrate recognition domain), einer kurzen Verbindungsdomäne (neck region), einer kollagenähnlichen Region (collagen-like domain) und einer kurzen N-terminalen Disulfid-Domäne (N-terminal domain).

SP-A ist mit 6 Collectin-Untereinheiten ähnlich wie ein Blumenstrauß angeordnet, SP-D kreuzförmig mit 4 Collectin-Untereinheiten.

(aus Haagsman HP, Diemel RV. Surfactant-associated proteins; functions and structural variation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; 129: 91-108)

Die Gene für SP-A und SP-D wurden auf dem langen Arm des Chromosoms 10 (10q22.2-23.1) lokalisiert [17, 52]. Humanes SP-A wird von zwei Genen, SP-A1 und SP-A2 codiert, während SP-D nur von einem einzelnen Gen codiert wird [17, 75, 26]. SP-A und SP-D werden in der Lunge von Typ-II-Pneumozyten als auch in den Clara-Zellen der Bronchioli gebildet, SP-A wird auch in trachealen Drüsenzellen exprimiert. Während sich SP-A größtenteils in lamellären Einschlüssen von Typ-II-Zellen befindet und im Alveolarraum an tubuläres Myelin gebunden ist, wird SP-D im Endoplasmatischen Retikulum der Typ-II-Zellen gefunden. Der größte Teil von SP-D liegt in löslicher Form im wässrigen Überstand, SP-A nahezu vollständig als Lipid-Protein-Komplex vor [72, 16, 90, 56].

SP-A und SP-D bzw. ihre mRNA werden nicht nur in der Lunge, sondern auch in den Epithelien nahezu aller innerer Organe nachgewiesen [68, 87].

1.3 Funktion der Surfactantproteine A und D

SP-A und SP-D können eine Vielzahl von Mikroorganismen wie Viren, Bakterien und Pilze, aber auch Lipopolysaccharide (LPS, Endotoxin) und Allergene binden [19, 37, 80]. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass die Hauptfunktion der beiden hydrophilen Surfactantproteine in der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr liegt.

In den meisten Fällen spielt bei der Bindung der Pathogene die CRD eine wichtige Rolle [85]. Die Bindung der Collectine an die Krankheitserreger führt in einigen Fällen zu deren Agglutination, wodurch die Mikroorganismen über die mukoziliäre Clearance leichter entfernt werden können [59, 41].

Sowohl SP-A als auch SP-D interagieren über spezifische Bindungsstellen mit Makrophagen. Dadurch kann die Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen gesteigert werden. SP-A und SP-D können die Phagozytose von *Pseudomonas aeruginosa* verstärken [11] und die Phagozytose von *Mycobacterium tuberculosis* durch Makrophagen wird verhindert [18]. SP-A führt zu einer Verstärkung der Phagozytose von grampositiven und gramnegativen Bakterien, von Pilzen wie *Aspergillus fumigatus* und *Candida albicans* und von Viren [51, 84].

Darüberhinaus können SP-A und SP-D durch Bindung an Makrophagen deren Chemotaxis verstärken [18, 85, 95]. Neben der Beeinflussung der Phagozytose und Chemotaxis ist für SP-A und SP-D auch eine Verstärkung des respiratory burst der Makrophagen nachgewiesen: durch die Bildung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen kann die Elimination von Mikroorganismen unterstützt werden [43, 6].

Andererseits wird die von den T-Zellen ausgehende Immunantwort durch SP-A und SP-D moduliert, um eine Überreaktion des Immunsystems zu verhindern. Erreicht wird dies durch eine verminderte Ausschüttung von Zytokinen und eine Proliferationshemmung der T-Zellen [85, 8, 7].

Um die Funktion der Surfactantproteine SP-A und SP-D in vivo untersuchen zu können, wurden Studien mit Knockout-Mäusen durchgeführt. Bei Mäusen ohne SP-A war die Surfactanthomöostase und die Atemfunktion nicht wesentlich beeinträchtigt, allerdings waren die Mäuse anfälliger für bakterielle Infektionen [54, 63].

Mäuse ohne SP-D hingegen zeigten deutliche Veränderungen wie Störungen in der Surfactanthomöostase und Auftreten von atypischen Alveolarmakrophagen.

Außerdem wurde kam es zu einer chronischen Inflammationsreaktion mit Fibrose- und Emphysembildung. Die Studien an Knockout-Mäusen zeigen, dass die beiden hydrophilen Surfactantproteine SP-A und SP-D sowohl inflammatorische als auch antiinflammatorische Funktionen haben [53, 9, 46, 92].

1.4 Surfactant und Atemwegsobstruktion

Bisher ist verhältnismäßig wenig über die Rolle von Surfactant in obstruktiven Lungenerkrankungen beim Menschen bekannt. Eine beeinträchtigte Surfactantfunktion dürfte aber zu einer Atemwegsobstruktion und einem erhöhten Atemwegswiderstand beitragen [44].

Es ist allgemein bekannt, dass in der Pathogenese des Asthma bronchiale eine bronchiale Entzündungsreaktion, eine bronchiale Hyperreaktivität und eine endobronchiale Obstruktion, verursacht durch Bronchospasmus, Schleimhautödem und Hypersekretion eines zähen Schleims, eine zentrale Rolle spielen. Entzündungsprozesse führen zu einer erhöhten Permeabilität des Epithels und Endothels, dadurch können Plasmaproteine aus den Blutgefäßen in das Lumen der Atemwege gelangen. Die Plasmaproteine führen einerseits zu einer Beeinträchtigung der Surfactantfunktion [83, 27] v.a. beim Offenhalten der kleinen Atemwege, andererseits führt die Proteinakkumulation im Lumen zu einem direkten Verschluss der Atemwege [44]. Beide Faktoren verstärken somit zusätzlich die Atemwegsobstruktion.

Ein wichtiger Anreiz für die Surfactantsekretion ist die Ventilation [94]. Deshalb dürften Atemwegsregionen mit Hypoventilation zusätzlich durch einen verminderten lokalen Surfactantgehalt beeinträchtigt sein [44].

1.5 Surfactantproteine A und D bei verschiedenen Lungenerkrankungen

Bei vielen Lungenerkrankungen ist bekannt, dass sie mit Veränderungen der Surfactantproteine einhergehen. Diese Veränderungen können sowohl den Gehalt an Surfactantproteinen als auch deren Funktion betreffen [32, 57].

Untersuchungen der Surfactantproteine werden meist im Lungensekret, das durch eine bronchoalveoläre Lavage gewonnen wird, durchgeführt, aber es sind auch Veränderungen im Serum gefunden worden [45, 29, 1, 58].

Als Untersuchungsmaterial in dieser Arbeit dienten hauptsächlich bronchoalveoläre Lavagen von Patienten mit chronischem Husten, die u.a. eine oder mehrere der folgenden Krankheiten zeigten.

Asthma

Bezüglich des Gehaltes an SP-A und SP-D von Patienten mit Asthma existieren unterschiedliche Daten.

Einerseits konnte gezeigt werden, dass die Surfactantproteine SP-A und SP-D in bronchoalveolären Lavagen von Asthma-Patienten im Vergleich zu Gesunden vermindert sind. Dafür wird eine gestörte Funktion der Typ II Zellen verantwortlich gemacht [86].

Eine andere Untersuchung fand erhöhte Konzentrationen von SP-A und SP-D bei Patienten mit Asthma. Das erhöhte SP-A könnte neben seiner Funktion in der Immunabwehr auch die allergische Entzündungsreaktion dämpfen [13].

Auch neuere Studien an Tieren, die hauptsächlich Veränderungen der Surfactantproteine bei allergischen Atemwegsentzündungen untersuchten, liefern unterschiedliche Ergebnisse. Einerseits zeigen sich in mit Milben sensibilisierten Mäusen verringerte SP-A- und SP-D-Konzentrationen [91], andererseits kommt es in einem anderen Versuch mit sensibilisierten Mäusen in Anwesenheit von Lymphozyten zu einem Anstieg von SP-A und SP-D [39]. Erhöhte SP-D-Konzentrationen bei unverändertem SP-A-Gehalt werden in einer weiteren Untersuchung an Mäusen gefunden [38].

Pneumonie

In der BAL von Patienten mit Pneumonien finden sich erniedrigte Konzentrationen an SP-A [35, 5]. Die geringsten Werte zeigen sich bei interstitiellen Pneumonien [35]. Pneumonien, die durch grampositive Erreger verursacht werden, gehen mit einem geringeren Gehalt an SP-A einher als durch gramnegative Bakterien verursachte Pneumonien [5].

Bei Pneumonien kommt es zu einer Schädigung und erhöhten Permeabilität der Alveolen. Das niedrige SP-A kann einerseits auf einen direkten Effekt der Bakterien zurückzuführen sein, andererseits kann die Entzündungsreaktion in den Alveoli zu einer Verringerung von SP-A führen [5].

In letzter Zeit wurden die Surfactantproteine auch vermehrt im Serum untersucht. Kürzlich konnte festgestellt werden, dass es bei Pneumonie-Patienten durchschnittlich zu einem dreifachen Anstieg der SP-D-Konzentration im Serum innerhalb von fünf Tagen kommt [61]. Daten zum SP-D-Gehalt in der BAL liegen hierbei nicht vor. Bisher ist der exakte Mechanismus für den Anstieg von SP-D im Serum nicht bekannt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass es primär aus der Lunge stammt [45]. Dabei dürfte eine erhöhte Permeabilität der Lungengefäße während Infektionen eine grosse Rolle spielen [61].

RSV-Infektion

Bei Kindern mit einer schweren RSV-Infektion werden erniedrigte SP-A und SP-D-Konzentrationen in der BAL gefunden [50, 21].

Es konnte nachgewiesen werden, dass SP-A einerseits die Phagozytose von RSV durch Alveolarmakrophagen und Monozyten verstärkt [4, 33] und andererseits mittels ihrer CRD selbst an das RS-Virus bindet und somit das Eindringen in Epithelzellen verhindert [28, 33]. Durch diese Funktion in der Abwehr von RSV gehen niedrige SP-A-Konzentrationen mit schweren RSV-Infektionen einher wie in vivo an Mäusen demonstriert werden konnte [64].

Kürzlich wurde gezeigt, dass bestimmte SP-A-Allele mit einem erhöhten Risiko, an einer schweren RSV-Infektion zu erkranken, einhergehen [67]. Auch SP-D bindet an das RS-Virus und spielt in der Abwehr einer RSV-Infektion eine wichtige Rolle [42].

Interstitielle Lungenerkrankungen

idiopathische Lungenfibrose

In mehreren Studien wurden bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose verminderte SP-A-Konzentrationen gemessen [74, 73, 34]. Weiterhin korreliert der in BAL gemessene SP-A-Gehalt mit dem Überleben [73].

Die SP-D-Konzentration hingegen zeigt keine wesentliche Veränderung [45].

Sarkoidose

Es wurden einerseits unveränderte SP-A-Werte bei Sarkoidose-Patienten gefunden [86], andererseits auch erhöhte SP-A-Konzentrationen [40]. Eine neuere Studie zeigt sogar einen verminderten SP-A-Gehalt [34].

Die SP-D-Konzentration war nicht verändert [45].

Die unterschiedlichen Ergebnisse im SP-A-System könnten verschiedene Schweregrade der Erkrankung widerspiegeln [76]. Man geht davon aus, dass es bei der Sarkoidose im Gegensatz zu anderen interstitiellen Lungenerkrankungen nicht zu schwerwiegenden Veränderungen im Surfactantsystem kommt [32].

1.6 Fragestellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob es bei Kindern mit chronischem Husten zu einer Veränderung der Surfactantproteine SP-A und SP-D in bronchoalveolären Lavagen kommt. Andererseits wäre es auch möglich, dass primäre Veränderungen von SP-A und SP-D zu einer Beeinträchtigung der Infektabwehr der Lunge führen und somit die Ursache für den chronischen Husten sein könnten.

Um quantitative Abweichungen der Surfactantproteine zwischen Patienten und einer lungengesunden Kontrollgruppe zu erkennen, wurde die Konzentration von SP-A und SP-D in beiden Gruppen bestimmt und miteinander verglichen. Darüberhinaus wurde eine SDS Elektrophorese mit anschließendem Western Blotting durchgeführt, um Rückschlüsse auf qualitative Veränderungen der Surfactantproteine SP-A und SP-D ziehen zu können. Wichtig erschien auch die Frage, ob es bei Patienten mit chronischem Husten zu einer proteolytischen Degradation von SP-A und SP-D, wie sie bei der Mukoviszidose (CF) beschrieben wurde [88, 89], kommt. Folge wäre eine eingeschränkte funktionelle Aktivität von SP-A bzw. SP-D.

Bewusst wurden die Patienten mit chronischem Husten symptomorientiert in Gruppen mit Obstruktion bzw. ohne Obstruktion eingeteilt, da es interessant erschien, ob sich Veränderungen im Surfactantsystem zwischen obstruktiven Lungenerkrankungen bzw. nicht-obstruktiven Lungenerkrankungen nachweisen lassen.

Im Rahmen einer retrospektiven Studie wurden klinische Daten der Patienten aufgearbeitet, um einen eventuellen Zusammenhang zwischen klinischen Besonderheiten und quantitativen bzw. qualitativen Veränderungen der Surfactantproteine SP-A und SP-D erkennen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Kontrollgruppe

2.1.1 *Patientenkollektiv*

Aus einer Gruppe von 76 Kindern, die im Zeitraum von 1997 bis 1999 eine diagnostische bronchoalveoläre Lavage (BAL) im Haunerschen Kinderspital der Universität München erhielten, wurden retrospektiv Patienten ausgesucht. Es wurden alle Patienten, bei denen ein chronischer Husten von mindestens drei Monaten Dauer diagnostiziert wurde, ausgewählt. Dies waren 62 der 76 Patienten. Weiterhin wurden von diesen 62 Patienten 12 Patienten ausgeschlossen, da bei ihnen nicht genug Material für die geplanten Untersuchungen vorhanden war. Die restlichen 50 Kinder, die zwischen 0,3 und 16,8 Jahren (Median 5,0) alt waren, wurden in dieser Arbeit untersucht.

Die klinischen Daten wurden mit Hilfe von Krankenakten und Gesprächen mit Eltern gewonnen. Letztere konnten bei 33 Patienten telefonisch mit einem einheitlichen Fragebogen erfolgreich durchgeführt werden.

Bei 45 der 50 Patienten mit chronischem Husten wurde laut Krankenakten die Diagnose chronische Bronchitis gestellt, die übernommen wurde. Weiterhin wurde eine Unterteilung in obstruktive und nicht-obstruktive Bronchitis vorgenommen. Eine obstruktive Bronchitis lag definitionsgemäß vor, wenn diese Diagnose vor Durchführung der BAL durch einen niedergelassenen Kinderarzt und/oder Klinikarzt einer Kinderklinik gestellt wurde. Die übrigen Kinder bildeten eine Gruppe mit chronischer nicht-obstruktiver Bronchitis. Die obstruktive Bronchitis-Gruppe umfasste 31 Kinder, die nicht-obstruktive 14. Die restlichen fünf Patienten mit chronischem Husten litten an einer schweren Grundkrankheit und wurden in die Gruppe der Einzelfälle eingeteilt. Bei den Grundkrankheiten handelte sich um eine Sarkoidose, eine interstitielle Lungenerkrankung unbekannter Genese, eine Amyloidose, eine Lungentuberkulose und eine chronisch septische Granulomatose.

2.1.2 Patienten der obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Die 31 Patienten aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe litten vor der BAL an einem chronischen Husten von mindestens dreimonatiger Dauer. Im Laufe ihrer Erkrankung war von einem Kinderarzt eine Bronchoobstruktion festgestellt worden. Die Kinder waren zwischen 0,3 und 15,2 Jahren alt (Median 4,2).

Die klinischen Parameter sind in der Tabelle 2.1 dargestellt.

Das Alter bezieht sich auf das Alter zum Zeitpunkt der BAL und die Krankheitsdauer erstreckt sich auf den Zeitraum vom Beginn der ersten Symptome bis zur Durchführung der BAL.

Mehr als zwei Pneumonien, die radiologisch gesichert wurden und/oder auf Antibiotikagabe angesprochen haben, wurden als rezidivierende Pneumonien bezeichnet.

Tabelle 2.1: klinische Parameter der obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Genus	Alter (Jahre)	Krankheitsdauer (Jahre)	Haupt- und Nebendiagnosen
ob1	w	0,3	0,3	Z.n. Pneumonien, Z.n. Bronchiolitis, Z.n. Atelektase
ob2	m	11,9	10,0	Bronchiale Hyperreagibilität, chron. laryngealer Husten und Stridor, Z.n. Pneumonien
ob3	m	2,5	2,0	Rez. obstruktive Bronchitiden, rez. inspiratorischer Stridor, Z.n. RSV-Infektion, Z.n. Pneumonien
ob4	m	4,6	4,0	Chron. Bronchitis, Z.n. Bronchopneumonien
ob5	m	4,2	4,0	Rez. Bronchitiden und rez. Bronchopneumonien
ob6	m	12,7	3,0	Hyperagiles Bronchialsystem, Z.n. Pneumonie
ob7	m	0,7	0,3	Rez. bronchopulmonale Infekte, Z.n. RDS I, AIS u. Sekundärinfektion, Z.n. ICH III rechts
ob8	w	5,3	1,0	Rez. Pneumonien, rez. Atemnotfälle
ob9	w	7,9	3,0	Rez. Atemwegsinfekte mit Obstruktion, Asthma bronchiale, rez. Pneumonien
ob10	m	3,4	3,0	Chronischer Husten
ob11	m	7,9	7,0	Asthma bronchiale
ob12	m	4,2	0,3	Rez. Bronchitiden, asthmoide Bronchitis, Z.n. Pneumonie
ob13	m	0,7	0,5	Rez. obstruktive Bronchitiden u. rez. Pneumonien
ob14	w	6,3	2,5	Chronische Bronchitis, Z.n. Pneumonien
ob15	m	9,3	5,0	Allergisches Asthma bronchiale, nächtliche Anfälle von Husten und Dyspnoe
ob16	m	8,0	5,0	Asthma bronchiale, chron. rez. Husten, Z.n. Pneumonie
ob17	m	0,8	0,3	Rez. obstruktive Bronchitiden
ob18	w	15,2	4,0	Rez. Husten, Belastungsdyspnoe, Z.n. Pneumonie, allergisches Asthma bronchiale
ob19	w	5,3	5,0	Rez. Bronchitiden, rez. Pneumonien
ob20	w	0,7	0,7	Rez. obstruktive Bronchitiden, Z.n. Pneumonie
ob21	m	2,4	2,2	Asthma bronchiale, rez. Pneumonien, Z.n. RSV-Bronchiolitis
ob22	w	2,8	2,5	Chronisch rez. Bronchitiden
ob23	w	3,4	3,4	Rez. obstruktive Bronchitiden, rez. Pneumonien
ob24	w	5,4	5,4	Z.n. Bronchopneumonien, hyperreagibles Bronchialsystem, bronchopulmonale Dysplasie
ob25	m	1,9	1,5	Rez. Bronchitiden, Z.n. Pneumonie
ob26	w	5,3	3,3	Rez. obstruktive Bronchitiden, Z.n. doppeltem Aortenbogen
ob27	w	5,2	2,0	Bronchopulmonale Infekte in Kombination mit Obstruktion u. bronchialer Hyperreagibilität, Asthma bronchiale, rez. Pneumonien
ob28	m	7,9	3,0	Chronischer Husten, Z.n. Pneumonie
ob29	w	1,0	0,8	Rez. spastische Bronchitiden, Z.n. Pneumonien
ob30	m	1,0	0,7	Obstruktive Bronchitiden, Z.n. Pneumonien
ob31	m	1,8	1,5	Rez. obstruktive Bronchitiden, Z.n. Pneumonie

Abkürzungen:

RDS = respiratory distress syndrome; AIS = Amnioninfektionssyndrom; ICH = intrakranielle Hämorrhagie

In der Tabelle 2.2 sind die Untersuchungsbefunde der obstruktiven Bronchitis-Gruppe aufgeführt.

Der Schweißtest war, soweit er durchgeführt wurde, bei allen Kindern negativ, so dass eine Mukoviszidose weitgehend ausgeschlossen werden konnte.

Es zeigten alle Patienten der obstruktiven Bronchitis-Gruppe leichte bis schwere entzündliche Veränderungen in der Bronchoskopie. Bei zwei Kindern konnte eine klinisch relevante Stenose von 80% des rechten bzw. linken Stammbronchus festgestellt werden.

Tabelle 2.2: Untersuchungsbefunde der obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Pulmo-Befund (Aufnahmetag)	Schweißtest	P/R	Bronchoskopischer Befund
ob1	diskretes Giemen	normal	n.b.	mäßige Tracheobronchitis
ob2	o.B.	n.d.	neg	Tracheobronchitis
ob3	n.b.	normal	pos	Tracheobronchitis
ob4	n.b.	normal	neg	entzündlich veränderte Schleimhaut der Bronchien und verdickte Septen
ob5	o.B.	normal	neg	Ausgeprägte Tracheitis, beide Bronchialsysteme mit Schleimhautrötung u. unregelmäßiger Schleimhautkontur
ob6	o.B.	normal	n.b.	80%ige Einengung des re. Stammbronchus mit V.a. asthmatische Bronchitis
ob7	in- und expir. Stridor, expir.trockene RG`s	normal	schwach pos	deutl. entzündetes Bronchialsystem
ob8	o.B.	normal	stark pos	geringgradige Tracheobronchitis
ob9	vereinzelte RG`s	nicht genug Schweiß	stark pos	mäßig entzündetes Bronchialsystem, chron. Entzündungszeichen (atrophische Schleimhaut)
ob10	o.B.	normal	stark pos	Trachea u. Bronchialsysteme mit deutl. Schleimhautentzündung
ob11	leichtes Giemen und RG`s	normal	pos	Schleimhaut gerötet, weißliche Sekretauflagerungen in den Bronchien, Kinoziliendyskinesie vermutlich sekundär infolge rez. Bronchitiden
ob12	insp. Knistern und feinblasige RG`s	n.d.	n.b.	erhebliche Tracheobronchitis, Tracheobronchomalazie mit Kollaps der Atemwege beim Absaugen des Sekrets, die z.B. zu einer chron. Entzündung passen könnte
ob13	beidseits basal RG`s	normal	n.b.	ausgeprägte Tracheobronchitis, eitrig wirkendes Sekret, Trache wirkt malazisch mit ovalärer Verformung
ob14	o.B.	normal	neg	mäßig entzündetes Bronchialsystem
ob15	diskretes Giemen und Brummen	normal	stark pos	Mäßige chron. Entzündungsreaktion in der Trachea, in den Bronchien viel gelblich-weißliches Sekret, re OL ca. 40%ige entzündlich bedingte Stenose in zwei Subsegmentbronchien
ob16	o.B.	normal	pos	Geringe Bronchitis

Patienten und Kontrollgruppe

Nr	Pulmo-Befund (Aufnahmetag)	Schweißtest	P/R	Bronchoskopischer Befund
ob17	grobblasige RG`s	n.d.	n.b.	Erhebliche Tracheomalazie, Trachea u. Bronchien entzündlich verändert
ob18	o.B.	normal	schwach pos	Ausgeprägte chronische Tracheobronchitis
ob19	o.B.	n.d.	schwach pos	Hauptbronchusstenose links ca. 80%
ob20	o.B.	normal	n.b.	Mäßig entzündetes Bronchialsystem
ob21	trockene RG`s	normal	neg	Leichte Hyperämie und etwas glasiges Sekret
ob22	o.B.	normal	neg	Gering entzündl. veränderte Schleimhaut ohne Eitersekretion
ob23	o.B.	n.d.	n.b.	Einengung der Trachea im Bereich d. Truncus brachiocephalicus von ca. 50%, 20%iges Restlumen des li. Stammbronchus
ob24	n.b.	normal	schwach pos	Ausgeprägte Tracheobronchitis mit Schleimatrophy, kaum Sekret
ob25	o.B.	normal	schwach pos	Chronische, nicht-eitrige Tracheobronchitis, fleckig entzündliche Schleimhaut
ob26	o.B.	n.d.	pos	Ausgeprägte entzündliche Veränderungen an Trachea und Bronchien, pulsierende Stenose der Trachea von ca. 20%
ob27	Giemen	normal	pos	etwas zähes Sekret
ob28	o.B:	n.d.	schwach pos	Ausgeprägte Tracheobronchitis; Hinweis auf ösophagotracheale Fistel, allerdings keine sondierbare Öffnung
ob29	o.B.	normal	neg	Chronische Bronchitis; erhebliche generalisierte chron. Entzündungsreaktion mit Knötchenbildung u. massiver Schleimsekretion
ob30	deutl. Giemen u. Pfeifen, vereinzelt RG`s	normal	schwach pos	Ausgeprägte Tracheobronchitis mit erheblicher Schleimhautschwellung und Einengung des Lumens der Atemwege
ob31	o.B.	normal	stark pos	Geringe Schleimhautentzündung

Abkürzungen:

P/R = Allergietestung im RAST bzw. Prick-Test; o.B. = ohne pathologischen Befund; n.d. = nicht durchgeführt; n.b. = nicht bekannt

2.1.3 Patienten der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Bei 14 Kindern mit chronischem Husten wurde vor Durchführung der BAL zu keinem Untersuchungstermin eine Obstruktion durch einen Arzt festgestellt. Diese Patienten waren zwischen 0,8 und 16,8 Jahren alt (Median 6,0).

Die klinischen Daten sind in Tabelle 2.3 festgehalten.

Tabelle 2.3: klinische Parameter der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Genus	Alter (Jahre)	Krankheitsdauer (Jahre)	Haupt- und Nebendiagnosen
n-ob1	m	9,3	9,0	Belastungsdyspnoe, Z.n. Pneumonien
n-ob2	w	3,5	n.b.	Chron. Reizhusten, rez. Pseudokrapp-Anfälle
n-ob3	m	3,2	3,0	Inspiratorischer Stridor, rez. Bronchitiden
n-ob4	w	7,2	1,0	Chronischer Husten
n-ob5	m	1,9	1,2	Rez. Bronchitiden, Z.n. Pneumonien
n-ob6	m	0,8	0,5	Dyspnoe, rez. Sättigungsabfälle im Schlaf bis 83-85%, Z.n. Bronchiolitis
n-ob7	w	11,3	0,8	Chronischer Husten
n-ob8	w	11,3	n.b.	Chronischer Husten, Cricoidstenose infolge Guillain-Barré-Syndrom
n-ob9	w	9,7	2,7	Rez. Pneumonien, Z.n. Patchverschluß VSD und ASD II
n-ob10	w	1,4	1,4	Z.n. doppeltem Aortenbogen, bei Atemwegsinfekten Probleme mit Stridor und Dyspnoe, rez. Pneumonien
n-ob11	m	9,0	4,5	Bellender Husten u. inspiratorischer Stridor
n-ob12	m	4,7	4,5	Rez. Infekte der Luftwege mit schleimigem Husten, Z.n. Aspiration, bronchopulmonale Dysplasie, ICH re. 4 und li. 3, rez. Pneumonien
n-ob13	w	16,8	0,8	Rez. trockener Reizhusten, Z.n. Pneumonie
n-ob14	w	1,8	1,8	Z.n. rez. Cyanoseanfällen mit inspir. Stridor u. chron. Husten, Z.n. Pneumonien

Abkürzungen:

n.b. = nicht bekannt; VSD = Ventrikelseptumdefekt; ASD = Vorhofseptumdefekt; ICH = intrakranielle Hämorrhagie

Tabelle 2.4 zeigt die Untersuchungsbefunde der Patienten aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe. Bei allen Kindern wurden in der Bronchoskopie entzündliche Veränderungen unterschiedlichen Schweregrades gefunden.

Tabelle 2.4: Untersuchungsbefunde der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Pulmo-Befund (Aufnahmetag)	Schweißtest	P/R	Bronchoskopischer Befund
n-ob1	o.B.	normal	neg	Mäßige Tracheobronchitis
n-ob2	o.B.	normal	neg	Deutliche Tracheobronchitis mit klarem Sekret
n-ob3	o.B.	normal	schwach pos	Ausgeprägte Tracheobronchitis, leichtgradige Hauptbronchuseinengung links
n-ob4	o.B.	normal	schwach pos	Ausgeprägte eitrig-schleimige Tracheobronchitis
n-ob5	n.b.	normal	neg	n.b.
n-ob6	verschärftes Atemgeräusch	normal	neg	n.b.
n-ob7	o.B.	nicht genug Schweiß	neg	Chron. Tracheobronchitis, ringförmige Einengung des re ML-Bronchus durch Leiste auf ca. 30%
n-ob8	o.B.	n.b.	n.b.	Subglottische Stenose von 20%, deutliche entzündliche Schleimhautreaktion distal
n-ob9	n.b.	normal	neg	Tracheobronchialbaum bis auf leichte Hyperämie unauffällig
n-ob10	Leicht erschwerte Atemtechnik, sonst o.B.	normal	neg	Trachealstenose (Restlumen ca. 50%) durch externe Kompression durch doppelten Aortenbogen
n-ob11	o.B.	normal	neg	Mäßig entzündetes Bronchialsystem, deutliche Schleimsekretion
n-ob12	n.b.	normal	neg	n.b.
n-ob13	o.B.	n.d.	neg	Mäßige Tracheobronchitis
n-ob14	n.b.	normal	neg	Gering entzündliche Schleimhautreaktion im Trachealbereich

Abkürzungen:

P/R = Allergietestung im RAST bzw. Prick-Test; o.B. = ohne pathologischen Befund; n.d. = nicht durchgeführt; n.b. = nicht bekannt

2.1.4 Kontrollgruppe lungengesunder Kinder

Als Kontrollgruppe dienten 15 Kinder im Alter zwischen 0,5 und 12,3 Jahren (Median 4,3), die sich im Haunerschen Kinderspital der Universität München einem elektiven operativen Eingriff unterzogen bzw. bei denen eine elektive Untersuchung (Kernspinuntersuchung) indiziert war. Lungenerkrankungen waren ausgeschlossen. Die elektiven Untersuchungen und die BAL wurden in derselben Intubationsnarkose durchgeführt. Nach der Narkoseeinleitung erfolgte die BAL mittels eines Endloch-Katheters.

Die Eltern wurden über das Vorgehen aufgeklärt und bei Zustimmung eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Untersuchung war von der Ethikkommission genehmigt worden.

Die klinischen Details dieser Kinder sind in der Tabelle 2.5 ersichtlich.

Tabelle 2.5: klinische Daten der Kontroll-Gruppe

Nr	Genus	Alter (Jahre)	Grund des Eingriffes	Atemwegs-erkrankung	Atopie	Familiäre Belastung (Atopien)
K1	w	1,6	Leistenhernie links	negativ	negativ	ja
K2	m	5,3	Ganglion linker Fußrücken	negativ	negativ	nein
K3	m	4,3	schnellender Daumen	negativ	negativ	ja
K4	m	2,8	Phimose	negativ	negativ	nein
K5	w	1,4	Kavernöses Hämangiom li. Wange	negativ	negativ	nein
K6	m	0,6	Phimose	negativ	negativ	n.b.
K7	w	0,5	rechter Doppeldaugen	negativ	negativ	nein
K8	m	1,3	Nävuszellnävus linke Scapula	negativ	negativ	n.b.
K9	m	2,3	NMR	negativ	negativ	n.b.
K10	m	10,6	TE	negativ	negativ	ja
K11	w	12,3	TE	negativ	negativ	nein
K12	w	6,6	TE	negativ	negativ	nein
K13	w	4,7	AT	negativ	negativ	nein
K14	m	8,7	Anthelixplastik	negativ	negativ	ja
K15	m	9,2	AT	negativ	negativ	ja

Abkürzungen:

NMR = Kernspintomographie; TE = Tonsillektomie; AT = Adenotomie; n.b. = nicht bekannt

2.2 Probengewinnung, bronchoalveoläre Lavagen

Bei den Kindern mit chronischem Husten wurde am Ende der Bronchoskopie mit Hilfe eines Endloch-Absaugkatheters eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. Dazu wurde eine auf Körpertemperatur erwärmte 0,9%ige Kochsalzlösung verwendet und viermal ein Volumen von je 1 ml/kg Körpergewicht in das am meisten betroffene Segment oder bei homogener Verteilung der Erkrankung im Röntgenbild in den rechten Mittellappen der Lunge instilliert und unmittelbar darauf wieder abgesaugt.

Bei den Kindern der Kontrollgruppe erfolgte die bronchoalveoläre Lavage unmittelbar nach der Intubation über den liegenden Tubus. Zu diesem Zweck wurde der Kopf des Kindes auf die linke Seite gelagert, um mit einem Endloch-Absaugkatheter den rechten Unterlappen lavagieren zu können. Die Lavage wurde in gleicher Weise wie oben beschrieben durchgeführt.

Das zurückerhaltene Volumen an BAL-Flüssigkeit (Recovery) war in den Patientengruppen und der Kontrollgruppe ähnlich mit $59,7 \pm 3,2\%$ (Mittelwert \pm Standardfehler) in der obstruktiven Bronchitis-Gruppe, $55,5 \pm 4,2\%$ in der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe und $58,1 \pm 3,6\%$ in der Kontrollgruppe.

Die BAL wurde über sterilisierte Gaze-Filter gereinigt, wobei nur gröbere Verunreinigungen beseitigt wurden. Viren, Bakterien und Zellen konnten den Filter ungestört passieren. Bei der so gereinigten BAL wurde die Gesamtzellzahl mikroskopisch mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation über 10 Minuten bei $200 \times g$ am Boden des Gefäßes gesammelt. Für die Zelldifferenzierung dienten nach May-Günwald-Giemsa gefärbte Cytosin-Präparate.

Um eine ex vivo Degradation der BAL-Proteine zu verhindern, wurde der Überstand nach Zentrifugation sofort aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Konzentration der Surfactantproteine SP-A und SP-D wurde durch einen „Sandwich“-ELISA bestimmt. Das Prinzip dabei ist, dass das nachzuweisende Antigen an zwei verschiedenen Antikörper gebunden und dann mit einem Antiglobulin-Enzym-Konjugat nachgewiesen wird.

2.3.1 Geräte

Mit folgenden Geräten wurde gearbeitet:

- ELISA-Waschstraße (UniTec, Gaißach, Deutschland)
- Photometer Anthos II (Anthos, Salzburg, Österreich)
- Ultraschallbad (Bandelin, Berlin, Deutschland)

Zur Auswertung wurde die Software von Biolise (Hombrechtikon, Schweiz) benutzt.

2.3.2 Material

Parafilm, 96-well Mikrotiterplatte (Maxisorp C96, Nunc, Wiesbaden, Deutschland)

Chemikalien

ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulphonate-(6)]) von Boehringer GmbH, (Mannheim, Deutschland).

Na₂CO₃, NaHCO₃, NaCl, Tris-HCl, Triton X, CaCl₂

BSA (bovines Serumalbumin, Paesel & Lorei; Hanau, Deutschland).

EDTA von der Firma Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden).

Antikörper und Standard-Antigen für SP-A-ELISA

Als Festphasenantikörper wurde PC-6 (Dr. Kuroki, International Reagents Corp., Kobe, Japan), ein monoklonaler Maus-Antikörper, der sich gegen humanes SP-A richtet, verwendet.

Der zweite Antikörper war ein polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes rekombinantes SP-A (Byk Gulden, Konstanz, Deutschland).

Zur Detektion des Intermediärkomplexes wurde der mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG (goat anti-rabbit IgG) von der Firma Dianova (Hamburg, Deutschland) verwendet.

Als Standard-Antigen wurde humanes rekombinantes SP-A (Byk Gulden, Konstanz, Deutschland) benutzt.

Antikörper und Standard-Antigen für SP-D-ELISA

Der Festphasenantikörper p13, ein polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes SP-D, war ein Geschenk von Prof. E. Crouch (St. Louis, MO, USA).

Als zweiter Antikörper wurde VIF11, ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen Ratten SP-D, kreuzreaktiv mit humanem SP-D, verwendet (BMA, Augst, Schweiz).

Zur Detektion des Intermediärkomplexes diente ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Kaninchenantikörper, der sich gegen Maus IgG richtet (DAKO, Glostrup, Dänemark).

Als Standard-Antigen wurde humanes SP-D benutzt, das aus bronchoalveolären Lavagen von Kindern mit Alveolarproteinose isoliert wurde.

2.3.3 ELISA für Surfactantprotein A

Für den SP-A ELISA wurden folgende Puffersysteme benötigt:

- Carbonatpuffer: 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6
- Tris-buffered-saline (TBS): 10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0,1% TritonX, pH 7,4
- Blockpuffer: TBS, 1% BSA

1. Coating (erster Antikörper):

Der monoklonale Festphasenantikörper PC 6 (mouse anti-human SP-A) wurde auf 1 µg/ml in Carbonatpuffer verdünnt und in alle Vertiefungen (wells) einer 96-well Mikrotiterplatte gegeben. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

2. Blocking:

Der Überstand wurde dekantiert. Anschließend wurde die Platte mit Blockpuffer eine Stunde bei 37°C inkubiert, um eine Bindung von nachfolgend hinzugefügten Proteinen an die Festphase zu verhindern.

3. Inkubation mit Antigen (Proben- und Standard-Antigen):

Vor dem Auftragen von Standard und Proben wurde die Platte mit TBS-Puffer dreimal gewaschen zur Entfernung ungebundener Reagenzien. Dieser Waschvorgang erfolgte auch vor allen weiteren Schritten.

Zur Bestimmung einer Standardkurve wurden zwei Standardreihen mitgeführt. Der Standard wurde in Blockpuffer angesetzt und in sieben Verdünnungsschritten in die Wells der ersten beiden Reihen pipettiert. Somit lag das Standard-Antigen (humanes rekombinantes SP-A) in Konzentrationen von 100 ng/ml bis 1,5 ng/ml auf der Platte vor. Um den Leerwert (Blank) zu erhalten, wurde in die untersten beiden Wells der ersten zwei Reihen nur Blockpuffer gegeben.

Die Proben mußten vor dem Auftragen zur besseren Lösung des SP-A aus dem Lipid-Protein-Gemisch noch weiter aufgearbeitet werden. Zuerst wurden sie fünffach verdünnt mit einem 10 mM EDTA enthaltenen TBS-Puffer, dann in einem Ultraschallbad eine Minute homogenisiert und schließlich wurde TritonX 22% bis zu einer 5,5-fachen Verdünnung hinzugefügt. Danach wurden die Proben auf der Platte sequentiell 1:1 mit Blockpuffer verdünnt, so dass acht Verdünnungsschritte vorhanden waren. Die Platte wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

4. Inkubation mit zweitem Antikörper:

Der zweite Antikörper (rabbit anti-human SP-A, polyklonal) wurde 1:100 in Blockpuffer verdünnt aufgetragen, und die Platte wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert.

5. Inkubation mit Antiglobulin-Enzym-Konjugat:

Zur Detektion des Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes (Intermediärkomplex) wurde ein mit Meerrettichperoxidase gekoppelter Antikörper (goat anti-rabbit IgG) in einer Konzentration von 1:5000 aufgetragen. Die Platte wurde wieder eine Stunde bei 37°C inkubiert.

6. Substratreaktion:

Die Fertigsubstanz ABTS wird hierbei durch die Meerrettichperoxidase in ein chromogenes Produkt umgewandelt. ABTS wurde in einer Konzentration von 0,0167 mg/ml als Puffer angesetzt. Es wurden 10 µl 30%iges H₂O₂ und zwei ABTS-Tabletten (50 mg/Tbl.) zu 10 ml ABTS-Puffer gegeben, der pH-Wert auf 4 eingestellt und dann das Substrat auf die Platte aufgetragen. Da das chromogene Produkt lichtempfindlich ist, wurde die Platte mit Aluminiumfolie bedeckt und anschließend bei Raumtemperatur auf einem Schüttler 30-60 Minuten inkubiert.

7. Auswertung:

Mittels eines Photometers wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen, um die Färbung der einzelnen Wells quantifizieren zu können. Mit Hilfe der Software von Biolise wurde aus den beiden Standardkurven und dem Leerwert eine Standardkurve berechnet sowie die davon abhängigen Meßwerte bestimmt.

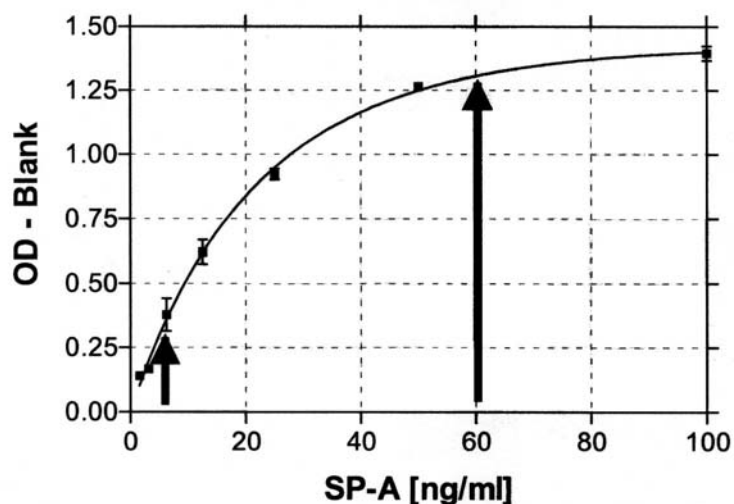


Abbildung 2: Standardkurve des SP-A ELISA. Der optimale Meßbereich liegt in dem Bereich zwischen den Pfeilen.

2.3.4 ELISA für Surfactantprotein D

Für den SP-D-ELISA wurden folgende Puffersysteme benötigt:

- Carbonatpuffer: 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6
- TBS/TC: 10mM Tris-HCl, 140mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,1% TritonX, pH 7,4
- Blockpuffer: TBS/TC, 1% BSA

1. Coating (erster Antikörper):

Der Festphasenantikörper p13 (rabbit anti-human SP-D, polyklonal) wurde in einer Konzentration von 1:10.000 aufgetragen und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert.

2. Blocking:

In die einzelnen Wells wurde Blockpuffer pipettiert und die Platte anschließend eine Stunde bei 37°C inkubiert. Vor allen weiteren Schritten erfolgte ein dreimaliges Waschen der Platte mit TBS/TC-Puffer.

3. Inkubation mit Antigen (Proben- und Standard-Antigen):

Der Standard (humanes SP-D) wurde auf 100 ng/ml bis 1,5 ng/ml in Blockpuffer verdünnt. Anschließend wurden die Proben sequentiell verdünnt aufgetragen und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

4. Inkubation mit zweitem Antikörper:

Der zweite Antikörper VIF11 (mouse anti-rat SP-D, monoklonal) wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml in Carbonatpuffer gelöst aufgetragen. Vor dem nächsten Schritt war eine erneute Inkubation bei 37°C nötig.

5. Inkubation mit Antiglobulin-Enzym-Konjugat:

Die Detektion des Intermediärkomplexes erfolgte durch einen mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper (rabbit anti-mouse IgG) in einer Konzentration von 1:1000. Die Platte wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert.

6. Substratreaktion:

Diese erfolgte mit 100 mg ABTS auf 10 ml ABTS-Puffer und 10 µl 30%iges H₂O₂ bei pH 4. Nach ungefähr 30 Minuten wurde mit dem Photometer gemessen

7. Auswertung:

Die Auswertung entsprach der Auswertung, wie sie bei dem SP-A-ELISA beschrieben wurde.

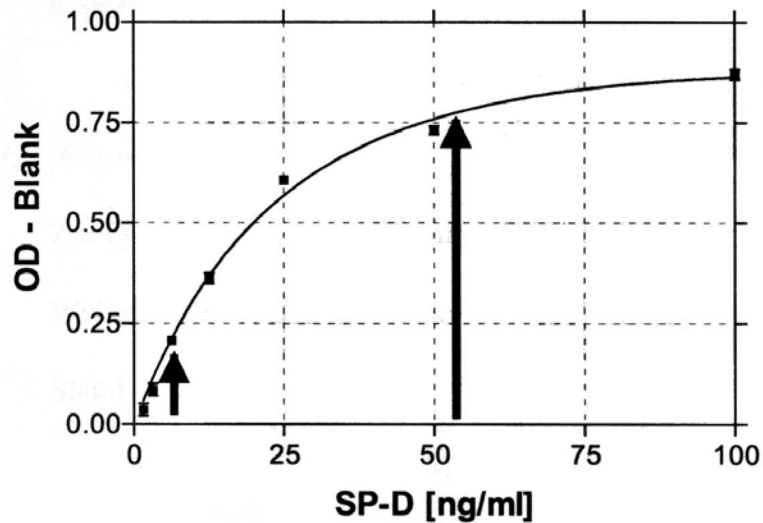


Abbildung 3: Standardkurve des SP-D ELISA. Der optimale Meßbereich liegt in dem Bereich zwischen den Pfeilen.

2.4 Gesamtproteinbestimmung

Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde mit dem Bio-Rad Proteinassay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) bestimmt. Als Standard wurde BSA in Konzentrationen von 5 mg/ml bis 10 µg/ml verwendet. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte in Mikrotiterplatten (niedrigaffin, F-Form, Greiner, München, Deutschland). Nachdem Proben und Standard auf die Platte gegeben worden waren, wurde das Bio-Rad Reagenz hinzugefügt und die Platte bei 600 nm im Photometer gemessen. Die Proben wurden jeweils dreimal aufgetragen, von den gemessenen Konzentrationen wurde der Mittelwert gebildet.

