

Aus der Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. D. Reinhardt

**Keimbesiedelung, Inflammationsreaktion und Surfactantproteine  
in der Lunge tracheotomierter Kinder**

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

vorgelegt von  
Jörg Felber  
aus  
München  
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Griese

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. G. Kuhnle

Priv. Doz. Dr. F. Ebel

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

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2003

**Beatrice, Tobias, Margret und Hans**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
1.1	SURFACTANT .....	5
1.2	STRUKTUR UND FUNKTION DER SURFACTANTPROTEINE A UND D.....	6
1.3	STRUKTUR UND FUNKTION DER SURFACTANTPROTEINE B UND C .....	9
1.4	SURFACTANTPROTEINE IN DER KRANKEN LUNGE .....	11
1.5	TRACHEOTOMIE UND DIE FOLGEN FÜR DIE LUNGE.....	12
1.6	FRAGESTELLUNG .....	13
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>14</b>
2.1	PATIENTEN UND GESUNDE KONTROLLGRUPPE.....	14
2.2	PROBENGEWINNUNG .....	16
2.3	ZYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG.....	18
2.4	VIROLOGISCHE UNTERSUCHUNG .....	19
2.5	BAKTERIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG .....	20
2.6	IMMUNOASSAY FÜR SURFACTANTPROTEINE UND KOHLENHYDRATBINDUNGSFÄHIGKEIT .....	21
2.7	GESAMTPROTEINBESTIMMUNG .....	37
2.8	AGGLUTINATION VON PSEUDOMONAS AERUGINOSA DURCH SP-A UND SP-D .....	38
2.9	STATISTIK .....	41
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>42</b>
3.1	PATIENTENKOLLEKTIV .....	42
3.2	ZYTOLOGISCHE ERGEBNISSE.....	45
3.3	SURFACTANTPROTEINE IN BRONCHOALVEOLÄREN LAVAGEN.....	54
3.4	VIROLOGISCHE ERGEBNISSE .....	71
3.5	BAKTERIOLOGISCHE ERGEBNISSE.....	74
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>98</b>
4.1	VERGLEICH ZWISCHEN TRACHEOSTOMA-PATIENTEN UND KONTROLLGRUPPE .....	98
4.2	VERGLEICH ZWISCHEN ABSTRICH, 1. FRAKTION UND POOL-FRAKTION .....	101
4.3	BAKTERIOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN IN DEN LAVAGEN TRACHEOTOMIERTER KINDER .....	103
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>115</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Surfactant

Im Jahre 1929 entdeckte Kurt von Neergaard, ein schwedischer Physiologe, der in Basel arbeitete, daß man, um eine lavagierte Lunge mit Luft zu füllen mehr Druck benötigte, als um sie mit Wasser zu füllen. Daraus schloß er, daß es eine Substanz geben mußte, die die Oberflächenspannung der Lunge herabsetzt [1].

Heute weiß man, daß diese Substanz ein komplexes Gemisch aus Phospholipiden, neutralen Lipiden und Proteinen ist. Sie wird als Surfactant bezeichnet. Surfactant wird von Typ II Pneumozyten gebildet und von diesen in die Lungenbläschen sezerniert. Hier senkt es die Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze und verhindert so das endexpiratorische Kollabieren der Alveolen.

Auf die Masse bezogen, haben die Lipide einen Anteil von ca. 90% am Surfactant, die Proteine machen ca. 10% aus. Dieses Verhältnis schwankt allerdings je nachdem welche Methode zur Gewinnung des Surfactants verwendet wurde. Neben dieser wichtigen Funktion für die Atemmechanik hat Surfactant und hier neben den Lipiden vor allem die Surfactantproteine A und D (SP-A, SP-D) eine große Bedeutung im Immunsystem der Lunge [2-4].