2.5 Eindimensionale SDS Elektrophorese und Western Blot

2.5.1 Geräte

Für die eindimensionale SDS Elektrophorese/Western Blotanalyse wurde das NuPAGE Elektrophorese/Blotting System von der Firma NOVEX/Invitrogen (San Diego/Carlsbad, CA, USA) verwendet. Mit folgenden Geräten wurde gearbeitet:

Gel- und Blotgerät:

- Power Ease 500 (NOVEX, San Diego, CA, USA)

Kassetten:

- XCell II Mini-Cell (NOVEX, San Diego, CA, USA)
- XCell II Blot Module (NOVEX, San Diego, CA, USA)

Entwicklungsmaschine:

- Agfa CP 1000 (Agfa, Mortsel, Belgien)

Zum Einscannen und zur weiteren Auswertung der Filme wurde das Fluor-S Multimager-System mit der Software MULTI ANALYST der Firma Biorad (Richmond, CA, USA) benutzt.

2.5.2 Material

Folgende Materialien aus dem NuPAGE Elektrophorese System der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) wurden für die SDS Elektrophorese verwendet: NuPAGE 10% Bis-Tris-Gele, NuPAGE LDS Sample Buffer, NuPAGE Reducing Agent, NuPAGE MOPS SDS Running Buffer, NuPAGE Antioxidant, See Blue Plus 2 Pre-Stained Standard.

Für die Western Blotanalyse wurden folgende Materialien benutzt: Nitrocellulosemembran (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), Filterpapier (Whatman International, Maidstone, USA), NuPAGE Transfer Buffer und Schwämme für XCell II Blotting von der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), ECL

Western Blotting Entwicklungslösung, Hyperfilm ECL und Hypercassette von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, England).

Antikörper

Als erste Antikörper wurden folgende Kaninchenantikörper verwendet:

- Anti-human SP-A (polyklonal; Konzentration 1:2000) war eine freundliche Gabe von Dr. Steinhilber (Byk Gulden, Konstanz, Deutschland).
- Anti-human SP-D (RS91, polyklonal; Konzentration 1:20.000) wurde in freundlicher Weise von Prof. K. B. Reid (Oxford, UK) zur Verfügung gestellt.
- Anti-human SP-D (P13, polyklonal; Konzentration 1:10.000) war ein Geschenk von Prof. E. Crouch (St. Louis, MO, USA).

Folgende mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG wurden als zweite Antikörper in einer Konzentration von 1:100.000 verwendet:

- Goat anti-rabbit IgG (Dianova, Hamburg, Deutschland)
- Fab-gereinigt goat anti-rabbit IgG (Dianova, Hamburg, Deutschland)

Surfactant Protein A und D

Als Standard dienten SP-A^{PAP} und SP-D^{PAP}. Dabei handelt es sich um humanes SP-A bzw. SP-D, die aus bronchoalveolären Lavagen von Kindern mit Alveolarproteinose isoliert wurden.

SP-D^{rh} (rekombinantes humanes SP-D) war eine freundliche Gabe von Prof. E. Crouch (St. Louis, MO, USA).

SP-A^{rh} (rekombinantes humanes SP-A) wurde freundlicherweise von Dr. Steinhilber (Byk Gulden, Konstanz, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Chemikalien

Methanol, NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ x H₂O von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland).

Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).

Tween 20 (Calbiochem)

Fischgelatine von Sigma (St. Louis, USA).

BSA (bovines Serumalbumin, Paesel & Lorei; Hanau, Deutschland)

2.5.3 *Probenvorbereitung*

Nach der Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wurden die Proben zu jeweils 5 µg Gesamtprotein aliquotiert. Anschließend wurden die Proben lyophilisiert.

Die hierfür verwendeten Geräte waren:

- Bachhofer Vakuum Concentrator, Typ: BA-VC-300H
- Vakuumpumpe, WKF-Typ: L 05-60

Die lyophilisierten Proben wurden anschließend bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.5.4 *Eindimensionale Gelelektrophorese*

Vor Durchführung der 1-D-Gelelektrophorese wurden die Proben mit je 22 µl Probenpuffer resuspendiert.

Der **Probenpuffer** wurde wie folgt hergestellt:

- 65% Aqua ad iniectabile
- 25% NuPAGE LDS Sample Buffer
- 10% NuPAGE Reducing Agent

Nach anschließendem Vortexen und kurzem Zentrifugieren der Proben wurden diese für 10 Minuten in einem Wasserbad von 70°C inkubiert.

Anschließend erfolgte die 1-D-Gelelektrophorese unter Verwendung von Bis-Tris-HCl gepufferten (pH 6,4) Polyacrylamid-Gelen mit einer Acrylamidkonzentration von 10% in Mini-Cell-Kassetten.

In die innere Kammer der Kassette wurde **Laufpuffer** (NuPAGE MOPS SDS Running Buffer und Aqua ad iniectabile) gefüllt und Antioxidant zugegeben. Die äußere Kammer wurde ebenfalls mit Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurde das Gel mit den resuspendierten Proben beladen. Als Proteinstandard wurde der gefärbte See Blue Plus 2 Standard verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte unter folgenden Laufbedingungen:

- 200 V
- Start: 100mA
- Ende: 60 mA
- Zeit: 50 Minuten

Nach dem Elektrophoreselauf wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Western Blot)

Denaturierung und Reduktion:

Die Zugabe von NuPAGE Reducing Agent sorgte aufgrund seines Dithiothreitol-(DTT)Gehaltes dafür, dass die Proteine durch Reduktion der Disulfidbrücken in ihre löslichen Untereinheiten aufgespalten wurden.

Um zu verhindern, dass die mit DTT reduzierten Proteine während der Elektrophorese reoxidieren, wurde NuPAGE Antioxidant zum Laufpuffer in die innere Kammer gegeben.

Der NuPAGE MOPS SDS Running Buffer enthält negativ geladene SDS-Moleküle, die die Eigenladung der Proteine überdecken und so die Proteine vollständig denaturieren.

2.5.5 Western Blot

Es wurden folgende Puffersysteme verwendet:

- Transfer-Puffer: NuPAGE Transfer Buffer, Aqua dest., Methanol
- Phosphate buffered saline (PBS): 12 mM Na_2HPO_4 , 3 mM NaH_2PO_4 x H_2O , 150mM NaCl, pH 7,4
- Tris-buffered saline Tween (TBS-T): 4 mM Tris, 100 mM NaCl, pH7,4, 0,5 g Tween 20/l
- Blockpuffer (PBS, 3% Fischgelatine)

1. Proteintransfer:

Nach der SDS Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert unter Nutzung des Systems von NOVEX (Blotgerät Power Ease 500, XCell II Blot Module). Der Proteintransfer erfolgte im Transfer-Puffer unter folgenden Bedingungen:

- 30 V
- Start: 170 mA
- Ende: 110 mA
- Zeit: 60 Minuten

2. Blocken:

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran bei Raumtemperatur drei Stunden mit Blockpuffer inkubiert zur Absättigung der noch freien Bindungsstellen. Anschließend wurde die Membran einmal kurz mit TBS-T gewaschen.

3. Inkubation mit erstem Antikörper:

Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit einem verdünnten ersten Antikörper inkubiert. Dafür wurde anti-human SP-A (polyklonal; Konzentration 1:2000) bzw. anti-human SP-D (RS91, polyklonal; Konzentration 1:20.000) verwendet.

4. Waschen:

Die Membran wurde 4x für je 15 Minuten mit TBS-T gewaschen, um überschüssige, nicht gebundene Moleküle zu entfernen.

5. Inkubation mit zweitem Antikörper:

Anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur zwei Stunden mit einem an Meerrettich-Peroxidase konjugierten zweiten Antikörper (goat anti-rabbit IgG bzw. Fab-gereinigt goat anti-rabbit IgG, jeweils in einer Konzentration von 1:100.000) inkubiert.

6. Waschen:

Die Membran wurde erneut 4x für je 15 Minuten mit TBS-T gewaschen.

7. Entwickeln:

Schließlich wurde mit dem ECL Western Blotting System entwickelt (Chemilumineszenz-Verfahren).

2.5.6 Stripping

Bei einigen Membranen wurde nach erfolgter Western Blotanalyse der gebundene erste und zweite Antikörper mit Hilfe einer Stripping-Lösung entfernt. Dazu wurden die Membranen jeweils 15 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Re-Blot Plus Mild Antibody Stripping Solution von der Firma Chemicon (Temecula, CA, USA) inkubiert. Anschließend wurden die Membranen wie unter 2.5.5 (Schritte 2-7) beschrieben weiterverarbeitet.

2.6 Statistik

Die Werte wurden als Median (25.;75. Perzentile) [Minimum-Maximum] angegeben. Beim Vergleich von zwei Gruppen wurde bei ungepaarten Werten mit dem parameterfreien Testverfahren nach Mann-Whitney ausgewertet. Wenn mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde der Kruskal-Wallis ANOVA durchgeführt, als post-hoc Test wurde der Test nach Dunns verwendet.

Korrelationen wurden nach Spearman berechnet.

Beim Vergleich von Häufigkeiten wurde bei zwei Gruppen der Fisher-Exact-Test und bei mehr als zwei Gruppen der χ^2 -Test benützt.

Als statistisch signifikant wurden alle Testergebnisse bezeichnet, deren $p < 0,05$ war.

Für alle statistischen Berechnungen wurde die Statistik- und Tabellenkalkulationssoftware Prism (Graph Pad, San Diego, CA, USA) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Daten

3.1.1 Demographische Daten

Von den 50 untersuchten Patienten wurden retrospektiv wie beschrieben 31 Kinder der Gruppe mit obstruktiver Bronchitis, 14 der Gruppe mit nicht-obstruktiver Bronchitis und fünf den Einzelfällen zugeteilt. In der obstruktiven Bronchitis- und Einzelfall-Gruppe sind mehr männliche Kinder, in der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe mehr weibliche. Die Patienten der drei verschiedenen Krankheitsgruppen wurden einer Kontrollgruppe aus 15 lungengesunden Kindern (neun männliche) gegenübergestellt.

Die obstruktiven Bronchitis-Kinder waren zu der Zeit, als die ersten Symptome aufgetreten sind, und zum Zeitpunkt der Lavage im Mittel jünger als die restlichen Kinder, während bei ihnen die Dauer vom Auftreten der ersten respiratorischen Symptomatik bis zur Bronchoskopie länger war.

Die Einzelfälle waren bei Beginn der respiratorischen Symptomatik und bei der BAL im Mittel die ältesten Kinder, bei ihnen war die Krankheitsdauer, bis eine Bronchoskopie durchgeführt wurde, am kürzesten.

Das mittlere Alter der Kontrollgruppe bei der BAL entsprach mit 4,8 Jahren dem der obstruktiven Gruppe.

In allen drei Krankheitsgruppen gab es Kinder, bei denen die respiratorische Symptomatik seit Geburt bestand oder im Laufe der ersten Lebenswochen aufgetreten ist.

Tabelle 3.1: Demographische Daten 1

	Obstruktive Bronchitis	Nicht-obstruktive Bronchitis	Einzelfälle	Kontrollen
Anzahl der Kinder	31	14	5	15
m/w	18/13	6/8	3/2	9/6
Mittleres Alter zum Lavagezeitpunkt (Jahre)	4,8 ± 0,7 (0,3-15,2)	6,6 ± 1,3 (0,8-16,8)	7,6 ± 2,2 (0,7-13,8)	4,8 ± 1,0 (0,5-12,3)
Mittleres Alter zum Zeitpunkt der ersten Symptome (Jahre)	2,0 ± 0,5 (0-11,2)	3,8 ± 1,5 (0-16)	6,0 ± 3,4 (0-13,5)	/
Krankheitsdauer bis zur Bronchoskopie (Jahre)	3,2 ± 0,4 (0,08-10)	2,9 ± 0,8 (0,75-9)	1,6 ± 1,5 (0,08-6)	/

Angaben sind **Mittelwerte ± Standardfehler** (Minimum – Maximum)

Bei insgesamt 12 von 50 Patienten wurde zum Zeitpunkt der Befragung in der elterlichen Wohnung geraucht, hiervon war v.a. die Hälfte der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe betroffen.

Mehr als die Hälfte der obstruktiven Bronchitis-Kinder (17 von 31) und knapp die Hälfte der nicht-obstruktiven Bronchitis-Kinder (sechs von 14) zeigten eine jahreszeitliche Abhängigkeit der Ausprägung der respiratorischen Symptomatik.

Unter rezidivierenden Infekten der oberen Luftwege litten 71% der Patienten aus der obstruktiven Gruppe und 64% der nicht-obstruktiven Gruppe. Erfragt wurden v.a. Rhinitiden, Sinusitiden, Pharyngitiden, Tonsillitiden und Otitiden.

Tabelle 3.2: Demograpische Daten 2

	Obstruktive Bronchitis	Nicht-obstruktive Bronchitis	Einzelfälle	Kontrollen
<i>Anzahl</i>	21-26/31	10-13/14	1/5	11-15/15
Passivrauchen zum Zeitpunkt der Lavage	4/23	7/12	1/1	2/11
Saisonale Abhängigkeit der Symptomatik	17/21	6/10	0/1	/
Rez. Infekte der oberen Luftwege, Otitiden, Tonsillitiden	22/26	9/13	0/1	5/15

Bei der Erhebung der Familienanamnese wurden nur Daten von Verwandten ersten Grades verwertet.

Ein kleiner Teil der Familienangehörigen von Patienten der obstruktiven und nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe litt ebenfalls unter rezidivierenden Bronchitiden, wobei es sich meist um Geschwister handelte.

Bei einem Drittel der obstruktiven Bronchitis-Gruppe und drei von 14 Kindern aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe konnte eine positive Familienanamnese für Asthma und bekannte Allergien erhoben werden.

In der Kontrollgruppe wurde nach einer familiären atopischen Belastung gefragt. Bei fünf Kontrollkindern litt ein Familienangehöriger unter einer atopischen Erkrankung.

Tabelle 3.3: Familienanamnese

	Obstruktive Bronchitis	Nicht-obstruktive Bronchitis	Einzelfälle	Kontrollen
<i>Anzahl</i>	23-27/31	10-13/14	1-2/5	12/15
rez. Bronchitiden	5/23	2/10	0/1	nicht erfragt
Asthma	10/27	3/13	0/2	/
Allergien	10/27	3/13	0/2	/
			Atopische Belastung	5/12

In der obstruktiven Bronchitis-Gruppe fanden sich fünf ehemalige Frühgeburten, davon eine extreme Frühgeburt mit 27 SSW und einem Geburtsgewicht von unter 1000 g. In der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe gab es drei Frühgeburten, auch hier eine extreme Frühgeburt mit 27 SSW. Bei einer Frühgeburt der nicht-obstruktiven Gruppe ließen sich keine klinischen Daten finden.

Bei insgesamt drei Frühgeborenen der obstruktiven Bronchitis-Gruppe setzte rasch eine ausreichende Spontanatmung ein, eines dieser Kinder entwickelte sich auch postpartal unauffällig. Das zweite Kind entwickelte im Alter von acht Wochen beidseits eine zentrale Pneumonie mit vermehrten Zyanosen und deutlicher obstruktiver Symptomatik, so dass intermittierende Sauerstoffgabe nötig war, während beim dritten Kind eine Ösophagusatresie noch am ersten Lebenstag operativ korrigiert wurde. Postoperativ wurde für 18 Tage eine Respiratorbehandlung angeschlossen.

Bei den anderen beiden Frühgeborenen der obstruktiven Bronchitis-Gruppe war sofort postnatal eine Beatmung über einen Rachentubus notwendig, eines dieser Kinder wurde insgesamt drei Wochen beatmet.

In der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe war eine Beatmung bei allen drei Frühgeburten notwendig, zwei dieser Kinder entwickelten eine bronchopulmonale Dysplasie.

In der Tabelle 3.4 sind die klinischen Daten der Frühgeburten ersichtlich.

Tabelle 3.4: Frühgeburten der obstruktiven und nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Pat-Nr	vollendete SSW	Geburtsgewicht (g)	weitere Diagnosen/ Verlauf
ob7	27	930	Beatmung über Rachentubus für drei Wochen; Z.n. AIS, RDS 1, ICH 3 rechts
ob13	32	1240	Spontanatmung; bds zentrale Pneumonie im Alter von acht Wochen
ob23	32	1540	Spontanatmung; Z.n. Ösophagusatresie, postoperativ für 18 Tage Respiratorbehandlung
ob20	34	1980	Beatmung über Rachentubus (Dauer nicht bekannt)
ob14	34	2110	Spontanatmung; Postpartal unauffällig
n-ob12	27	1050	Beatmung (Dauer nicht bekannt); ICH 4 rechts, ICH 3 links, BPD
n-ob5	31	1700	Beatmung für 21 Tage; ICH 1 rechts, BPD

Abkürzungen:

AIS = Amnioninfektionssyndrom; RDS = respiratory distress syndrome; ICH = intrakranielle Hämorrhagie; BPD = bronchopulmonale Dysplasie

3.1.2 Erkrankungen der Atemwege

Im folgenden Teil werden Erkrankungen der Atemwege wie Pneumonien, Asthma, Pseudokrupp, Pertussis und Bronchiolitis der obstruktiven und nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe und Einzelfälle dargestellt. Da aus der Kontrollgruppe kein Kind an diesen Krankheiten gelitten hat, wurde sie nicht mitaufgeführt.

Tabelle 3.5: Pneumonien

Pneumonie(n)	Obstruktive Bronchitis	Nicht-obstruktive Bronchitis	Einzelfälle
<i>Anzahl</i>	31	13	4
Keine Pneumonie	7	6	1
1x	9	1	1
2x	7	3	0
>2x	8	3	2

Es handelt sich um Pneumonien, die laut Anamnese oder laut Krankenakten als röntgenologisch gesichert galten und/oder auf Antibiotikagabe angesprochen haben. Nur sieben Kinder aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe erkrankten nicht an einer Pneumonie, während 24 Patienten dieser Gruppe eine oder mehrere Pneumonien in ihrer Krankengeschichte aufwiesen. Neun Kinder litten an einer Pneumonie, sieben an zwei und acht Patienten an rezidivierenden Pneumonien (mehr als zwei Pneumonien) mit Spitzenwert bei 15 nachgewiesenen Pneumonien.

In der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe hatte knapp die Hälfte (sechs von 14 Patienten) keine Pneumonie erlitten, wobei auch in dieser Gruppe drei Kinder an zwei und ebenfalls drei Kinder an rezidivierenden Pneumonien erkrankten, ein Patient hatte eine Pneumonie.

Bei den Einzelfällen gab es einen Patienten mit negativer Pneumonieanamnese, weiterhin fanden sich ein Kind mit einer Pneumonie und zwei Kinder mit mehr als zwei Pneumonien.

Tabelle 3.6: Asthma, Pseudokrupp, Pertussis, Bronchiolitis

	Obstruktive Bronchitis	Nicht-obstruktive Bronchitis	Einzelfälle
<i>Anzahl</i>	23-27/31	9-14/14	1-3/5
Asthma	19/27	0/14	0/3
Pseudokrupp	9/23	5/11	1/2
Pertussis	6/30	1/11	1/1
Bronchiolitis	4/23	1/9	0/1

Die Diagnosen Asthma bzw. Bronchiolitis wurden übernommen, wenn sie vom behandelnden Kinderarzt bzw. einer Kinderklinik gestellt wurden. Pseudokruppanfälle und Pertussis waren entweder aus den eingesehenen Krankenakten bekannt oder konnten anamnestisch von den Eltern erfragt werden.

Bei mehr als der Hälfte der Kinder mit obstruktiver Symptomatik (19 von 31 Kindern) wurde die Diagnose Asthma gestellt.

Pseudokruppanfälle sind bekannt bei neun Kindern aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe und bei fünf Kindern aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe und bei einem Einzelfall. Meist handelte es sich um rezidivierende Ereignisse mit bis zu 14 angegebenen Pseudokruppanfällen.

Die Mehrheit der Kinder war gegen Pertussis geimpft. Acht Kinder erkrankten in dem Zeitraum vor der BAL an Keuchhusten, bei vier Kindern ist der ungefähre Erkrankungszeitpunkt bekannt (sieben Monate, drei Jahre, vier Jahre und ca. viereinhalb Jahre vor der BAL). Sechs der acht Pertussis-Patienten sind der obstruktiven Bronchitis-Gruppe zugeteilt, jeweils ein Patient der nicht-obstruktiven Bronchitis- und Einzelfallgruppe.

Vier Kinder aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe und ein Kind aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe erkrankten an einer Bronchiolitis.

Bei dem Patienten aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe handelte es sich um eine durch Adenoviren und Influenza A-Infektion verursachte Bronchiolitis im Alter

von drei Monaten, im Anschluß daran kam es zu rezidivierenden Sättigungsabfällen im Schlaf (83-85%). Sieben Monate später wurde die BAL durchgeführt.

Ein Patient aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe erkrankte im Alter von drei Monaten an einer Bronchiolitis, weder Adeno- noch RS-Viren waren im Rachensekret nachweisbar. Sieben Wochen später erfolgte die BAL. Seit dieser Bronchiolitis zeigte das Kind eine obstruktive Symptomatik.

Ein weiteres obstruktives Kind erkrankte drei Wochen nach der Geburt an einer Bronchiolitis (5,3 Jahre vor der BAL). Zuvor war es an einer perinatalen B-Streptokokken-Pneumonie erkrankt, bei der eine neuntägige Beatmung erforderlich war. Seit der dritten Lebenswoche litt das Kind häufig an Luftwegsinfekten mit z.T. erheblicher Bronchoobstruktion. Im Alter von neun Monaten machte es eine Pertussisinfektion durch, die Bronchoskopie wurde 4,6 Jahre später durchgeführt.

Zwei obstruktive Patienten hatten eine durch RS-Viren verursachte Bronchiolitis. Einer dieser Patienten erkrankte im Alter von 11 Monaten (1,6 Jahre vor der Bronchoskopie) und zeigte seither rezidivierende obstruktive Bronchitiden. Das andere Kind machte die RSV-Infektion mit neun Lebenswochen durch. Seit dem zweiten Lebensmonat litt es an rezidivierenden Atemwegsinfekten bzw. frühkindlichem Asthma bronchiale. Nach der Beschreibung der Eltern hatte das Kind nach der RSV-Bronchiolitis nahezu keinen symptomfreien Tag, die chronischen respiratorischen Beschwerden äußerten sich im Sinne von Hustenanfällen sowie Atemnot. Darüberhinaus erkrankte der Patient dreimalig an einer radiologisch gesicherten Pneumonie. 2,2 Jahre nach der RSV-Bronchiolitis wurde die BAL durchgeführt.

Tabelle 3.7: Ein- und Mehrfacherkrankungen der obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Einfacherkrankungen (Anzahl)	Asthma 8	Pseudokrupp 2	Pertussis 1	Bronchiolitis 1
Zweifacherkrankungen (Anzahl)	Asthma Pseudokrupp 5	Asthma Pertussis 3	Asthma Bronchiolitis 1	Pertussis Bronchiolitis 1
Dreifacherkrankungen (Anzahl)	Asthma Pseudokrupp Bronchiolitis 1	Asthma Pseudokrupp Pertussis 1		

Zwei Kinder aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe erkrankten nur an Pseudokrupp, jeweils ein obstruktiver Patient zeigte außer einer Pertussisinfektion bzw. einer Bronchiolitis keine weitere Lungenerkrankung.

Während acht Patienten der obstruktiven Bronchitis-Gruppe mit Asthma keine der anderen aufgeführten Krankheiten aufwiesen, zeigten fünf Asthmatiker Pseudokruffanfälle in ihrer frühen Krankengeschichte, drei Kinder mit Asthma erkrankten auch an Keuchhusten und ein Kind zeigte eine positive Anamnese für Asthma und Bronchiolitis. Ein Kind mit Asthma litt sowohl an Pseudokruffanfällen als auch an einer Bronchiolitis und ein weiterer Patient an Asthma, Pseudokruff und Pertussis.

Weiterhin gab es in der obstruktiven Bronchitis-Gruppe ein Kind, das nicht an Asthma erkrankte, aber an Keuchhusten und einer Bronchiolitis.

In der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe gab es nur einen Patienten, der anamnestisch positiv für zwei der aufgeführten Erkrankungen (Pseudokruff und Pertussis) war.

3.1.3 Beschreibung der Einzelfälle

Fünf Kindern mit chronisch rezidivierendem Husten litten an einer bekannten Grundkrankheit und wurden deshalb nicht in eine der Patientengruppen eingeteilt. Diese Patienten werden im folgenden einzeln beschrieben.

In der Tabelle 3.8 sind die klinischen Daten der Einzelfälle dargestellt.

Tabelle 3.8: klinische Daten der Einzelfälle

Nr	Genus	Alter (Jahre)	Grundkrankheit	Immunsuppression	Verlauf nach BAL
1	w	10,3	Amyloidose	ja	besser
2	w	7,2	Sarkoidose	n.b.	n.b.
3	m	0,7	Lungen-Tbc	nein	gesund
4	m	13,8	Interstitielle Lungenerkrankung	ja	n.b.
5	m	6,0	Chronische Granulomatose	ja	verstorben

Abkürzungen:

n.b. = nicht bekannt

Einzelfall 1:

Bei diesem Patienten ist bekannt, dass er an einer Amyloidose leidet und in diesem Rahmen eine Nierentransplantation durchgeführt wurde. Außerdem zeigte der Patient eine Atelektase des rechten Mittellappens.

Einzelfall 2:

Dieser Patient leidet an einer Sarkoidose. Man führte eine BAL im Alter von sieben Jahren durch, in der Differentialcytologie fand sich ein pathologischer Befund mit einer deutlichen Lymphozytose von 57%. Die bakteriologische Untersuchung der BAL erbrachte keinen Keimnachweis.

Diese beiden Patienten wurden nur konsiliarisch für die BAL vorgestellt. Weitere Informationen konnten trotz umfangreicher Recherchen nicht beigebracht werden.

Einzelfall 3:

Beim dritten Einzelfall wurde eine Lungentuberkulose im Alter von acht Monaten diagnostiziert.

Als der Patient vier Wochen alt war, wurde beim Vater eine offene Tbc festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt bestanden bei dem Kind keine Hinweise auf eine Tuberkuloseinfektion.

Im Alter von fünf Monaten hatte der kleine Patient Fieber und einen trockenen Husten. Der durchgeführte MM war negativ, bei der Röntgenaufnahme wurde der Verdacht auf eine Pneumonie des rechten Unterfeldes geäußert, die antibiotisch behandelt wurde, aber keine vollständige Besserung brachte, die respiratorische Symptomatik bestand weiterhin. Die Röntgenkontrolle 11 Tage später zeigte eine vollständige Mittellappenatelektase rechts, die auch bei der röntgenologischen Kontrolle drei Wochen später unverändert bestand. Der GT-10-Test war zu diesem Zeitpunkt negativ .

Zwei Monate später wurde zur weiteren Abklärung des Lungenbefundes eine Bronchoskopie durchgeführt, die den Verdacht auf eine Tuberkulose mit Einengung des rechten Zwischenbronchus und Verschuß des rechten Mittellappen-Bronchus ergab. Zu diesem Zeitpunkt war der Patient in gutem Allgemeinzustand, und der auskultatorische Lungenbefund war unauffällig. Die Mykobakterien-PCR aus der BAL war positiv, in der Kultur des Magensaftes wurde ein M. tuberculosis-Komplex nachgewiesen. Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse wurde ein Dreifach-Therapie mit Isoniazid, Rifampicin und Pyrazinamid für neun Monate eingeleitet.

Bei der zytologische Untersuchung der BAL war eine ausgeprägte Neutrophilie (50% Neutrophile) als Hinweis auf eine entzündliche Reaktion auffallend.

Zwei Jahre später wurde ein Telefonat mit den Eltern geführt. Zu diesem Zeitpunkt war die Tuberkulose ausgeheilt und der Patient war vollkommen beschwerdefrei. Die letzte Röntgenkontrolle zeigte nach Angaben der Eltern Vernarbungen, die Mittellappenatelektase rechts war nicht mehr nachweisbar.

Einzelfall 4:

Bei diesem Einzelfall wurde eine interstitielle Lungenerkrankung ohne ätiologische Zuordnung diagnostiziert.

Die Symptomatik dieses Patienten begann im Alter von 13,7 Jahren mit Reizhusten, Temperaturen bis 38,7 °C, Bauchschmerzen sowie Muskelschmerzen. Radiologisch

wurde die Diagnose einer primär atypischen Pneumonie gestellt, unter Sauerstoffgabe und einer Tetrazyklin-Therapie kam es zu einer deutlichen Besserung.

Eine Woche später kam es zu einer erneuten klinischen und radiologischen Verschlechterung, die nicht auf Makrolide und Cotrim ansprach. Unter der Verdachtsdiagnose einer Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie (BOOP) wurde eine Therapie mit systemischen Steroiden und Pulmicort-Inhalationen durchgeführt. Darunter besserten sich die Beschwerden deutlich, nach Reduktion der Dosis trat jedoch wiederum eine Verschlechterung des klinischen Zustandes mit deutlicher Dyspnoe auf.

Die anschließende Diagnostik erbrachte restriktive Lungenfunktionsveränderungen, die Diffusionskapazität war normal. Im CT des Thorax fanden sich generalisierte subpleurale Fibrosierungen sowie feinknotige bronchoalveoläre Granulationen. In der Bronchoskopie zeigten sich ausgeprägte entzündliche Veränderungen an Trachea und Bronchialschleimhaut. Die Differentialzytologie aus der BAL zeigte Lymphozytose mit 53% Lymphozyten, 42% Makrophagen, 4% Neutrophile, 1% Basophile und keine Eosinophilen. Der weitere Untersuchungsbefund der BAL erbrachte insbesondere keinen Nachweis einer Alveolarproteinose und keinen Anhalt für chronische Aspirationen.

Ein halbes Jahr nach der Diagnose einer interstitiellen Lungenerkrankung ohne ätiologische Zuordnung befand sich der Patient in gutem Allgemeinzustand, er war körperlich gut belastbar und es bestand kein produktiver Husten. Die Dauertherapie mit Decortin konnte schrittweise reduziert werden unter Konstanz der Lungenfunktion.

Sieben Monate nach der Diagnosestellung wurde die Cortisonmedikation abgesetzt, vier Wochen später klagte der Patient wieder über verstärkten Husten, er hatte jedoch keine massiven Atemprobleme und wirkte noch belastbar. Da sich sowohl im Röntgenbild als auch in der Lungenfunktion die Befunde verschlechtert haben, wurde die Cortisonmedikation wieder aufgenommen, woraufhin sich der Allgemeinzustand und die Lungenfunktionsparameter verbesserten.

Eineinhalb Jahre nach der Diagnosestellung befand sich der Patient unter einer Dauertherapie mit Decortin 2,5 mg jeden zweiten Tag weiterhin in klinisch stabilem Zustand, er hustete nur noch sehr selten und hatte keine weiteren

Atembeschwerden. Auch die Werte in der Lungenfunktion haben sich stabilisiert. Eine Lungenbiopsie war leider nicht durchgeführt worden.

Einzelfall 5:

Bei diesem Kind wurde in den ersten Lebensmonaten eine chronische Granulomatose bei rezidivierenden Hautabszessen und Infekten der oberen Luftwege diagnostiziert.

Bis zum Alter von 5 4/12 Jahren fand sich ein komplikationsloser Verlauf, seitdem klagte das Kind über zunehmenden Husten und schlechtere Belastbarkeit.

Bei zunehmender klinischer Symptomatik mit Thoraxschmerz, Reizhusten und intermittierendem Fieber mit septischen Temperaturen und zunehmender interstitieller Zeichnungsvermehrung im Röntgen-Thoraxbild wurde im Alter von sechs Jahren unter dem Verdacht einer Aspergillenbesiedelung eine Bronchoskopie zur Gewinnung von Bronchiallavage durchgeführt. In der Differentialzytologie der BAL-Probe fand sich eine deutliche lymphozytäre Entzündungsreaktion mit 44% Lymphozyten bei einer Gesamtzellzahl von $25 \cdot 10^4$ /ml. Erreger konnten aus der BAL nicht gewonnen werden.

Im weiteren Verlauf zeigten sich im Röntgen-Thorax pneumonische fleckförmige Infiltrate beidseits und zusätzlich eine Ergußbildung, eine Pleurapunktion erbrachte Flüssigkeit aus einer Pleuraempyemhöhle, in der *Aspergillus fumigatus* nachgewiesen werden konnte. Eine klinische Besserung trat nach Entleerung des Pleuraempyems ein.

Drei Wochen später klagte der Patient über zunehmende Rückenschmerzen, der neurologische Untersuchungsbefund war unauffällig. Im NMR wurden entzündliche Veränderungen von LWK1 (V.a. Aspergillenspondylitis) mit Einbruch von Knochenfragmenten in den Spinalkanal und drohendem Querschnitt festgestellt, so dass das befallene Wirbelsäulensegment operativ ausgeräumt wurde.

Zunächst zeigte der Patient eine deutliche Befundbesserung mit Entfieberung und gutem Allgemeinzustand nach Entlastung des Pleuraempyems und Knochenfocus. Im Alter von 6 2/12 Jahren kam es zu einem Wiederauftreten von Fieber, Thoraxschmerzen und Husten, eine erneute Diagnostik legte den Verdacht auf eine Aspergillenpneumonie mit Rezidiv des Pleuraempyems nahe. Es wurde der Entschluß zur radikalen operativen Herdsanierung gefaßt. Nach zunächst

unauffälliger Narkoseeinleitung kam es zu einer zunehmenden kardialen Verschlechterung und der Patient ist an Herzversagen verstorben.

Der Sektionsbefund bestätigte als Todesursache ein Herzversagen bei ausgedehnter, eitrig abszedierender Aspergillenpneumonie, eitriger Aspergillenspondylitis und mäßiggradiger Myokardhypertrophie.

3.1.4 Medikamente

In der folgenden Tabelle 3.9 ist die Anzahl der Patienten der einzelnen Gruppen aufgeführt, die Medikamente aufgrund ihrer Hustensymptomatik noch einen Tag vor Durchführung der BAL bzw. noch am gleichen Tag eingenommen haben.

Von den lungengesunden Kontrollkindern wurden keine Medikamente zum Zeitpunkt der BAL genommen.

Tabelle 3.9: Medikation zum Zeitpunkt der BAL

Medikamente	Obstruktive Bronchitis (n=31)	Nicht-obstruktive Bronchitis (n=14)	Einzelfälle (n=5)
Keine Medikation	7	7	1
Bronchodilatoren inhalativ	22	1	0
Glukokortikosteroide inhalativ	18	2	0
Mastzellstabilisatoren inhalativ	4	3	0
Antibiotika	5	1	1

22 Patienten der obstruktiven Bronchitis-Gruppe erhielten zum Zeitpunkt der BAL einen inhalativen Bronchodilatator, von diesen 22 Kindern wurden 15 mit kurzwirksamen β_2 -Sympathomimetika, zwei mit langwirksamen β_2 -Sympathomimetika und fünf mit Anticholinergika behandelt. Weiterhin bekamen insgesamt 18 Patienten der obstruktiven Bronchitis-Gruppe inhalative Glukokortikosteroide und vier Kinder inhalative Mastzellstabilisatoren. Zwei Patienten wurden mit oralen Methylxanthinen therapiert, ein Patient mit einem oralen β_2 -Sympathomimetikum und ebenfalls ein Patient mit einem oralen Kortikosteroid. Insgesamt fünf Kinder aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe wurden zum Zeitpunkt der BAL antibiotisch behandelt.

Aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe erhielten sieben Kinder keine Medikation, während ein Kind mit einem kurzwirksamen β_2 -Sympathomimetikum, zwei Kinder mit inhalativen Glukokortikosteroiden und drei Patienten mit inhalativen Mastzellstabilisatoren therapiert wurden. Ebenfalls in dieser Gruppe wurde ein Kind bis zwei Tage vor der durchgeführten Bronchoskopie mit einem Antibiotikum behandelt.

Drei Einzelfälle wurden im Rahmen ihrer Grundkrankheit immunsuppressiv mit oralen Glukokortikosteroiden behandelt, von diesen drei Kindern erhielt eines zusätzlich Antibiotika und Antimykotika.

Kein Patient aus der Gruppe der Einzelfälle bekam zum Zeitpunkt der BAL inhalative Bronchodilatoren, inhalative Glukokortikosteroide oder inhalative Mastzellstabilisatoren.

3.1.5 Krankheitsverlauf

Der Krankheitsverlauf ist eine subjektive Einschätzung der Eltern und bezieht sich auf den Zeitraum nach der BAL verglichen mit der Krankheitsaktivität vor der BAL.

Bei insgesamt zwei obstruktiven Kindern zeigte sich wie in Tabelle 3.10 ersichtlich eine Verschlechterung ihres bisherigen Krankheitsverlaufes mit zunehmender respiratorischer Symptomatik. Ein Einzelfall ist im Rahmen seiner Grundkrankheit gestorben.

Drei Patienten aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe und ein Patient aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe zeigten keine Veränderung ihrer bisherigen Krankheitsaktivität nach der BAL.

Beim Großteil der obstruktiven Bronchitis-Gruppe (19 Patienten) und der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe (sechs Kinder) konnte eine wesentliche Verbesserung des Gesundheitszustandes mit abnehmender Hustensymptomatik im Zeitraum zwischen der Bronchoskopie und der Befragung festgestellt werden. Dies traf auch für einen Einzelfall zu.

Bei zwei ehemals obstruktiven und vier nicht-obstruktiven Patienten und einem Einzelfall konnte zum Befragungstermin keine respiratorische Symptomatik mehr festgestellt werden, so dass diese Kinder nach der subjektiven Einschätzung der Eltern als gesund eingestuft wurden.

Tabelle 3.10: Krankheitsverlauf nach der BAL

	Obstruktive Bronchitis	Nicht-obstruktive Bronchitis	Einzelfälle
<i>Anzahl</i>	26/31	11/14	3/5
Schlechter	2	0	1
Gleich	3	1	0
Besser	19	6	1
Gesund	2	4	1

Erklärung:

Anzahl = bekannter Krankheitsverlauf/Gesamtanzahl; Rest ist jeweils unbekannt

3.2 Zytologische Ergebnisse

3.2.1 Vergleich der BAL-Zytologie zwischen den einzelnen Gruppen

Die BAL der drei Patientengruppen wurde zytologisch untersucht, um Veränderungen des Zellbildes zu erkennen und den Grad der Entzündungsreaktion bei Kindern mit chronischem Husten zu bestimmen. Um die Zellbilder von Kindern mit chronischem Husten mit den Zellen von lungengesunden Kindern vergleichen zu können, wurde auch bei den Kontrollen eine zytologische Untersuchung der BAL durchgeführt.

Bei drei Kindern der obstruktiven Bronchitis-Gruppe und einem Kind aus der Kontrollgruppe konnte keine Differenzierung der Zellen vorgenommen werden, da die Zellen defekt waren.

In der Tabelle 3.11 wird die BAL-Zytologie der obstruktiven Bronchitis-Gruppe, der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe und der Kontrollen miteinander verglichen. Die zytologischen Ergebnisse der Einzelfälle werden wegen der geringen Patientenzahl gesondert dargestellt und in die statistischen Berechnungen nicht miteinbezogen.

Tabelle 3.11: Vergleich der BAL-Zytologien der einzelnen Gruppen

	Obstruktive Bronchitis	Nicht-obstruktive Bronchitis	Kontroll-Gruppe	p	Einzelfälle
Anzahl	25-31/31	10-14/14	14-15/15		3-4/5
Recovery (%)	59 (45,5;73,5) [33-87] 25	54,5 (44,5;71) [33-72] 10	57 (49,5;72,5) [31-82] 15	0,8062	24 [20-48] 3
Zellvitalität (%)	82 (70;90) [50-100] 27	87 (72,5;92) [50-94] 13	83 (70,5;96,5) [64-100] 14	0,8002	91,8 [71-100] 4
Gesamtzellzahl (*10 ⁴ /ml)	15,5 (9,8;26,5) [2,1-114,4] 30	16 (7,3;26,5) [5,4-44,5] 14	10,9 (7,2;19) [4,9-82] 14	0,5042	55 [18-90] 4
Makrophagen (%)	78,5 (68;88) [22-95] 28 *	85,5 (57,5;93,3) [25-98] 14	89,5 (83,5;93) [77-98] 14 *	0,0230	40 [34-52] 4
Lymphozyten (%)	10,5 (5;18) [1-52,5] 28	11 (5,8;22,5) [2-30] 14	9,5 (6-14) [2-23] 14	0,6829	48,5 [11-57] 4
Neutrophile (%)	3 (2;9,5) [0-76] 28 *	2,5 (0,7-24) [0-37,5] 14	1 (0;2) [0-4] 14 *	0,0057	4 [4-50] 4
Eosinophile (%)	0 (0;1,5) [0-4] 28	0,2 (0;1) [0-10] 14	0 (0;0) [0-1] 14	0,1277	0 [0-5] 4
Mastzellen (%)	0 (0;0) [0-1] 28	0 (0;0) [0-1] 14	0 (0;0) [0-0] 14	0,6009	0 [0-1] 4
Basophile (%)	/	/	/	/	0 [0-1] 4

Unterschiede wurden mit dem Kruskal-Wallis ANOVA Test berechnet. Die Einzelfälle wurden in die Berechnung nicht miteinbezogen. Der jeweils angegebene p-Wert bezieht sich auf alle in der Berechnung berücksichtigten Gruppen. Bei signifikanten Unterschieden (p < 0,05) wurde anschließend der post-hoc Test nach Dunns verwendet und die beiden Gruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden, mit einem Sternchen (*) markiert.

Die obstruktive Bronchitis-Gruppe zeigt gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Verminderung der Makrophagen (siehe Abbildung 4). Die Neutrophilen dagegen sind bei der obstruktiven Bronchitis-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermehrt (siehe Abbildung 5). Obstruktive Bronchitis-Gruppe versus nicht-obstruktiver Bronchitis-Gruppe und nicht-obstruktive Bronchitis-Gruppe versus Kontrollgruppe zeigen keine signifikanten Unterschiede der Makrophagen und Neutrophilen.

Für die Gesamtzellzahl, die Lymphozyten, die Eosinophilen, die Mastzellen, die Zellvitalität und die Recovery konnten keine signifikante Unterschiede zwischen der obstruktiven Bronchitis-Gruppe, der nicht-obstruktiven-Bronchitis-Gruppe und der Kontroll-Gruppe festgestellt werden.

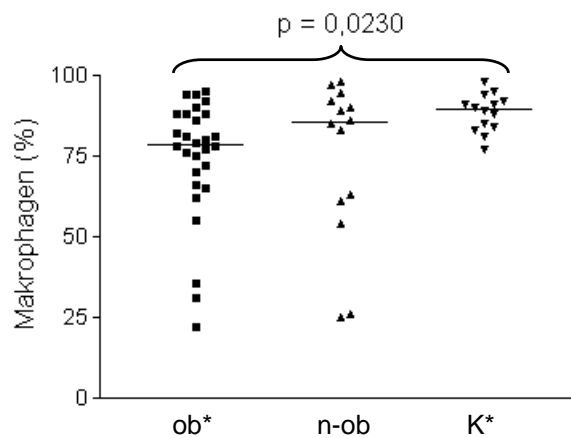


Abbildung 4: Unterschiede zwischen den drei Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis ANOVA berechnet (Gesamt-p = 0,0230). Als post-hoc Test wurde der Test nach Dunns verwendet und die beiden Gruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden, mit einem Sternchen (*) markiert. Der Anteil der Makrophagen ist in der obstruktiven Bronchitis-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant vermindert.

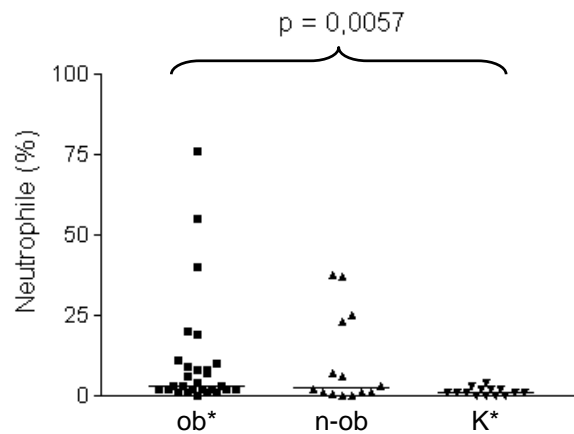


Abbildung 5: Unterschiede zwischen den drei Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis ANOVA berechnet (Gesamt-p = 0,0057). Als post-hoc Test wurde der Test nach Dunns verwendet und die beiden Gruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden, mit einem Sternchen (*) markiert. Der Anteil der Neutrophilen ist in der obstruktiven Bronchitis-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erhöht.

3.3 Bakteriologische Ergebnisse

Um das Ausmaß der Keimbesiedelung in den unteren Atemwegen bei Kindern mit chronisch rezidivierendem Husten erfassen zu können, wurde eine bakteriologische Untersuchung der bronchoalveolären Lavage durchgeführt. Zusätzlich war von Interesse, welche Keime bevorzugt anzutreffen sind.

Tabelle 3.12: Anzahl und Art der gefundenen Bakterien in den verschiedenen Gruppen

	Obstruktive Bronchitis	Nicht-obstruktive Bronchitis	Einzelfälle	Kontroll- Gruppe
untersuchte Patienten	25	11	4	15
mit positiver Bakteriologie	21	9	1	2
ohne Keimnachweis	4	2	3	13
physiologische Keime des oberen Atemtraktes	13	9	0	2
potentiell pathogene Keime	14	2	1	0
Potentiell pathogene Keime:				
Haemophilus influenzae	6	1	0	0
Pneumokokken	6	1	0	0
Staphylokokkus aureus	2	1	0	0
E. coli	1	0	0	0
Pseudomonas aeruginosa	1	0	0	0
Klebsiella oxytoca	2	0	0	0
Klebsiella pneumoniae	1	0	0	0
Moraxella catharralis	1	0	0	0
Mykobakterien	0	0	1	0

Es fanden sich bei 84% der Kinder mit obstruktiver und bei 81,8% der Kinder mit nicht-obstruktiver Bronchitis Bakterien in der Lavage, außerdem bei einem von vier untersuchten Einzelfällen. In der Kontrollgruppe dagegen zeigten sich nur bei 13,3% der lungengesunden Kinder Keime in der BAL.

Die Keime wurden eingeteilt in physiologische Keime des oberen Atemtrakts und potentiell pathogene Keime (siehe Tabelle 3.12).

Potentiell pathogene Keime in der Lavage wurden in der Kontrollgruppe nicht gefunden, aber bei 56% der obstruktiven und bei 18,2% der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe und bei einem Einzelfall.

Tabelle 3.13: Häufigkeit des Keimbefalls und potentiell pathogener Keime in den einzelnen Gruppen

Bakteriologie	Obstruktive Bronchitis (n = 25)	Nicht-obstruktive Bronchitis (n = 11)	Kontrollen (n = 15)	p
Keimbefall				
ja	21	9	2	<0,0001
nein	4	2	13	
potentiell pathogene Keime				
ja	14	2	0	0,0006
nein	11	9	15	

Die Häufigkeit des Keimbefalls und potentiell pathogener Keime in den unterschiedlichen Gruppen wurde mit dem χ^2 -Test berechnet. Die Einzelfälle wurden wegen der geringen Fallzahl nicht in die Berechnung miteinbezogen.

In der obstruktiven und in der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe konnte signifikant häufiger ein Bakterienbefall in der Lavage als in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Gesamt-p < 0,0001). Potentiell pathogene Keime fanden sich in der BAL der Kinder mit obstruktiver Bronchitis signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe (Gesamt-p = 0,0006).

3.3.1 Vergleich von Lavagen mit und ohne Bakteriennachweis in der obstruktiven Bronchitis-Gruppe

In Abhängigkeit von einem Keimnachweis wurde die Zytologie der obstruktiven Bronchitis-Patienten miteinander verglichen.

Wegen der geringen Fallzahl der Patienten ohne Keimnachweis in der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe (n=2) und der geringen Fallzahl der Kontrollen mit positiver Bakteriologie (n=2) wurde in diesen beiden Gruppen kein Vergleich der Differentialzytologie in Abhängigkeit der Bakteriologie durchgeführt.

Tabelle 3.14: Vergleich der Lavagen mit und ohne Keimnachweis von Patienten mit obstruktiver Bronchitis bzgl. der Differentialzytologie

	Positive Bakteriologie	Negative Bakteriologie	(p)
<i>Anzahl</i>	20-21/21	2-4/4	
Zellvitalität (%)	83,5 (70;90) [50-100] 20	87,5 [85-90] 2	(0,6475)
Gesamtzellzahl (*10 ⁴ /ml)	16,1 (10,2;25,3) [2,1-81,3] 20	15,3 [9,5-114,4] 4	(0,9075)
Makrophagen (%)	79,5 (73,5;87) [31-94] 20	62 [22-94] 3	(0,5228)
Lymphozyten (%)	10,5 (8,5;16) [3-52,5] 20	4 [1-35] 3	(0,4652)
Neutrophile (%)	3,5 (2;10) [0-55] 20	3 [2-76] 3	(0,6478)
Eosinophile (%)	0 (0;1) [0-4] 20	0 [0-1] 3	(0,8545)

Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Differentialzytologie in den Lavagen mit bzw. ohne Keimbefall bei den Kinder mit obstruktiver Bronchitis. Allerdings ist das Ergebnis wegen der geringen Fallzahl der Patienten ohne Keimnachweis nicht sehr aussagekräftig.

Insgesamt zeigten sechs obstruktive Bronchitis-Kinder eine Erhöhung der Neutrophilenzahl größer 10%, bei drei Patienten lagen die Neutrophilenzahlen sogar über 35%. Bei fünf dieser Patienten konnten Keime in der Lavage nachgewiesen werden, der Patient mit der höchsten Neutrophilenzahl hatte hingegen keinen Bakteriennachweis in seiner BAL.

3.3.2 *Vergleich von Lavagen mit potentiell pathogenen und physiologischen Keimen bzw. ohne Keimnachweis in der obstruktiven Bronchitis-Gruppe*

Da man bei den Patienten aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe häufig potentiell pathogene Keime in der BAL finden konnte, wurde untersucht, ob diese einen Einfluß auf das Zellbild haben. Dazu wurde die Zytologie der Patienten mit potentiell pathogenen Keimen gezielt mit dem Zellbild der Kinder, bei denen man entweder keine Bakterien oder physiologische Keime in der Lavage nachweisen konnte, verglichen.

Tabelle 3.15: Vergleich der Lavagen mit potentiell pathogenen und physiologischen Keimen bzw. ohne Keimnachweis von Patienten mit obstruktiver Bronchitis bzgl. der Differentialzytologie

	Potentiell pathogene Keime	Physiologische Keime bzw. kein Keimnachweis	p
<i>Anzahl</i>	14/14	8-10/11	
Zellvitalität (%)	82 (69,5;90) [50-96,4] 14	87,5 (82;90) [73-100] 8	0,3043
Gesamtzellzahl (*10 ⁴ /ml)	18,4 (10,2;25,3) [2,1-33] 14	15,3 (9,3;55,7) [5,5-114,4] 10	0,9068
Makrophagen (%)	78,5 (73,5;84) [35,5-88] 14	80 (46,5;93) [22-94] 9	0,8255
Lymphozyten (%)	11 (7;21,5) [3-52,5] 14	10 (5;15) [1-35] 9	0,3439
Neutrophile (%)	5 (2-10) [1-40] 14	2 (1,5;37,5) [0-76] 9	0,6812
Eosinophile (%)	0 (0;1) [0-3] 14	0 (0;1,5) [0-4] 9	1,0000

Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.

Zwischen beiden untersuchten Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied in der Differentialzytologie festgestellt werden.

3.4 Quantitative Untersuchung der Surfactantproteine

3.4.1 Vergleich zwischen Patienten-Gruppen und Kontroll-Gruppe

Es konnte für alle Patienten aus der obstruktiven und der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe und für alle Kinder aus der Kontroll-Gruppe der Gehalt an SP-A mittels ELISA bestimmt werden. Bei einem Patienten aus der Gruppe der Einzelfälle war SP-A außerhalb des Meßbereiches.

Bei zehn Patienten aus der obstruktiven und zwei Patienten aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe ist eine Bestimmung des SP-D-Gehaltes nicht gelungen, auch bei zwei Einzelfällen war SP-D unterhalb der Nachweisgrenze. Dagegen konnte bei allen Kontrollkindern der SP-D-Gehalt bestimmt werden.

Der Gesamtproteingehalt der BAL's, der bei allen untersuchten Kinder bestimmt werden konnte, wurde gemessen, um ein Verhältnis von SP-A und SP-D zum Proteingehalt bilden zu können.

Wegen der geringen Zahl der Einzelfälle wurden diese in den statistischen Berechnungen nicht berücksichtigt.

Tabelle 3.16: Vergleich von SP-A- und SP-D-Gehalt zwischen den einzelnen Gruppen. Außerdem Vergleich von SP-A und SP-D im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt.

	Obstruktive Bronchitis	Nicht-obstruktive Bronchitis	Kontroll-Gruppe	p	Einzelfälle
Anzahl	21-31/31	12-14/14	15/15		3-5/5
Gesamtprotein (µg/ml)	73,7 (54,2;127,8) [17,2-207,1] 31	98,7 (59,4; 174,7) [32,2-245,6] 14	76,8 (63,9; 90,1) [47,9-103,7] 15	0,4284	108,9 [51,1-557,7] 5
SP-A (ng/ml)	2780 (2081;4883) [160-10770] 31	3132 (1822;7205) [507,1-9807] 14	4498 (2189;10120) [805-12300] 15	0,2956	2554 [300,6-5404] 4
SP-D (ng/ml)	61,3 (37,4;84,7) [16,2-137,5] 21 *	34,8 (17,7;59,8) [12-153,3] 12	16,3 (11,3;30,5) [9,6-70,1] 15 *	0,0002	82,9 [19,7-134,8] 3
SP-A/Protein (%)	3,69 (2,01;6,63) [0,49-18,27] 31	4,09 (1,51;8,21) [0,34-13,18] 14	5,86 (3,75;11,31) [1,43-15,62] 15	0,1312	1,14 [0,49-2,17] 4
SP-D/Protein (%)	0,06 (0,04;0,1) [0,01-0,28] 21 *	0,05 (0,02;0,07) [0,01-0,22] 12	0,02 (0,02;0,04) [0,01-0,07] 15 *	0,0036	0,01 [0,01-0,12] 3

Unterschiede wurden mit dem Kruskal-Wallis ANOVA Test berechnet. Die Einzelfälle wurden in die Berechnung nicht miteinbezogen. Der jeweils angegebene p-Wert bezieht sich auf alle in der Berechnung berücksichtigten Gruppen. Bei signifikanten Unterschieden ($p < 0,05$) wurde anschließend der post-hoc Test nach Dunns verwendet und die beiden Gruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden, mit einem Sternchen (*) markiert.

Die SP-D-Bestimmung mittels ELISA ergab für die obstruktive Bronchitis-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte Werte (siehe Abbildung 6). Auch der SP-D/Gesamtprotein-Quotient war in der obstruktiven Bronchitis-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (siehe Abbildung 7). Obstruktive Bronchitis-Gruppe versus nicht-obstruktiver Bronchitis-Gruppe und nicht-obstruktive Bronchitis-Gruppe versus Kontrollgruppe zeigten keine signifikanten Unterschiede der SP-D-Konzentration bzw. des SP-D/Gesamtprotein-Quotienten.

Das Gesamtprotein und SP-A war in den verschiedenen Gruppen nicht signifikant verändert.

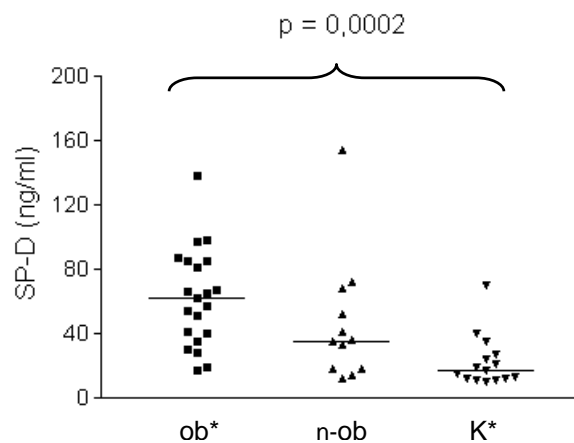


Abbildung 6: Unterschiede zwischen den drei Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis ANOVA berechnet (Gesamt-p = 0,0002). Als post-hoc Test wurde der Test nach Dunns verwendet und die beiden Gruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden, mit einem Sternchen (*) markiert. Die Konzentration an SP-D ist in der obstruktiven Bronchitis-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erhöht.

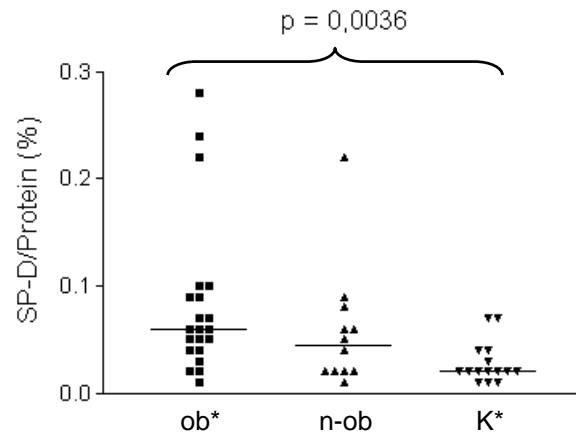


Abbildung 7: Unterschiede zwischen den drei Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis ANOVA berechnet (Gesamt-p = 0,0036). Als post-hoc Test wurde der Test nach Dunns verwendet und die beiden Gruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden, mit einem Sternchen (*) markiert. Der SP-D/Gesamtprotein-Quotient ist in der obstruktiven Bronchitis-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erhöht.

3.4.2 Zusammenhang zwischen Surfactantproteinen, Zellbild und klinischen Ergebnissen

Zusammenhang zwischen Surfactantproteinen und Zellbild

Das Zellbild und der Gehalt an Surfactantproteinen wurden in den einzelnen Gruppen gezielt miteinander verglichen, um eventuell bestehende Zusammenhänge erkennen zu können.

Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen den zytologischen Ergebnissen und dem Gehalt an SP-A bzw. SP-D in den verschiedenen Patientengruppen.

In der Kontrollgruppe hingegen zeigte sich ein schwacher Zusammenhang zwischen der SP-A-Konzentration und der Zellvitalität. Außerdem konnte eine Korrelation zwischen der SP-A-Konzentration und dem Anteil der Lymphozyten in der Lavage festgestellt werden (siehe Abbildung 8).

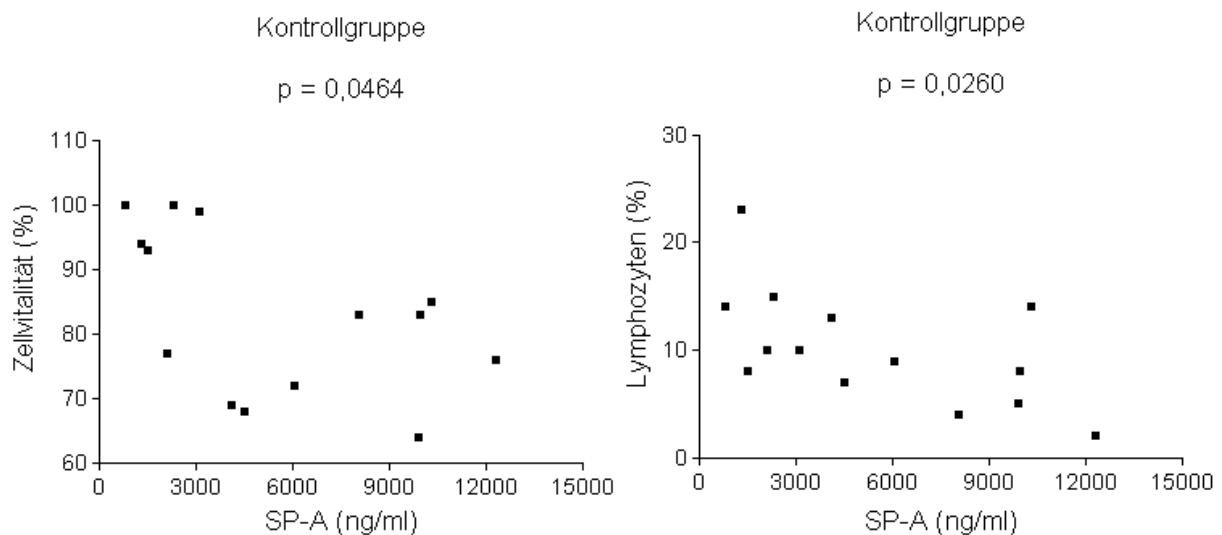


Abbildung 8: Bei dem Vergleich der Surfactantproteine mit dem Zellbild konnte ein Zusammenhang zwischen dem SP-A-Gehalt und der Zellvitalität (Spearman $r = -0,5396$; $p = 0,0464$; $n = 14$) für die Kontrollgruppe gefunden werden. Dieser Nachweis gelang ebenfalls für die SP-A-Konzentration und dem Anteil der Lymphozyten in der BAL (Spearman $r = -0,5910$; $p = 0,0260$; $n = 14$).

Auch hinsichtlich des SP-D-Gehaltes konnte in der Kontrollgruppe ein schwacher Zusammenhang zwischen der SP-D-Konzentration und dem Anteil der Neutrophilen bzw. zwischen SP-D und der Recovery beobachtet werden (siehe Abbildung 9).

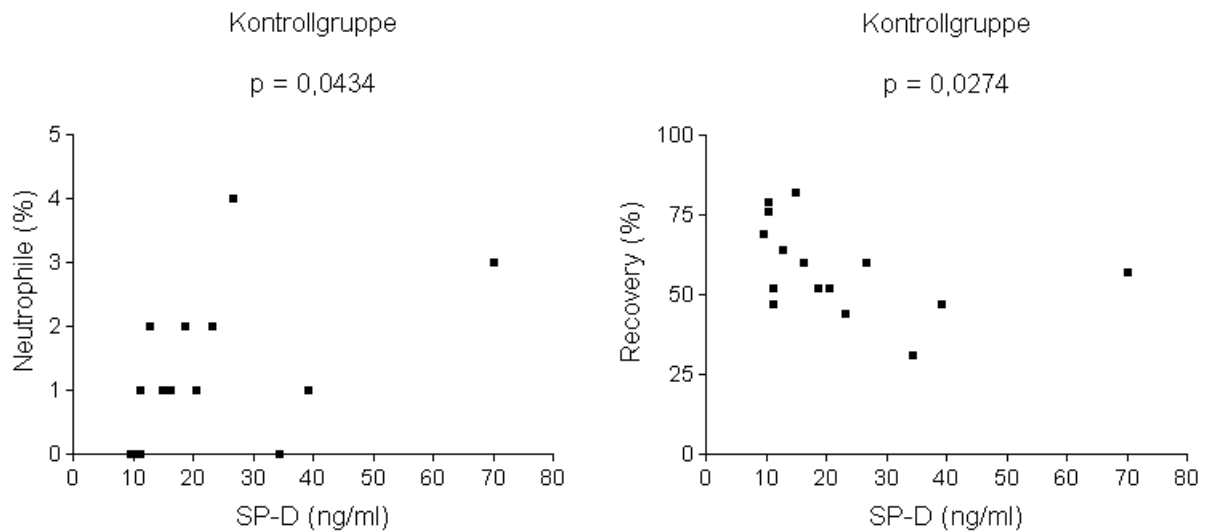


Abbildung 9: Bei dem Vergleich der Surfactantproteine mit dem Zellbild konnte ein Zusammenhang zwischen dem SP-D-Gehalt und dem Anteil der Neutrophilen in der BAL (Spearman $r = 0,5461$; $p = 0,0434$; $n = 14$) für die Kontrollgruppe gefunden werden. Dieser Nachweis gelang ebenfalls für die SP-D-Konzentration und die Recovery (Spearman $r = -0,5673$; $p = 0,0274$; $n = 14$).

Zusammenhang zwischen der SP-A- und SP-D-Konzentration

Weder in der obstruktiven und nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe noch in der Kontrollgruppe zeigte sich eine Korrelation zwischen der SP-A- und SP-D-Konzentration.

Zusammenhang zwischen der SP-A- bzw. SP-D-Konzentration und Krankheitsdauer

Auch hier konnte bei den Patienten der obstruktiven und nicht-obstruktiven Bronchitis kein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an SP-A bzw. SP-D und der Krankheitsdauer festgestellt werden.

Zusammenhang zwischen der SP-A- bzw. SP-D-Konzentration und dem Alter zum Lavagezeitpunkt

In der obstruktiven Bronchitis-Gruppe konnte ein schwacher Zusammenhang zwischen der Konzentration an SP-A und dem Alter zum Lavagezeitpunkt festgestellt werden (siehe Abbildung 10). Der Gehalt an SP-D hingegen korrelierte nicht mit dem Alter zum Lavagezeitpunkt.

Für die nicht-obstruktive Bronchitis-Gruppe zeigte sich keinerlei Zusammenhang zwischen der SP-A- bzw. SP-D-Konzentration und dem Alter bei Durchführung der BAL.

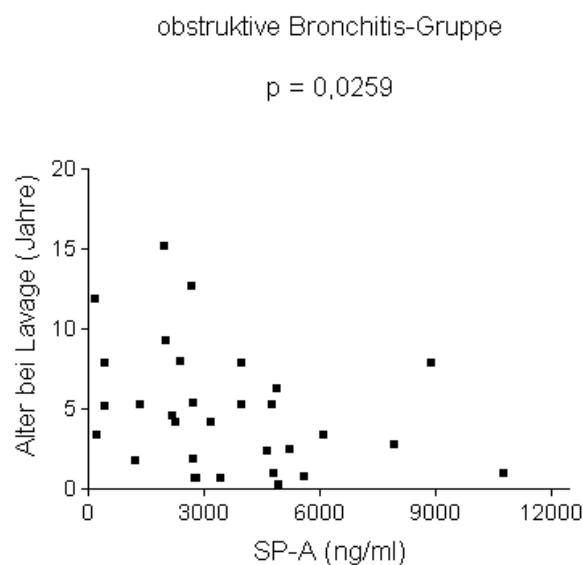


Abbildung 10: Bei dem Vergleich der Surfactantproteine mit dem Alter bei Lavage konnte ein schwacher Zusammenhang zwischen dem SP-A-Gehalt und dem Alter bei Lavage (Spearman $r = -0,3996$; $p = 0,0259$; $n = 31$) für die obstruktive Bronchitis-Gruppe gefunden werden.

Zusammenhang zwischen der SP-A- bzw. SP-D-Konzentration und dem Alter bei Krankheitsbeginn

Es konnte in den Patientengruppen mit obstruktiver und nicht-obstruktiver Bronchitis kein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an SP-A bzw. SP-D und dem Alter bei Krankheitsbeginn gefunden werden.

Zusammenhang zwischen Krankheitsdauer und Zellbild

Die Krankheitsdauer und die Ergebnisse aus der zytologischen Untersuchung der BAL zeigten in keinem Fall eine Korrelation.

Zusammenhang zwischen dem Alter zum Lavagezeitpunkt und Zellbild

Bei den Patienten mit obstruktiver Bronchitis zeigte sich ein schwacher Zusammenhang zwischen dem Alter zum Lavagezeitpunkt und der Gesamtzellzahl (siehe Abbildung 11).

Das Alter bei Durchführung der BAL korrelierte ansonsten weder in der obstruktiven noch in der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe zu den einzelnen zytologischen Ergebnissen.

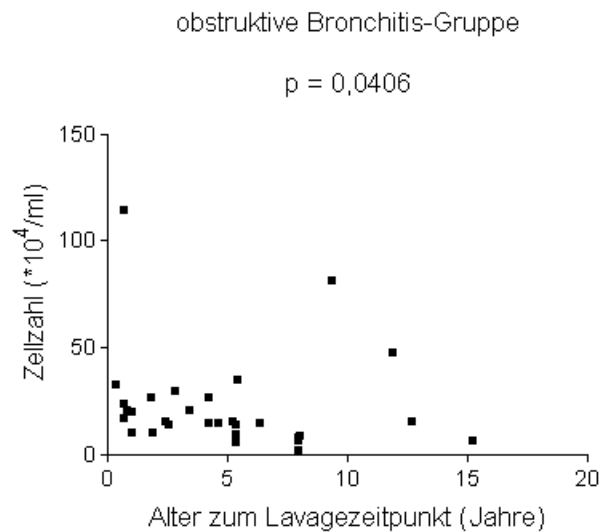


Abbildung 11: Bei dem Vergleich des Alters bei Lavage mit dem Zellbild konnte ein schwacher Zusammenhang zwischen dem Alter bei Lavage und der Gesamtzellzahl (Spearman $r = -0,3759$; $p = 0,0406$; $n = 30$) für die obstruktive Bronchitis-Gruppe gefunden werden.

Zusammenhang zwischen dem Alter bei Krankheitsbeginn und Zellbild

Sowohl in der obstruktiven als auch in der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe konnte ein schwacher Zusammenhang zwischen dem Alter bei Krankheitsbeginn und der Gesamtzellzahl festgestellt werden (siehe Abbildung 12).

Weiterhin korrelierte bei den Patienten mit obstruktiver Bronchitis das Alter bei Auftreten der ersten Symptome mit der Zellvitalität (siehe Abbildung 13).

Ansonsten zeigte sich in den beiden Patientengruppen kein Zusammenhang zwischen dem Alter bei Krankheitsbeginn und den zytologischen Ergebnissen.

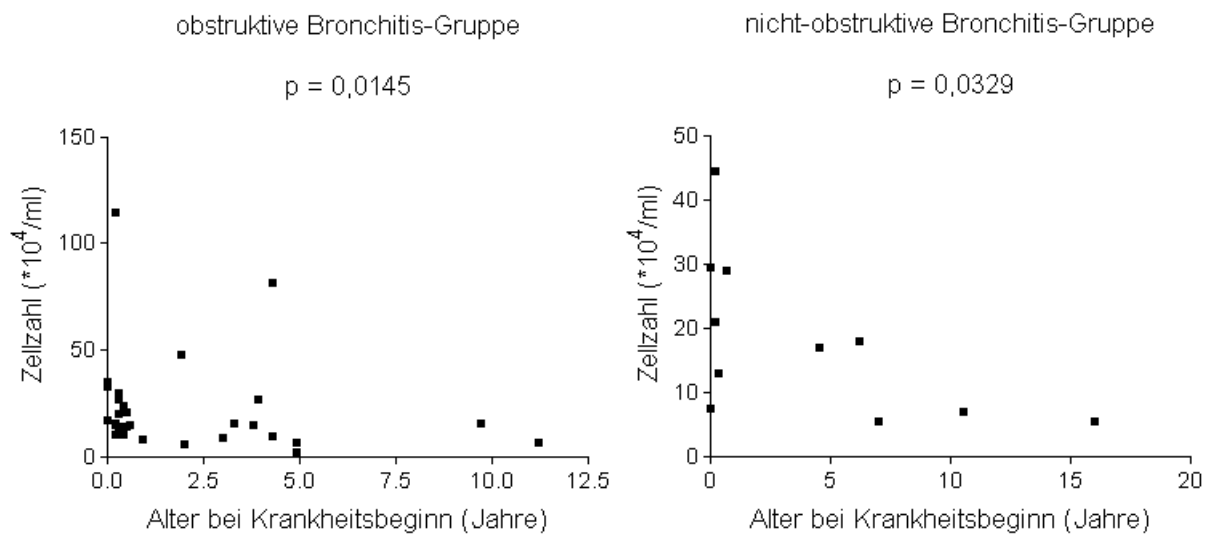


Abbildung 12: Bei dem Vergleich des Alters bei Krankheitsbeginn mit dem Zellbild konnte ein schwacher Zusammenhang zwischen dem Alter bei Krankheitsbeginn und der Gesamtzellzahl für die obstruktive Bronchitis-Gruppe (Spearman $r = -0,4420$; $p = 0,0145$; $n = 30$) und für die nicht-obstruktive Bronchitis-Gruppe (Spearman $r = -0,6162$; $p = 0,0329$; $n = 12$) gefunden werden.

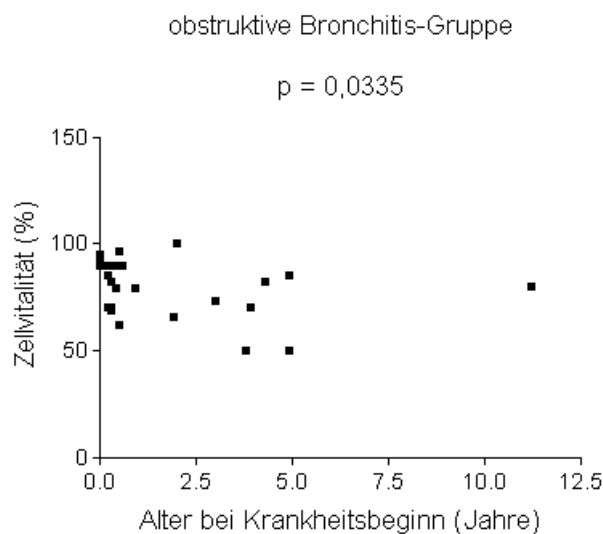


Abbildung 13: Bei dem Vergleich des Alters bei Krankheitsbeginn mit dem Zellbild konnte ein schwacher Zusammenhang zwischen dem Alter bei Krankheitsbeginn und der Zellvitalität (Spearman $r = -0,4103$; $p = 0,0335$; $n = 27$) für die obstruktive Bronchitis-Gruppe gefunden werden.

3.5 Qualitative Untersuchung der Surfactantproteine

3.5.1 Charakterisierung der SP-A- und SP-D-Detektionssysteme 1

Zur qualitativen Untersuchung der Surfactantproteine wurden die Proteine der BAL in einer 1-D-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend Western Blotting dargestellt. SP-A und SP-D wurden mit polyklonalen humanen anti-SP-A bzw. anti-SP-D Antikörpern nachgewiesen.

Darstellung von SP-A^{PAP} und SP-A^{rh} und Überprüfung einer Kreuzreaktivität

Um auszuschließen, dass der verwendete antihumane SP-A-Antikörper mit SP-D eine Kreuzreaktion zeigt, wurden aus einer PAP-Lavage aufgereinigtes SP-D und rekombinantes SP-D mit spezifischem antihumanen SP-A-Antikörper inkubiert. Außerdem wurde in der folgenden Abbildung rekombinantes SP-A dem üblicherweise verwendeten Standard SP-A^{PAP} gegenübergestellt.

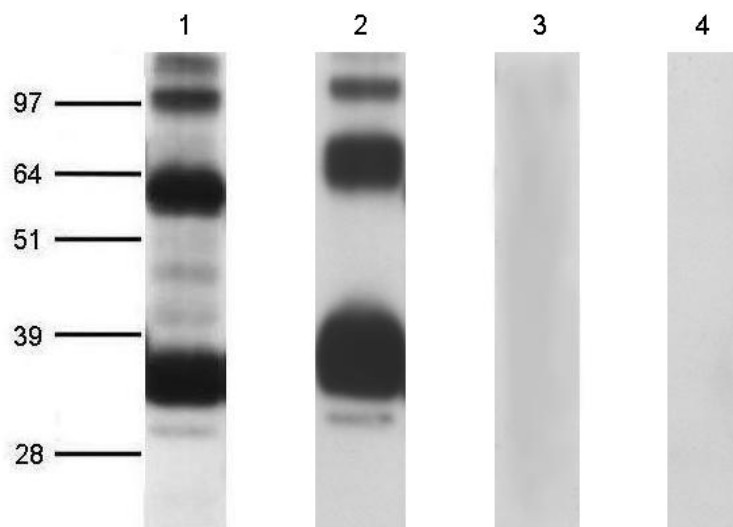


Abbildung 14: Darstellung von SP-A^{PAP} und SP-A^{rh} in SDS Elektrophorese und anschließendem Western Blotting. Außerdem Beurteilung einer Kreuzreaktivität des spezifischen SP-A-Antikörpers (rabbit anti-hum SP-A, polyklonal) mit SP-D durch Inkubation von SP-D^{PAP} und SP-D^{rh} mit spezifischem SP-A-Antikörper.

Lane 1: SP-A^{PAP} 213 ng

Lane 2: SP-A^{rh} 200 ng

Lane 3: SP-D^{PAP} 50 ng

Lane 4: SP-D^{rh} 50 ng

SP-A^{rh} zeigt die gleichen SP-A-Formen wie SP-A^{PAP}, wobei alle Banden etwas in den höheren Molekulargewichtsbereich verschoben sind. Im Gegensatz zum SP-A^{PAP} sieht man beim rekombinanten SP-A keine Banden bei 40 kDa und 45 kDa.

Man kann weder bei SP-D^{PAP} noch bei SP-D^{rh} nach Inkubation mit spezifischem antihumanen SP-A-Antikörper Banden erkennen. Somit konnte weitgehend ausgeschlossen werden, dass der spezifische SP-A-Antikörper mit SP-D reagiert.

Darstellung von SP-D^{PAP} und SP-D^{rh} und Überprüfung einer Kreuzreaktivität

Auf den SP-D-Blots sieht man z.T. schwache Banden bei 35-38 kDa. Diese erinnern vom Molekulargewichtsbereich her an die SP-A-Hauptbande. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob der verwendete antihumane SP-D-Antikörper auch SP-A erkennt. Um diese Frage beantworten zu können, wurde SP-A^{rh} und SP-A^{PAP} mit dem spezifischen SP-D-Antikörper inkubiert.

Außerdem wurde der aus PAP-Lavage aufgereinigte SP-D-Standard mit rekombinantem SP-D verglichen.

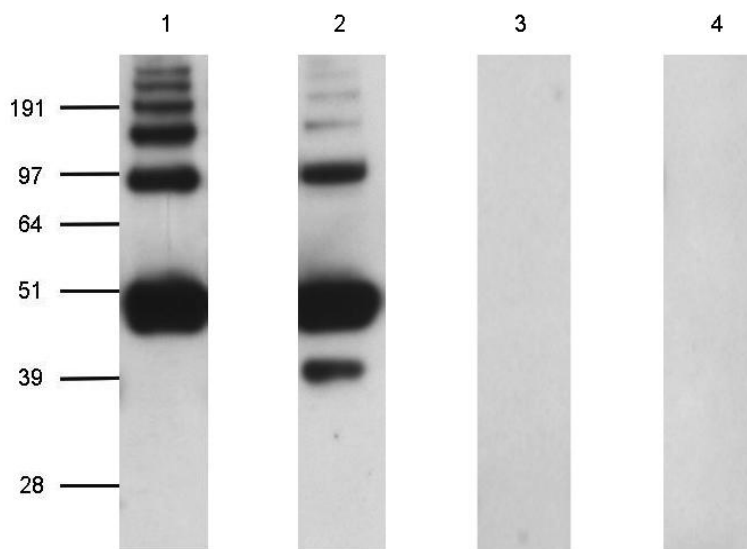


Abbildung 15: Darstellung von SP-D^{PAP} und SP-D^{rh} in SDS Elektrophorese und anschließendem Western Blotting. Außerdem Beurteilung einer Kreuzreaktivität des spezifischen SP-D-Antikörpers (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) mit SP-A durch Inkubation von SP-A^{PAP} und SP-A^{rh} mit spezifischem SP-D-Antikörper.

Lane 1: SP-D^{PAP} 16,4 ng

Lane 3: SP-A^{PAP} 1 μg

Lane 2: SP-D^{rh} 40 ng

Lane 4: SP-A^{rh} 1 μg

Der Vergleich von SP-D^{PAP} und SP-D^{rh} zeigt identische polymere Formen im höhermolekularen Bereich und im Hauptbereich von 47-51 kDa. Zusätzlich sieht man beim SP-D^{rh} eine Bande bei 40-43 kDa.

Man kann nach Inkubation von SP-A^{PAP} und SP-A^{rh} mit antihumanem SP-D-Antikörper keine Banden im Bereich 35-38 kDa erkennen, so dass es sich bei den Banden in diesem Molekulargewichtsbereich auf den SP-D-Blots vermutlich nicht um SP-A handelt.

Vergleich antihumaner SP-D-Antikörper

Um zu überprüfen, ob die auf den SP-D-Blots zusätzlich erscheinenden Banden auf unspezifischen Reaktionen des ersten Antikörpers beruhen, wurde versuchsweise für die Inkubation der Membranen ein anderer erster Antikörper verwendet.

In der folgenden Abbildung findet man einen Vergleich der beiden ersten antihumanen SP-D-Antikörper.

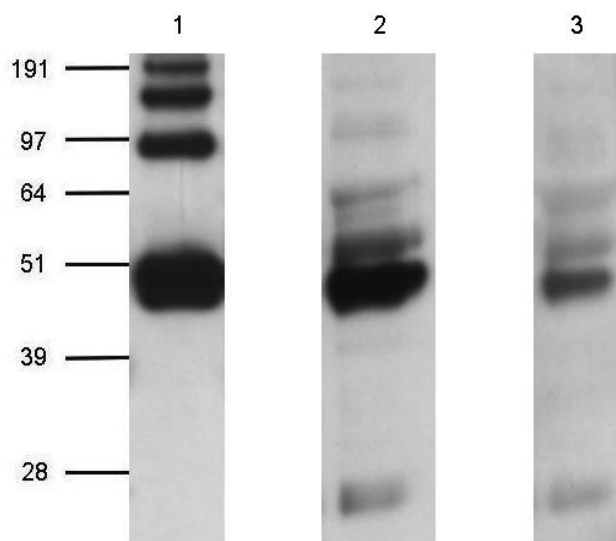


Abbildung 16: Darstellung des SP-D in der BAL bei einem Patienten in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch zwei unterschiedliche spezifische erste Antikörper (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) und einem zweiten Antikörper (goat anti-rabbit).

Lane 1: SP-D^{PAP} 16,4 ng

Lane 2: E4, inkubiert mit polyklonalem antihumanen SP-D-Antikörper (RS 91 von Reid)

Lane 3: E4, inkubiert mit polyklonalem antihumanen SP-D-Antikörper (P13 von Crouch)

Lane 2 zeigt die Inkubation der geblotteten Membran eines Patienten mit interstitieller Lungenerkrankung mit dem üblicherweise verwendeten antihumanen ersten Antikörper, während in Lane 3 bei demselben Patienten ein anderer erster Antikörper verwendet wurde. Dieser polyklonale Kaninchenantikörper gegen humanes SP-D erkennt eine andere Antigenstruktur. Unterschiedliche Ergebnisse können nicht festgestellt werden, auch mit dem neuen ersten Antikörper werden neben den spezifischen SP-D-Banden zusätzliche Banden in den beschriebenen Molekulargewichtsbereichen beobachtet.

Vergleich von SP-A und SP-D in BAL und Serum

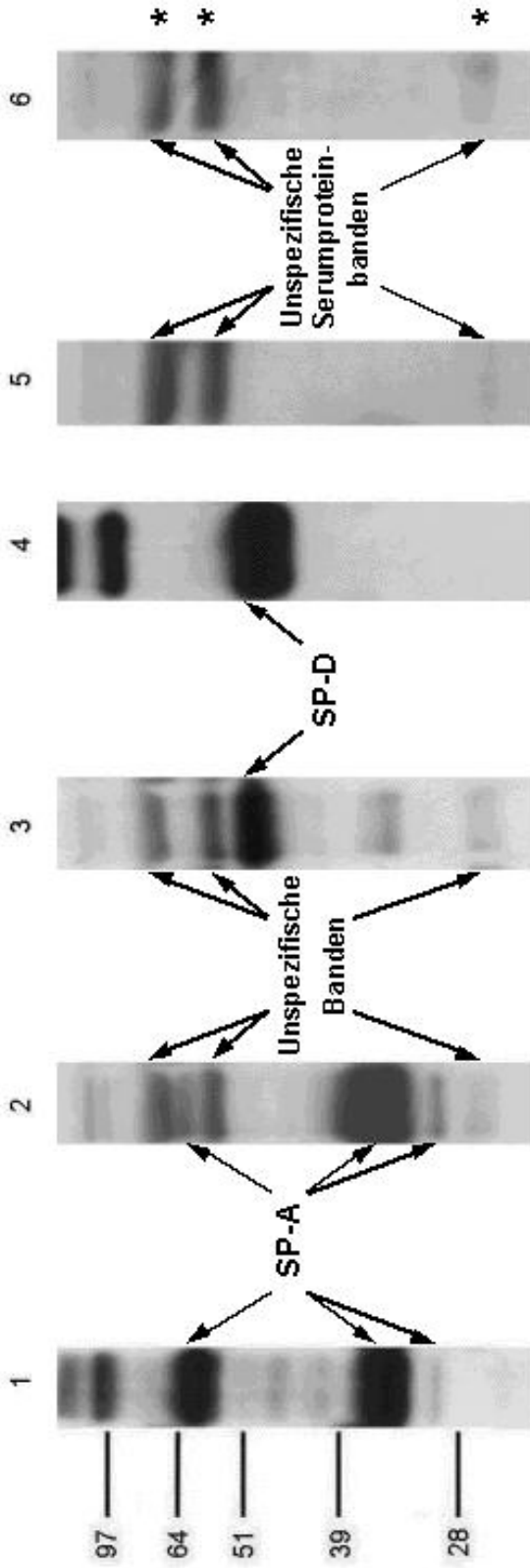


Abbildung 17: Vergleich spezifischer und unspezifischer Banden in BAL und Serum nach SDS-Elektrophorese und Western Blotanalyse und anschließender Inkubation mit antihumanem SP-A- bzw. SP-D-Antikörper.

Lane 1: SP-A^{PAP} 213 ng, inkubiert mit antihumanem **SP-A**-Antikörper

Lane 2: ob17, inkubiert mit antihumanem **SP-A**-Antikörper

Lane 3: ob17, inkubiert mit antihumanem **SP-D**-Antikörper

Lane 4: SP-D^{PAP} 16,4 ng, inkubiert mit antihumanem **SP-D**-Antikörper

Lane 5: Serum, 6 µg Gesamtprotein, inkubiert mit antihumanem **SP-A**-Antikörper

Lane 6: Serum, 6 µg Gesamtprotein, inkubiert mit antihumanem **SP-D**-Antikörper

* unspezifische Banden

Spezifisches SP-A zeigt sich in Form von drei Banden (Lane 1 und Lane 2) mit Molekulargewichten von 29-31 kDa, 33-37 kDa und 54-60 kDa, spezifisches SP-D erkennt man in einer Hauptbande (Lane 3 und Lane 4) bei 47-51 kDa sowie bei 97 und 140 kDa etwas schwächere Banden.

Darüberhinaus sieht man eine Vielzahl weiterer Banden, die analysiert werden müssen.

Beim Vergleich von Lane 2 und Lane 3 fällt auf, dass diese zusätzlichen Banden in den Bereichen 25-28 kDa, 51-54 kDa und 60-65 kDa auf den SP-A- und SP-D-Blots deckungsgleich sind. Weiterhin kann man erkennen, dass nach elektrophoretischer Auftrennung von Serum und anschließendem Western Blotting Banden in genau diesen Molekulargewichtsbereichen sichtbar werden. Die Inkubation mit antihumanem SP-A-Antikörper liefert hierbei das gleiche Ergebnis wie die Inkubation mit spezifischem SP-D-Antikörper (Lane 5 und 6).

Da die erwähnten zusätzlichen Banden sowohl nach Inkubation mit SP-A- als auch SP-D-Antikörper aufgetreten sind und sich in der BAL wie auch im Serum zeigen, wird vermutet, dass es sich um unspezifische Proteinbanden handelt. Die Herkunft dieser Banden wurde weiter untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Verwendung der beschriebenen SP-A- und SP-D-Detektionssysteme u.a. drei Banden in den Molekulargewichtsbereichen 25-28 kDa, 51-54 kDa und 60-65 kDa sichtbar werden. Diese drei Banden sind in der BAL wie auch im Serum vorhanden. In den folgenden Abbildungen wurden diese Banden mit einem Stern (*) markiert.

3.5.2 *Ergebnisse im SP-A-Detektionssystem 1*

Um qualitative Veränderungen des SP-A bei den Patienten der verschiedenen Krankheitsgruppen zu erkennen und mit lungengesunden Kontrollkindern vergleichen zu können, wurden die Proteine der BAL bei allen Patienten und der Kontrollgruppe elektrophoretisch unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Dazu wurde pro Patient bzw. Kontrolle jeweils BAL mit einer Gesamtproteinmenge von 5 µg aufgetragen. Anschließend wurde in der Westernblotanalyse SP-A mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Im folgenden Teil sind die Ergebnisse der einzelnen Patienten und Kontrollen dargestellt.

Kontrollen

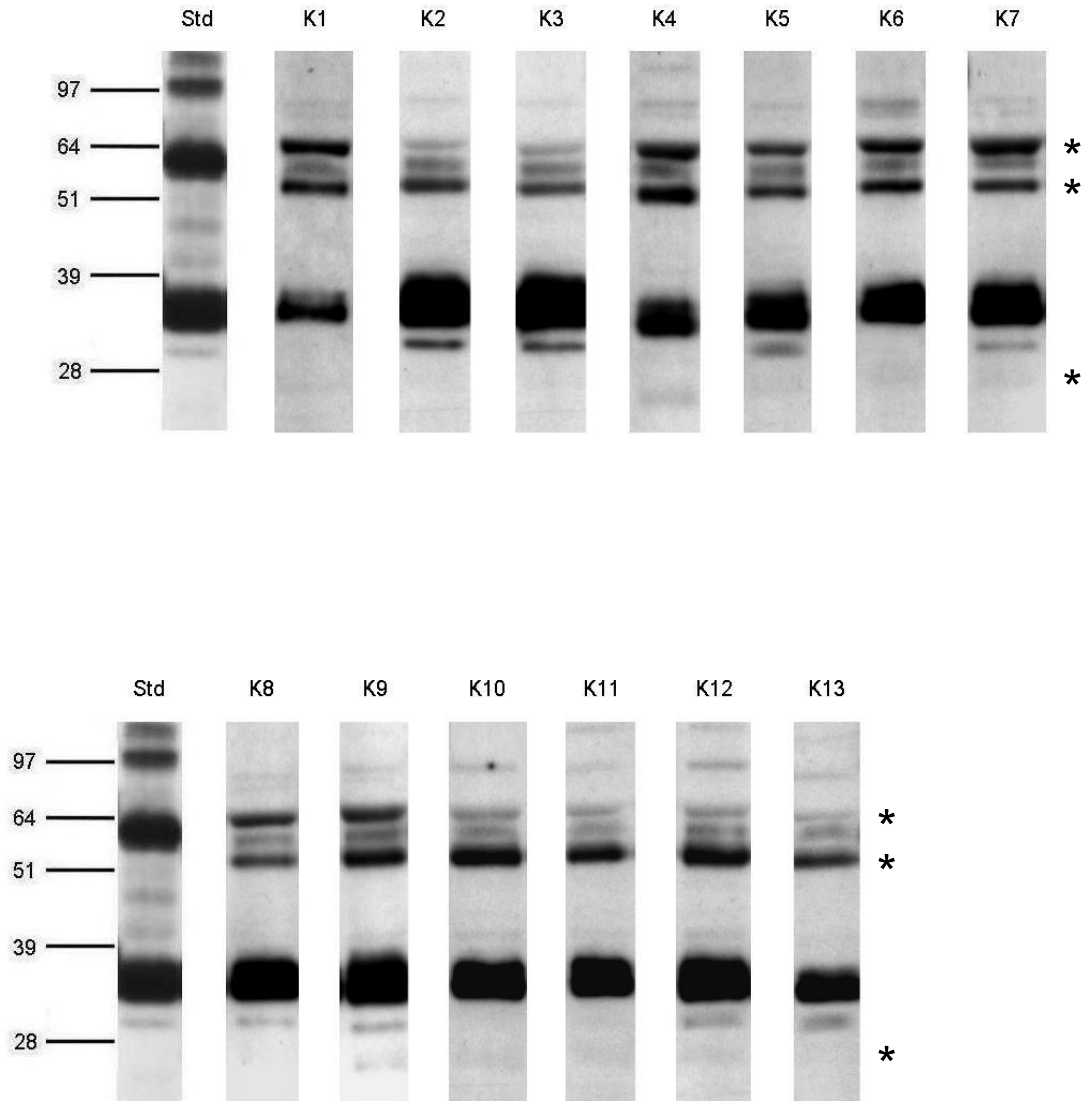


Abbildung 18: Darstellung des SP-A in der BAL bei Kontrollen K1-K13 in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-A, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit). Als Standard (Std) wurde SP-A^{PAP} 213 ng verwendet.

* unspezifische Banden

Obstruktive Bronchitis-Gruppe

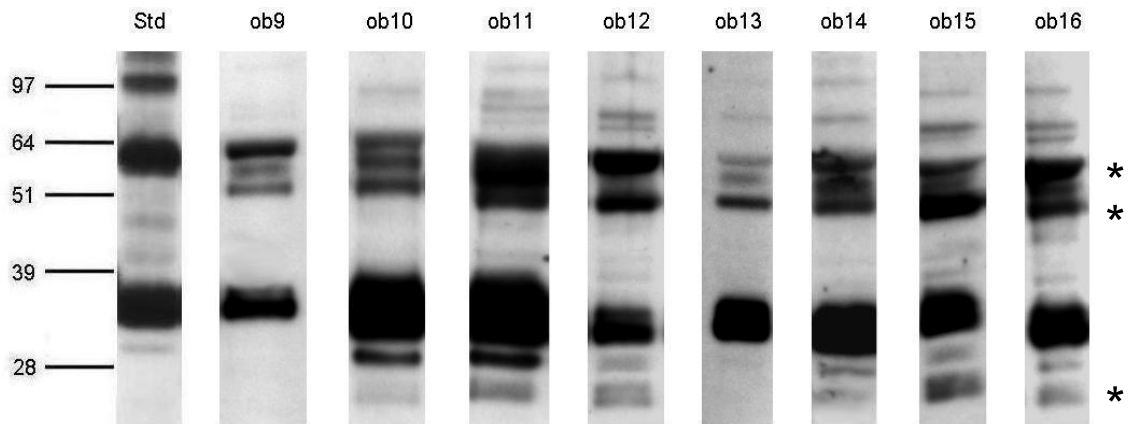
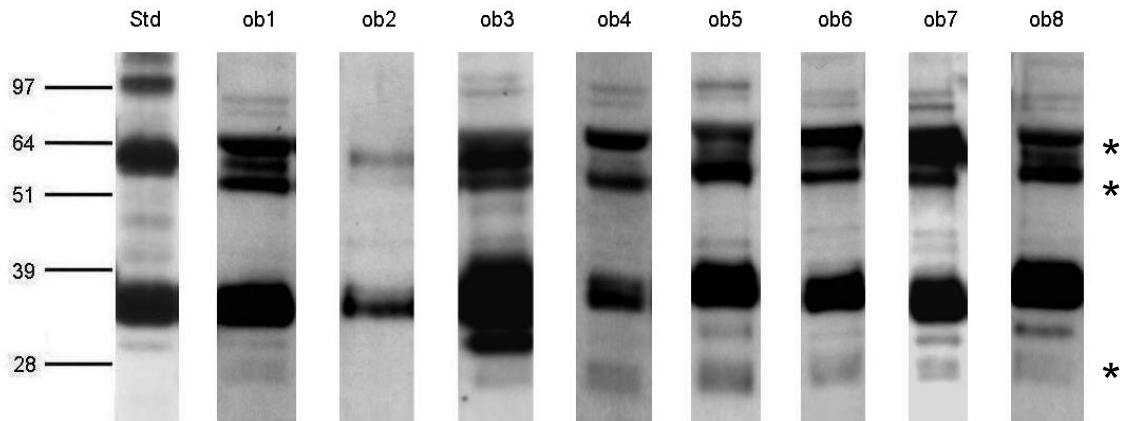


Abbildung 19: Darstellung des SP-A in der BAL bei Patienten aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-A, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit). Als Standard (Std) wurde SP-A^{PAP} 213 ng verwendet.

* unspezifische Banden

Obstruktive Bronchitis-Gruppe

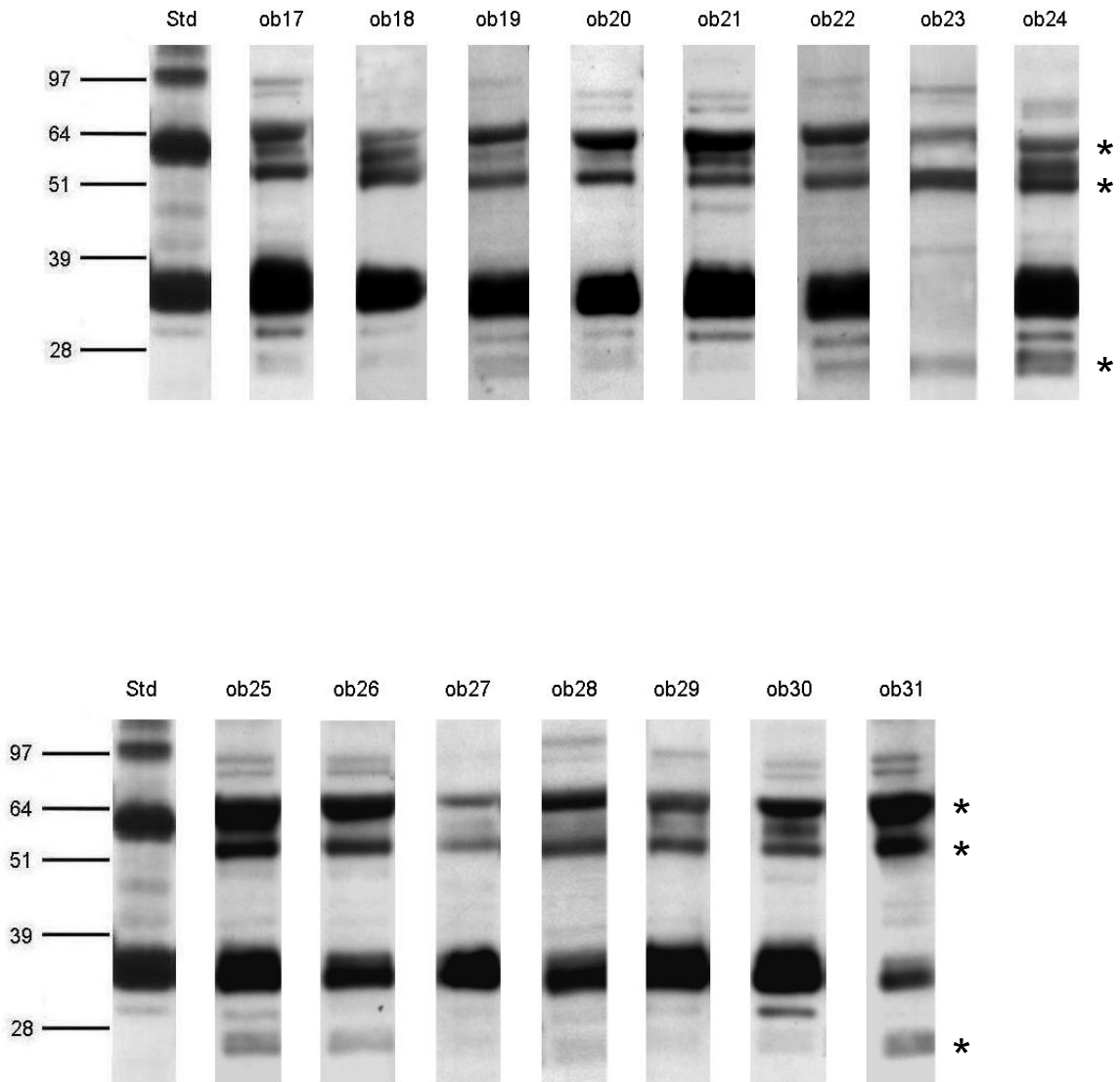


Abbildung 20: Darstellung des SP-A in der BAL bei Patienten aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-A, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit). Als Standard (Std) wurde SP-A^{PAP} 213 ng verwendet.

* unspezifische Banden

Nicht-obstruktive Bronchitis-Gruppe

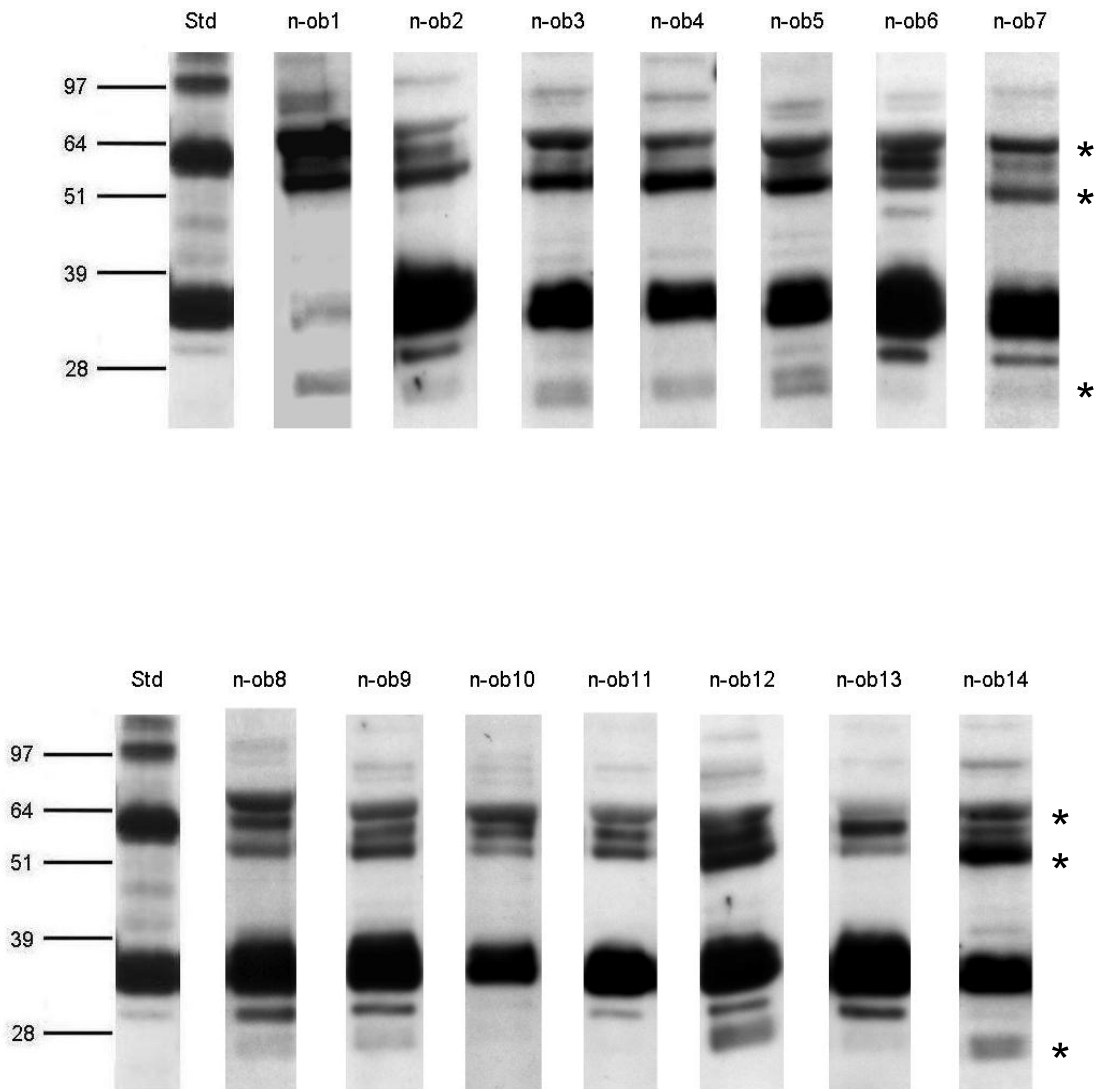


Abbildung 21: Darstellung des SP-A in der BAL bei Patienten aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-A, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit). Als Standard (Std) wurde SP-A^{PAP} 213 ng verwendet.

* unspezifische Banden

Einzelfälle

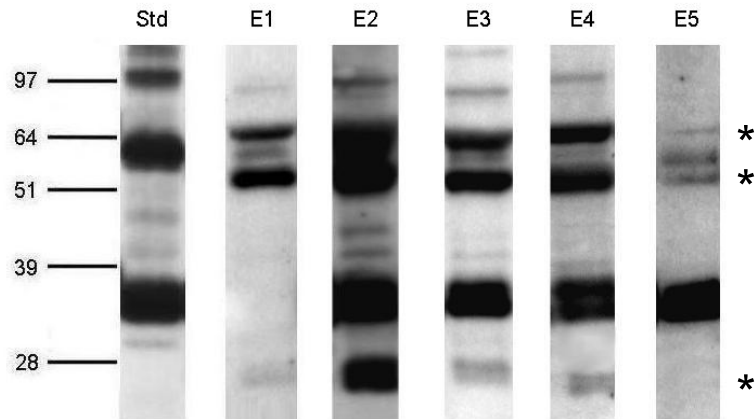


Abbildung 22: Darstellung des SP-A in der BAL bei Einzelfällen in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-A, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit). Als Standard (Std) wurde SP-A^{PAP} 213 ng verwendet.

* unspezifische Banden

CF- und PAP-Patienten

Da bei der qualitativen Untersuchung der Surfactantproteine die Frage, ob sich bei Kindern mit chronischem Husten Degradationsprodukte des SP-A finden lassen, von besonderem Interesse war, wurde zum Vergleich SP-A bei CF-Patienten, die häufig proteolytische Fragmente zeigen, untersucht. Dazu wurde die BAL von CF- und zum weiteren Vergleich auch von PAP-Patienten in der 1-D-Gelelektrophorese aufgetrennt.

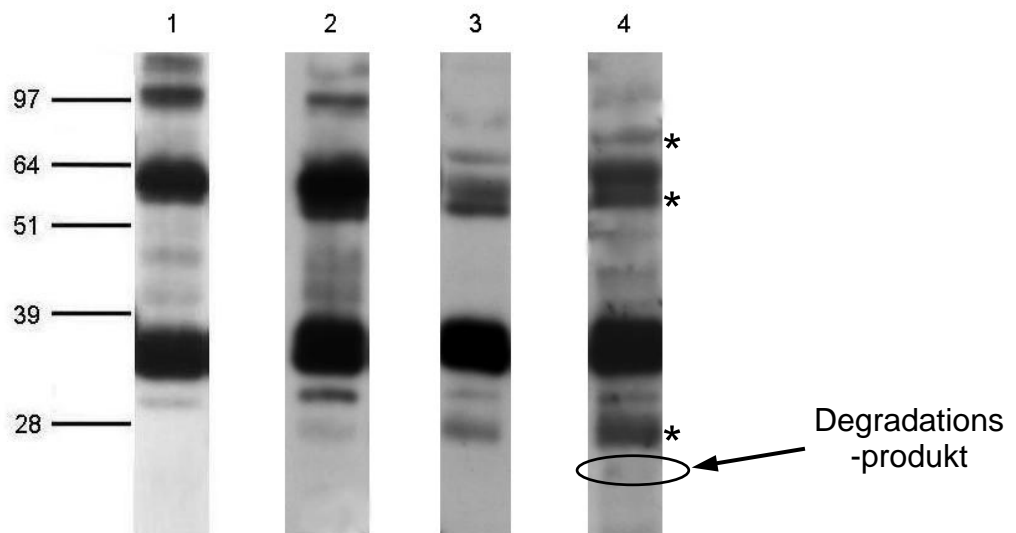


Abbildung 23: Darstellung des SP-A bei einem Patienten mit Alveolarproteinose und zwei CF-Patienten in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti- hum SP-A, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit).

Lane 1: SP-A^{PAP} 213 ng

Lane 2: PAP-Patient, 20 µg Gesamtprotein

Lane 3: CF-Patient, 5 µg Gesamtprotein

Lane 4: CF-Patient, 5 µg Gesamtprotein

Bei den untersuchten PAP- und CF-Patienten kann SP-A wie bei den Kindern mit chronischem Husten als Hauptbande bei 33-37 kDa beobachtet werden, als weitere monomere Form bei 29-31 kDa und als Dimer bei 54-60 kDa. Darüberhinaus zeigen sich auch hier unspezifische Banden.

Der in Lane 4 dargestellte CF-Patient läßt eine weitere schwache Bande bei ungefähr 20 kDa erkennen. Hierbei könnte es sich um ein Degradationsprodukt des SP-A handeln.

Übersicht der verschiedenen im SP-A-System 1 nachgewiesenen Banden

Die nächste Tabelle zeigt eine Übersicht über alle Banden, die im SP-A-System 1 in den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden können.

Tabelle 3.17: Übersicht über alle im SP-A-System 1 nachgewiesenen Banden

Molekulargewichtsbereich (kDa)	Obstruktive Bronchitis (n = 31)	Nicht-obstruktive Bronchitis (n = 14)	Einzelfälle (n = 5)	Kontrollen (n = 13)
0-25	0	0	0	0
25-28*	28	14	4	11
29-31♣	24	12	0	8
31-33	0	0	0	0
33-37♣	30	14	4	13
37-51	17	6	3	3
51-54*	30	14	5	13
54-60♣	30	14	5	13
60-65*	30	14	5	13
65-100	28	14	4	13

Erklärung:

n = Anzahl der Patienten einer Gruppe, die im jeweiligen Molekulargewichtsbereich eine Bande zeigen

*: siehe Tabelle 3.18

♣: siehe Tabelle 3.19

In den Molekulargewichtsbereichen 0-25 kDa und 31-33 kDa können in keiner Gruppe Banden nachgewiesen werden.

Unspezifische Proteinbanden

Wie beschrieben lassen sich neben den regulären SP-A-Banden (Tabelle 3.19) drei vermutlich unspezifische Bandenbereiche (Tabelle 3.18) nachweisen.

Tabelle 3.18: unspezifische Proteinbanden in den verschiedenen Gruppen nach Inkubation mit spezifischem SP-A Antikörper

Gruppe	25-28 kDa	51-54 kDa	60-65 kDa	Anzahl der Kinder
Obstruktive Bronchitis (n = 31)	+	+	+	28
	-	+	+	2
	-	-	-	1
Nicht-obstruktive Bronchitis (n = 14)	+	+	+	14
Einzelfälle (n = 5)	+	+	+	4
	-	+	+	1
Kontrollgruppe (n = 13)	+	+	+	11
	-	+	+	2

Die unspezifischen Proteinbanden bei 25-28 kDa sind z.T. schwach ausgeprägt, während sie bei 51-54 kDa und 60-65 kDa meist sehr gut sichtbar sind.

90,3% der obstruktiven Bronchitis-Patienten und alle Kinder mit nicht-obstruktiver Bronchitis zeigen Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich von 25-28 kDa nach Inkubation mit spezifischem SP-A-Antikörper. Auch bei vier Einzelfällen und 84,6% der lungengesunden Kontrollkinder lassen sich Banden bei 25-28 kDa finden.

Mit Ausnahme eines Kindes aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe (ob2) haben alle untersuchten Patienten und Kontrollen Banden bei 51-54 kDa und 60-65 kDa.

Spezifische SP-A-Formen

SP-A kann bei Patienten und Kontrollen als Monomer mit einer Hauptbande bei 33-37 kDa und einer schwächeren Bande bei 29-31 kDa gefunden werden. Zusätzlich zeigt sich SP-A als Dimer in einem Molekulargewichtsbereich von 54-60 kDa. Im höhermolekularen Bereich finden sich polymere Formen.

Da SP-A nicht konstant bei allen untersuchten Patienten bzw. Kontrollen in diesen verschiedenen Formen zu finden war, konnten unterschiedliche Proteinmuster erarbeitet werden.

Tabelle 3.19: SP-A-Formen in den verschiedenen Gruppen nach Inkubation mit spezifischem SP-A-Antikörper

Gruppe	29-31 kDa	33-37 kDa	54-60 kDa	Anzahl der Kinder	Bandenvariation
Obstruktive Bronchitis (n = 31)	+	+	+	24	1
	-	+	+	6	2a
	-	-	-	1	4
Nicht-obstruktive Bronchitis (n = 14)	+	+	+	12	1
	-	+	+	1	2a
	-	(+)	+	1	2b
Einzelfälle (n = 5)	-	+	+	4	2a
	-	-	+	1	3
Kontrollen (n = 13)	+	+	+	8	1
	-	+	+	5	2a

Bei der Mehrheit der untersuchten Patienten lassen sich alle drei SP-A-Formen nachweisen.

Das SP-A-Monomer im Molekulargewichtsbereich von 29-31 kDa fehlt bei allen Einzelfällen und bei 38,5% der Kontrollen, auch 22,6% der Patienten mit obstruktiver und 14,3% der Patienten mit nicht-obstruktiver Bronchitis zeigen keine 29-31 kDa-Bande. Mit Ausnahme eines Kindes aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe haben alle Kinder eine SP-A-Bande bei 54-60 kDa, die aber teilweise sehr schwach ausgeprägt ist.

In der folgenden Abbildung sind die Variationen im SP-A-Muster dargestellt, die bei Patienten und Kontrollen beobachtet werden können.

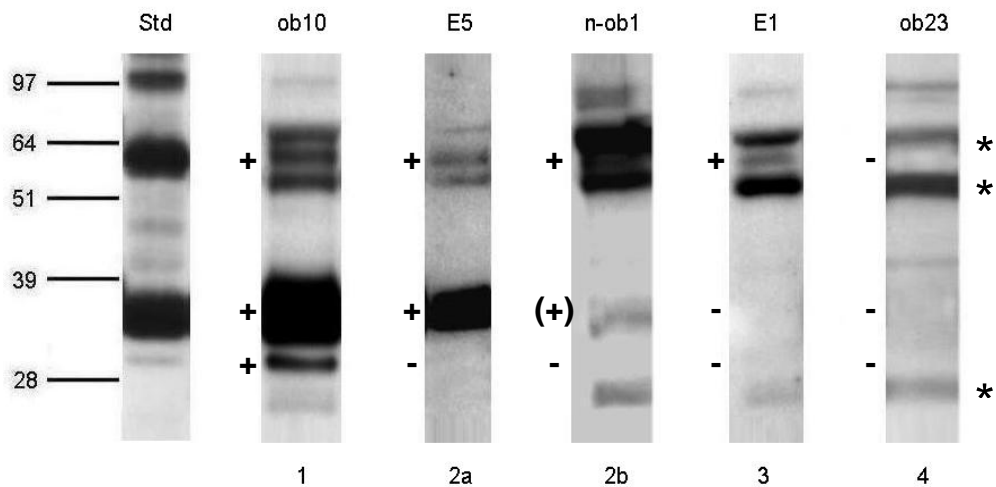


Abbildung 24: Darstellung der SP-A-Muster in der BAL bei Patienten in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-A, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit).

Std: SP-A^{PAP} 213 ng als Standard verwendet

ob10: positive Banden in den drei SP-A-Bereichen

E5: negatives SP-A-Monomer bei 29-31 kDa, positive SP-A-Hauptbande (33-37 kDa), positives SP-A-Dimer (54-60 kDa)

n-ob1: negatives SP-A-Monomer bei 29-31 kDa, stark abgeschwächte SP-A-Hauptbande (33-37 kDa), positives SP-A-Dimer (54-60 kDa)

E1: negatives SP-A-Monomer bei 29-31 kDa, negative SP-A-Hauptbande (33-37 kDa), positives SP-A-Dimer (54-60 kDa)

ob23: alle drei SP-A-Banden sind negativ

* unspezifische Banden

Drei positive SP-A-Formen (siehe Beispiel ob10) finden sich bei 77,4% der obstruktiven Bronchitis-Gruppe, 85,7% der nicht-obstruktiven Bronchitis Kinder und bei 61,5% der Kontrollen.

19,4% der obstruktiven und 7,1% der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe zeigen ebenso wie 38,5% der Kontrollkinder negative SP-A-Monomere im Bereich 29-31 kDa bei positiver SP-A-Hauptbande und positivem SP-A-Dimer (siehe Beispiel E5). Auch vier von fünf Einzelfällen haben dieses Muster.

Tabelle 3.20: Häufigkeit des Auftretens der SP-A-Formen in den einzelnen Gruppen

SP-A-Formen	Obstruktive Bronchitis (n = 31)	Nicht-obstruktive Bronchitis (n = 14)	Kontrollen (n = 13)	p
SP-A 3+				
ja	24	12	8	0,3263
nein	7	2	5	
SP-A 2+				
ja	6	1	5	0,1286
nein	25	13	8	

Erklärung:

SP-A 3+: drei positive SP-A-Formen

SP-A 2+: zwei positive SP-A-Formen

Die Häufigkeit des Auftretens von zwei oder drei SP-A-Formen in den unterschiedlichen Gruppen wurde mit dem χ^2 -Test berechnet. Die Einzelfälle wurden wegen der geringen Fallzahl nicht in die Berechnung miteinbezogen.

Die Häufigkeit des Auftretens von zwei (Gesamt-p = 0,1286) oder drei (Gesamt-p = 0,3263) positiven SP-A-Formen unterschied sich innerhalb der obstruktiven Bronchitis-Gruppe, der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe und der Kontrollgruppe nicht.

37-51 kDa:

Ein bis zwei Banden im Bereich 37-51 kDa können bei Patienten und Kontrollen beobachtet werden. Auch der SP-A-Standard zeigt zwei Banden in diesem Bereich, so dass es sich hierbei um weitere SP-A-Formen handeln dürfte.

Insgesamt haben 54,8% der obstruktiven Bronchitis-Patienten ein bis zwei Banden im Molekulargewichtsbereich 37-51 kDa wie auch 42,9% der nicht-obstruktiven Bronchitis-Patienten, drei von fünf Einzelfällen und 23,1% der Kontrollen.

In der folgenden Tabelle ist aufgeführt, wieviele Banden im Bereich 37-51 kDa in den verschiedenen Gruppen gefunden werden können.

Tabelle 3.21: 37-51 kDa-Banden in den verschiedenen Gruppen nach Inkubation mit spezifischem SP-A-Antikörper

	37-51 kDa		
	-	+	2+
Obstruktive Bronchitis (n = 31)	14	8	9
Nicht-obstruktive Bronchitis (n = 14)	8	4	2
Einzelfälle (n = 5)	2	2	1
Kontrollen (n = 13)	10	3	/

Erklärung:

- : keine Bande im Bereich 37-51 kDa
- +: eine Bande im Bereich 37-51 kDa
- 2+: zwei Banden im Bereich 37-51 kDa

65-100 kDa:

Bei 65-100 kDa sieht man bei allen Kindern aus der nicht-obstruktiven Gruppe und bei allen Kontrollen sowie bei 90,3% der obstruktiven Bronchitis-Patienten und bei 80% der Einzelfälle Banden, die auf nicht reduzierbare Aggregate zurückzuführen sind. Diese finden sich auch beim Standard.

Auffällige Patienten

Alle Patienten hatten eine stark ausgeprägte Hauptbande bei 33-37 kDa ausser drei Patienten.

Der Patient n-ob1 zeigt eine deutlich abgeschwächte Bande im Bereich 33-37 kDa. Dem Einzelfall E1 und dem obstruktiven Bronchitis-Patienten ob23 fehlt die SP-A-Hauptbande.

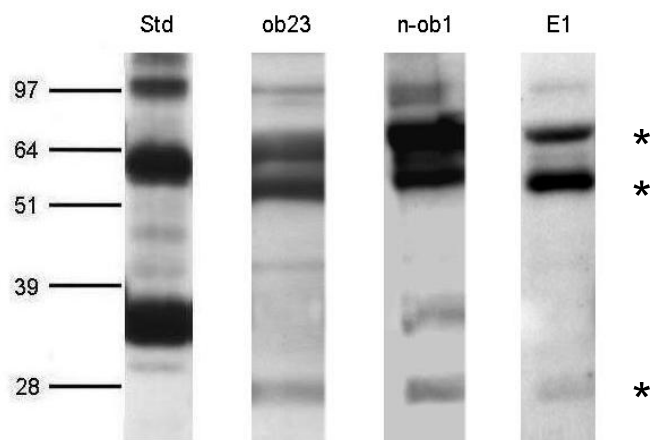


Abbildung 25: Darstellung auffälliger SP-A-Hauptbanden im Bereich 33-37 kDa bei drei Patienten in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-A, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit).

Std: SP-A^{PAP} 213 ng als Standard verwendet

ob 23: fehlende SP-A-Hauptbande, fehlendes SP-A-Monomer bei 29-31 kDa, fehlendes SP-A-Dimer (54-60 kDa)

n-ob1: schwache SP-A-Hauptbande, fehlendes SP-A-Monomer bei 29-31 kDa, positives SP-A-Dimer (54-60 kDa)

E1: fehlende SP-A-Hauptbande, fehlendes SP-A-Monomer bei 29-31 kDa, positives SP-A-Dimer (54-60 kDa)

* unspezifische Banden

Zusammenfassung

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass bei keinem Patienten mit chronischem Husten Degradationsprodukte von SP-A gefunden werden konnten.

Variationen im SP-A-Muster wurden sowohl bei Patienten als auch bei lungengesunden Kontrollkindern beobachtet. Signifikante Unterschiede zwischen Patientengruppen und Kontrollen konnten dabei nicht festgestellt werden.

Die SP-A-Hauptbande bei 33-37 kDa fehlte bei zwei Patienten und war bei einem Patienten nur sehr schwach ausgeprägt.

3.5.3 *Ergebnisse im SP-D-Detektionssystem 1*

Die BAL der Patienten mit chronischem Husten und der Kontrollkinder wurde auch hinsichtlich qualitativer Veränderungen des SP-D untersucht. Dazu wurden analog zu den SP-A-Versuchen die Proteine der BAL mittels 1-D-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Je Patient bzw. Kontrolle wurde BAL mit einer Gesamtproteinmenge von 5 μg aufgetragen. In einer anschließenden Westernblotanalyse wurde SP-D mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Kontrollen

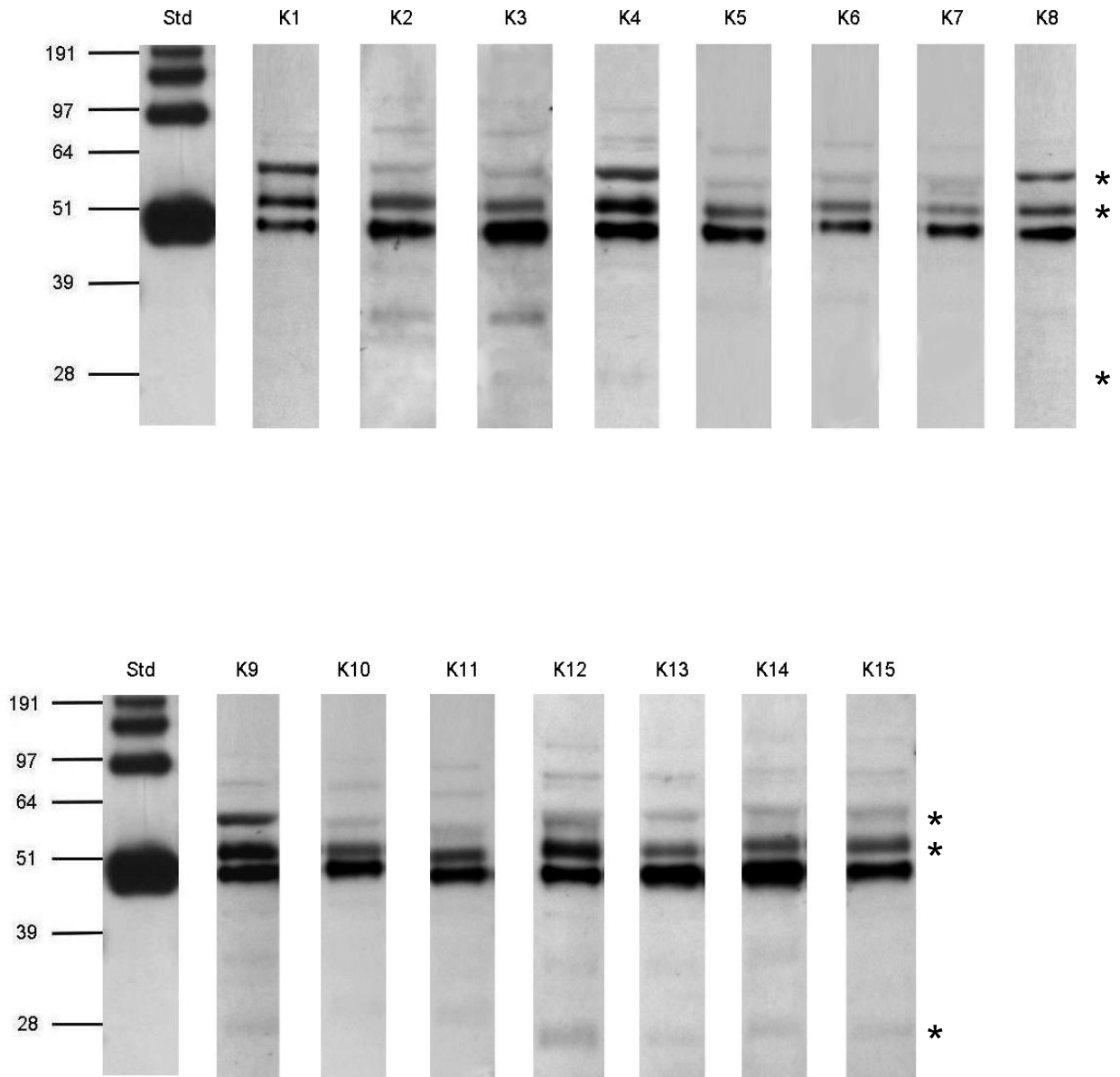


Abbildung 26: Darstellung des SP-D in der BAL bei Kontrollen in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit). Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

* unspezifische Banden

Obstruktive Bronchitis-Gruppe

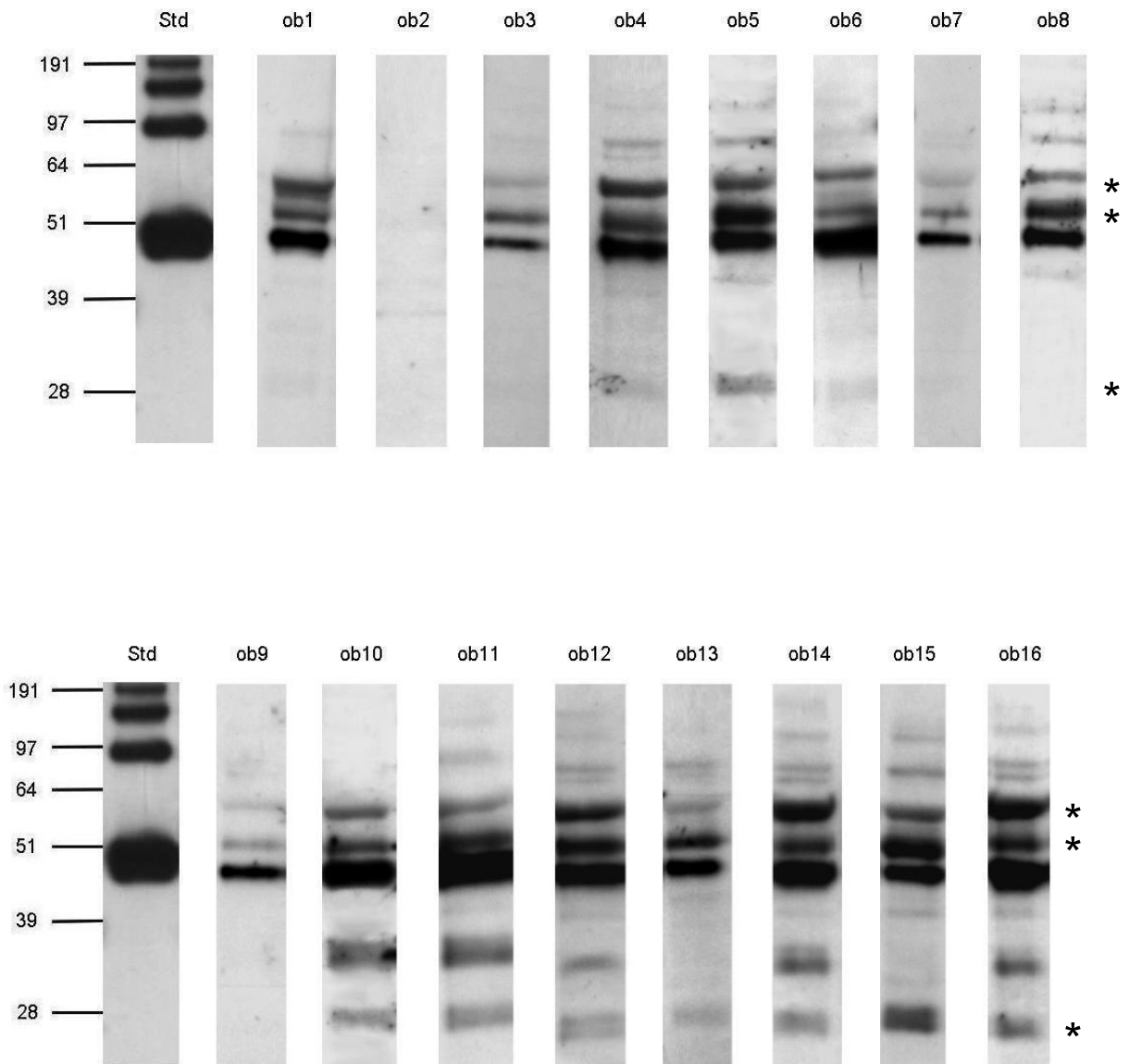


Abbildung 27: Darstellung des SP-D in der BAL bei Patienten aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit). Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

* unspezifische Banden

Obstruktive Bronchitis-Gruppe

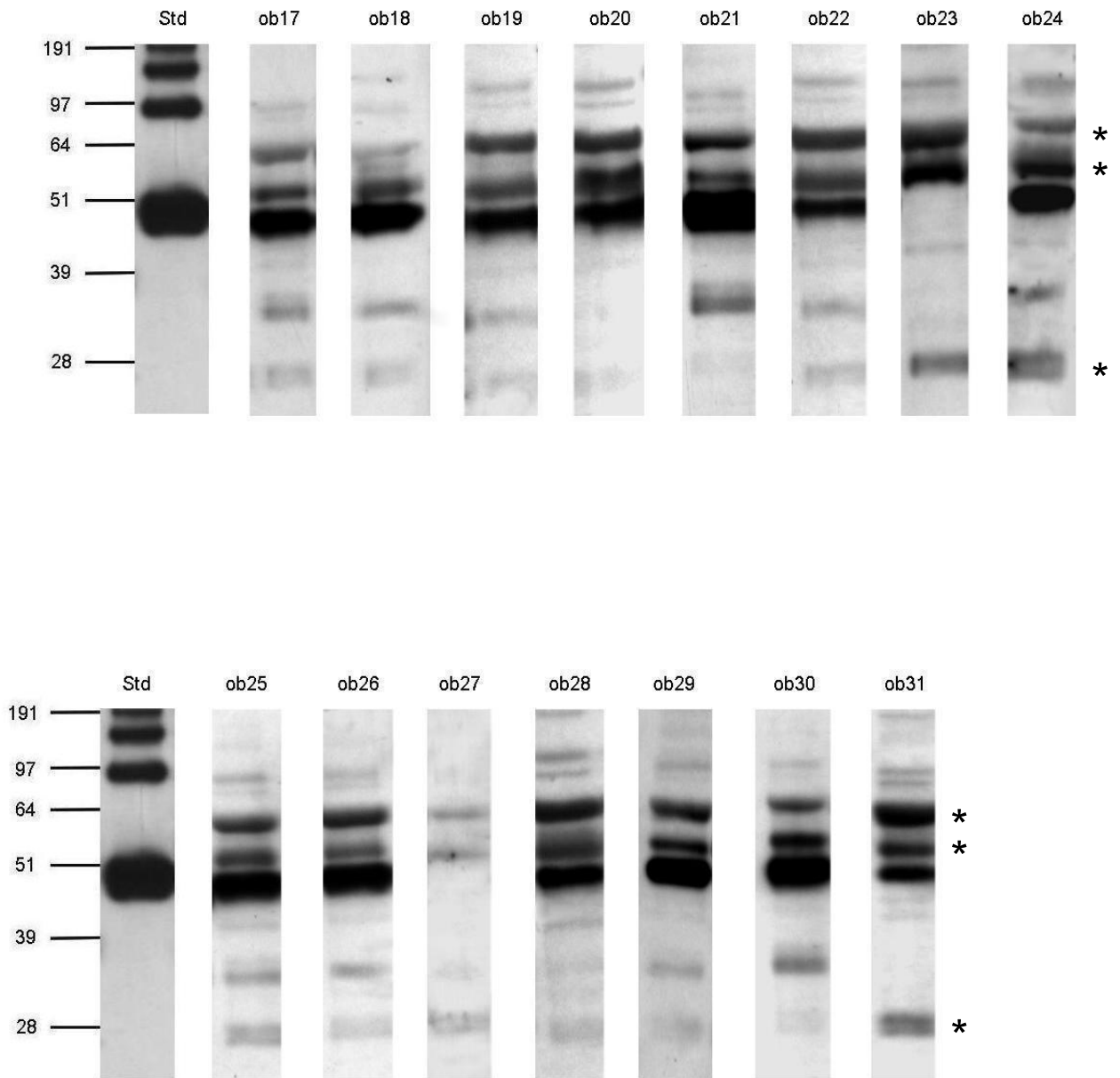


Abbildung 28: Darstellung des SP-D in der BAL bei Patienten aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit). Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

* unspezifische Banden

Nicht-obstruktive Bronchitis-Gruppe

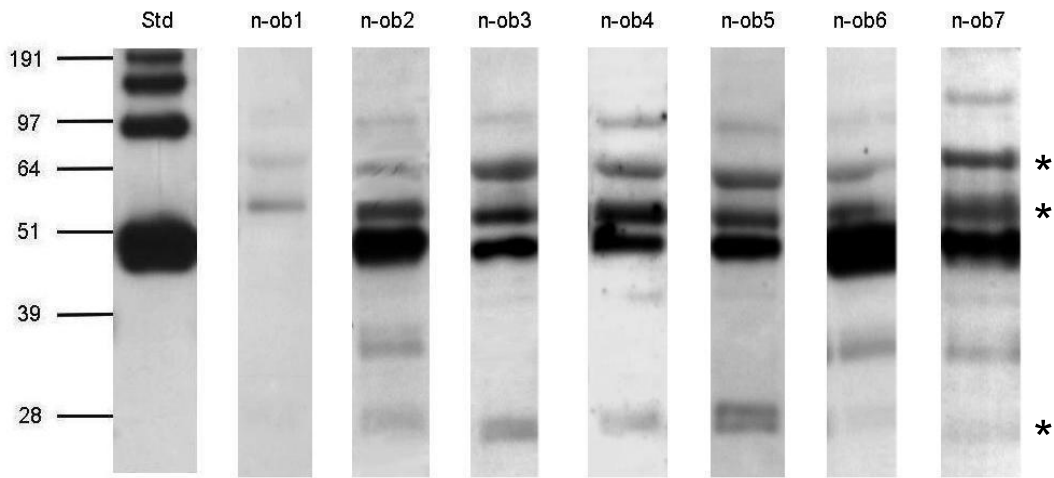


Abbildung 29: Darstellung des SP-D in der BAL bei Patienten aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit). Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

* unspezifische Banden

Einzelfälle

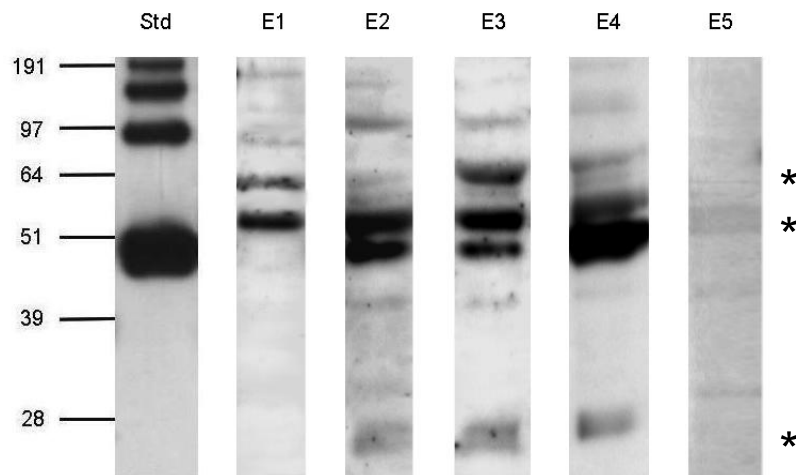


Abbildung 30: Darstellung des SP-D in der BAL bei den Einzelfällen in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit). Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

* unspezifische Banden

CF- und PAP-Patienten

Auch bei der qualitativen Untersuchung von SP-D stand die Frage im Vordergrund, ob sich bei Kindern mit chronischem Husten Degradationsprodukte erkennen lassen. Deshalb wurde zum Vergleich die BAL von einem CF- Patienten elektrophoretisch untersucht, um eventuelle Positivkontrollen für proteolytische Fragmente zu gewinnen. Zum weiteren Vergleich wurde auch die BAL von einem Alveolarproteinose-Patienten untersucht.

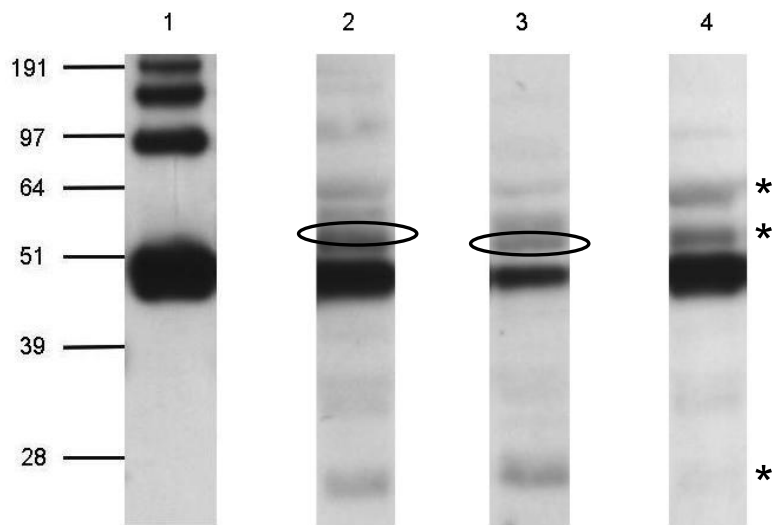


Abbildung 31: Darstellung des SP-D bei einem Patienten mit Alveolarproteinose, einem CF-Patienten und einem Kind mit nicht-obstruktiver Bronchitis in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti hum SP-D, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti rabbit, POX).

Lane 1: SP-D^{PAP} 16,4 ng

Lane 2: PAP-Patient, 5 µg Gesamtprotein

Lane 3: CF-Patient, 5 µg Gesamtprotein

Lane 4: Patient mit nicht-obstruktiver Bronchitis (n-ob11), 5 µg Gesamtprotein

* unspezifische Banden

Der Alveolarproteinose- und der CF-Patient haben wie das Kind mit nicht-obstruktiver Bronchitis eine deutliche SP-D-Bande im Bereich 47-51 kDa. Auch die beschriebenen zusätzlichen Banden zeigen keinen Unterschied zwischen diesen Patienten.

Sowohl der Alveolarproteinose-Patient in Lane 2 als auch der CF-Patient in Lane 3 weisen darüberhinaus eine schmale Bande im Molekulargewichtsbereich von ungefähr 58 kDa auf. Es könnte sich bei dem CF-Patienten um zwei proteolytisch abgespaltene niedermolekulare SP-D Fragmente handeln, die sich zu einem Dimer zusammengelagert haben und somit als Bande im höhermolekularen Bereich sichtbar werden [Wiesener A; Proteolytische Degradation von SP-D; 2002].

Da aber auch der Alveolarproteinose-Patient eine Bande in diesem Molekulargewichtsbereich zeigt, erscheint es eher unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um ein Degradationsprodukt handelt.

Übersicht der verschiedenen im SP-D-System 1 nachgewiesenen Banden

Die nächste Tabelle zeigt eine Übersicht über alle Banden, die im SP-D-System 1 in den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden können.

Tabelle 3.22: Übersicht über alle im SP-D-System 1 nachgewiesenen Banden

Molekulargewichtsbereich (kDa)	Obstruktive Bronchitis (n = 31)	Nicht-obstruktive Bronchitis (n = 14)	Einzelfälle (n = 5)	Kontrollen (n = 15)
0-25	0	0	0	0
25-28*	27	14	5	14
33	1	0	2	0
35-38	16	7	0	6
43♣	21	8	4	5
47-51♣	28	13	3	15
51-54*	30	14	5	15
58	2	1	2	0
60-65*	30	14	5	15
65-100	28	13	4	12

Erklärung:

n = Anzahl der Patienten einer Gruppe, die im jeweiligen Molekulargewichtsbereich eine Bande zeigen

*: siehe Tabelle 3.23

♣: siehe Tabelle 3.24

Im Molekulargewichtsbereich 0-25 kDa können in keiner Gruppe Banden nachgewiesen werden.

Unspezifische Proteinbanden

Auch auf den SP-D-Blots finden sich neben den spezifischen SP-D-Banden die bekannten unspezifischen Banden (siehe Tabelle 3.18 und 3.23). In den Molekulargewichtsbereichen 51-54 kDa und 60-65 kDa zeigen sich meist kräftige Banden, während die Banden im Bereich 25-28 kDa in ihrer Intensität schwächer sind.

Tabelle 3.23: Unspezifische Proteinbanden in den verschiedenen Gruppen nach Inkubation mit spezifischem SP-D-Antikörper

Gruppe	25-28 kDa	51-54 kDa	60-65 kDa	Anzahl der Kinder
Obstruktive Bronchitis (n = 31)	+	+	+	27
	-	+	+	3
	-	-	-	1
Nicht-obstruktive Bronchitis (n = 14)	+	+	+	14
Einzelfälle (n = 5)	+	+	+	5
Kontrollen (n = 15)	+	+	+	14
	-	+	+	1

Mit Ausnahme eines Patienten mit obstruktiver Bronchitis (ob2), der keine unspezifischen Banden zeigt, haben die restlichen untersuchten Kinder Banden im Bereich von 51-54 kDa und 60-65 kDa analog zu den Ergebnissen der SP-A-Blots. Die Mehrzahl der untersuchten Kinder zeigt 25-28 kDa-Banden, insgesamt 87,1% der obstruktiven Kindern, alle nicht-obstruktiven-Bronchitis-Patienten, alle Einzelfälle und 93,3% der Kontrollen.

Spezifische SP-D-Formen

Spezifisches SP-D wird bei Patienten und Kontrollen mit einer Hauptbande bei 47-51 kDa und bei 43 kDa gefunden. Die Bande im Molekulargewichtsbereich 43 kDa ist meist sehr schwach ausgeprägt.

In der folgenden Tabelle sind die unterschiedlichen Proteinmuster, die durch die beschriebenen zwei spezifischen SP-D-Banden gebildet werden, dargestellt.

Tabelle 3.24: SP-D-Muster in den verschiedenen Gruppen nach Inkubation mit spezifischem SP-D-Antikörper

Gruppe	43 kDa	47-51 kDa	Anzahl der Kinder	Bandenvariation
Obstruktive Bronchitis (n = 31)	+	+	19	1
	-	+	9	2
	+	-	2	3
	-	-	1	4
Nicht-obstruktive Bronchitis (n = 14)	+	+	8	1
	-	+	5	2
	-	-	1	4
Einzelfälle (n = 5)	+	+	3	1
	+	-	1	3
	-	-	1	4
Kontrollen (n = 15)	+	+	5	1
	-	+	10	2

Eine Hauptbande bei 47-51 kDa wird bei 90,3% der obstruktiven und bei 92,9% der nicht-obstruktiven Bronchitis Kinder beobachtet, ebenso bei drei der fünf Einzelfällen. Demgegenüber fehlt keinem Kind aus der Kontrollgruppe die SP-D-Bande bei 47-51 kDa.

Insgesamt zeigen 67,7% der obstruktiven Bronchitis-Kinder, 57,1% der Patienten mit nicht-obstruktiver Bronchitis, vier von fünf Einzelfällen und 33,3% der Kontrollen eine Bande im Molekulargewichtsbereich 43 kDa.

In der folgenden Abbildung sind die Variationen im SP-D-Muster dargestellt, die man bei Patienten und Kontrollen beobachten kann.

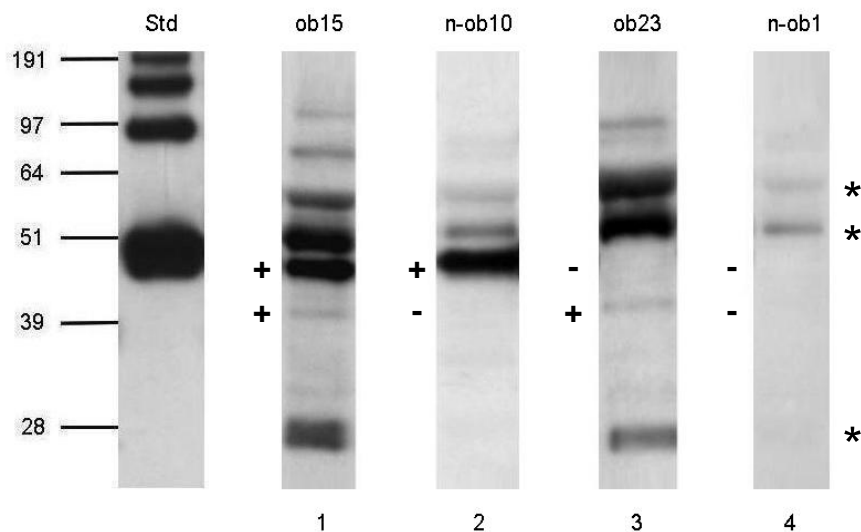


Abbildung 32: Darstellung der SP-D-Muster in der BAL bei Patienten in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti hum SP-D, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti rabbit).

Std: SP-D^{PAP} 16,4 ng als Standard verwendet

ob15: positive Banden bei 43 kDa und 47-51 kDa

n-ob10: fehlende 43 kDa-Bande bei positiver 47-51 kDa-Bande

ob23: fehlende 47-51 kDa-Bande bei positiver 43 kDa-Bande

n-ob1: fehlende 43 kDa- und 47-51 kDa-Bande

* unspezifische Banden

Zwei positive SP-D-Formen (siehe Beispiel ob15) finden sich bei 61,3% der obstruktiven Bronchitis-Kinder, 57,1% der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe, zwei von fünf Einzelfällen und 33,3% der Kontrollen.

Die Bandenvariation 2 (siehe Beispiel n-ob10) mit negativer 43 kDa-Bande bei positiver Bande im Bereich 47-51 kDa zeigt sich bei 29% der obstruktiven-Bronchitis- und 35,7% der nicht-obstruktiven-Bronchitis-Gruppe, außerdem bei einem von fünf Einzelfällen und 66,7% der Kontrollkinder.

6,5% der Patienten mit obstruktiver Bronchitis und einer von fünf Einzelfällen haben das SP-D-Muster 3 mit negativer 47-51 kDa-Bande bei positiver 43 kDa-Bande (siehe Beispiel ob23).

Fehlende SP-D-Banden sowohl bei 43 kDa als auch bei 47-51 kDa (siehe Beispiel n-ob1) können jeweils bei einem Kind aus der obstruktiven und einem Kind aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe sowie bei einem Einzelfall beobachtet werden.

Tabelle 3.25: Häufigkeit des Auftretens der SP-D-Formen in den einzelnen Gruppen

SP-D-Formen	Obstruktive Bronchitis (n = 31)	Nicht-obstruktive Bronchitis (n = 14)	Kontrollen (n = 15)	p
SP-D 2+				
ja	19	8	5	0,1939
nein	12	6	10	
SP-D 1+				
<i>47-51 kDa</i>				
ja	9	5	10	0,0472
nein	22	9	5	
<i>43 kDa</i>				
ja	2	0	0	0,3799
nein	29	14	15	

Erklärung:

SP-D 2+: zwei positive SP-D-Formen

SP-D 1+: eine positive SP-D-Form im Bereich 47-51 kDa oder bei 43 kDa

Die Häufigkeit des Auftretens von einer SP-D-Form bzw. zwei SP-D-Formen in den unterschiedlichen Gruppen wurde mit dem χ^2 -Test berechnet. Die Einzelfälle wurden wegen der geringen Fallzahl nicht in die Berechnung miteinbezogen.

Es konnte weder ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens von zwei positiven SP-D-Formen (Gesamt-p = 0,1939) oder einer positiven SP-D-Form bei 43 kDa (Gesamt-p = 0,3799) zwischen der obstruktiven Bronchitis-Gruppe, der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe und der Kontrollgruppe gefunden werden.

Eine positive 47-51 kDa-SP-D-Form zeigte sich in der Kontrollgruppe signifikant häufiger (Gesamt-p = 0,0472) als in der obstruktiven Bronchitis-Gruppe.

65-100 kDa:

Bei 90,3% der Kinder mit obstruktiver und bei 92,9% der Kinder mit nicht-obstruktiver Bronchitis können höhermolekulare Banden gefunden werden. Diese zeigen sich auch bei vier von fünf Einzelfällen und 80% der Kontrollen. Diese Banden vor allem im Bereich 65 bis 100 kDa sind auch beim Standard darstellbar. Es handelt sich hierbei um nicht-reduzierbare Aggregate.

Patienten und Kontrollen mit einer 35-38 kDa-Bande

Bei knapp der Hälfte der untersuchten Patienten und bei sechs Kontrollen können zusätzliche Banden im Bereich 35-38 kDa gefunden werden. Diese Kinder sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

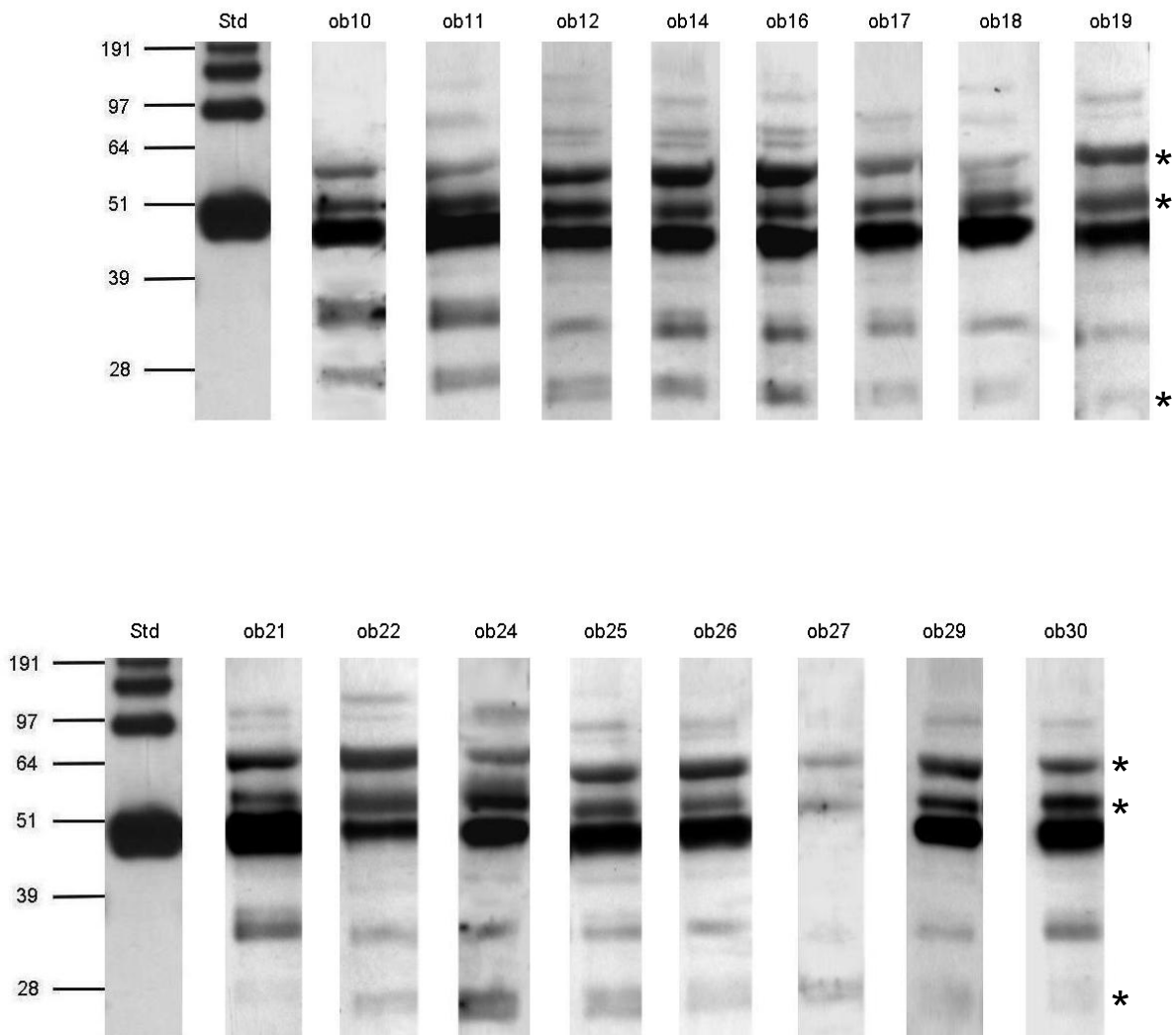


Abbildung 33: Darstellung der Patienten mit einer 35-38 kDa-Bande in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit). Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

* unspezifische Banden

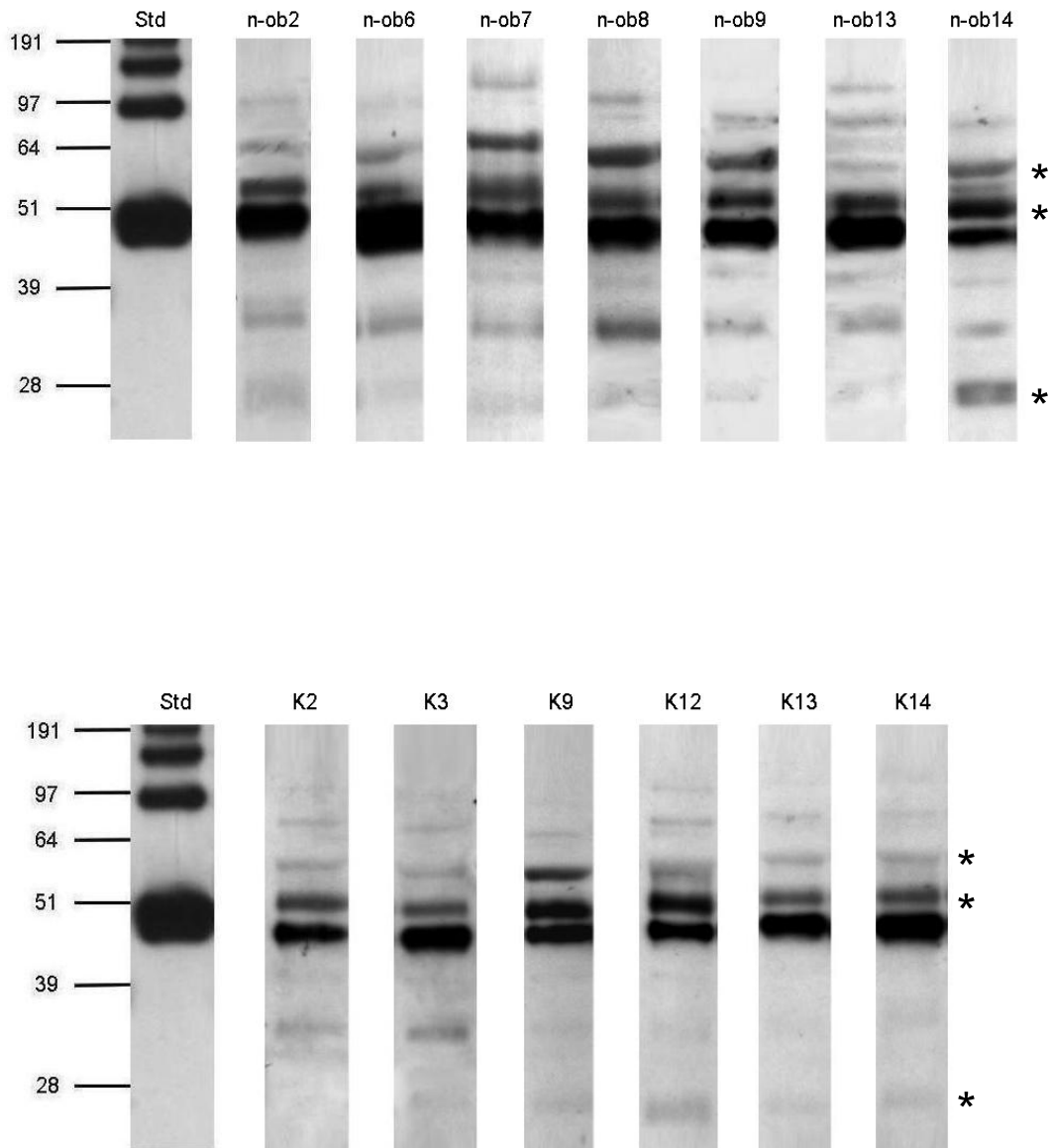


Abbildung 34: Darstellung der Patienten und Kontrollen mit einer 35-38 kDa-Bande-Bande in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit). Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

* unspezifische Banden

Deutliche Banden im Molekulargewichtsbereich 35-38 kDa haben 51,6% der Patienten aus der obstruktiven und 50% der Patienten aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe. Auch 40% der Kontrollen zeigen 35-38 kDa-Banden, wobei diese bei K2 und K3 deutlich ausgeprägt und bei K9, K12, K13 und K14 nur schwach sichtbar sind. Bei keinem Einzelfall kann eine Bande in diesem Bereich entdeckt werden. Im Serum konnte beim Auftragen von 6 µg Gesamtprotein keine 35-38 kDa-Bande gefunden werden. Vermutlich handelt es sich bei dieser Bande um eine besondere SP-D-Form oder um ein Degradationsprodukt.

Patienten mit fehlender SP-D-Bande

Auffällige Patienten mit negativer SP-D-Bande sind in folgender Abbildung dargestellt.

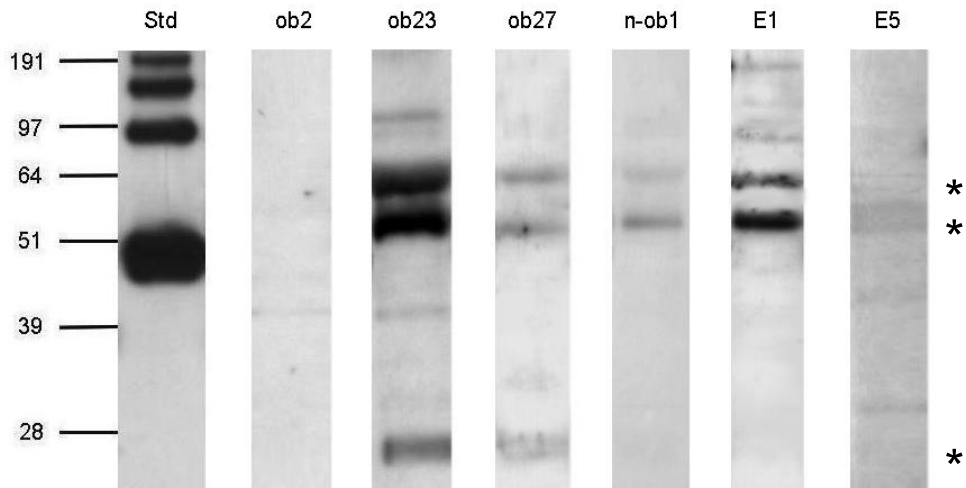


Abbildung 35: Darstellung der Patienten mit fehlender SP-D-Bande in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti hum SP-D, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti rabbit). Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

* unspezifische Banden

Bei insgesamt sechs Patienten kann keine SP-D-Bande im Bereich 47-51 kDa gefunden werden. Drei dieser Patienten sind aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe, ein Patient stammt aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe und zwei Patienten gehören zu den Einzelfällen.

Drei Patienten (ob2, ob23, E5) haben eine Bande bei ungefähr 43 kDa.

Ob23 und E1 weisen schwache Banden mit höherem Molekulargewicht auf

Bei insgesamt sechs Patienten erscheinen im SP-D-System weitere Banden, die in der folgenden Abbildung dargestellt sind. Zwei Patienten aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe, ein Kind mit nicht-obstruktiver Bronchitis und zwei Einzelfälle haben eine schmale Bande bei ungefähr 58 kDa, die bei der lungengesunden Kontrollgruppe nicht beobachtet werden kann. Darüberhinaus zeigt sich bei zwei Einzelfällen und einem Patienten mit obstruktiver Bronchitis eine schwache Bande im Molekulargewichtsbereich von ca. 33 kDa. Bei diesen Banden könnte es sich um Degradationsprodukte des SP-D handeln.

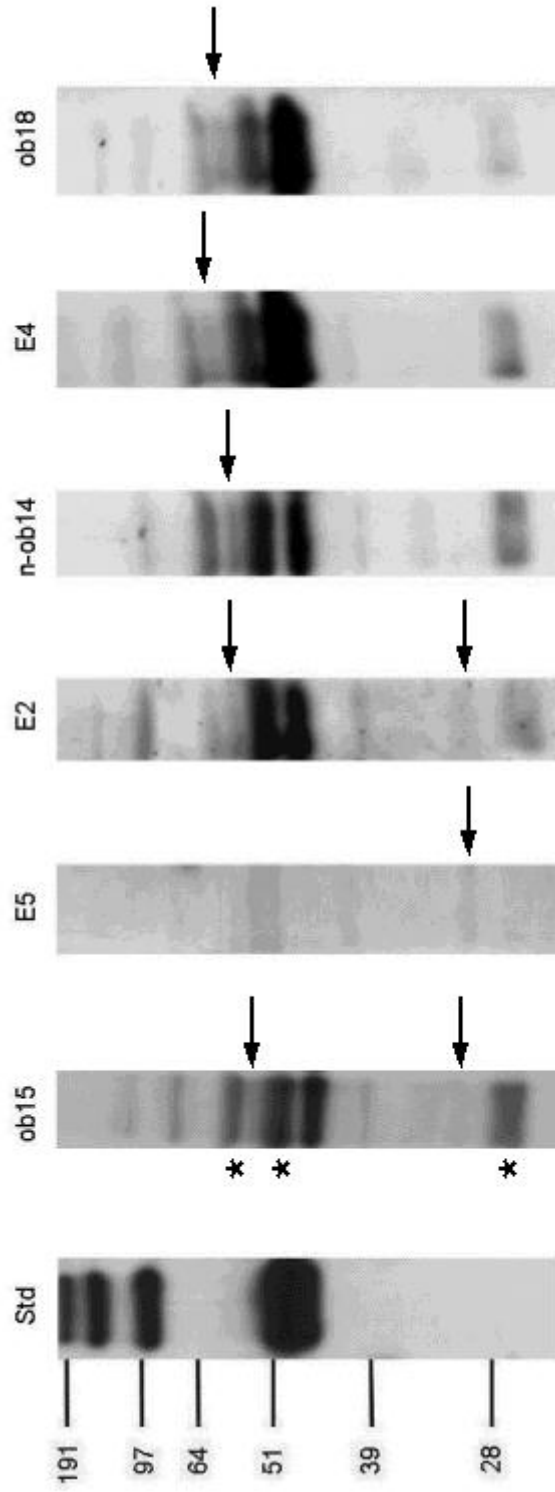


Abbildung 36: Darstellung der Patienten mit zusätzlichen Banden im SP-D-System 1 in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti- hum SP-D, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit).

Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

* unspezifische Banden

.Zusammenfassung

Nach Untersuchung der BAL im SP-D-System 1 kann man feststellen, dass man Variationen im SP-D-Muster sowohl bei Patienten als auch bei lungengesunden Kontrollkindern beobachten konnte.

In der Kontrollgruppe konnte signifikant häufiger eine Bande bei 47-51 kDa beobachtet werden als in der obstruktiven Bronchitis-Gruppe.

In jeder Krankheitsgruppe wurde mindestens ein Patient mit fehlender SP-D-Hauptbande bei 47-51 kDa gefunden.

Darüberhinaus zeigten sich in den drei Patientengruppen einzelne Kinder mit zusätzlichen Banden, die vermutlich Degradationsprodukte von SP-D sind und weiter analysiert werden müssen.

3.5.4 Vergleich von Ergebnissen der SP-D- und SP-A-Detektionssysteme 1 mit Zellbild und klinischen Daten

35-38 kDa-Bande im SP-D-Detektionssystem 1 und Zellbild

Um zu klären, ob ein Zusammenhang zwischen Vorhandensein einer 35-38 kDa-Bande und der Zytologie besteht, wurde das Zellbild der Kinder mit positiver 35-38 kDa-Bande mit dem Zellbild der Kinder mit negativer 35-38 kDa-Bande gezielt miteinander verglichen. Die Ergebnisse der Patienten mit obstruktiver und nicht-obstruktiver Bronchitis und der Kontrollen sind in den folgenden drei Tabellen dargestellt.

Tabelle 3.26: Vergleich der obstruktiven Bronchitis Patienten mit positiver und negativer 35-38 kDa-Bande bzgl. der BAL-Zytologie

	obstruktive Bronchitis		p
	positive 35-38 kDa-Bande	negative 35-38 kDa-Bande	
<i>Anzahl</i>	<i>15-16/16</i>	<i>13-14/15</i>	
Gesamtzellzahl (*10 ⁴ /ml)	15,3 (9,5;21) [5,5-35] 16	16,1 (11,8;40,5) [2,1-114,4] 14	0,3714
Makrophagen (%)	78 (68;89) [35,5-94] 15	79 (67;88) [22-95] 13	0,9449
Lymphozyten (%)	11 (6,5;21,5) [3-52,5] 15	10 (4;19,5) [1-35] 13	0,6446
Neutrophile (%)	3 (2;15) [0-40] 15	3 (2;9) [1-76] 13	0,7819
Eosinophile (%)	0 (0;2,5) [0-4] 15	0 (0;1,5) [0-4] 13	0,9253

Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.

Tabelle 3.27: Vergleich der nicht-obstruktiven Bronchitis Patienten mit positiver und negativer 35-38 kDa-Bande bzgl. der BAL-Zytologie

	Nicht-obstruktive Bronchitis		p
	positive 35-38 kDa-Bande	negative 35-38 kDa-Bande	
<i>Anzahl</i>	7/7	7/7	
Gesamtzellzahl (*10 ⁴ /ml)	13 (6,3;26,8) [5,4-59,5] 7	18 (15;36,8) [7,5-44,5] 7	0,2086
Makrophagen (%)	90 (87;96,3) [25-98] 7	63 (57,5;91,5) [26-97] 7	0,1649
Lymphozyten (%)	7,2 (5,8;18,5) [2-25] 7	14 (12;28,5) [2-30] 7	0,1282
Neutrophile (%)	1 (0,7;20,3) [0-37,5] 7	7 (3,5;31) [0-37] 7	0,2593
Eosinophile (%)	0 (0;1) [0-1] 7	1 (0;5,5) [0-10] 7	0,4557

Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.

Tabelle 3.28: Vergleich der Kontrollen mit positiver und negativer 35-38 kDa-Bande bzgl. der BAL-Zytologie

	Kontrollen		p
	positive 35-38 kDa-Bande	negative 35-38 kDa-Bande	
<i>Anzahl</i>	5/6	9/9	
Gesamtzellzahl (*10 ⁴ /ml)	8 [5-33] 5	10,9 (8,5;18,5) [4,9-82] 9	0,7972
Makrophagen (%)	91 [77-94] 5	89 (84,5;93) [81-98] 9	0,8981
Lymphozyten (%)	8 [5-23] 5	10 (5,5;14) [2-15] 9	1
Neutrophile (%)	1 [0-3] 5	1 (0,5;2) [0-4] 9	0,5185
Eosinophile (%)	0 [0-1] 5	0 (0;0) [0-1] 9	0,7972

Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.

Es konnten für keine der drei Gruppen signifikante Unterschiede in der Differentialzytologie zwischen Kindern mit vorhandener bzw. fehlender 35-38 kDa-Bande festgestellt werden. Insbesondere unterschied sich die Zahl der Neutrophilen nicht, was gegen die Anwesenheit von freier Elastase und konsekutiver Degradationsprodukte spricht.

Vergleich von Patienten mit fehlendem SP-D bei 47-51 kDa bzw. fehlender SP-A-Hauptbande bei 33-37 kDa mit klinischen Ergebnissen

In der folgenden Tabelle sind klinische Daten und ELISA-Ergebnisse der Patienten, die keine SP-D-Hauptbande bei 47-51 kDa zeigen (ob2, ob23, ob27, n-ob1, E1, E5), aufgeführt.

Darüberhinaus fehlt die SP-A-Hauptbande bei 33-37 kDa zusätzlich bei den Patienten ob23 und E1, bei dem Patienten n-ob1 ist diese sehr schwach ausgeprägt. Die drei Patienten, die Auffälligkeiten sowohl im SP-D- als auch im SP-A-Detektionssystem 1 zeigen, sind in der folgenden Tabelle *kursiv* dargestellt.

Tabelle 3.29: klinische Daten der Patienten mit fehlender 47-51 kDa-Bande

	ob2	ob23	ob27	n-ob1	E1	E5
Alter der ersten Symptome (Jahre)	1,9	<i>0,0</i>	3,2	<i>0,3</i>	<i>10,0</i>	0,0
Krankheitsdauer bis zur Bronchoskopie (Jahre)	10,0	<i>3,4</i>	2,0	<i>9,0</i>	<i>0,3</i>	6,0
Grundkrankheit der Einzelfälle	/	/	/	/	<i>Amyloidose</i>	Chron. Granulomatose
Immunsuppression	nein	<i>nein</i>	nein	<i>nein</i>	<i>ja</i>	ja
Pneumonie(n) (Anzahl)	2	<i>10</i>	11	<i>2</i>	<i>0</i>	>2
Asthma	ja	<i>nein</i>	ja	<i>nein</i>	<i>nein</i>	nein
Pseudokrupp (Anzahl)	2	<i>nein</i>	nein	<i>>2</i>	<i>n.b.</i>	n.b.
Pertussis	nein	<i>nein</i>	nein	<i>ja (0,6 Jahre vor BAL)</i>	<i>n.b.</i>	n.b.
Verlauf nach BAL	besser	<i>besser</i>	besser	<i>gesund</i>	<i>besser</i>	verstorben
Follow up Zeitraum nach BAL (Jahre)	2	<i>3,8</i>	1,8	<i>2,8</i>	<i>2,3</i>	0,2
Gesamtprotein (µg/ml)	17,2	<i>45,0</i>	53,2	<i>151,1</i>	<i>96,2</i>	51,1
SP-D (ng/ml)	nicht messbar	<i>nicht messbar</i>	nicht messbar	<i>nicht messbar</i>	<i>nicht messbar</i>	nicht messbar
SP-A (ng/ml)	160,0	<i>219,8</i>	434,5	<i>507,1</i>	<i>nicht messbar</i>	300,6
SP-A-Hauptbande (Blot)	positiv	<i>negativ</i>	positiv	<i>sehr schwach</i>	<i>negativ</i>	positiv

Abkürzung: n.b. = nicht bekannt

Die Patienten ob23 und E5 zeigen einen sehr frühen Krankheitsbeginn mit den ersten Symptomen bereits seit Geburt bestehend. Das Alter der ersten Symptome der obstruktiven Gruppe liegt bei 0,5 ([0-11,2] 31) = Median ([Min-Max] n), der nicht-obstruktiven Gruppe bei 0,5 ([0-16] 12) und der Einzelfälle bei 5,2 ([0-13,5] 4) Jahren.

Bis zur Bronchoskopie dauerte die Erkrankung in der obstruktiven Gruppe 2,5 Jahre ([0,25-10] 31), der Patient ob2 zeigt hierbei mit 10 Jahren einen sehr langen Krankheitsverlauf. Ebenso hat der Patient n-ob1 mit 9 Jahren eine lange Krankengeschichte verglichen mit der Krankheitsdauer der nicht-obstruktiven Gruppe von 1,6 Jahren ([0,5-9] 12). Auch bei den Einzelfällen mit einer Dauer der Erkrankung von 0,25 Jahren ([0,25-6] 4) zeigt der Patient E5 mit 6 Jahren einen langen Verlauf der Krankheit.

Die beiden Einzelfälle waren im Rahmen ihrer Grundkrankheit immunsupprimiert.

Der Patient E5 ist an seiner Grundkrankheit (chronische Granulomatose) verstorben. Die anderen fünf Patienten mit fehlender SP-D-Bande bei 47-51 kDa und teilweise fehlender SP-A-Hauptbande bei 33-37 kDa zeigten im Verlauf nach der Bronchoskopie eine Verbesserung ihres klinischen Zustandes.

Patienten ohne Nachweis einer SP-D-Bande bei 47-51 kDa hatten signifikant häufiger viel (≥ 10) Pneumonien als Patienten mit SP-D-Nachweis (siehe Tabelle 3.30; $p = 0,0376$ im Fisher-Exact-Test).

Entsprechend einer negativen SP-D-Bande in der SDS-Elektrophorese lag bei diesen Patienten SP-D im ELISA unterhalb der Nachweisgrenze. Auffällig ist, dass diese Patienten im ELISA sehr bis relativ niedriges SP-A hatten. In der obstruktiven Bronchitis-Gruppe wurde ein SP-A von 2780 ng/ml ([160-10770] 31) gemessen, in der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe 3132 ng/ml ([507,1-9807] 14) und bei den Einzelfällen 2554 ng/ml ([300,6-5404] 4). Wie unter 3.4.2 beschrieben konnte allerdings keine Korrelation zwischen der SP-A- und SP-D-Konzentration in den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden. Der Patient ob2 zeigte darüberhinaus auch noch ein sehr geringes Gesamtprotein von 17,2 $\mu\text{g/ml}$, in der obstruktiven Gruppe wurden 73,7 $\mu\text{g/ml}$ ([17,2-207,1] 31) gemessen.

Auch Patienten mit einem SP-D-Mangel im ELISA hatten signifikant häufiger viel (≥ 10) Pneumonien als Patienten mit nachweisbarem SP-D (siehe Tabelle 3.31; $p = 0,0210$ im Fisher-Exact-Test).

Tabelle 3.30: Häufigkeit von viel Pneumonien und Nachweis bzw. Fehlen einer SP-D-Bande bei 47-51 kDa

Anzahl der Pneumonien	SP-D bei 47-51 kDa (Western Blot)		p
	positiv	negativ	
< 10	41	4	0,0376
>/= 10	1	2	

Die Häufigkeit von viel Pneumonien bei Patienten mit bzw. ohne Nachweis von SP-D bei 47-51 kDa wurde mit dem Fisher-Exact-Test berechnet. Zwei Patienten (n-ob8 und E2) wurden ausgeschlossen, da bei ihnen nicht bekannt ist, ob sie an Pneumonien erkrankt sind.

Tabelle 3.31: Häufigkeit von viel Pneumonien und Nachweis bzw. Fehlen von SP-D im ELISA

Anzahl der Pneumonien	SP-D im ELISA		p
	positiv	negativ	
< 10	34	11	0,0210
>/= 10	0	3	

Die Häufigkeit von viel Pneumonien bei Patienten mit bzw. ohne Nachweis von SP-D im ELISA wurde mit dem Fisher-Exact-Test berechnet. Zwei Patienten (n-ob8 und E2) wurden ausgeschlossen, da bei ihnen nicht bekannt ist, ob sie an Pneumonien erkrankt sind.

3.5.5 Charakterisierung der SP-A- und SP-D-Detektionssysteme 2

Das unter 3.5.1 bis 3.5.3 verwendete Detektionssystem erkennt neben den spezifischen SP-A- und SP-D-Banden zusätzliche Banden. In weiteren Kontrollexperimenten wurde schließlich gefunden, dass diese Banden durch eine unspezifische Reaktion des zweiten Antikörpers zustande kommen. Ein Fab-gereinigter Antikörper hatte diese Reaktion nicht. Daher wurde zur weiteren Bandenanalyse unter sonst gleichbleibenden Bedingungen der zweite Antikörper durch den Fab-gereinigten Antikörper ersetzt. Teilweise wurden alte Membranen nach Strippen mit diesem neuen Antikörper nachinkubiert, z.T. wurde eine erneute 1-D-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blotting durchgeführt.

Vergleich der SP-A-Detektionssysteme 1 und 2

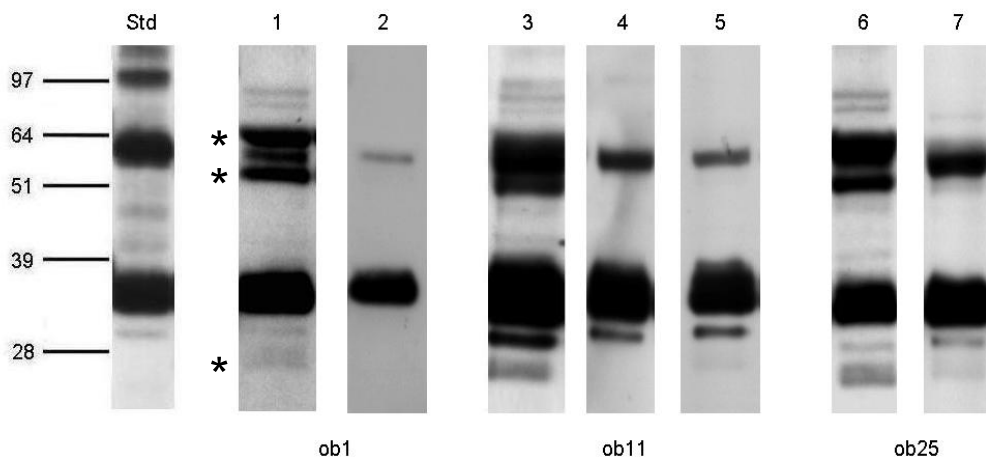


Abbildung 37: Darstellung des SP-A bei drei Patienten in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-A, polyklonal) und zwei verschiedene zweite Antikörper [goat anti-rabbit (System 1) und goat anti-rabbit Fab- gereinigt (System 2)].

Als Standard (Std) wurde SP-A^{PAP} 213 ng verwendet.

Lane 1: System 1

Lane 2: System 2, Nachinkubation

Lane 3: System 1

Lane 4: System 2, Nachinkubation

Lane 5: System 2

Lane 6: System 1

Lane 7: System 2

* unspezifische Banden

Vergleich der SP-A-Detektionssysteme 1 und 2

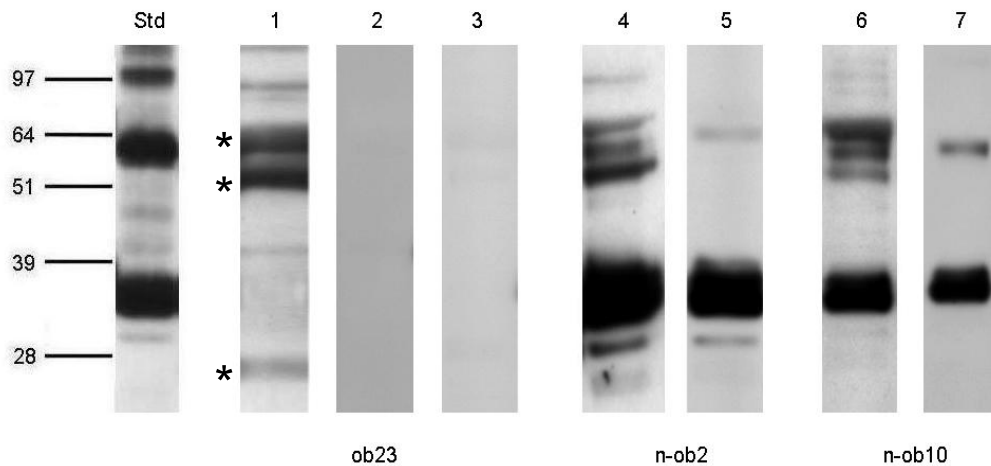


Abbildung 38: Darstellung des SP-A bei drei Patienten in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-A, polyklonal) und zwei verschiedene zweite Antikörper [goat anti-rabbit (System 1) und goat anti-rabbit Fab-gereinigt (System 2)].

Als Standard (Std) wurde SP-A^{PAP} 213 ng verwendet.

Lane 1: System 1

Lane 2: System 2, Nachinkubation

Lane 3: System 2

Lane 4: System 1

Lane 5: System 2

Lane 6: System 1

Lane 7: System 2, Nachinkubation

* unspezifische Banden

Beim Vergleich der beiden SP-A-Detektionssysteme sieht man deutlich, dass die Banden in den Bereichen 25-28 kDa, 51-54 kDa und 60-65 kDa mit Verwendung des neuen zweiten Antikörpers sehr viel schwächer werden bzw. teilweise ganz verschwinden. Die SP-A-Banden bei 29-31 kDa, 33-37 kDa und 54-60 kDa zeigen in ihrer Intensität kaum eine Veränderung. Das SP-A-Monomer bei 29-31 kDa ist, falls vorhanden, auch hier oft nur sehr schwach ausgeprägt.

Die Nachinkubation einer alten Membran mit dem neuen zweiten Antikörper zeigt die gleichen Ergebnisse wie eine erneute 1-D-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blotting.

Vergleich der SP-D-Detektionssysteme 1 und 2

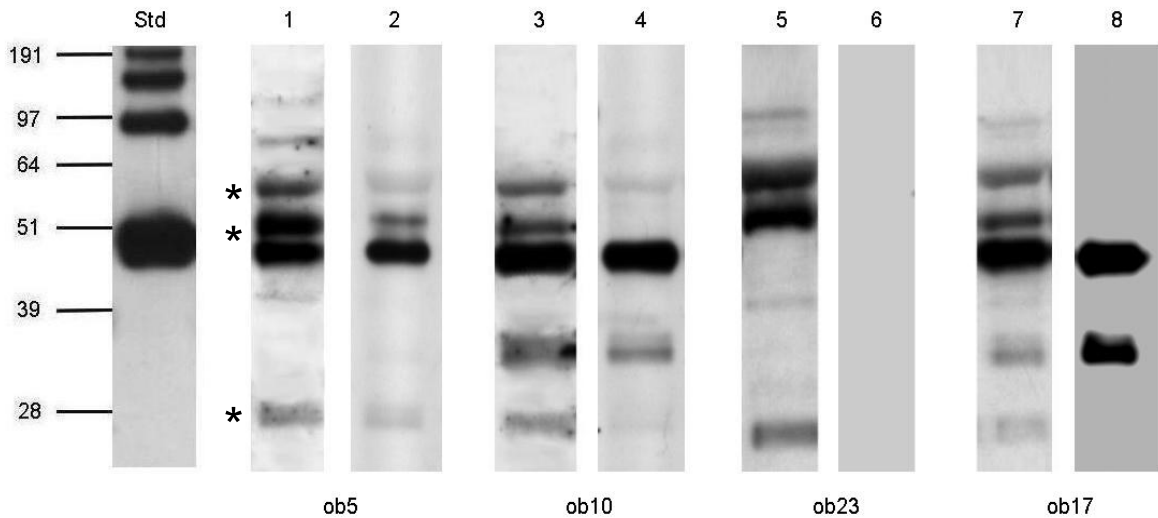


Abbildung 39: Darstellung des SP-D bei vier Patienten in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) und zwei verschiedene zweite Antikörper [goat anti-rabbit (System 1) und goat anti-rabbit Fab-gereinigt (System 2)].
 Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

- Lane 1:** System 1
- Lane 2:** System 2
- Lane 3:** System 1
- Lane 4:** System 2
- Lane 5:** System 1
- Lane 6:** System 2, Nachinkubation
- Lane 7:** System 1
- Lane 8:** System 2, Nachinkubation

* unspezifische Banden

Auch bei Verwendung des neuen SP-D-Detektionssystems fällt auf, dass die Banden in den Bereichen 25-28 kDa, 51-54 kDa und 60-65 kDa in ihrer Intensität schwächer werden bzw. verschwinden. Die SP-D-Bande bei 47-51 kDa verändert sich nicht. Die Bande im Molekulargewichtsbereich 35-38 kDa wird auch mit dem Fab-gereinigten zweiten Antikörper bei Durchführung einer erneuten Gelelektrophorese kaum schwächer (Lane 3 und 4). In einer Nachinkubation mit dem neuen Antikörper ist diese Bande z.T. noch besser sichtbar (Lane 7 und 8). Dies spricht dafür, dass es sich bei dieser Bande um eine Form von SP-D handelt.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die drei Banden bei 25-28 kDa, 51-54 kDa und 60-65 kDa sowohl im neuen SP-A- als auch im neuen SP-D-Detektionssystem in ihrer Intensität nachlassen oder vollständig verschwinden, während sich die spezifischen SP-A- und SP-D-Banden nicht verändern. Somit konnte die Vermutung, dass es sich bei den drei Banden um unspezifische Proteine handelt, die mit dem zweiten Antikörper reagiert haben, bestätigt werden.

3.5.6 Ergebnisse im SP-A-Detektionssystem 2

Im folgenden Teil sind die Kontrollen und Patienten, die mit dem neuen SP-A-System untersucht wurden, einzeln dargestellt.

Kontrollen

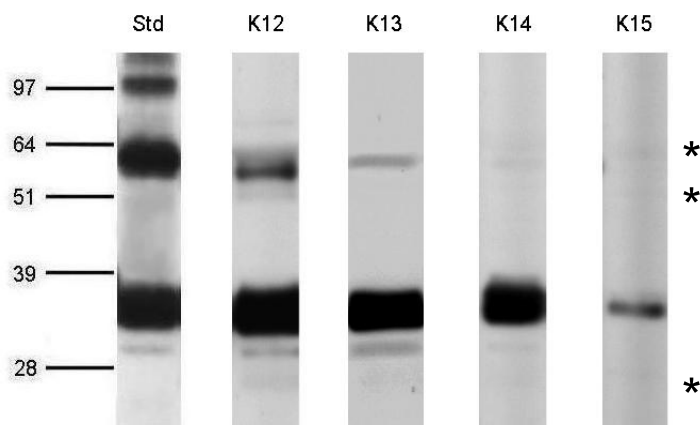


Abbildung 40: Darstellung des SP-A in der BAL bei Kontrollen in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-A, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit Fab-gereinigt). Als Standard (Std) wurde SP-A^{PAP} 213 ng verwendet.

Die Kontrollen K14 und K15 wurden nur mit dem SP-A-System 2 untersucht.

* unspezifische Banden

Obstruktive Bronchitis-Gruppe

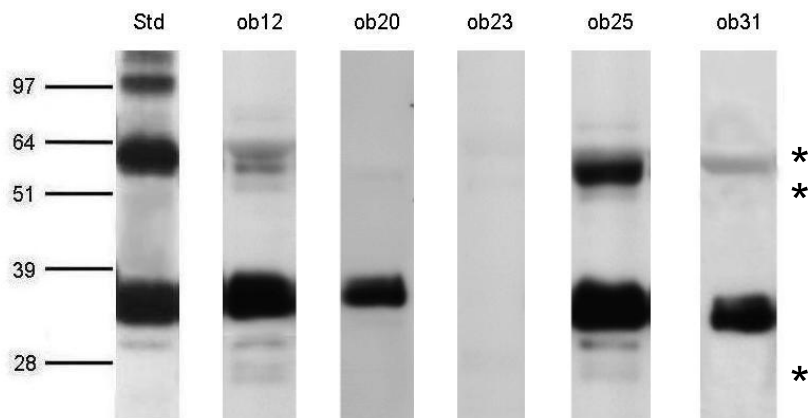
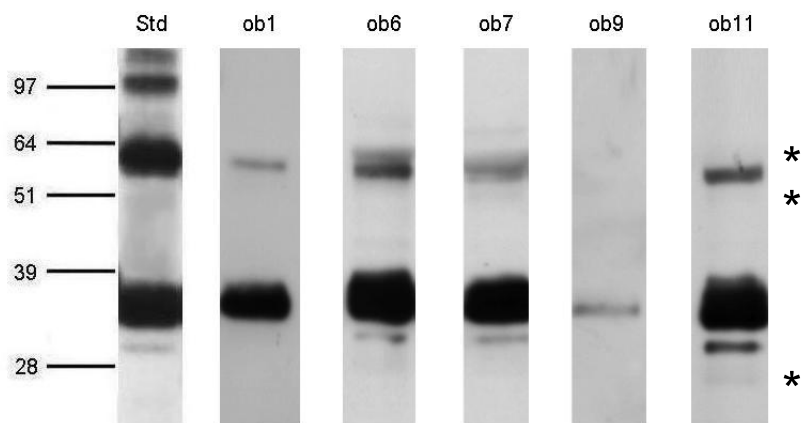
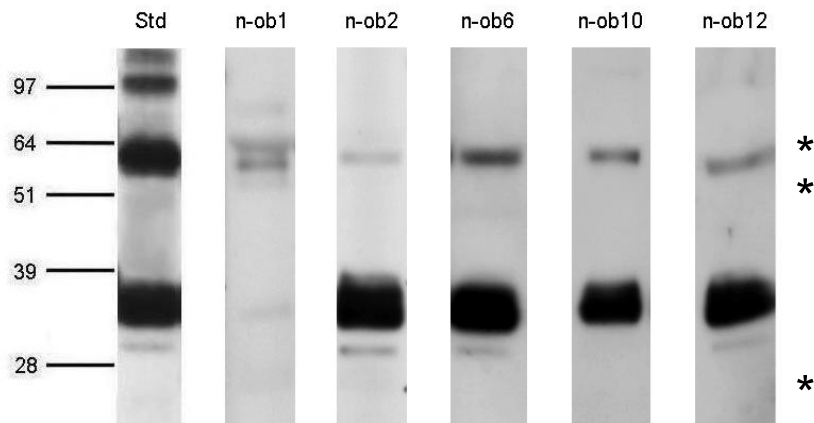


Abbildung 41: Darstellung des SP-A in der BAL bei Patienten aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-A, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit Fab-gereinigt) bzw. Nachinkubation mit diesen Antikörpern. Als Standard (Std) wurde SP-A^{PAP} 213 ng verwendet.

Nachinkubation bei Patienten **ob1, ob9, ob20**.

* unspezifische Banden

Nicht-obstruktive Bronchitis-Gruppe



Einzelfälle

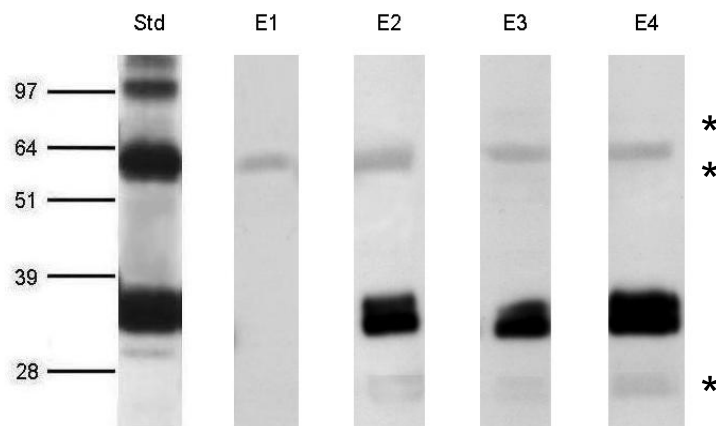


Abbildung 42: Darstellung des SP-A in der BAL bei Patienten aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe und bei Einzelfällen in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-A, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti- rabbit Fab-gereinigt) bzw. Nachinkubation mit diesen Antikörpern.

Als Standard (Std) wurde SP-A^{PAP} 213 ng verwendet.

Nachinkubation bei Patienten **n-ob6, n-ob10, n-ob12.**

* unspezifische Banden

Insgesamt wurden 23,8% der Kinder mit dem SP-A-System 2 (inklusive Nachinkubation 33,3% der Kinder) nachuntersucht. Mit dem neuen Detektionssystem für SP-A ohne Berücksichtigung der Nachinkubation konnten die Ergebnisse des ersten Systems bestätigt werden. Bei den nachinkubierten Patienten sind die spezifischen SP-A-Banden bei 29-31 kDa und/oder bei 54-60 kDa oft nur sehr schwach sichtbar (z.B. ob1, ob20, n-ob10), die 54-60 kDa-Bande des Patienten ob9 ist in der Nachinkubation nicht mehr darstellbar.

Die beschriebenen unspezifischen Banden sind mit dem neuen Antikörper nicht mehr darstellbar oder sehr viel schwächer geworden (z.B. Patienten ob6, ob12, n-ob1 mit noch schwachen unspezifischen Banden).

Problem mit dem SP-A-System 1 war die Frage, ob sich hinter den unspezifischen Banden Degradationsprodukte verstecken. Bei den Patienten, die auch mit dem neuen Antikörper nachuntersucht wurden, konnten ebenfalls keine proteolytischen Fragmente entdeckt werden.

Für alle mit dem SP-A-System 2 nachuntersuchten Patienten (ohne Nachinkubation) konnten die im System 1 gefundenen Muster der SP-A-Banden (siehe Tabelle 3.19 und Abbildung 24) bestätigt werden. In den beiden folgenden Abbildungen sind exemplarisch die Proteinmuster des SP-A-System 2 dargestellt. In der Abbildung 43 sieht man die beiden häufigen Muster 1 und 2a, in der Abbildung 44 die auffälligen Patienten mit sehr schwacher bzw. fehlender SP-A-Hauptbande (seltene Muster 2b, 3 und 4).

Häufige Muster

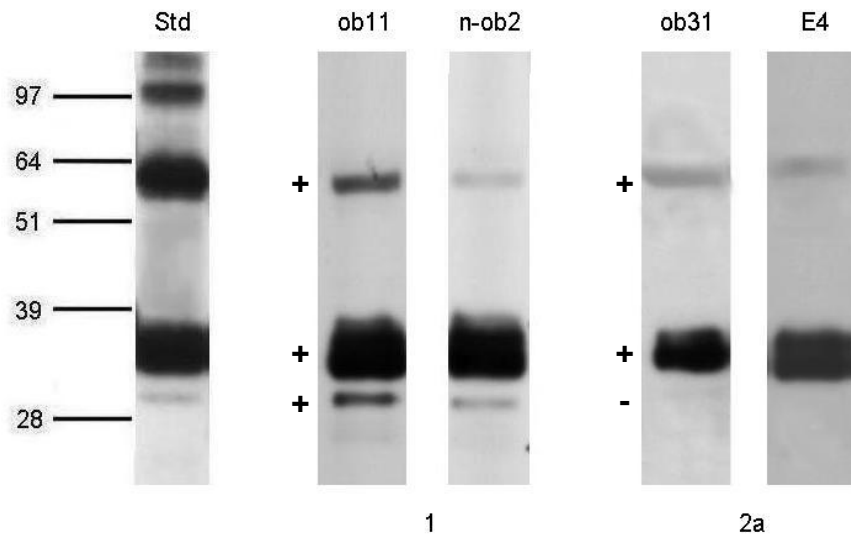


Abbildung 43: exemplarische Darstellung von jeweils zwei Patienten mit den häufigen Proteinmustern 1 und 2a in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-A, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit Fab-gereinigt). Als Standard (Std) wurde SP-A^{PAP} 213 ng verwendet.

Muster 1: positive Banden in allen drei SP-A-Bereichen

Muster 2a: negatives SP-A-Monomer bei 29-31 kDa, positive SP-A-Hauptbande (33-37 kDa), positives SP-A-Dimer (54-60 kDa)

Das Proteinmuster 1 fand sich im SP-A-System 1 bei 77,4% der obstruktiven Bronchitis-Gruppe, 85,7% der nicht-obstruktiven Bronchitis Kinder und bei 61,5% der Kontrollen. Die mit dem System 2 nachuntersuchten Kinder können alle dieses Muster bestätigen (K12, K13, ob6, ob7, ob11, ob12, ob25, n-ob2).

19,4% der obstruktiven und 8,3% der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe zeigten wie 38,5% der Kontrollen im SP-A-Detektionssystem 1 das Muster 2a mit fehlendem SP-A-Monomer bei 29-31 kDa. Auch vier von fünf Einzelfällen hatten diese Bandenvariation. Im System 2 bestätigen alle nachuntersuchten Kinder (ob31, E2, E3, E4) das Proteinmuster 2a.

Auffällige Patienten mit seltenen Mustern

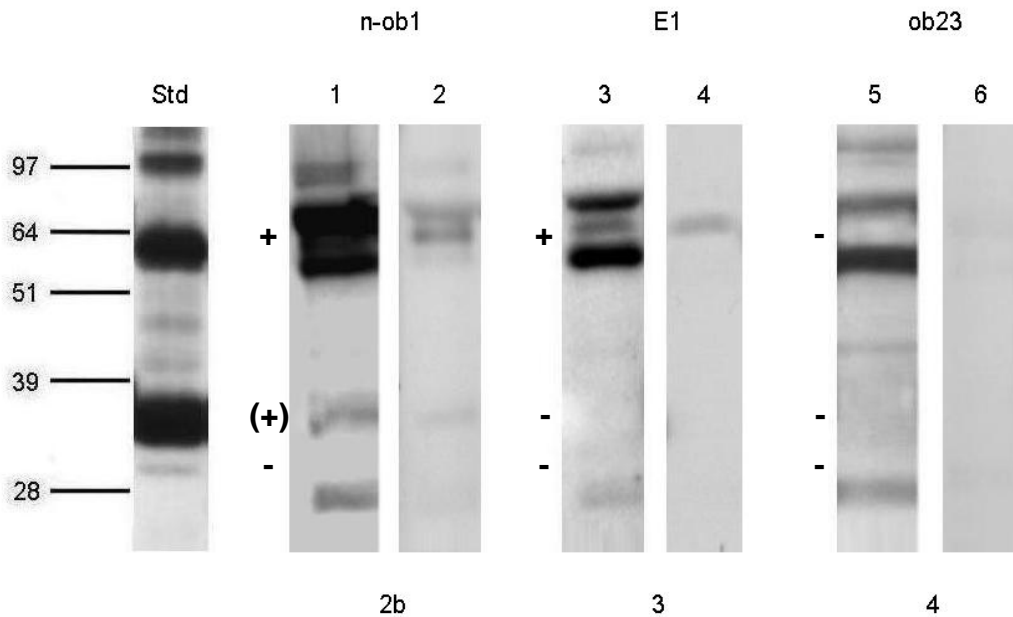


Abbildung 44: Darstellung der Patienten mit extrem schwacher oder fehlender SP-A-Hauptbande in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-A, polyklonal) und zwei verschiedene zweite Antikörper [goat anti-rabbit (System 1) und goat anti-rabbit Fab-gereinigt (System 2)]. Als Standard (Std) wurde SP-A^{PAP} 213 ng verwendet.

Lane 1, 3, 5: System 1

Lane 2, 4, 6: System 2

Muster 2b: negatives SP-A-Monomer bei 29-31 kDa, stark abgeschwächte SP-A-Hauptbande (33-37 kDa), positives SP-A-Dimer (54-60 kDa)

Muster 3: negatives SP-A-Monomer bei 29-31 kDa, negative SP-A-Hauptbande (33-37 kDa), positives SP-A-Dimer (54-60 kDa)

Muster 4: alle drei SP-A-Banden sind negativ

Die drei Patienten, die im SP-A-System 1 mit einer deutlich abgeschwächten bzw. fehlenden SP-A-Hauptbande im Bereich 33-37 kDa aufgefallen sind, zeigen im SP-A-Detektionssystem 2 das gleiche Ergebnis.

3.5.7 Ergebnisse im SP-D-Detektionssystem 2

Bei folgenden Patienten und Kontrollen wurde SP-D mit dem Fab-gereinigten zweiten Antikörper untersucht.

Kontrollen

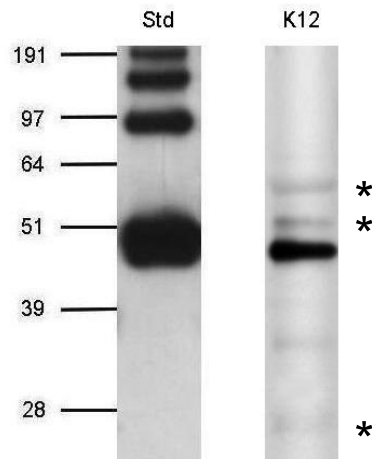


Abbildung 45: Darstellung des SP-D in der BAL bei einem Kontrollkind in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit, Fab-gereinigt). Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

* unspezifische Banden

Obstruktive Bronchitis-Gruppe

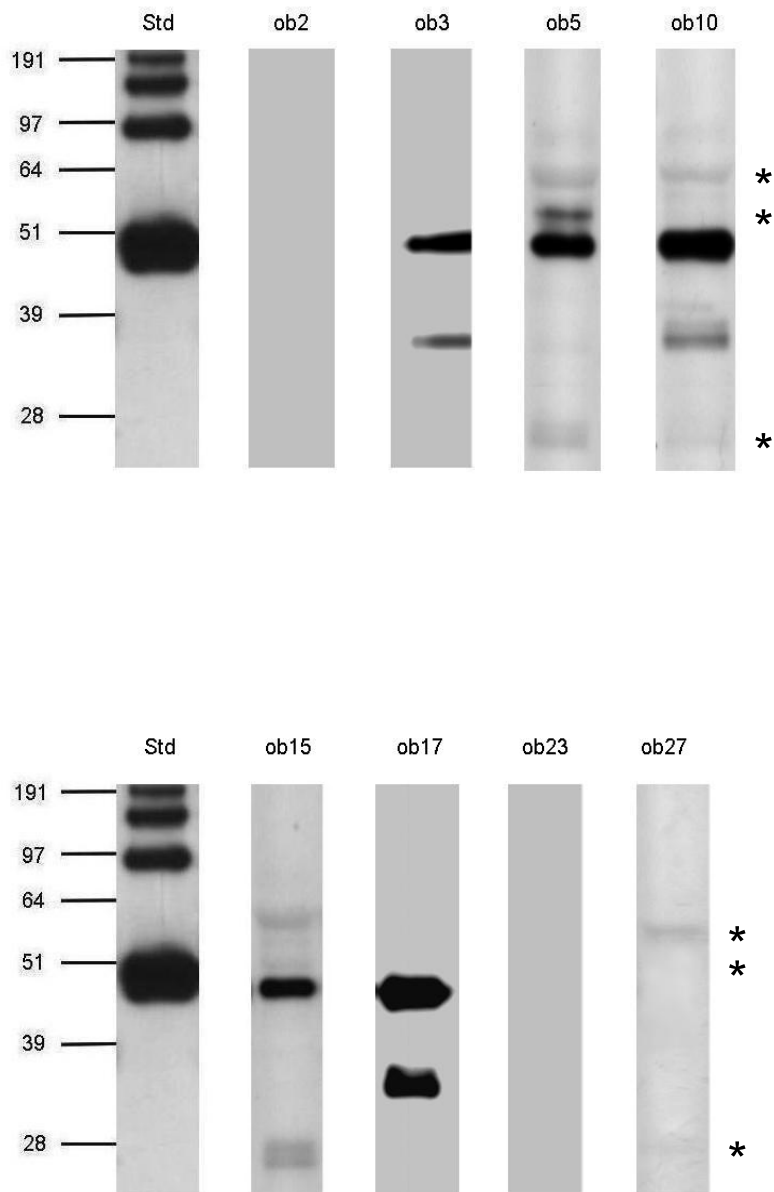


Abbildung 46: Darstellung des SP-D in der BAL bei Patienten aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit, Fab-gereinigt) bzw. Nachinkubation mit diesen Antikörpern. Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet. Nachinkubation bei Patienten **ob2, ob3, ob17, ob23**.

* unspezifische Banden

Nicht-obstruktive Bronchitis-Gruppe

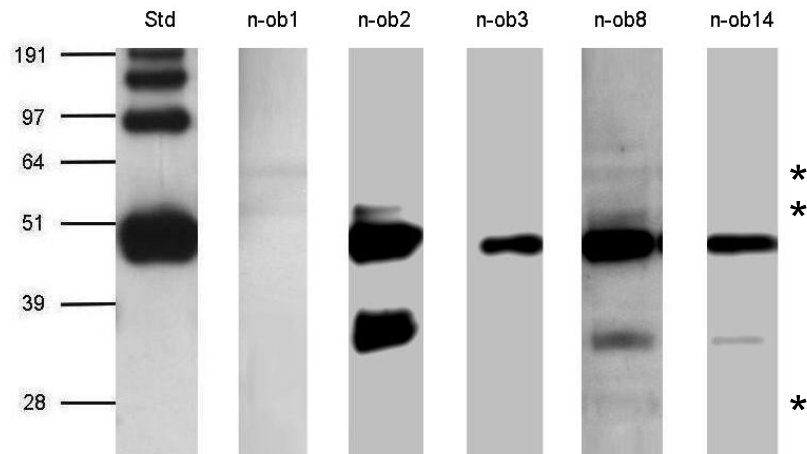


Abbildung 47: Darstellung des SP-D in der BAL bei Patienten aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit, Fab-gereinigt) bzw. Nachinkubation mit diesen Antikörpern. Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

Nachinkubation bei Patienten **n-ob2, n-ob3, n-ob14.**

Einzelfälle

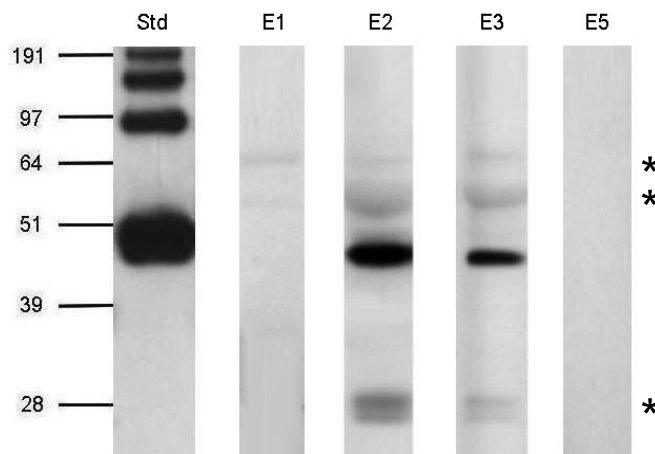


Abbildung 48: Darstellung des SP-D in der BAL bei Einzelfällen in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) und zweiten Antikörper (goat anti-rabbit, Fab-gereinigt). Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

* unspezifische Banden

Es wurden mit dem SP-D-Detektionssystem 2 insgesamt 16,9% der Kinder (inklusive Nachinkubation 27,7% der Kinder) nachuntersucht.

Analog zum SP-A-System 2 sind auch bei der SP-D-Analyse mit dem neuen Antikörper die beschriebenen unspezifischen Banden nicht mehr darstellbar oder sehr viel schwächer geworden.

Bei den Patienten, die mit dem SP-D-System 2 nachuntersucht wurden, konnten keine Degradationsprodukte gefunden werden.

Die im SP-D-Detektionssystem 1 entdeckte 35-38 kDa-Bande hat sich auch im SP-D-System 2 gezeigt (siehe Abbildung 49).

Bei allen Patienten, die im SP-D-System 1 keine SP-D-Bande bei 47-51 kDa gezeigt haben, wurde das Ergebnis mit dem SP-D-System 2 bestätigt (siehe Abbildung 50).

Im SP-D-System 1 wurde bei vielen Patienten und einigen Kontrollen eine Bande bei 43 kDa gesehen, die allerdings z.T. sehr schwach ausgeprägt war. Diese Bande konnte mit dem neuen Antikörper bei den nachuntersuchten Patienten nicht mehr dargestellt werden (siehe Abbildungen 51 und 52).

35-38 kDa-Bande

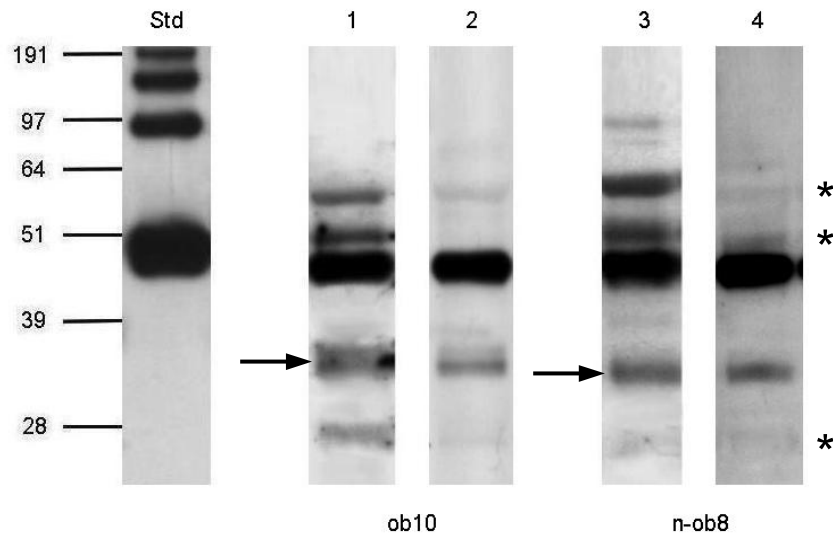


Abbildung 49: exemplarische Darstellung von zwei Patienten mit einer 35-38 kDa-Bande in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) und zwei verschiedene zweite Antikörper [goat anti-rabbit (System 1) und goat anti-rabbit Fab-gereinigt (System 2)]. Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

Lane 1,3: System 1

Lane 2,4: System 2

* unspezifische Banden

Im SP-D-System 1 konnten bei 51,6% der obstruktiven und bei 50% der nicht-obstruktiven Bronchitis-Patienten ebenso wie bei 40% der Kontrollen Banden im Bereich 35-38 kDa gesehen werden (siehe Abbildungen 33 und 34). Drei Kinder (ob10, ob27, n-ob8) wurden mit dem System 2 (ohne Nachinkubation) nachuntersucht. In der Abbildung 49 erkennt man, dass sich die 35-38 kDa-Banden bei den Patienten ob 10 und n-ob 8 auch mit dem System 2 deutlich darstellen lassen. Bei dem Patienten ob27 ist die Bande im Molekulargewichtsbereich 35-38 kDa bei der Nachuntersuchung mit dem System 2 kaum sichtbar, aber sie ist vorhanden. Die 35-38 kDa-Bande war bei diesem Patienten allerdings auch im SP-D-System 1 nur schwach ausgeprägt. Mit dem neuen zweiten Antikörper nachinkubiert wurden die Patienten ob 17, n-ob2 und n-ob 14, und bei allen drei Patienten konnte die 35-38 kDa-Bande deutlich dargestellt werden.

Die Ergebnisse mit dem SP-D-System 2 bekräftigen die Vermutung, dass es sich bei dieser Bande um eine besondere SP-D-Form handeln könnte.

Fehlende SP-D-Bande

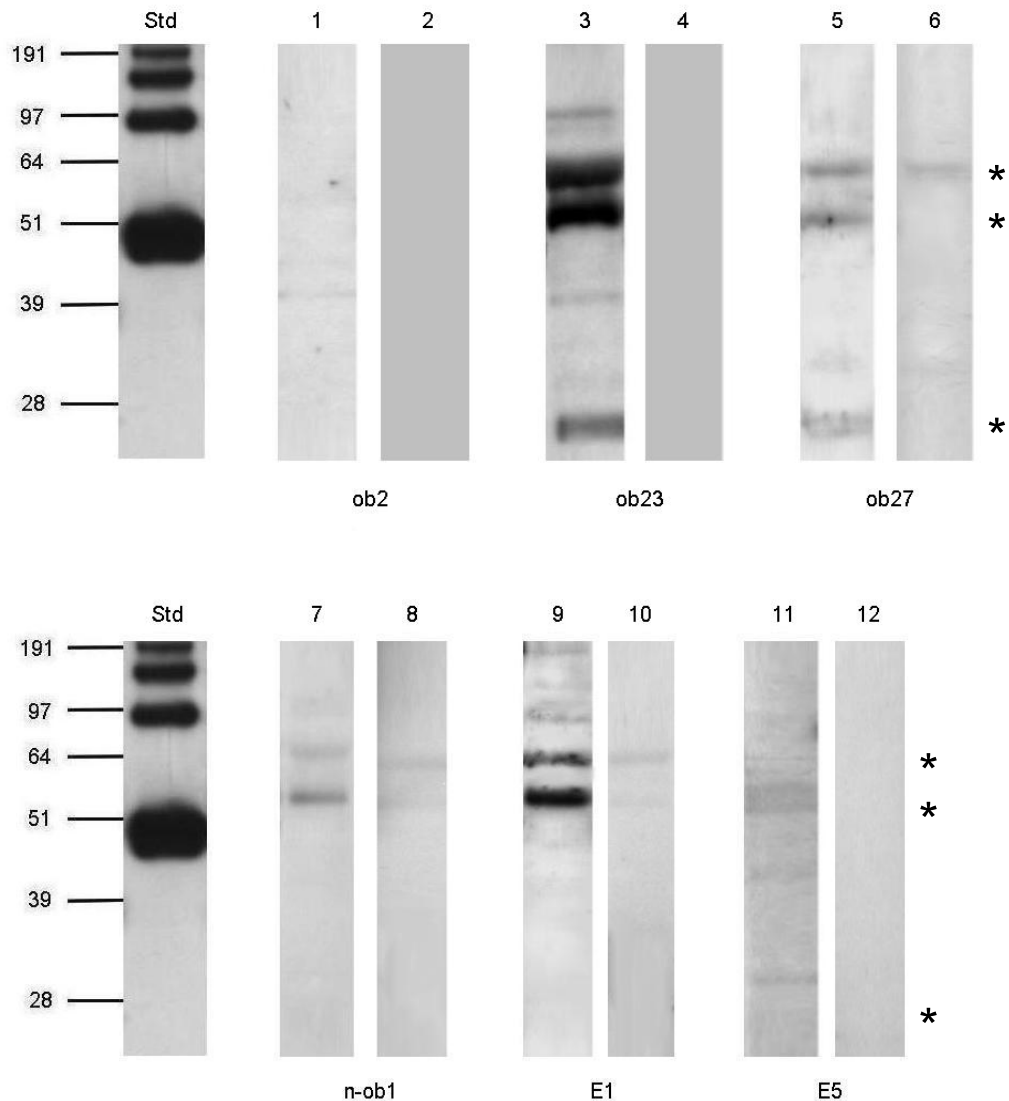


Abbildung 50: Darstellung der Patienten mit fehlender SP-D-Bande in einer SDS Elektrophorese und Western Blotanalyse durch einen spezifischen ersten Antikörper (rabbit anti-hum SP-D, polyklonal) und zwei verschiedene zweite Antikörper [goat anti-rabbit (System 1) und goat anti-rabbit Fab-gereinigt (System 2)]. Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

Lane 1,3,5,7,9,11: System 1

Lane 2,4,6,8,10,12: System 2

* unspezifische Banden

Bei sechs Patienten konnte mit dem SP-D-System 1 keine SP-D-Bande im Bereich 47-51 kDa nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigte sich bei allen sechs Patienten mit dem SP-D-Detektionssystem 2.

43 kDa-Bande

Im SP-D-Detektionssystem 1 wurde eine meist sehr schwach ausgeprägte 43 kDa-Bande bei 67,7% der obstruktiven und 57,1% der nicht-obstruktiven Bronchitis-Kinder, bei drei von fünf Einzelfällen und auch bei 33,3% der Kontrollen beobachtet. Es wurde vermutet, dass es sich bei dieser Bande neben der SP-D-Hauptbande bei 47-51 kDa um eine zweite spezifische SP-D-Form handelt. Dementsprechend wurden vier verschiedene Proteinmuster, die durch diese beiden spezifischen SP-D-Formen beschrieben wurden, erarbeitet (siehe Tabelle 3.24 und Abbildung 32). Im SP-D-Detektionssystem 2 wurden insgesamt 18,4% der Kinder (inklusive Nachinkubation 26,3% der Kinder), die im SP-D-System 1 eine 43 kDa gezeigt haben, nachuntersucht (siehe Abbildungen 51 und 52).

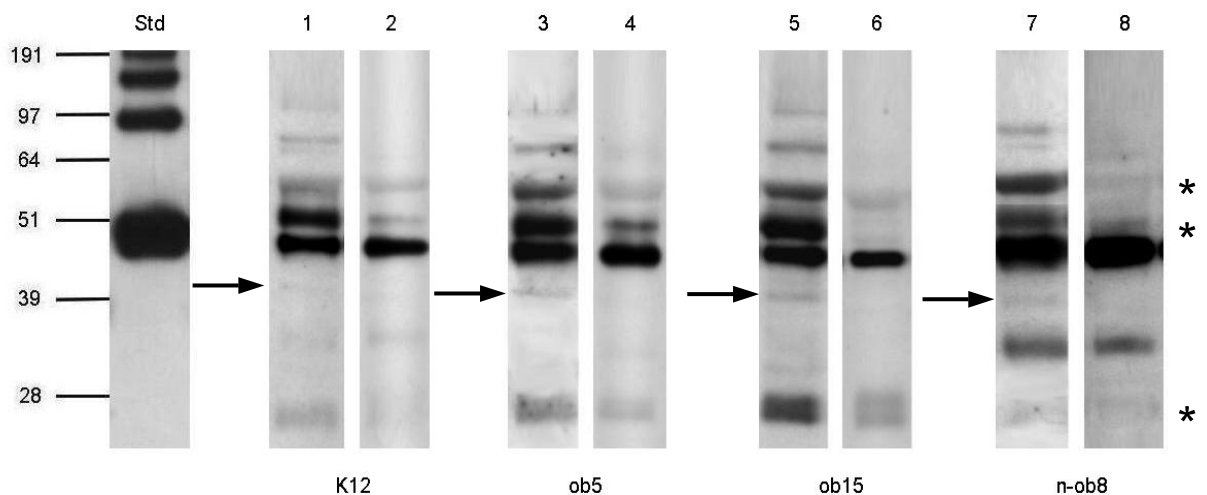


Abbildung 51: Darstellung von Patienten mit einer 43 kDa-Bande im SP-D-System 1 und Vergleich mit SP-D-System 2.

Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

Lane 1,3,5,7: System 1

Lane 2,4,6,8: System 2

* unspezifische Banden

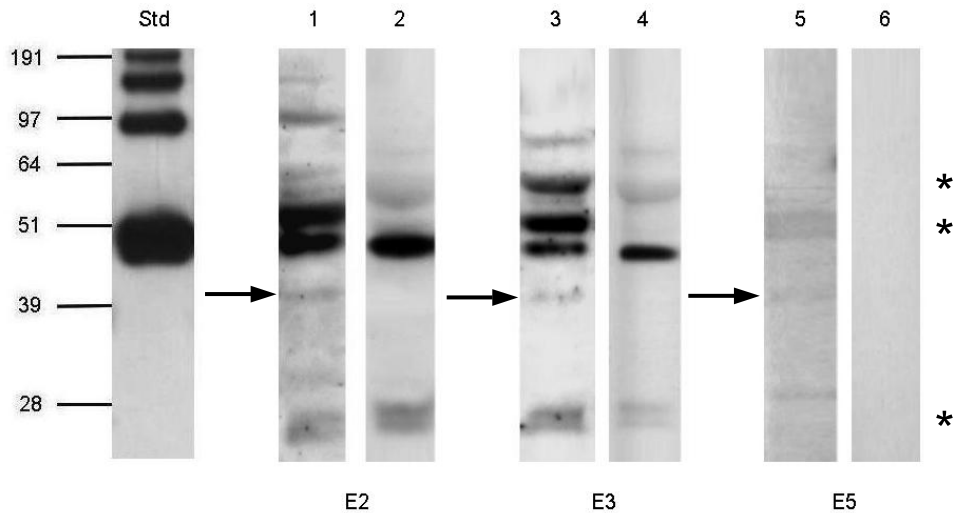


Abbildung 52: Darstellung von Patienten mit einer 43 kDa-Bande im SP-D-System 1 und Vergleich mit SP-D-System 2. Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

Lane 1,3,5: System 1

Lane 2,4,6: System 2

* unspezifische Banden

Bei keinem dieser Patienten konnte im SP-D-System 2 eine Bande bei 43 kDa dargestellt werden. Somit hat sich die Annahme, dass es sich hierbei um eine spezifische SP-D-Form handelt, bei 18,4% der Kinder nicht bestätigt. Vermutlich handelt es sich bei dieser Bande ebenfalls um eine unspezifische Bande, die von dem neuen Antikörper des SP-D-Detektionssystem 2 nicht erkannt worden ist. Festzustellen ist, dass spezifisches SP-D bei Patienten und Kontrollen im SP-D-System 2 nur als Bande bei 47-51 kDa-Bande gefunden werden konnte. Das erarbeitete SP-D-Proteinmuster des SP-D-System 1 hat sich nicht bestätigen können.

58 und 33 kDa-Bande

Bei sechs Patienten wurden mit dem SP-D-Detektionssystem 1 unklare Banden bei 58 kDa und/oder bei 33 kDa gefunden (siehe Abbildung 36). In der folgenden Abbildung sieht man drei dieser Kinder, die auch mit dem neuen Antikörper untersucht wurden, im Vergleich dargestellt.

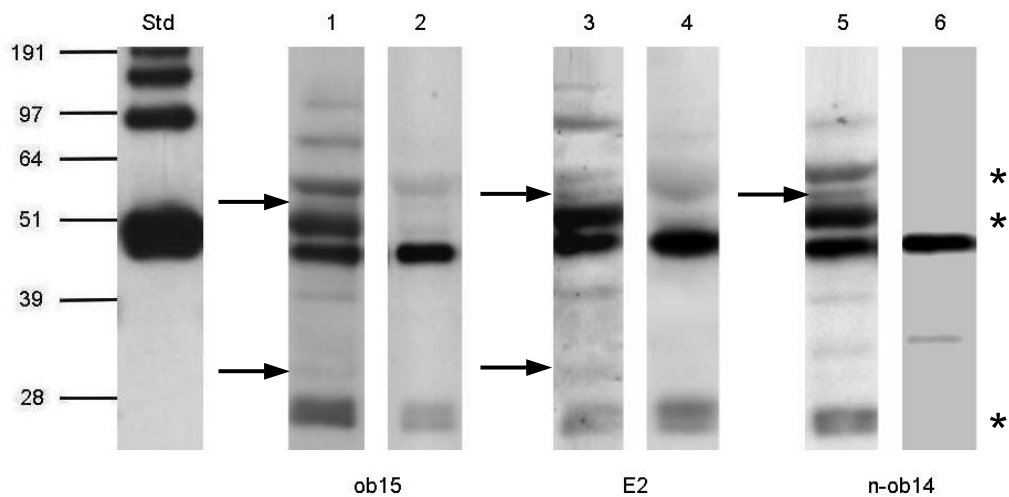


Abbildung 53: Darstellung von Patienten mit zusätzlichen Banden im SP-D-System 1 und Vergleich mit SP-D-System 2. Als Standard (Std) wurde SP-D^{PAP} 16,4 ng verwendet.

Lane 1,3,5: System 1 **Lane 2,4,6:** System 2

* unspezifische Banden

Die Banden bei 33 kDa, die man bei den Patienten ob15, E2 und E5 (hier nicht dargestellt) mit dem SP-D-System 1 erkennen konnte, verschwinden bei Inkubation mit dem Fab-gereinigtem Antikörper. Die Vermutung, dass es sich hierbei um Degradationsprodukte von SP-D handeln könnte, ist nicht bestätigt worden.

Die 58 kDa-Bande des Patienten n-ob14 ist mit dem System 2 nicht mehr darstellbar, beim Patienten ob15 ist sie kaum sichtbar. Der Einzelfall E2 lässt sich schwer beurteilen, da man hier auch mit dem neuen Antikörper eine schwache unspezifische 60-65 kDa-Bande sieht, die bis in den Bereich 58 kDa verwischt ist.

Auch bei der 58 kDa-Bande erscheint es jetzt eher unwahrscheinlich, dass sie ein Degradationsprodukt von SP-D sein könnte.

4 Diskussion

Nach wie vor stellt chronischer Husten nach Ausschluß von Mukoviszidose und Ziliendyskinesie ein großes Problem im Kindesalter dar. Aus diesem Grund wurde bei den Kindern mit chronischem Husten bei erheblicher und langandauernder Symptomatik eine Bronchoskopie zum Ausschluß von Fehlbildungen, Stenosen, Fremdkörpern oder persistierenden Entzündungen durchgeführt. Um Hinweise auf Veränderungen des lokalen Abwehrsystems der Lunge bei diesen Patienten zu erhalten, wurden die Surfactantproteine SP-A und SP-D in den bronchoalveolären Lavagen untersucht. Dabei zeigte sich eine unveränderte SP-A-Konzentration in den verschiedenen Patientengruppen. In der obstruktiven Bronchitis-Gruppe konnte ein erhöhter SP-D-Gehalt und eine Erhöhung des Anteils der neutrophilen Granulozyten festgestellt werden. Es wurden einzelne Patienten mit einem Mangel an SP-A und/oder einem Fehlen von SP-D gefunden. Diese Beobachtungen könnten kausal zusammenhängen.

4.1 Patienten

Die Auswahl der Patienten in der vorliegenden Arbeit erfolgte weitgehend symptomorientiert, hier anhand der Symptome des chronisch rezidivierenden Hustens mit oder ohne Obstruktion.

Nachteil einer derartigen Patienteneinteilung ist, dass die Pathophysiologie, die zu den Symptomen, führt, sehr unterschiedlich sein kann und somit eventuell zu wenig berücksichtigt wird. Der Vergleich mit anderen Arbeiten, die hauptsächlich Krankheiten selbst wie beispielsweise Asthma untersuchen, ist erschwert. Es ist auch vorstellbar, dass sich einzelne, für die jeweiligen Subgruppen typischen Ergebnisse, durch das Zusammenwürfeln zu einer heterogenen Gruppe mit ähnlichen Symptomen, relativieren.

Andererseits ist chronischer Husten eines der häufigsten Symptome im Kindesalter. Die Differentialdiagnosen sind zahlreich, oft lassen sich für den rezidivierenden Husten jedoch keine Ursachen finden [22]. Trotzdem sind bisher nur wenige Studien

zu Bronchiallavagen von Kindern mit chronischem Husten durchgeführt worden. Meist handelte es sich hierbei um Arbeiten, die die BAL-Zytologie untersuchten [25]. Studien zu den Surfactantproteinen SP-A und SP-D bei Kindern mit chronischem Husten konnten nicht gefunden werden.

Da das Aufsuchen von klinischen Informationen zu den einzelnen Patienten in vorliegender Arbeit retrospektiv erfolgte, waren trotz großer Bemühungen einige Daten nachträglich nicht mehr zu erfassen.

4.2 Zytologische und bakteriologische Veränderungen

Kinder mit obstruktiver Bronchitis zeigten eine Verminderung der Makrophagen gegenüber der lungengesunden Kontrollgruppe (siehe Tabelle 3.11 und Abbildung 4). Der Anteil der neutrophilen Granulozyten hingegen war bei den obstruktiven Bronchitis-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (siehe Tabelle 3.11 und Abbildung 5). 21,4% der obstruktiven Bronchitis-Kinder hatten einen erhöhten Neutrophilenanteil über 10%, von diesen wiederum war bei 10,7% sogar eine Erhöhung der Neutrophilen über 35% feststellbar. Auch in der Gruppe der nicht-obstruktiven Bronchitis konnte bei 28,6% der Patienten ein Neutrophilenanteil über 10% festgestellt werden (bei 14,3% der Kinder mehr als 20% Neutrophile und ebenfalls bei 14,3% erhöhter Neutrophilenanteil über 35%). Allerdings waren die Neutrophilen der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe gegenüber den anderen untersuchten Gruppen nicht signifikant verändert.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit anderen Studien wird durch die z.T. unterschiedlichen Kriterien der Patientenauswahl erschwert. In unserer Arbeit wurden die Kinder mit chronischem Husten weiterunterteilt in die Gruppen obstruktive und nicht-obstruktive Bronchitis, in der obstruktiven Bronchitis-Gruppe wiederum wurde bei 19 von 31 Kindern Asthma diagnostiziert (Daten nur bei 27 Kindern erhältlich). Die Studie von Marguet et al. untersuchte u.a. die Differentialzytologie in der BAL von Kindern mit Asthma und chronischem Husten. Das Zellbild der Kinder mit chronischem Husten zeigte gegenüber der Kontrollgruppe keine Unterschiede. In der Gruppe der Asthmatiker jedoch konnte bei einem Drittel der Kinder eine Erhöhung des Neutrophilenanteils über 10% festgestellt werden. Außerdem war der Prozentsatz der Makrophagen bei den Patienten mit Asthma niedriger als bei den

Kindern mit chronischem Husten und bei den Kontrollen [69]. Ähnliche Ergebnisse wie die Kinder mit Asthma in beschriebener Arbeit zeigten sich in unserer obstruktiven Bronchitis-Gruppe verglichen mit der lungengesunden Kontrollgruppe.

In einer anderen Arbeit konnte bei Kindern mit chronischem Husten ein signifikant höherer Neutrophilenanteil in der BAL im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden werden. Außerdem hatten drei von 23 Kindern einen erhöhten Eosinophilenanteil, der Unterschied zur Kontrollgruppe war signifikant [25].

In der genannten Studie von Marguet et al. hatte ein Großteil der Patienten einen positiven Keimnachweis in der BAL, und es konnte festgestellt werden, dass die Lavagen mit Bakterien mit einem höheren Neutrophilenanteil assoziiert waren. Somit könnten die erhöhten Neutrophilenzahlen bei Kindern mit Asthma durch eine neutrophile Entzündungsreaktion im Rahmen einer bakteriellen Infektion erklärt werden [69, 55].

Bei den Kindern mit chronisch rezidivierendem Husten in der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls signifikant häufiger eine Keimbesiedelung in den unteren Atemwegen als bei lungengesunden Kontrollkindern gefunden werden (siehe Tabellen 3.12 und 3.13). Im Gegensatz zu den Patienten mit chronischem Husten waren in der Kontroll-Gruppe auch keine potentiell pathogenen Keime identifizierbar (siehe Tabellen 3.12 und 3.13). Allerdings zeigte sich in den Lavagen der Kinder mit obstruktiver Bronchitis, bei denen Keime gefunden wurden, kein Unterschied in der Differentialzytologie gegenüber Lavagen ohne Keimnachweis (siehe Tabelle 3.14). Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen neutrophiler Entzündungsreaktion und bakterieller Infektion finden [48]. Wegen der geringen Fallzahl der Patienten mit steriler Lavage in unserer Arbeit ist dieses Ergebnis aber nicht sehr aussagekräftig, so dass nicht auszuschließen ist, dass der häufige Keimnachweis in der BAL der Kinder mit obstruktiver Bronchitis den erhöhten Neutrophilenanteil mitbedingt oder aufrechterhält. Ein Befall mit potentiell pathogenen Keimen hatte keinen Einfluß auf das Zellbild (siehe Tabelle 3.15).

Weiterhin könnten Virusinfektionen [24, 25, 69] oder allergische Prozesse verantwortlich sein für die Erhöhung der neutrophilen Granulozyten [69].

Es konnte bei den Kindern mit obstruktiver und nicht-obstruktiver Bronchitis kein Zusammenhang zwischen dem Zellbild und der Krankheitsdauer festgestellt werden (siehe 3.4.2), insbesondere war der erhöhte Neutrophilenanteil nicht mit einer längeren Krankheitsdauer assoziiert wie für Kinder mit Asthma gezeigt werden

konnte [48]. Da es sich um eine retrospektive Studie handelte, konnte die Schwere der Erkrankung zum Zeitpunkt der Lavage nachträglich nicht mehr objektiviert werden. Es ist vorstellbar, dass eine ausgeprägte Krankheitssymptomatik mit einem erhöhten Prozentsatz an Neutrophilen in der BAL einhergeht. Dies konnte bei Asthmatikern gezeigt werden [69, 10].

Verglichen mit der Differentialzytologie der BAL von lungengesunden Kindern aus anderen Studien ist der Median des Neutrophilenanteils der obstruktiven Bronchitis-Gruppe nur ungefähr zwei- bis dreifach erhöht, wobei in einer Arbeit nur 4,2% der Kinder einen Neutrophilenanteil größer 10% [78] aufwiesen und in der anderen Studie kein Kind mit einem Neutrophilenanteil mehr als 10% gefunden werden konnte [81].

4.3 Veränderungen von SP-A

4.3.1 SP-A-Konzentration

In den bronchoalveolären Lavagen der Patienten mit obstruktiver und nicht-obstruktiver Bronchitis konnte kein signifikanter Unterschied im SP-A-Gehalt im Vergleich zur lungengesunden Kontrollgruppe festgestellt werden. Auch die beiden Patientengruppen untereinander zeigten keine signifikante Veränderung der SP-A-Konzentration. Dies gilt sowohl für die absolute Konzentration als auch für die Konzentration relativ zum Gesamtproteingehalt (siehe Tabelle 3.16). Vorstellbar gewesen wäre eine verminderte SP-A-Konzentration mit beeinträchtigter lokaler Infektabwehr der Lunge als eine der Ursachen für die rezidivierenden Infekte der untersuchten Patienten. Festzustellen ist aber, dass es bei den Kindern mit obstruktiver bzw. nicht-obstruktiver Bronchitis trotz chronisch rezidivierendem Husten und rezidivierender Infekte sekundär zu keiner quantitativen Veränderung des hydrophilen Surfactantproteins SP-A gekommen ist.

Daten zum SP-A-Gehalt in der BAL bei Kindern mit nicht-obstruktiver Bronchitis oder zu Kindern mit chronisch rezidivierendem Husten konnten nicht gefunden werden. Bei den obstruktiven Lungenerkrankungen außerhalb des Kindesalters wurden die Surfactantproteine insbesondere bei Asthma untersucht. Dabei konnten sowohl erniedrigte SP-A-Konzentrationen [86] als auch ein erhöhter Gehalt an SP-A [13]

gefunden werden. Pneumonie-Patienten zeigten erniedrigte SP-A-Konzentrationen [35, 5], vermutlich als Folge der Entzündungsreaktion in den Alveoli [5].

4.3.2 Qualitative SP-A-Analyse

SP-A-Darstellung

SP-A stellte sich unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen in der SDS Elektrophorese and anschließender Westernblotanalyse mit polyklonalen Antikörpern im SP-A-Detektionssystem 1 und 2 in drei Formen dar: eine Hauptbande konnte bei 33-37 kDa beobachtet werden, zwei schwächere Formen zeigten sich bei 29-31 kDa (Monomer) und bei 54-60 kDa (Dimer). Diese drei verschiedenen SP-A-Formen wurden in vergleichbarem Molekulargewichtsbereich auch von Doyle et al. in der 2D-Gelelektrophorese beobachtet [23], bei Verwendung der 1-D-Gelelektrophorese wurden SP-A-Hauptbanden bei 28-36 kDa beschrieben [66, 82].

Die SP-A-Formen zeigten sich in unterschiedlicher Intensität sowohl bei Patienten als auch Kontrollen. Da SP-A nicht konstant in diesen drei verschiedenen Formen zu finden war, konnten im SP-A-Detektionssystem 1 fünf verschiedene SP-A-Muster erarbeitet werden (siehe Tabelle 3.19 und Abbildung 24). Am häufigsten fanden sich alle drei Formen (Muster 1), dann das Muster 2a mit fehlender SP-A-Bande bei 29-31 kDa. Auch Doyle et al. beschrieb in seiner Arbeit eine Variation der verschiedenen SP-A-Formen zwischen den einzelnen Alveolarproteinose-Patienten, darüberhinaus unterschied sich die Häufigkeit der SP-A-Formen der Patienten von denen der Kontrollen [23]. In vorliegender Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens von zwei bzw. drei positiven SP-A-Formen in den einzelnen Gruppen festgestellt werden (siehe Tabelle 3.20). Es ist vorstellbar, dass es sich bei den beschriebenen Mustern um genetische Variationen handelt.

Bei insgesamt drei Patienten zeigten sich auffällige Musterbildungen (2b, 3 und 4) mit veränderter SP-A-Hauptbande bei 33-37 kDa, die im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

Höhermolekulare, polymere Formen im Bereich 65-100 kDa wurden sowohl bei der Mehrzahl der Patienten als auch bei allen Kontrollkindern im SP-A-Detektionssystem

1 gefunden. Diese hochmolekularen SP-A-Formen stellen wahrscheinlich Polymere dar, die sich nicht reduzieren lassen. SP-A-Formen größer als 60 kDa wurden in einer weiteren Studie ebenfalls bei allen Kontrollen beobachtet, während sie bei Mukovizidose-Patienten nur vereinzelt aufgetreten sind. Die genaue Funktion dieser Formen ist nicht bekannt [88].

Fehlende SP-A-Hauptbande

Bei insgesamt drei Patienten zeigten sich in der Western Blotanalyse Auffälligkeiten bezüglich der SP-A-Hauptbande bei 33-37 kDa in beiden SP-A-Detektionssystemen. Ein Patient aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe (n-ob1) hatte eine sehr schwach ausgeprägte SP-A-Hauptbande, dem Patienten ob23 aus der obstruktiven Bronchitis-Gruppe und dem Einzelfall-Patienten E1 fehlte diese Bande (siehe Abbildungen 25 und 44). Alle anderen untersuchten Patienten und Kontrollen hatten gut sichtbare SP-A-Hauptbanden. Klinische Details der drei Patienten mit veränderter SP-A-Hauptbande sind in der Tabelle 3.29 zusammengefaßt. Der Patient E1 litt an einer Amyloidose. Bei dem Patienten ob23, der erste Krankheitssymptome bereits seit Geburt aufwies, wurden 10 Pneumonien diagnostiziert. In der Krankengeschichte des Patienten n-ob1 konnten zwei Pneumonien, rezidivierende Pseudokrapp-Anfälle und eine Pertussis-Erkrankung festgestellt werden, außerdem zeigte er einen langen Krankheitsverlauf. Weiterhin auffällig ist, dass man bei diesen drei Patienten kein SP-D im ELISA messen konnte und sich in der Western Blotanalyse auch keine SP-D-Hauptbande (47-51 kDa) darstellen ließ. Es konnte eine Korrelation zwischen der SP-A- und SP-D-Konzentration in den einzelnen Gruppen ausgeschlossen werden (siehe 3.4.2).

In einer Arbeit von Schochett et al. stellte sich SP-A nach SDS-Elektrophorese und Western Blotting mit einer breiten Bande zwischen 28 und 36 kDa dar. Nach Inkubation mit aktivierten Neutrophilen verschwand unter Anwesenheit von EDTA diese SP-A-Bande fast vollständig mit resultierender Surfactantdysfunktion. Man vermutete eine Degradation von SP-A durch die von aktivierten Neutrophilen freigesetzten Serinproteasen. Allerdings zeigten sich wie in vorliegender Arbeit keine proteolytischen Fragmente mit niedrigerem oder höherem Molekulargewicht [82].

Der vollständige Verlust der SP-A-Hauptbande bei zwei Patienten bzw. die stark abgeschwächte SP-A-Hauptbande bei einem Patienten könnte das Resultat einer Degradation von SP-A sein wie bei Schochett et al. in vitro gezeigt wurde. Andererseits ist es auch vorstellbar, dass primär die SP-A-Veränderung vorhanden war mit vermutlich eingeschränkter lokaler Abwehrfunktion der Lunge und resultierenden rezidivierenden Atemwegsinfektionen. V.a. im Hinblick auf den sehr frühen Krankheitsbeginn der Patienten ob23 (seit Geburt) und n-ob1 (0,3 Jahre) erscheint eine primäre Veränderung der hydrophilen Surfactantproteine SP-A und auch SP-D bei diesen beiden Kindern wahrscheinlich.

In Studien mit Knockout-Mäusen waren die Mäuse ohne SP-A anfälliger für bakterielle und virale Infektionen [63, 62]. Diese Beobachtungen scheinen auch auf die Patienten mit fehlender SP-A-Hauptbande zuzutreffen. Wie beschrieben hatten diese gehäuft Infektionen, insbesondere der Patient mit 10 Pneumonien scheint sehr anfällig zu sein. Dies könnte durch das veränderte SP-A bedingt sein. Andererseits ist wegen der geringen Anzahl der Patienten ohne nachweisbare SP-A-Hauptbande eine fundierte Aussage kaum möglich.

Untersuchung auf proteolytische Degradation von SP-A

Diese Arbeit beschäftigte sich u.a. mit der Fragestellung, ob es bei Kindern mit chronischem Husten zu einer proteolytischen Degradation des Surfactantproteins A kommt.

In einer in vitro-Studie von Liao et al. konnte nachgewiesen werden, dass es nach Inkubation von Hunde-SP-A mit humaner Leukozyten-Elastase zu einer Degradation von SP-A mit einem resultierenden Degradationsprodukt von etwa 21 kDa kommt. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass die proteolytische Degradation von SP-A mit einer verminderten biophysikalischen Surfactantfunktion einhergeht [66].

Viel früher erkannte man bereits eine Degradation von SP-A in vitro durch das Enzym Kollagenase mit einem proteolytischen Fragment bei 20-23 kDa [93].

Bei Mukoviszidose-Patienten wurden proteolytische SP-A-Fragmente mit einem Molekulargewicht von ungefähr 14-24 kDa gefunden. Diese Ergebnisse könnten mitverantwortlich sein für eine verminderte Infektabwehr der Lunge bei CF-Patienten [88].

Baughman et al. zeigte in seinen Western Blot Analysen der bronchoalveolären Lavagen von Pneumonie-Patienten, dass die Menge an detektiertem SP-A vermindert ist. Darüberhinaus fand er bei zwei von 20 untersuchten Patienten SP-A-Degradationsprodukte mit einem Molekulargewicht von 10-14 kDa. Bei einem Patienten wurde *Staphylococcus aureus* und bei dem anderen *Klebsiella pneumoniae* nachgewiesen [5].

In der vorliegenden Arbeit konnten nach Inkubation von BAL mit spezifischem SP-A-Antikörper weder bei den verschiedenen Patientengruppen noch bei den Kontrollen im SP-A-Detektionssystem 1 Banden im Bereich 0-25 kDa gefunden werden (siehe Tabelle 3.17). Die Abwesenheit proteolytischer Fragmente läßt vermuten, dass es tatsächlich zu keiner Degradation von SP-A gekommen ist. Es muß aber berücksichtigt werden, dass bei unseren Versuchen nur eine relativ geringe Gesamtproteinmenge von 5 µg aufgetragen wurde. Im Vergleich hierzu wurde in einer Studie zum Nachweis von SP-A-Degradationsprodukten bei ARDS-Patienten die dreifache Proteinmenge von 15 µg für eine SDS-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen mit anschließendem Western Blotting verwendet [3]. Vielleicht ist unsere Menge zu gering, um Degradationsprodukte sehen zu können. Wir hatten uns für diese geringe Proteinmenge entschieden, da man einen Kompromiß zwischen optimaler Auftrennung des SP-A in die verschiedenen Formen und trotzdem noch gut sichtbaren Banden schaffen wollte. Mit dem Auftragen einer geringeren Proteinmenge war auch eine Reduktion der unspezifischen Banden des SP-A-Detektionssystem 1 möglich. Bei höheren Proteinmengen wirkten die Blots v.a. wegen der unspezifischen Banden sehr überladen. Die weiteren Analysen mit dem SP-A-System 2 wurden ebenfalls mit einer Gesamtproteinmenge von 5 µg durchgeführt, um gleiche Bedingungen zum System 1 zu schaffen und damit einen direkten Vergleich zwischen beiden Detektionssystemen zu ermöglichen.

Ein weiterer Grund für das Fehlen von Degradationsprodukten könnte die schnelle Beseitigung der proteolytischen Fragmente sein [5]. Vorstellbar ist weiterhin, dass Degradationsprodukte keine Reaktion mit unserem verwendeten Antikörpersystem gezeigt haben, z.B. bei den drei beschriebenen Patienten mit auffälliger SP-A-Hauptbande. Eine Degradation von SP-A wurde jedoch bisher in vivo v.a. bei Patienten beobachtet, die eine neutrophile Inflammationsreaktion zeigten, wie bei Patienten mit Mukoviszidose [88] und ARDS [3]. Somit erscheint es am wahrscheinlichsten, dass es zu keiner Degradation von SP-A bei den Patienten mit

chronischem Husten gekommen ist. Dies hängt sicher auch mit dem vergleichsweise geringen Anteil an neutrophilen Granulozyten bei Patienten in dieser Arbeit zusammen, da bei Mukoviszidose- und ARDS-Patienten regelmäßig Prozentanteile von mehr als 50% gefunden werden und auch die absoluten Zahlen viel höher sind.

4.4 Veränderungen von SP-D

4.4.1 SP-D-Konzentration

In der BAL der Patienten mit obstruktiver Bronchitis konnte im Vergleich zur lungengesunden Kontrollgruppe ein erhöhter Gehalt an SP-D gemessen werden. Auch der auch das Gesamtprotein bezogene SP-D-Gehalt war in der obstruktiven Bronchitis-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht (siehe Tabelle 3.16 und Abbildungen 6 und 7). Eine signifikante Veränderung der SP-D-Konzentration zwischen der obstruktiven und der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe konnte nicht festgestellt werden. Ebenso zeigte die nicht-obstruktive Bronchitis-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollkindern keinen signifikanten Unterschied im SP-D-Gehalt (siehe Tabelle 3.16).

Bisher wurden in vivo mit Ausnahme von Asthma-Patienten [13] und Alveolar Proteinose-Patienten [14] eher unveränderte oder erniedrigte SP-D-Konzentrationen bei Patienten mit verschiedenen Lungenerkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen gefunden [61].

In der obstruktiven Bronchitis-Gruppe wurde sowohl ein Anstieg des Neutrophilenanteils als auch eine erhöhte Konzentration von SP-D im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen. Die Kohlenhydratbindungsstelle (carbohydrate recognition domain, CRD) des SP-D soll chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirken [12]. Diese Funktion von SP-D in der Infektabwehr könnte für die Erhöhung von SP-D und Neutrophilen bei Kindern mit obstruktiver Bronchitis mitverantwortlich sein, allerdings zeigte sich in dieser Arbeit keine signifikante Korrelation zwischen SP-D und neutrophilen Granulozyten (siehe 3.4.2).

Weiterhin könnte das SP-D in der obstruktiven Bronchitis-Gruppe an der Suppression von allergischen Entzündungsreaktionen beteiligt sein. Erhöhte Konzentrationen von SP-D konnten bei Patienten mit Asthma gefunden werden [13]. In Tiermodellen mit induzierten allergischen Entzündungsreaktionen der Atemwege kam es zu einer

Hochregulation von SP-D [49, 38], während die SP-A-Konzentration unverändert blieb [38].

In anderen Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass es bei bestimmten viralen und bakteriellen Infektionen zu einem Anstieg der SP-D-Konzentration gekommen ist [79, 2, 47]. Dies könnte auch für diese Arbeit zutreffen, da immerhin bei 21 von 25 untersuchten Lavagen der obstruktiven Bronchitis-Gruppe ein Bakteriennachweis gelungen ist (siehe Tabelle 3.12). Da bei den vier Patienten mit sterilen Lavagen nur bei einem Patienten SP-D gemessen werden konnte, während bei den anderen drei Kindern SP-D unterhalb der Nachweisgrenze lag, konnte dies nicht in einer statistischen Berechnung überprüft werden. Kürzlich wurde gezeigt, dass SP-D und auch SP-A direkt das Wachstum von gramnegativen Bakterien unabhängig von Makrophagen verhindern können, indem sie die Membranpermeabilität der Bakterien erhöhen [96].

Die Überlegung, ob eine Verminderung der hydrophilen Surfactantproteine SP-A und SP-D zu einer verminderten lokalen Infektabwehr mit der Folge häufiger Atemwegsinfektionen führt, hat sich bei der Untersuchung der BAL von Kindern mit chronischem Husten nicht bestätigen können. Im Hinblick auf den SP-D-Gehalt scheint es sogar eher sekundär zu einer Hochregulation gekommen zu sein. Ob die erhöhte SP-D-Konzentration aber auch zu einer verbesserten Abwehrfunktion oder zu einer verstärkten Suppression von Entzündungsreaktionen führt, ist in dieser Arbeit nicht geklärt worden und bedarf weiterer Untersuchungen. Allerdings zeigte sich wie in 4.4.2 dargestellt, dass ein komplettes Fehlen von SP-D mit dem Auftreten von vielen Pneumonien assoziiert ist (siehe auch Tabellen 3.30 und 3.31).

4.4.2 qualitative SP-D-Analyse

SP-D-Darstellung

Unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen in der SDS Elektrophorese und anschließender Westernblotanalyse mit polyklonalen Antikörper konnte SP-D im SP-D-Detektionssystem 1 und 2 bei Patienten und Kontrollen mit einer Hauptbande bei 47-51 kDa beobachtet werden. Im SP-D-Detektionssystem 1 wurde vermutet,

dass sich SP-D zusätzlich in einer schmalen Bande bei 43 kDa zeigte. Dementsprechend wurden im SP-D-Detektionssystem 1 vier verschiedene SP-D-Muster (siehe Tabelle 3.24 und Abbildung 32) erarbeitet. Im SP-D-Detektionssystem 2 wurden 18,4% der Kinder, die eine 43 kDa-Bande im SP-D-System 1 gezeigt haben, nachuntersucht. Dabei konnte bei keinem Kind diese Bande dargestellt werden (siehe Abbildungen 51 und 52), die Proteinmuster des SP-D-System 1 haben sich nicht bestätigt. Mit dem von uns verwendeten SDS Elektrophorese- und Western Blot-System konnte somit nur eine SP-D-Bande bei 47-51 kDa sicher dargestellt werden.

Ursprünglich wurde zuerst eine 43 kDa-Bande als die dominante monomere SP-D-Form unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen beschrieben. Auch in neueren Untersuchungen ist sie stets die dominante SP-D-Form [71, 15, 77, 60]. Erst 1998 entdeckten Mason et al. [71] eine 50 kDa-Form von SP-D, die sich sowohl unter Verwendung von monoklonalen als auch polyklonalen Antikörpern darstellen ließ. Mason fand diese 50 kDa-Form sowohl bei Alveolarproteinose-Patienten und bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose als auch bei Kontrollen. Er konnte darüberhinaus nachweisen, dass die 50 kDa-Form eine veränderte Glykosylierung zeigt und sich im Gegensatz zur 43 kDa-Form nicht zu höhermolekularen Multimeren vereint. In unserer Arbeit hingegen liegt die dominante SP-D-Form im Molekulargewichtsbereich 47-51 kDa, somit 4-8 kDa höher als die in der Literatur beschriebene dominante SP-D-Form.

Fehlende SP-D-Hauptbande

Bei insgesamt sechs Patienten (ob2, ob23, ob27, n-ob1, E1, E5) fehlte die SP-D-Hauptbande bei 47-51 kDa. Dieses Ergebnis zeigte sich in beiden verwendeten SP-D-Detektionssystemen (siehe Abbildungen 35 und 50). Klinische Details finden sich in der Tabelle 3.29. Im ELISA war SP-D bei diesen Kindern unterhalb der Nachweisgrenze. Drei dieser Patienten (ob23, n-ob1, E1) hatten wie unter 4.4.1 diskutiert auch keine bzw. nur eine sehr schwach ausgeprägte SP-A-Hauptbande. Klinische Auffälligkeiten zeigten sich insbesondere in der Häufigkeit von Pneumonien: Patienten ohne Nachweis einer SP-D-Bande bei 47-51 kDa hatten

signifikant häufiger viel (≥ 10) Pneumonien als Patienten mit SP-D-Nachweis (siehe Tabelle 3.30).

Drei Patienten (ob2, n-ob1, E5) hatten darüberhinaus einen sehr langen Krankheitsverlauf.

Einen sehr geringen Gesamtproteingehalt fand man bei dem Patienten ob2, so dass man den Verdacht haben könnte, die gemessenen BAL-Proben seien z.B. verdünnt gewesen, was das nicht nachweisbare SP-D erklären könnte. SP-A war zwar im ELISA messbar, allerdings war dies der geringste aller gemessenen SP-A-Werte. Auch in der Western Blotanalyse war SP-A mit einer nur relativ schmalen SP-A-Hauptbande darstellbar. Dieser Patient war der einzige, bei dem man im SP-A- und SP-D-Detektionssystem die unspezifischen Banden nicht gesehen hat (siehe Tabellen 3.18 und 3.23). Dies dürfte durch den niedrigen Gesamtproteingehalt der Proben bedingt sein, allerdings wurde immer die gleiche Gesamtproteinmenge für die SDS Elektrophorese aufgetragen.

Bisher wurde keine Erkrankung beschrieben, die durch einen Mangel an SP-D verursacht wird [61]. Aber in Studien mit Knockout-Mäusen kam es zu deutlichen Veränderungen wie Störungen in der Surfactanthomöostase [9] und der Entwicklung eines Emphysems [92]. Mäuse ohne SP-D zeigten eine verminderte Clearance von RS-Viren und Influenza A-Viren [20]. Nach bakteriellen Infektionen wurde bei SP-D-Knockout-Mäusen eine verstärkte Inflammationsreaktion und eine verminderte Phagozytose durch Makrophagen beobachtet [65]. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass es bei den Patienten mit fehlender SP-D-Hauptbande zu Veränderungen der SP-D-Funktionen wie Infektabwehr und Immunmodulation gekommen ist.

Untersuchung auf proteolytische Degradation von SP-D

Wie auch bei SP-A war von Interesse, ob bei Kindern mit chronischem Husten eine proteolytische Degradation von SP-D stattgefunden hat.

Bisher existieren nicht viele Studien über eine proteolytische Degradation von SP-D in vivo. Mason et. al berichtete, dass es in der BAL von Alveolar Proteinose-Patienten durch das Enzym Kollagenase zu einer Proteolyse von SP-D mit resultierendem Degradationsprodukt von ungefähr 20 kDa gekommen ist [71]. In

unserer Arbeit konnten im Molekulargewichtsbereich 0-25 kDa weder bei Patienten noch bei Kontrollen Banden entdeckt werden (siehe Tabelle 3.22).

Kürzlich wurden in der BAL von Mukoviszidose-Patienten proteolytische SP-D-Fragmente mit einem Molekulargewicht von 27-29 kDa und 33-38 kDa gefunden [89]. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass es durch die Elastase von *Pseudomonas aeruginosa* zu einer Degradation von SP-D mit resultierendem Degradationsprodukt bei ungefähr 35 kDa [70] bzw. 32-41 kDa [89] kommt. Wie oben erwähnt, war das Ausmaß der neutrophilen Inflammationsreaktion bei den Patienten in dieser Arbeit nur sehr gering ausgeprägt, insbesondere im Vergleich mit den Patienten mit Mukoviszidose.

Im SP-D-Detektionssystem 1 zeigte die Mehrzahl der untersuchten Patienten und Kontrollen Banden bei 25-28 kDa (siehe Tabelle 3.22 und 3.23), vergleichbar mit der 27-29 kDa-Bande bei Mukoviszidose-Patienten. Die große Anzahl an Patienten und Kontrollen mit 25-28 kDa-Banden spricht gegen Degradationsprodukte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Banden im SP-D-Detektionssystem 2 verschwinden bzw. sehr viel schwächer werden, so dass wir davon ausgehen, dass es sich hierbei um unspezifische Banden handelt. Dies wurde für 16,9% der Patienten überprüft. Bei den restlichen Patienten wäre es möglich, dass sich hinter diesen unspezifischen Banden proteolytische Fragmente verbergen, dies erscheint aber unwahrscheinlich. In vorliegender Arbeit konnten ebenfalls Banden im Molekulargewichtsbereich 35-38 kDa im SP-D-Detektionssystem 1 bei 51,6% der Patienten aus der obstruktiven und 50% der Kinder aus der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe detektiert werden (siehe Tabelle 3.22 und Abbildungen 33, 34, 49). Da diese Banden aber auch bei 40% der Kontrollen aufgetreten sind, handelt es sich hierbei vermutlich eher um eine besondere SP-D-Form als um Degradationsprodukte. Außerdem wurde in den verschiedenen Patientengruppen und der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied in der Zahl der Neutrophilen zwischen Kindern mit positiver bzw. negativer 35-38 kDa-Bande gefunden (siehe Tabellen 3.26-3.28). Dies spricht gegen die Anwesenheit von freier Elastase und konsekutiver Degradationsprodukte.

Es konnten bei keinem Patienten proteolytische SP-D-Fragmente gefunden werden. Wie schon für SP-A diskutiert, könnte dies an einer zu geringen aufgetragenen Proteinmenge, an einer schnellen Beseitigung der Fragmente oder an einer fehlenden Reaktion mit dem verwendeten Antikörpersystem liegen. Erwartet wird

jedoch eine proteolytische Degradation von SP-D hauptsächlich bei Lungenerkrankungen, die mit einer neutrophilen Inflammationsreaktion in der BAL einhergehen [30]. Somit ist es am wahrscheinlichsten, dass es bei den Patienten in dieser Arbeit, die nur einen vergleichsweise geringen Anteil an neutrophilen Granulozyten zeigten, zu keiner Degradation von SP-D gekommen ist.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Surfactantproteine SP-A und SP-D in bronchoalveolären Lavagen (BAL) von Kindern mit chronischem Husten zu untersuchen. Darüberhinaus wurden die Lavagen zytologisch und bakteriologisch analysiert und klinische Daten der Patienten retrospektiv aufgearbeitet.

Bei den Kindern mit obstruktiver Bronchitis wurde eine signifikante Verminderung des Makrophagenanteils und eine signifikante Erhöhung des Anteils der neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur lungengesunden Kontrollgruppe gefunden.

Es zeigte sich bei den Patienten mit obstruktiver und nicht-obstruktiver Bronchitis signifikant häufiger eine Keimbesiedelung in den unteren Atemwegen als in der Kontrollgruppe. Potentiell pathogene Keime in der Lavage fanden sich bei den Kindern mit obstruktiver Bronchitis signifikant häufiger als bei den Kontrollen.

Zum quantitativen Nachweis der Surfactantproteine SP-A und SP-D wurden Immunoassays durchgeführt. Die SP-A-Konzentration zeigte bei den Patienten keine Veränderung. SP-D war in den Lavagen der Patienten mit obstruktiver Bronchitis im Vergleich zur lungengesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht.

Mittels einer SDS Elektrophorese und anschließendem Western Blotting wurden die Surfactantproteine SP-A und SP-D qualitativ analysiert. Dabei zeigten sich bei der Mehrzahl der Patienten und Kontrollen ähnliche, vermutlich genetisch determinierte, SP-A- und SP-D-Muster. Weder in der SP-A- noch in der SP-D-Analyse konnten proteolytische Degradationsprodukte gefunden werden.

Zwei Patienten fehlte die SP-A-Hauptbande und bei einem Kind war diese stark abgeschwächt. Die SP-D-Hauptbande konnte bei insgesamt sechs Patienten nicht dargestellt werden. Klinisch zeigten die Kinder mit fehlender SP-A- und/oder fehlender SP-D-Hauptbande gehäuft Infektionen, wobei mit Ausnahme eines Kindes diese Patienten insbesondere an rezidivierenden Pneumonien erkrankten.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es durch primäre oder sekundäre Veränderungen der Lungenkollektine SP-A und SP-D bei einzelnen Kindern mit chronischem Husten zu einer Beeinträchtigung des lokalen Abwehrsystems der Lunge gekommen ist.

6 Anhang

Tabelle 6.1: Demographische Daten 1 der obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Genus	Alter bei BAL (Jahre)	Krankheitsdauer (Jahre)
ob1	w	0,3	0,3
ob2	m	11,9	10,0
ob3	m	2,5	2,0
ob4	m	4,6	4,0
ob5	m	4,2	4,0
ob6	m	12,7	3,0
ob7	m	0,7	0,3
ob8	w	5,3	1,0
ob9	w	7,9	3,0
ob10	m	3,4	3,0
ob11	m	7,9	7,0
ob12	m	4,2	0,3
ob13	m	0,7	0,5
ob14	w	6,3	2,5
ob15	m	9,3	5,0
ob16	m	8,0	5,0
ob17	m	0,8	0,3
ob18	w	15,2	4,0
ob19	w	5,3	5,0
ob20	w	0,7	0,7
ob21	m	2,4	2,2
ob22	w	2,8	2,5
ob23	w	3,4	3,4
ob24	w	5,4	5,4
ob25	m	1,9	1,5
ob26	w	5,3	3,3
ob27	w	5,2	2,0
ob28	m	7,9	3,0
ob29	w	1,0	0,8
ob30	m	1,0	0,7
ob31	m	1,8	1,5

Tabelle 6.2: Demographische Daten 2 der obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Alter der ersten Symptome (Jahre)	Passivrauchen zum Zeitpunkt der Lavage	saisonale Abhängigkeit der Symptomatik	rez. Infekte der oberen Luftwege, Otitiden, Tonsillitiden
ob1	0,0	nein	nicht bekannt	ja
ob2	1,9	nein	ja	ja
ob3	0,5	nein	nein	ja
ob4	0,6	nein	nein	ja
ob5	0,2	nein	ja	ja
ob6	9,7	nein	nicht bekannt	nicht bekannt
ob7	0,4	nicht bekannt	nicht bekannt	ja
ob8	4,3	nicht bekannt	nein	nein
ob9	4,9	ja	nein	ja
ob10	0,4	ja	ja	nein
ob11	0,9	nicht bekannt	ja	ja
ob12	3,9	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
ob13	0,2	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
ob14	3,8	nein	ja	ja
ob15	4,3	nein	ja	ja
ob16	3,0	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
ob17	0,5	nein	nicht bekannt	nein
ob18	11,2	nein	ja	ja
ob19	0,3	nein	ja	ja
ob20	0,0	ja	nicht bekannt	nicht bekannt
ob21	0,2	nicht bekannt	ja	ja
ob22	0,3	nein	ja	ja
ob23	0,0	nein	ja	ja
ob24	0,0	nicht bekannt	nicht bekannt	ja
ob25	0,4	nein	ja	nein
ob26	2,0	nein	ja	ja
ob27	3,2	nein	ja	ja
ob28	4,9	nein	ja	ja
ob29	0,2	nein	nicht bekannt	ja
ob30	0,3	ja	ja	ja
ob31	0,3	nein	ja	ja

Tabelle 6.3: Demographische Daten 1 der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Genus	Alter bei BAL (Jahre)	Krankheitsdauer (Jahre)
n-ob1	m	9,3	9,0
n-ob2	w	3,5	n.b.
n-ob3	m	3,2	3,0
n-ob4	w	7,2	1,0
n-ob5	m	1,9	1,2
n-ob6	m	0,8	0,5
n-ob7	w	11,3	0,8
n-ob8	w	11,3	n.b.
n-ob9	w	9,7	2,7
n-ob10	w	1,4	1,4
n-ob11	m	9,0	4,5
n-ob12	m	4,7	4,5
n-ob13	w	16,8	0,8
n-ob14	w	1,8	1,8

Tabelle 6.4: Demographische Daten 2 der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Alter der ersten Symptome (Jahre)	Passivrauchen zum Zeitpunkt der Lavage	saisonale Abhängigkeit der Symptomatik	rez. Infekte der oberen Luftwege, Otitiden, Tonsillitiden
n-ob1	0,3	nein	ja	ja
n-ob2	nicht bekannt	ja	nein	nein
n-ob3	0,2	ja	ja	ja
n-ob4	6,2	ja	nein	ja
n-ob5	0,7	ja	ja	ja
n-ob6	0,3	nein	ja	nein
n-ob7	10,5	ja	ja	nein
n-ob8	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	ja
n-ob9	7,0	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
n-ob10	0,0	ja	nein	ja
n-ob11	4,5	nein	nicht bekannt	ja
n-ob12	0,2	nein	ja	nein
n-ob13	16,0	ja	nein	ja
n-ob14	0,0	nein	nicht bekannt	ja

Tabelle 6.5: Demographische Daten 1 der Einzelfälle

Nr	Genus	Alter bei BAL (Jahre)	Krankheitsdauer (Jahre)
1	w	10,3	0,3
2	w	7,2	nicht bekannt
3	m	0,7	0,3
4	m	13,8	0,3
5	m	6,0	6,0

Tabelle 6.6: Demographische Daten 2 der Einzelfälle

Nr	Alter der ersten Symptome (Jahre)	Passivrauchen zum Zeitpunkt der Lavage	saisonale Abhängigkeit der Symptomatik	rez. Infekte der oberen Luftwege, Otitiden, Tonsillitiden
E1	10,0	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
E2	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
E3	0,4	ja	nein	nein
E4	13,5	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
E5	0,0	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt

Tabelle 6.7: Familienanamnese der obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Asthma	Allergien	sonstige Atemwegserkrankungen
ob1	Vater	Mutter: Rhinitis allergica	nicht bekannt
ob2	Mutter	Schwester: Neurodermitis, Mutter: diverse Nahrungsmittelallergien	Bruder: rez. Bronchitiden u. Pneumonien
ob3	nein	nein	nein
ob4	nein	Vater: Rhinitis allergica, Penicillinallergie	Vater: chron. Bronchitis
ob5	nein	nein	Bruder: rez. Bronchitiden u. Pneumonien
ob6	nein	Vater: Rhinitis allergica, Bruder: Neurodermitis	nein
ob7	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
ob8	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
ob9	Vater, Bruder	nein	Bruder: rez. Bronchitiden
ob10	nein	nein	nein
ob11	nein	nein	nein
ob12	nein	nein	nein
ob13	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
ob14	nein	nein	nicht bekannt
ob15	nein	nein	nein
ob16	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
ob17	nein	nein	nein
ob18	nein	nein	nein
ob19	nein	nein	nein
ob20	Mutter	diverse Nahrungsmittelallergien	nicht bekannt
ob21	nein	nein	nein
ob22	nein	nein	nein
ob23	nein	nein	nein
ob24	Vater	nein	nicht bekannt
ob25	nein	nein	nein
ob26	Vater	nein	nein
ob27	Mutter	Vater: Rhinitis allergica u. Neurodermitis, Mutter: Tetrazyklinallergie	Schwester: chron. Bronchitiden
ob28	Bruder	Bruder: Rhinitis allergica	nein
ob29	nein	Bruder: Rhinitis allergica, Schwester: Neurodermitis	nein
ob30	Bruder	Mutter: Neurodermitis, starke Allergie auf Gräser u. Pollen	nein
ob31	Mutter	Mutter: Neurodermitis, Allergie auf Tierepithelien	nein

Tabelle 6.8: Familienanamnese der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Asthma	Allergien	sonstige Atemwegserkrankungen
n-ob1	Bruder	Bruder: Pollenallergie	nein
n-ob2	Vater	nein	nein
n-ob3	nein	Schwester: Neurodermitis, Mutter Allergie gegen Citrusfrüchte	nein
n-ob4	nein	nein	Bruder: rez. Bronchitiden
n-ob5	nein	nein	Mutter: chron. Bronchitis
n-ob6	nein	nein	nicht bekannt
n-ob7	nein	nein	nicht bekannt
n-ob8	Vater	Mutter: Neurodermitis, Milbenallergie	nicht bekannt
n-ob9	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
n-ob10	nein	nein	Schwester u. Mutter: rez. Pseudokrappanfalle
n-ob11	nein	nein	nein
n-ob12	nein	nein	nein
n-ob13	nein	nein	nein
n-ob14	nein	nein	nein

Tabelle 6.9: Familienanamnese der Einzelfälle

Nr	Asthma	Allergien	sonstige Atemwegserkrankungen
E1	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
E2	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
E3	nein	nein	Vater: offene Tuberkulose
E4	nein	nein	nicht bekannt
E5	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt

Tabelle 6.10: Erkrankungen der Atemwege der obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Pneumonie(n) (Anzahl)	Asthma	Pseudokrupp (Anzahl)	Pertussis	Bronchiolitis
ob1	2 (R 2x)	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	7 Wochen vor BAL
ob2	2 (AB)	ja	2	nein	nein
ob3	2 (R 2x)	ja	>2	nein	RSV-Bronchiolitis 1,6 Jahre vor BAL
ob4	2 (R 2x)	ja	1	nein	nein
ob5	4 (R 2x)	nein	>2	nein	nein
ob6	1 (R)	ja	nicht bekannt	ja (ca. 4 Jahre vor BAL)	nicht bekannt
ob7	0	nicht bekannt	nein	nein	nein
ob8	>2 (R wh)	ja	nicht bekannt	nein	nicht bekannt
ob9	15-20 (R wh)	ja	nein	ja	nein
ob10	0	ja	>2	nein	nein
ob11	0	ja	nein	ja	nicht bekannt
ob12	1 (R)	nicht bekannt	nicht bekannt	nein	nicht bekannt
ob13	>2 (R 2x)	ja	nicht bekannt	nein	nicht bekannt
ob14	2 (AB)	ja	nein	nein	nicht bekannt
ob15	0	ja	nein	nein	nein
ob16	1 (R)	ja	nein	nein	nein
ob17	0	nein	nein	nein	nein
ob18	1 (R)	ja	nein	nein	nein
ob19	>2 (R wh)	nein	nein	nein	nein
ob20	1 (R)	nein	nicht bekannt	ja	nicht bekannt
ob21	3 (R 3x)	ja	nicht bekannt	nein	RSV-Bronchiolitis 2,2 Jahre vor BAL
ob22	0	nein	nein	nein	nein
ob23	10 (R 2x)	nein	nein	nein	nein
ob24	1 (R)	nicht bekannt	nicht bekannt	ja (4,6 Jahre vor BAL)	5,3 Jahre vor BAL
ob25	1 (R)	ja	nein	nein	nicht bekannt
ob26	0	ja	>2	nein	nein
ob27	11 (R 4x)	ja	nein	nein	nein
ob28	1 (R)	ja	ja	ja (ca. 3 Jahre vor BAL)	nein
ob29	2 (R 1x)	nein	1	nein	nein
ob30	2 (R 2x)	ja	ja	nein	nein
ob31	1 (R)	nein	nein	nein	nein

Abkürzungen: R = Nachweis der Pneumonie durch Röntgen; AB = positives Ansprechen der Pneumonie auf Antibiotikagabe, keine radiologische Sicherung;

Tabelle 6.11: Erkrankungen der Atemwege der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Pneumonie(n) (Anzahl)	Asthma	Pseudokrupp	Pertussis	Bronchiolitis
n-ob1	2 (R 2x)	nein	>2	ja (0,6 Jahre vor BAL)	nein
n-ob2	0	nein	14	nein	nein
n-ob3	0	nein	ja	nein	nein
n-ob4	0	nein	nein	nein	nein
n-ob5	2 (R 2x)	nein	nein	nein	nein
n-ob6	0	nein	nein	nein	0,6 Jahre vor BAL
n-ob7	0	nein	nicht bekannt	nein	nein
n-ob8	nicht bekannt	nein	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
n-ob9	>2 (R wh)	nein	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
n-ob10	>2 (AB)	nein	1	nein	nein
n-ob11	0	nein	14	nein	nein
n-ob12	4 (R 4x)	nein	nein	nein	nicht bekannt
n-ob13	1 (AB)	nein	nein	nein	nicht bekannt
n-ob14	2 (R 2x)	nein	nein	nicht bekannt	nicht bekannt

Abkürzungen: R = Nachweis der Pneumonie durch Röntgen; AB = positives Ansprechen der Pneumonie auf Antibiotikagabe, keine radiologische Sicherung;

Tabelle 6.12: Erkrankungen der Atemwege der Einzelfälle

Nr	Pneumonie(n) (Anzahl)	Asthma	Pseudokrupp	Pertussis	Bronchiolitis
E1	0	nein	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
E2	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
E3	1 (R)	nein	nein	nicht bekannt	nein
E4	>2 (R wh)	nicht bekannt	3	ja	nicht bekannt
E5	>2 (R wh)	nein	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt

Abkürzungen: R = Nachweis der Pneumonie durch Röntgen; AB = positives Ansprechen der Pneumonie auf Antibiotikagabe, keine radiologische Sicherung;

Tabelle 6.13: Medikamente und Krankheitsverlauf der obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Med. z. Zeitpunkt der BAL	aktuelle Medikation	Verlauf	Follow up Zeitraum nach BAL (Jahre)
ob1	Ulogant	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
ob2	Pulmicort+Aarane inh., Singulair	keine	besser	2
ob3	Pulmicort inh.	Euphyllin,Pulmicort, Sultanol, Berodualspray, Atrovent	besser	3
ob4	keine	Pulmicort	besser	2
ob5	Pulmicort, DNCG inh.	keine	besser	1
ob6	Sanasthmax inh.	nicht bekannt	besser	4
ob7	Pulmicort, Sultanol, Atrovent	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
ob8	Pulmicort, Sultanol	nicht bekannt	besser	4
ob9	keine	nicht bekannt	schlechter	2,4
ob10	Sultanol, DNCG, Pulmicort	nicht bekannt	gleich	2
ob11	Pulmicort, Foradil, Elobact	Aarane inh.b.Bedarf, Viani mite	besser	4,3
ob12	keine	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
ob13	Atrovent, Sultanol, Pulmicort, Infectotrimet	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
ob14	Emser-Inhalationen, Antibiosen	Flutide 125	schlechter	2
ob15	Atrovent b.Bedarf inh, Pulmicort, Foradil	Pulmicort, Foradil	besser	1,3
ob16	Pulmicort, Sultanol	nicht bekannt	gesund	2
ob17	keine	keine	besser	1,8
ob18	Fluticason	Oxis und Pulmicort inh., Dosisreduktion	besser	3,3
ob19	Pulmicort, Sultanol	keine	gesund	2,7
ob20	Pulmicort, Sultanol	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
ob21	Pulmicort, Sultanol	Cortison inh., Sultanol	besser	2
ob22	Cefuroxim, Mucosolvan, Spiropent, Sultanol	keine	besser	1,6
ob23	keine	keine	besser	3,8
ob24	keine	Foradil, Budesonid, Decanoxylat	gleich	3,8
ob25	Mucosolvan, Sultanol, Atrovent	Sultanol b. Bedarf	besser	3,8
ob26	keine	Dauertherapie mit Cromohexal, Absomol, Atrovent, b. Bedarf Rectodelt u. Pulmicort	besser	1,3
ob27	Aarane, Pulmicort	keine regelmäßige Dauermedikation	besser	1,8
ob28	Pulmicort	Dauertherapie: Viani; Inhalation v. Sultanol, Atrovent	besser	1,3
ob29	Propulsin, Theophyllin	nicht bekannt	gleich	1,3
ob30	Cefuroxim, Bronchoretard, Decortin H p.o., Sultanol, Pulmicort, Atrovent	Bronchoretard; Dauertherapie: Pulmicort, Sultanol, Atrovent inh.	besser	2
ob31	Sultanol, Flutide	keine	besser	1,7

Tabelle 6.14: Medikamente und Krankheitsverlauf der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Med. z. Zeitpunkt der BAL	aktuelle Medikation	Verlauf	Follow up Zeitraum nach BAL (Jahre)
n-ob1	keine	keine	gesund	2,8
n-ob2	keine	keine Dauermedikation; b.Anfällen Rectodelt	besser (seit BAL)	5
n-ob3	keine	keine	besser	2
n-ob4	Pulmicort	nicht bekannt	gleich	2,3
n-ob5	keine	keine	gesund	3,8
n-ob6	Cromoglicinsäure	nicht bekannt	besser	1,8
n-ob7	Budesonid inh., Terbutalin inh.	nicht bekannt	besser	3,3
n-ob8	DNCG inh.	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
n-ob9	keine	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
n-ob10	keine	keine	gesund	3,8
n-ob11	keine	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
n-ob12	ACC, Antra	Antra	besser	1,3
n-ob13	Nedocromil inh, Sultanol inh.	keine	gesund	2,3
n-ob14	Cephalosporin bis 2 Tage vor BAL	keine	besser	2,4

Tabelle 6.15: Medikamente und Krankheitsverlauf der Einzelfälle

Nr	Med. z. Zeitpunkt der BAL	aktuelle Medikation	Verlauf	Follow up Zeitraum nach BAL (Jahre)
E1	keine	nicht bekannt	besser	2,3
E2	keine	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
E3	keine	keine	gesund	1,8
E4	Prednisolon mg	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
E5	Urbason, Sempera, Bactrim, Paracetamol, Cotrim, Sobelin, Zithromax, Fosfomycin, Ampho B		verstorben	0,2

Tabelle 6.16: BAL-Cytologie der obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Ges. Zellzahl (Zellen/ml* 10.000)	Zellvitalität (%)	Mak (%)	Lym (%)	Neut (%)	Eos (%)	Mast (%)	Recovery (%)
ob1	33	90	75	23	2	0	0	56
ob2	48	66	95	4	1	0	0	59
ob3	14	62	76	11	10	2	0	n.b.
ob4	14,5	90	81	11	8	0	0	87
ob5	15	90	94	4	2	0	0	42
ob6	15,4	/	/	/	/	/	/	/
ob7	24	90	72	26	1	1	0	52,4
ob8	9,5	n.b.	62	35	3	0	0	53
ob9	2,1	50	88	3	6	0	0	85
ob10	21	79	77	11	11	1	0	77
ob11	8,3	79	65	29	3	3	0	54
ob12	26,5	70	55	4	40	1	0	n.b.
ob13	114,4	85	22	1	76	1	0	33
ob14	15	50	82	16	2	0	0	85
ob15	81,3	82	31	10	55	4	0	42
ob16	9	73	92	7	1	0	0	n.b.
ob17	21	96,4	86	10	4	0	0	59
ob18	6,5	80	90	4	1	4	1	50
ob19	14	90	80	16	2	2	0	64
ob20	16,7	95	81	16	3	0	0	59
ob21	15,5	90	94	6	0	0	0	77
ob22	30	82	88	10	2	0	0	83
ob23	/	/	/	/	/	/	/	/
ob24	35	91	70	23	7	0	0	n.b.
ob25	10,4	90	35,5	52,5	9	3	0	42
ob26	5,5	100	66	14	20	0	0	70
ob27	15,5	/	/	/	/	/	/	70
ob28	6,5	85	88	10	2	0	0	67
ob29	10	70	78	20	2	0	0	38
ob30	20	70	78	3	19	0	0	40
ob31	26,5	69	79	10	8	3	0	49

Abkürzung: n.b. = nicht bekannt

Tabelle 6.17: BAL-Cytologie der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Ges. Zellzahl (Zellen/ml* 10.000)	Zellvitalität (%)	Mak (%)	Lym (%)	Neut (%)	Eos (%)	Mast (%)	Recovery (%)
n-ob1	13	n.b	83	10	6	1	0	n.b.
n-ob2	24	92	90	7	3	0	0	72
n-ob3	21	75	61	14	23	1	1	33
n-ob4	18	70	63	30	7	0	0	41
n-ob5	29	92	54	20	25	1	0	n.b.
n-ob6	13	65	98	2	0	0	0	52
n-ob7	7	80	92	7,2	0,4	0,4	0	58
n-ob8	15	87	94,5	4,5	1	0	0	70
n-ob9	5,5	82	85	12	2	1	0	72
n-ob10	7,5	50	97	2	1	0	0	n.b.
n-ob11	17	90	86	14	0	0	0	48
n-ob12	44,5	90	26	27	37	10	0	53
n-ob13	5,4	93,3	89	10	1	0	0	n.b.
n-ob14	29,5	94	25	25	37,5	1	0	56

Abkürzung: n.b. = nicht bekannt

Tabelle 6.18: BAL-Cytologie der Einzelfälle

Nr	Ges. Zellzahl (Zellen/ml* 10.000)	Zellvitalität (%)	Mak (%)	Lym (%)	Neut (%)	Eos (%)	Mast (%)	Basophile (%)	Recovery (%)
E1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	20
E2	90	97,5	34	57	4	5	0	0	48
E3	85	71	38	11	50	0	1	0	24
E4	18	86	42	53	4	0	0	1	n.b.
E5	25	100	52	44	4	0	0	0	n.b.

Abkürzung: n.b. = nicht bekannt

Tabelle 6.19: BAL-Cytologie der Kontrollgruppe

Nr	Ges. Zellzahl (Zellen/ml* 10.000)	Zellvitalität (%)	Mak (%)	Lym (%)	Neut (%)	Eos (%)	Mast (%)	Recovery (%)
K1	4,9	77	90	10	0	0	0	31
K2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	79
K3	33	83	91	8	1	0	0	47
K4	82	68	91	7	2	0	0	52
K5	10,9	72	89	9	2	0	0	64
K6	17	83	95	4	1	0	0	82
K7	20	85	84	14	1	1	0	60
K8	10,9	76	98	2	0	0	0	47
K9	5	64	94	5	1	0	0	52
K10	7	100	81	15	4	0	0	60
K11	16,7	99	88	10	2	0	0	44
K12	7,3	93	92	8	0	0	0	69
K13	8	94	77	23	0	0	0	76
K14	18	69	83	13	3	1	0	57
K15	10	100	85	14	1	0	0	52

Abkürzungen: n.b. = nicht bekannt

Tabelle 6.20: bakteriologische Untersuchung der BAL der verschiedenen Gruppen

Obstruktive Bronchitis		Nicht-obstruktive Bronchitis		Einzelfälle		Kontroll-Gruppe	
Nr	Bakteriologie	Nr	Bakteriologie	Nr	Bakteriologie	Nr	Bakteriologie
1	2,5	1	nicht bekannt	1	nicht bekannt	1	0
2	nicht bekannt	2	0	2	0	2	0
3	nicht bekannt	3	1	3	10	3	0
4	2,3	4	nicht bekannt	4	0	4	0
5	0	5	1,2,3	5	0	5	0
6	nicht bekannt	6	1			6	0
7	2,3	7	0			7	0
8	0	8	1			8	0
9	4	9	1			9	0
10	1,2,9	10	1,4			10	1
11	nicht bekannt	11	1			11	1
12	1,2	12	1			12	0
13	0	13	1			13	0
14	4	14	nicht bekannt			14	0
15	1					15	0
16	1						
17	3						
18	nicht bekannt						
19	1						
20	1,7						
21	1						
22	1						
23	1						
24	nicht bekannt						
25	2,3						
26	1						
27	0						
28	6,8						
29	1,3						
30	1,7						
31	1,3						

Bakterien:**0=kein Nachweis****1=physiologische Keimflora des oberen Atemtraktes****2=Haemophilus influenzae****3=Pneumokokken****4=Staphylokokkus aureus****5=E. coli****6=Pseudomonas aeruginosa****7=Klebsiella oxytoca****8=Klebsiella pneumoniae****9=Moraxella catharralis****10=Mykobakterien**

Tabelle 6.21: Gesamtprotein und Surfactantproteine SP-A und SP-D der obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Gesamtprotein (µg/ml)	SP-A (ng/ml)	SP-D (ng/ml)	SP-A/Protein (%)	SP-D/Protein (%)
ob1	111,0	4912,0	64,9	4,43	0,06
ob2	17,2	160,0	nicht messbar	0,93	/
ob3	58,7	5198,0	56,4	8,86	0,10
ob4	77,2	2159,7	67,0	2,80	0,09
ob5	91,8	3173,7	nicht messbar	3,46	/
ob6	73,7	2648,2	50,4	3,59	0,07
ob7	183,8	2752,8	39,9	1,50	0,02
ob8	55,2	3942,7	53,4	7,14	0,10
ob9	22,3	402,4	nicht messbar	1,80	/
ob10	45,0	6067,9	nicht messbar	13,48	/
ob11	48,6	8877,6	137,5	18,27	0,28
ob12	156,0	2237,3	18,8	1,43	0,01
ob13	154,0	3415,6	nicht messbar	2,22	/
ob14	75,6	4854,7	40,7	6,42	0,05
ob15	140,9	2002,0	81,0	1,42	0,06
ob16	70,3	2395,7	nicht messbar	3,41	/
ob17	149,5	5586,0	61,3	3,74	0,04
ob18	58,1	1947,6	29,2	3,35	0,05
ob19	95,0	4730,1	84,8	4,98	0,09
ob20	114,6	2780,3	27,2	2,43	0,02
ob21	44,1	4638,4	97,8	10,52	0,22
ob22	109,6	7909,0	nicht messbar	7,22	/
ob23	45,0	219,8	nicht messbar	0,49	/
ob24	57,8	2720,8	34,9	4,71	0,06
ob25	60,7	2724,2	16,2	4,49	0,03
ob26	36,6	1351,6	86,4	3,69	0,24
ob27	53,2	434,5	nicht messbar	0,82	/
ob28	88,8	3967,5	66,0	4,47	0,07
ob29	70,0	4789,7	nicht messbar	6,84	/
ob30	180,5	10767,5	97,1	5,97	0,05
ob31	207,1	1228,3	84,5	0,59	0,04

Tabelle 6.22: Gesamtprotein und Surfactantproteine SP-A und SP-D der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe

Nr	Gesamtprotein (µg/ml)	SP-A (ng/ml)	SP-D (ng/ml)	SP-A/Protein (%)	SP-D/Protein (%)
n-ob1	151,1	507,1	nicht messbar	0,34	/
n-ob2	63,9	4223,6	35,2	6,61	0,06
n-ob3	178,6	1747,5	41,1	0,98	0,02
n-ob4	119,9	2520,6	nicht messbar	2,10	/
n-ob5	112,3	1897,0	17,6	1,69	0,02
n-ob6	183,8	6520,3	153,3	3,55	0,08
n-ob7	36,5	2216,8	32,3	6,07	0,09
n-ob8	74,4	9806,5	34,3	13,18	0,05
n-ob9	32,2	3486,6	71,4	10,83	0,22
n-ob10	58,1	1305,1	14,0	2,25	0,02
n-ob11	170,7	7889,1	68,1	4,62	0,04
n-ob12	60,6	2985,0	12,0	4,93	0,02
n-ob13	85,0	8336,2	51,5	9,81	0,06
n-ob14	245,6	3278,6	17,8	1,33	0,01

Tabelle 6.23: Gesamtprotein und Surfactantproteine SP-A und SP-D der Einzelfälle

Nr	Gesamtprotein (µg/ml)	SP-A (ng/ml)	SP-D (ng/ml)	SP-A/Protein (%)	SP-D/Protein (%)
E1	96,2	nicht messbar	nicht messbar	/	/
E2	557,7	2746,4	82,9	0,49	0,01
E3	320,8	5404,3	19,7	1,68	0,01
E4	108,9	2361,8	134,8	2,17	0,12
E5	51,1	300,6	nicht messbar	0,59	/

Tabelle 6.24: Gesamtprotein und Surfactantproteine SP-A und SP-D der Kontrollen

Nr	Gesamtprotein (µg/ml)	SP-A (ng/ml)	SP-D (ng/ml)	SP-A/Protein (%)	SP-D/Protein (%)
K1	47,9	2095,5	34,3	4,37	0,07
K2	80,6	11343,5	10,3	14,07	0,01
K3	95,8	9940,5	39,3	10,38	0,04
K4	76,8	4497,5	18,6	5,86	0,02
K5	54,7	6046,4	12,9	11,05	0,02
K6	81,8	8067,6	14,9	9,86	0,02
K7	94,6	10289,6	16,3	10,88	0,02
K8	78,7	12295,7	11,2	15,62	0,01
K9	85,6	9894,5	20,6	11,56	0,02
K10	64,4	2282,4	26,7	3,54	0,04
K11	67,1	3120,1	23,2	4,65	0,03
K12	63,4	1481	9,6	2,34	0,02
K13	72,9	1302	10,4	1,79	0,01
K14	103,7	4098	70,1	3,95	0,07
K15	56,1	805	11,3	1,43	0,02

Tabelle 6.25: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 1 der obstruktiven Bronchitis-Gruppe im SP-A-System 1/System 2

Nr	SP-A-Bandenvariation			Unspezifische Banden		
	29-31 kDa	33-37 kDa	54-60 kDa	25-28 kDa	51-54 kDa	60-65 kDa
ob1	+/(+)	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-
ob2	-	+	+	-	-	-
ob3	+	+	+	+	+	+
ob4	-	+	+	+	+	+
ob5	+	+	+	+	+	+
ob6	+/+	+/+	+/+	+/(+)	+/-	+/-
ob7	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-
ob8	+	+	+	+	+	+
ob9	-/-	+/+	+/-	-/-	+/-	+/-
ob10	+	+	+	+	+	+
ob11	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-
ob12	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
ob13	-	+	+	-	+	+
ob14	+	+	+	+	+	+
ob15	+	+	+	+	+	+
ob16	+	+	+	+	+	+
ob17	+	+	+	+	+	+
ob18	+	+	+	+	+	+
ob19	+	+	+	+	+	+
ob20	+/(+)	+/+	+/(+)	+/-	+/-	+/-
ob21	+	+	+	+	+	+
ob22	+	+	+	+	+	+
ob23	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-
ob24	+	+	+	+	+	+
ob25	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
ob26	-	+	+	+	+	+
ob27	+	+	+	+	+	+
ob28	+	+	+	+	+	+
ob29	+	+	+	+	+	+
ob30	+	+	+	+	+	+
ob31	-/-	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-

Tabelle 6.26: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 2 der obstruktiven Bronchitis-Gruppe im SP-A-System 1/System 2

Nr	0-25 kDa	31-33 kDa	37-51 kDa	65-100 kDa
ob1	-/-	-/-	-/-	+/-
ob2	-	-	-	-
ob3	-	-	2+	+
ob4	-	-	-	+
ob5	-	-	+	+
ob6	-/-	-/-	+/(+)	+/+
ob7	-/-	-/-	2+/-	+/+
ob8	-	-	-	+
ob9	-/-	-/-	-/-	-/-
ob10	-	-	-	+
ob11	-/-	-/-	2+/-	+/-
ob12	-/-	-/-	+/-	+/+
ob13	-	-	-	+
ob14	-	-	-	+
ob15	-	-	2+	+
ob16	-	-	2+	+
ob17	-	-	2+	+
ob18	-	-	-	+
ob19	-	-	-	+
ob20	-/-	-/-	-/-	+/-
ob21	-	-	+	+
ob22	-	-	-	+
ob23	-/-	-/-	+/-	+/-
ob24	-	-	2+	+
ob25	-/-	-/-	2+/-	+/+
ob26	-	-	-	+
ob27	-	-	-	-
ob28	-	-	+	+
ob29	-	-	+	+
ob30	-	-	+	+
ob31	-/-	-/-	2+/-	+/-

Tabelle 6.27: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 1 der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe im SP-A-System 1/System 2

Nr	SP-A-Bandenvariation			Unspezifische Banden		
	29-31 kDa	33-37 kDa	54-60 kDa	25-28 kDa	51-54 kDa	60-65 kDa
n-ob1	-/-	(+)/(+)	+/+	+/-	+/-	+/-
n-ob2	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-
n-ob3	+	+	+	+	+	+
n-ob4	-	+	+	+	+	+
n-ob5	+	+	+	+	+	+
n-ob6	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-
n-ob7	+	+	+	+	+	+
n-ob8	+	+	+	+	+	+
n-ob9	+	+	+	+	+	+
n-ob10	+/(+)	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-
n-ob11	+	+	+	+	+	+
n-ob12	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-
n-ob13	+	+	+	+	+	+
n-ob14	+	+	+	+	+	+

Tabelle 6.28: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 2 der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe im SP-A-System 1/System 2

Nr	0-25 kDa	31-33 kDa	37-51 kDa	65-100 kDa
n-ob1	-/-	-/-	-/-	+/+
n-ob2	-/-	-/-	-/-	+/-
n-ob3	-	-	2+	+
n-ob4	-	-	+	+
n-ob5	-	-	2+	+
n-ob6	-/-	-/-	+/(+)	+/-
n-ob7	-	-	-	+
n-ob8	-	-	-	+
n-ob9	-	-	-	+
n-ob10	-/-	-/-	-/-	+/-
n-ob11	-	-	-	+
n-ob12	-/-	-/-	+/-	+/-
n-ob13	-	-	-	+
n-ob14	-	-	+	+

Tabelle 6.29: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 1 der Einzelfälle im SP-A-System 1/System 2

Nr	SP-A-Bandenvariation			Unspezifische Banden		
	29-31 kDa	33-37 kDa	54-60 kDa	25-28 kDa	51-54 kDa	60-65 kDa
E1	-/-	-/-	+/+	+/-	+/-	+/-
E2	-/-	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-
E3	-/-	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-
E4	-/-	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-
E5	-	+	+	-	+	+

Tabelle 6.30: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 2 der Einzelfälle im SP-A-System 1/System 2

Nr	0-25 kDa	31-33 kDa	37-51 kDa	65-100 kDa
E1	-/-	-/-	-/-	+/-
E2	-/-	-/-	2+/-	+/-
E3	-/-	-/-	+/-	+/(+)
E4	-/-	-/-	+/-	+/-
E5	-	-	-	-

Tabelle 6.31: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 1 der Kontrollen im SP-A-System 1/System 2

Nr	SP-A-Bandenvariation			Unspezifische Banden		
	29-31 kDa	33-37 kDa	54-60 kDa	25-28 kDa	51-54 kDa	60-65 kDa
K1	-	+	+	-	+	+
K2	+	+	+	+	+	+
K3	+	+	+	+	+	+
K4	-	+	+	+	+	+
K5	+	+	+	+	+	+
K6	-	+	+	+	+	+
K7	+	+	+	+	+	+
K8	+	+	+	+	+	+
K9	+	+	+	+	+	+
K10	-	+	+	+	+	+
K11	-	+	+	+	+	+
K12	+/+	+/+	+/+	+/(+)	+/(+)	+/(+)
K13	+/+	+/+	+/+	-/-	+/-	+/-

Tabelle 6.32: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 2 der Kontrollen im SP-A-System 1/System 2

Nr	0-25 kDa	31-33 kDa	37-51 kDa	65-100 kDa
K1	-	-	-	+
K2	-	-	-	+
K3	-	-	-	+
K4	-	-	-	+
K5	-	-	-	+
K6	-	-	-	+
K7	-	-	-	+
K8	-	-	-	+
K9	-	-	-	+
K10	-	-	+	+
K11	-	-	+	+
K12	-/-	-/-	+/-	+/+
K13	-/-	-/-	-/-	+/-

Tabelle 6.33: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 1 der obstruktiven Bronchitis-Gruppe im SP-D-System 1/System 2

Nr	SP-D-Bandenvariation		Unspezifische Banden		
	43 kDa	47-51 kDa	25-28 kDa	51-54 kDa	60-65 kDa
ob1	+	+	+	+	+
ob2	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
ob3	-/-	+/+	+/-	+/-	+/-
ob4	+	+	+	+	+
ob5	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
ob6	-	+	+	+	+
ob7	-	+	-	+	+
ob8	+	+	-	+	+
ob9	-	+	-	+	+
ob10	-/-	+/+	+/(+)	+/(+)	+/+
ob11	+	+	+	+	+
ob12	+	+	+	+	+
ob13	+	+	+	+	+
ob14	+	+	+	+	+
ob15	+/-	+/+	+/+	+/(+)	+/+
ob16	+	+	+	+	+
ob17	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-
ob18	-	+	+	+	+
ob19	+	+	+	+	+
ob20	+	+	+	+	+
ob21	-	+	+	+	+
ob22	+	+	+	+	+
ob23	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-
ob24	+	+	+	+	+
ob25	+	+	+	+	+
ob26	+	+	+	+	+
ob27	-/-	-/-	+/(+)	+/-	+/+
ob28	+	+	+	+	+
ob29	-	+	+	+	+
ob30	-	+	+	+	+
ob31	+	+	+	+	+

Tabelle 6.34: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 2 der obstruktiven Bronchitis-Gruppe im SP-D-System 1/System 2

Nr	0-25 kDa	33 kDa	35-38 kDa	58 kDa	65-100 kDa
ob1	-	-	-	-	+
ob2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
ob3	-/-	-/-	-/+	-/-	+/-
ob4	-	-	-	-	+
ob5	-/-	-/-	-/-	-/-	+/(+)
ob6	-	-	-	-	+
ob7	-	-	-	-	+
ob8	-	-	-	-	+
ob9	-	-	-	-	+
ob10	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-
ob11	-	-	+	-	+
ob12	-	-	+	-	+
ob13	-	-	-	-	+
ob14	-	-	+	-	+
ob15	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-
ob16	-	-	+	-	+
ob17	-/-	-/-	+/+	-/-	+/-
ob18	-	-	+	+	+
ob19	-	-	+	-	+
ob20	-	-	-	-	+
ob21	-	-	+	-	+
ob22	-	-	+	-	+
ob23	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-
ob24	-	-	+	-	+
ob25	-	-	+	-	+
ob26	-	-	+	-	+
ob27	-/-	-/-	+/(+)	-/-	-/-
ob28	-	-	-	-	+
ob29	-	-	+	-	+
ob30	-	-	+	-	+
ob31	-	-	-	-	+

Tabelle 6.35: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 1 der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe im SP-D-System 1/System 2

Nr	SP-D-Bandenvariation		Unspezifische Banden		
	43 kDa	47-51 kDa	25-28 kDa	51-54 kDa	60-65 kDa
n-ob1	-/-	-/-	+/-	+/(+)	+/(+)
n-ob2	-/-	+/+	+/-	+/+	+/-
n-ob3	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-
n-ob4	+	+	+	+	+
n-ob5	+	+	+	+	+
n-ob6	-	+	+	+	+
n-ob7	+	+	+	+	+
n-ob8	+/-	+/+	+/(+)	+/(+)	+/(+)
n-ob9	+	+	+	+	+
n-ob10	-	+	+	+	+
n-ob11	-	+	+	+	+
n-ob12	-	+	+	+	+
n-ob13	+	+	+	+	+
n-ob14	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-

Tabelle 6.36: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 2 der nicht-obstruktiven Bronchitis-Gruppe im SP-D-System 1/System 2

Nr	0-25 kDa	33 kDa	35-38 kDa	58 kDa	65-100 kDa
n-ob1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
n-ob2	-/-	-/-	+/+	-/-	+/-
n-ob3	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-
n-ob4	-	-	-	-	+
n-ob5	-	-	-	-	+
n-ob6	-	-	+	-	+
n-ob7	-	-	+	-	+
n-ob8	-/-	-/-	+/+	-/-	+/(+)
n-ob9	-	-	+	-	+
n-ob10	-	-	-	-	+
n-ob11	-	-	-	-	+
n-ob12	-	-	-	-	+
n-ob13	-	-	+	+	+
n-ob14	-/-	-/-	+/+	+/-	+/-

Tabelle 6.37: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 1 der Einzelfälle im SP-D-System 1/System 2

Nr	SP-D-Bandenvariation		Unspezifische Banden		
	43 kDa	47-51 kDa	25-28 kDa	51-54 kDa	60-65 kDa
E1	-/-	-/-	+/-	+(+)	+/+
E2	+/-	+/+	+/+	+/+	+/(+)
E3	+/-	+/+	+/+	+/+	+/(+)
E4	+	+	+	+	+
E5	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-

Tabelle 6.38: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 2 der Einzelfälle im SP-D-System 1/System 2

Nr	0-25 kDa	33 kDa	35-38 kDa	58 kDa	65-100 kDa
E1	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-
E2	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-
E3	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-
E4	-	-	-	+	+
E5	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-

Tabelle 6.39: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 1 der Kontrollen im SP-D-System 1/System 2

Nr	SP-D-Bandenvariation		Unspezifische Banden		
	43 kDa	47-51 kDa	25-28 kDa	51-54 kDa	60-65 kDa
K1	-	+	-	+	+
K2	+	+	+	+	+
K3	+	+	+	+	+
K4	+	+	+	+	+
K5	-	+	+	+	+
K6	-	+	+	+	+
K7	-	+	+	+	+
K8	-	+	+	+	+
K9	+	+	+	+	+
K10	-	+	+	+	+
K11	-	+	+	+	+
K12	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
K13	-	+	+	+	+
K14	-	+	+	+	+
K15	-	+	+	+	+

Tabelle 6.40: SDS-Elektrophorese und Western Blotting; Bandenübersicht 2 der Kontrollen im SP-D-System 1/System 2

Nr	0-25 kDa	33 kDa	35-38 kDa	58 kDa	65-100 kDa
K1	-	-	-	-	-
K2	-	-	+	-	+
K3	-	-	+	-	+
K4	-	-	-	-	+
K5	-	-	-	-	+
K6	-	-	-	-	+
K7	-	-	-	-	-
K8	-	-	-	-	-
K9	-	-	+	-	+
K10	-	-	-	-	+
K11	-	-	-	-	+
K12	-/-	-/-	+/+	-/-	+/-
K13	-	-	+	-	+
K14	-	-	+	-	+
K15	-	-	-	-	+

7 Literatur

1. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Yazawa N, Kubo M, Fujimoto M, Tamaki K. Clinical significance of surfactant protein D as a serum marker for evaluating pulmonary fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1363-1369
2. Atochina EN, Beers MF, Scanlon ST, Preston AM, Beck JM. P. carinii induces selective alterations in component expression and biophysical activity of lung surfactant. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278: L599-L609
3. Baker CS, Evans TW, Randle BJ, Haslam PL. Damage to surfactant-specific protein in acute respiratory distress syndrome. *Lancet* 1999; 353: 1232-1237
4. Barr FE, Pedigo H, Johnson TR, Shepherd VL. Surfactant protein A enhances uptake of respiratory syncytial virus by monocytes and U937 macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 586-592
5. Baughman RP, Sternberg RI, Hull W, Buchsbaum JA, Whitsett J. Decreased surfactant protein A in patient with bacterial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 653-657
6. Blau H, Riklis S, Van Iwaarden JF, Mc Cormack FX, Kalina M. Nitric oxide production by rat alveolar macrophages can be modulated in vitro by surfactant protein A. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1997; 272: L1198-L2004
7. Borron P, Crouch EC, Lewis JF, Wright JR, Possmayer F, Fraher LJ. Recombinant rat surfactant-associated protein D inhibits human T lymphocyte proliferation and Il-2 production. *J Immunol* 1998; 161: 4599-4603
8. Borron P, McCormack FX, Elhalwagi BM, Chroneos ZC, Lewis JF, Zhu S, Wright JR, Shepherd VL, Possmayer F, Inchley K, Fraher LJ. Surfactant protein A inhibits T cell proliferation via its collagen-like tail and a 210-kDa receptor. *Am J Physiol* 1998; 275: L679-L686
9. Botas C, Poulain F, Akiyama J, Brown C, Allen L, Goerke J, Clements J, Carlson E, Gillespie AM, Epstein C, Hawgood S. Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11869-11874

10. Buchanan DR, Cromwell O, Kay AB. Neutrophilic chemotactic activity in acute severe asthma (status asthmaticus). *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 1397-1402
11. Bufler P, Schmidt B, Schikor D, Bauernfeind A, Crouch EC, Griesse M. Surfactant protein A and D differently regulate the immune response to nonmukoid *Pseudomonas aeruginosa* and its lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 249-256
12. Chai GZ, Griffin GL, Senior RM, Longmore WJ, Moxley MA. Recombinant SP-D carbohydrate recognition domain is a chemoattractant for human neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1999; 276: L131-L136
13. Cheng G, Ueda T, Numao T, Kuroki Y, Nakajima H, Fukushima Y, Motojima S, Fukuda T. Increased levels of surfactant protein A and D in bronchoalveolar lavage fluids in patients with bronchial asthma. *Eur Respir J* 2000; 16: 831-835
14. Crouch E, Persson A, Chang D. Accumulation of surfactant protein D in human pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Pathol* 1993; 142: 241-248
15. Crouch E, Persson A, Chang D. Accumulation of surfactant protein D in human pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Pathol* 1993, 142: 241-248
16. Crouch EC, Parghi D, Kuan SF, Persson A. Surfactant protein D: subcellular localization in nonciliated bronchiolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1992; 263: L60-L66
17. Crouch EC, Rust K, Veile R, Donis-Keller H, Grosso L. Genomic organization of human surfactant protein D (SP-D): SP-D is encoded in chromosome 10q22.2-23.1. *J Biol Chem* 1993; 268: 2976-2983
18. Crouch EC, Wright JR. Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 521-54
19. Crouch EC. Collectins und pulmonary host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 177-201
20. Crouch EC. Surfactant protein D and pulmonary host defense. *Respir Res* 2000; 1: 93-108
21. Dargaville PA, South M, McDougall PN. Surfactant abnormalities in infants with severe viral bronchiolitis. *Arch Dis Child* 1996; 75: 133-136
22. de Jongste, Shields MD. Chronic cough in children. *Thorax* 2003; 58: 998-1003

23. Doyle IR, Davidson KG, Barr HA, Nicholas TE, Payne K, Pfitzner J. Quantity and structure of surfactant proteins vary among patients with alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 658-664
24. Everard ML, Swarbrick A, Wraitham M, McIntyre J, Dunkley C, James PD, Sewell HF, Milner AD. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. *Arch Dis Child* 1994; 71: 428-423
25. Fitch PS, Brown V, Schock BC, Taylor R, Ennis M, Shields MD. Chronic cough in children: bronchoalveolar lavage findings. *Eur Respir J* 2000; 16: 1109-1114
26. Floros J, DiAngelo S, Koptides M, Karinch AM, *et al.* Human SP-A locus: allele frequencies and linkage disequilibrium between the two surfactant protein A genes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15: 489-498
27. Fuchimukai T, Fujiwara T, Takahashi A, Enhorning G. Artificial pulmonary surfactant inhibited by proteins. *J Appl Physiol* 1987; 62: 429-437
28. Ghildyal R, Hartley C, Varrasso A, Meanger J, Voelker DR, Anders EM, Mills J. Surfactant protein A binds to the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and neutralizes virion infectivity. *J Infect Dis* 1999; 180: 2009-2013
29. Greene KE, King TE, Kuroki Y, Bucher-Bartelson B, Hunninghake GW, Newman LS, Nagae H, Mason RJ. Serum surfactant proteins-A and -D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2002; 19: 439-446
30. Griese M, Wiesener A, Lottspeich F, von Bredow C. Limited proteolysis of surfactant protein D causes a loss of its calcium-dependent lectin functions. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1638: 157-163
31. Griese M. Lungensurfactant und Immunsystem. *Monatsschr Kinderheilkd* 1992; 140: 57-61
32. Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* 1999; 13: 1455-1476
33. Griese M. Respiratory syncytial virus and pulmonary surfactant. *Viral Immunol* 2002; 15: 357-363
34. Günther A, Schmidt R, Nix F, Yabut-Perez, Guth C, Rosseau S, Siebert C, Grimminger F, Morr H, Velcovsky HG, Seeger W. Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Eur Respir J* 1999; 14: 565-573

35. Günther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, Temmesfeld B, Walmrath D, Morr H, Seeger W. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 176-184
36. Haagsman HP, Diemel RV. Surfactant-associated proteins: functions and structural variation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; 129: 91-108
37. Haagsman HP. Interactions of surfactant protein A with pathogens. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1408: 264-277
38. Haczku A, Atochina EN, Tomer Y, Chen H, Scanlon ST, Russo S, Xu J, Panettieri RAJ, Beers M. *Aspergillus fumigatus*-induced allergic airway inflammation alters surfactant homeostasis and lung function in BALB/c mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 45-50
39. Haley KJ, Ciota A, Contreras JP, Boothby MR, Perkins DL, Finn PW. Alterations in lung collectins in an adaptive immune response. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L573-L584
40. Hamm H, Löhrs J, Guzman y Rotaecche J, Costabel U, Fabel H, Bartsch W. Elevated surfactant protein A in bronchoalveolar lavage fluids from sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis patients. *Chest* 1994; 106: 1766-1770
41. Hartshorn KL, Crouch E, White MR, Colamussi ML, *et al.* Pulmonary surfactant protein A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. *Am J Physiol* 1998; 274: L958-L969
42. Hickling TP, Bright H, Wing K, Gower M, Martin SL, Sim RB, Malhortra R. A recombinant trimeric surfactant protein D carbohydrate recognition domain inhibits respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 1999; 29: 3478-3484
43. Hickmann-Davis JM, F.F., Nathan C, Shepherd VL, Voelker DR, Wright JR. Lung surfactant and reactive oxygen-nitrogen species: antimicrobial activity and host-pathogen interactions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: L517-23
44. Hohlfeld J, Fabel H, Hamm H. The role of pulmonary surfactant in obstructive airways disease. *Eur Respir J* 1997; 10: 482-491

45. Honda Y, Kuroki Y, Matsuura E, Nagae H, Takahashi H, Akino T, Abe S. Pulmonary surfactant protein D in sera and bronchoalveolar lavage fluids. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1860-1866
46. Ikegami M, K.T., Whitsett JA, Bruno MD, Wert SE, Wada K, Jobe AH. Characteristics of surfactant from SP-A-deficient mice. *Am J Physiol* 1998; 275: L247-254
47. Jain-Vora S, Le Vine AM, Chroneos Z, Ross GF, Hull WM, Whitsett JA. Interleukin-4 enhances pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1998; 66: 4229-4236
48. Just J, Fournier L, Momas I, Zambetti C, Sahraoui F, Grimfeld A. Clinical significance of bronchoalveolar eosinophils in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 42-44
49. Kasper M, Sims G, Koslowski R, Kuß H, Thuemmler M, Fehrenbach H, Auten RL. Increased surfactant protein D in rat airway goblet and Clara cells during ovalbumin-induced allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1251-1258
50. Kerr MH, Paton JY. Surfactant protein levels in severe respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1115-1118
51. Khubchandani KR, Synder JM. Surfactant protein A (SP-A): the alveolus and beyond. *Faseb J* 2001; 15: 59-69
52. Kolble K, Reid KB. The genomics of soluble proteins with collagenous domains: C1q, MBL, SP-A, SP-D, conglutinin, and CL-43. *Behring Inst Mitt* 1993; 81-86
53. Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsman KM, Ikegami M, Jobe AH, Wert SE, Stripp BR, Morris RE, Glasser SW, Bachurski CJ, Iwamoto HS, Whitsett JA. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9594-9599
54. Korfhagen TR, LeVine AM, Whitsett JA. Surfactant protein A (SP-A) gene targeted mice. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1408: 296-302
55. Krawiec ME, Westcott JY, Chu HW, Balzar S, Trudeau JB, Schwartz LB, Wenzel SE. Persistent wheezing in very young children is associated with lower respiratory inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1338-1343

56. Kuroki Y, Shiratori M, Ogasawara Y, Tsuzuki A, Akino T. Characterization of pulmonary surfactant protein D: its copurification with lipids. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1086: 185-190
57. Kuroki Y, Takahashi H, Chiba H, Akino T. Surfactant proteins A and D: disease markers. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1408: 334-345
58. Kuroki Y, Tsutahara S, Shijubo N, Takahashi H, Shiratori M, Hattori A, Honda Y, Abe S, Akino T. Elevated levels of lung surfactant protein A in sera from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary alveolar proteinosis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 723-729
59. Lawson PR, Reid KBM. The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity. *Immunological Reviews* 2000; 147: 66-78
60. Leth-Larsen R, Holmskov U, Hoerup P. Structural characterization of human and bovine lung surfactant protein D. *Biochem J* 1999; 343: 645-652
61. Leth-Larsen R, Nordenbaek, Tornoe I, Moeller V, Schlosser A, Koch C, Teisner B, Junker P, Holmskov U. Surfactant protein D (SP-D) serum levels in patients with community-acquired pneumonia. *Clinical Immunology* 2003; 108: 29-37
62. LeVine A, Gwozdz J, Stark J, Bruno M, Whitsett J, Korfhagen T. Surfactant protein-A enhances respiratory syncytial virus clearance in vivo. *J Clin Invest* 1999; 103: 1015-1021
63. LeVine AM, Bruno MD, Huelsman KM, Ross GF, Whitsett JA, Korfhagen TR. Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J Immunol* 1997; 158: 4336-4340
64. LeVine AM, Gwozdz J, Stark J, Bruno M, Whitsett J, Korfhagen T. Surfactant protein A enhances respiratory syncytial virus clearance in vivo. *J Clin Invest* 1999; 103: 1015-1021
65. LeVine AM, Whitsett JA, Gwozdz JA, Richardson TR, Fisher JH, Burhans MS, Korfhagen TR. Distinct effects of surfactant protein A or D deficiency during bacterial infection on the lung. *J Immunol* 2000; 165: 3934-3940
66. Liao DF, Yin NX, Huang J, Ryan SF. Effects of human polymorphonuclear leukocyte elastase upon surfactant proteins in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1302: 117-128

67. Löfgren J, Rämet M, Renko M, Marttila R, Hallman M. Association between surfactant protein A gene locus and severe respiratory syncytial virus infection in infants. *J Infect Dis* 2002; 185: 283-289
68. Madsen J, Kliem A., Tornøe I, Skjødt K, Koch C, Holmskov U. Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues. *J Immunol* 2000; 164: 5866-5870
69. Marguet C, Jouen-Boedes F, Dean TP, Warner JO. Bronchoalveolar cell profiles in children with asthma, infantile wheeze, chronic cough, or cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1533-1540
70. Mariencheck WI, Alcorn JF, Palmer SM, Wright JR. Pseudomonas aeruginosa elastase degrades surfactant protein A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 528-537
71. Mason RJ, Nielsen LD, Kuroki Y, Matsuura E, Freed JH, Shannon JM. A 50-kDa variant form of human surfactant protein D. *Eur Respir J* 1998; 12: 1147-55
72. Mason RJ, Voelker DR. Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *Am J Physiol* 1998; 275: L1-13
73. McCormack FX, King TE, Bucher BL, Nielsen L, Mason R. Surfactant Protein A predicts survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 751-759
74. McCormack FX, King TE, Voelker DR, Robinson PC, Mason RJ. Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in bronchoalveolar lavage content of surfactant apoprotein A. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 160-166
75. McCormick SM, Boggaram V, Mendelson CR. Characterization of mRNA transcripts and organization of human SP-A1 and SP-A2 genes. *Am J Physiol* 1994; 94: L354-L366
76. Pantelidis P, Veeraraghavan S, du Bois RM. Surfactant gene polymorphism and interstitial lung diseases. *Respir Res* 2002; 3: 14]
77. Persson A, Rust K, Chang D, Moxley M, Longmore W, Crouch E. CP4: a pneumocyte-derived collagenous surfactant-associated protein. Evidence for heterogeneity of collagenous surfactant proteins. *Biochemistry* 1988; 27: 8576-8584

78. Ratjen F, Bredendiek M, Brendel M, Meltzer J, Costabel U. Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in normal children. *Eur Respir J* 1994; 7: 1865-1870
79. Reading PC, Morey LS, Crouch EC, Anders EM. Collectin-mediated antiviral host defence of the lung: evidence from influenza virus infection of mice. *J Virol* 1997; 71: 8204-8212
80. Reid KB. Interactions of surfactant protein D with pathogens, allergens und phagocytes. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1408: 290-295
81. Riedler J, Grigg J, Stone C, Tauro G, Robertson CF. Bronchoalveolar lavage cellularity in healthy children. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 163-168
82. Schochett P, Mora R, Mark L, Butler M, Ingenito EP. Calcium-dependent degradation of surfactant protein A by activated neutrophils due to serine proteases. *Exp Lung Res* 1999; 25: 595-616
83. Seeger W, Stohr G, Wolf HRD, Neuhof H. Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer. *J Appl Physiol* 1985; 58: 326-338
84. Tino MJ, Wright JR. Surfactant protein A stimulates phagocytosis of specific pulmonary pathogens by alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1996; 270: L677-L688
85. Vaandrager AB, van Golde LM. Lung surfactant proteins A and D in innate immune Defense. *Biol Neonate* 2000; 77 (suppl 1): 9-13
86. Van de Graaf E, Jansen HM, Lutter R, Alberts C, Kobesen J, De Vries IJ, Out TA. Surfactant protein A in bronchoalveolar lavage fluid. *J Lab Clin Med* 1992; 120: 252-263
87. van Rozendaal BA, v.G.L., Haagsman HP. Localization and functions of SP-A and SP-D at mucosal surfaces. *Pediatr Pathol Mol Med* 2001; 20: 319-339
88. von Bredow C, Birrer P, Griese M. Degradation of surfactant protein A and other bronchoalveolar lavage fluid proteins in patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2001; 17: 716-722
89. von Bredow C, Wiesener A, Griese M. Proteolysis of surfactant protein D by cystic fibrosis relevant proteases. *Lung* 2003; 181: 79-88

90. Voorhout WF, Veendaal T, Kuroki Y, Ogasawara Y, van Golde LM, Geuze HJ. Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1589-1597
91. Wang JY, Shieh CC, Yu CK, Lei HY. Allergen-induced bronchial inflammation is associated with decreased levels of surfactant proteins A and D in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 652-662
92. Wert SE, Yoshida M, LeVine AM, Ikegami M, Jones T, Ross GF, Fisher JH, Korfhagen TR, Whitsett JA. Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5972-5977
93. Whitsett JA, Weaver T, Hull W, Ross G, Dion C. Synthesis of surfactant associated glycoprotein A by rat type II epithelial cells. Primary translation products and post-translational modification. *Biochimica et Biophysica Acta* 1985; 828: 162-171
94. Wirtz H, Schmidt M. Ventilation and secretion of pulmonary surfactant. *Clin Invest* 1992; 70: 3-13
95. Wright JR. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev* 1997; 77: 931-962
96. Wu H, Kuzmenko A, Wan S, Schaffer L, Weiss A, Fisher JH, Kwang SK, McCormack FX. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of gramnegative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest* 2003; 111 (10): 1589-1602

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. med. M. Griese entgegenbringen, der mich während der gesamten Arbeit stets mit hervorragenden Ideen und excellentem fachlichen Wissen unterstützte und herausforderte.

Ebenso möchte ich mich bei Frau A. Schams bedanken für ihre unermüdlichen Hilfestellungen und ständigen Ermutigungen.

Nicht zu vergessen sind die anderen Doktoranden in der Arbeitsgruppe, die durch ihre Unterstützung und ihre Ratschläge einen erheblichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Hierbei möchte ich insbesondere Silja Schumacher und Annika Braun herzlich danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Manuela Steinecker
geboren am 26.10.1976 in München

Schulbildung:

1987-1994	Gymnasium Grafing
1994-1996	Gymnasium Ottobrunn, Abitur

Studium:

1996-2003	Studium der Humanmedizin an der LMU München
08/1998	Physikum
08/1999	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/2002	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2003	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Beruf:

Seit 07/2004: Ärztin im Praktikum in der Inneren Abteilung des Krankenhauses der Missions-Benediktinerinnen von Tutzing