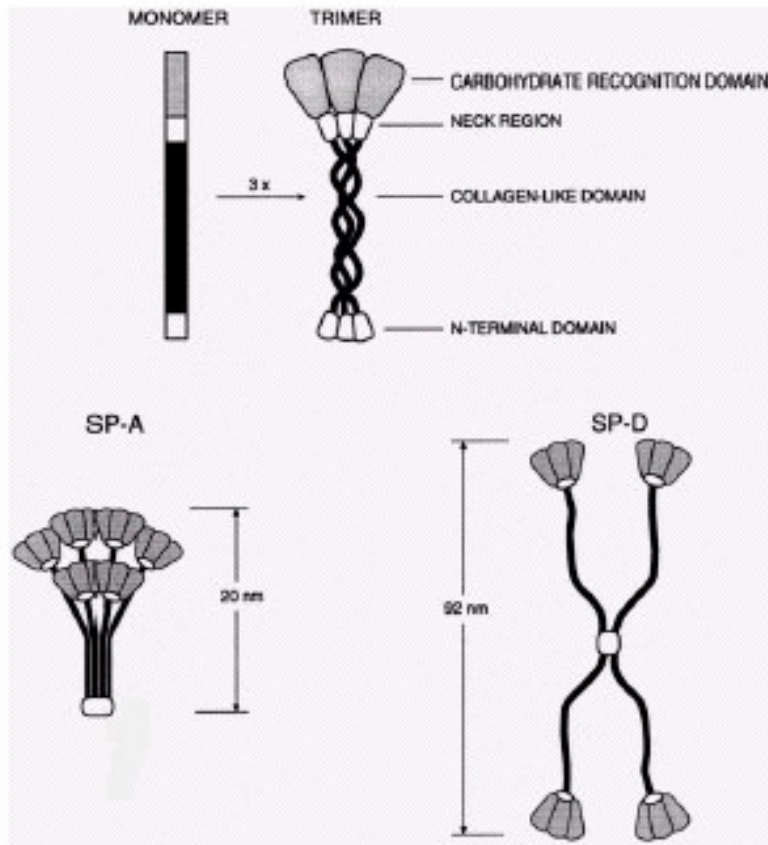
## **1.2 Struktur und Funktion der Surfactantproteine A und D**

Sowohl SP-A als auch SP-D gehören zur Familie der Collectine oder kalziumabhängigen Lectine, einer Untergruppe der „Säugetier“-Lectine. Zu den Collectinen zählen ebenso das Mannan-bindende-Protein (MBP), das bovine Conglutinin und das Collectin-43 (CL-43). Während die Struktur von SP-A sehr große Ähnlichkeit mit dem MBP und dem Komplementfaktor C1q hat, zeigen sich zwischen SP-D und dem bovinem Conglutinin ebenfalls Übereinstimmungen. Da C1q und Conglutinin eine wichtige Rolle in der unspezifischen Immunabwehr spielen, weisen diese Übereinstimmungen auf mögliche immunologische Funktionen der Surfactantproteine hin [4, 5].

Die Gene für diese beiden Proteine wurden ebenso wie das Gen für das MBP auf dem langen Arm des Chromosoms 10 (10q22.2-q23.1) lokalisiert [6-8].

Die Proteine sind als Oligomere organisiert, die sich aus trimeren Untereinheiten zusammensetzen, jede Untereinheit besteht aus drei Polypeptidketten, die alle sehr ähnlich aufgebaut sind. Am C-terminalen Ende findet sich der Bereich der Kohlenhydratbindungsstelle (carbohydrate-recognition-domain, CRD), gefolgt von einer kurzen Verbindungsdomäne (neck region), einer langen kollagenähnlichen Region (collagen-like domain) und schließlich einer kurzen N-terminalen, glycinreichen Disulfid-Domäne (N-terminale domain).

SP-A liegt als Hexamer vor, besitzt also insgesamt 18 Polypeptidketten. SP-D ist ein Tetramer mit 12 Ketten. Dabei hat SP-A gewisse Ähnlichkeit mit einem Blumenstrauß und SP-D mit einem Kreuz [3, 9, 10].



**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 Tripelhelix (collagen-like domain) und einer kurzen N-terminalen Disulfid-Domäne (n-terminal domain).

SP-A ähnelt mit 6 Collectin-Untereinheiten einem Blumenstrauß; das kreuzförmige SP-D besteht aus 4 Collectin-Untereinheiten.

(aus Haagsman HP, D.R., *Surfactant-associated proteins: functions and structural variation*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol., 2001 May. **129(1):91-108.**)

Beide Proteine sind in der Lage mit Hilfe der CRD eine kalziumabhängige Bindung mit Kohlenhydratoberflächen einzugehen. Dabei hat SP-A eine Präferenz für Mannose- und Fucose-reiche Strukturen, während SP-D bevorzugt an Maltose-, Glucose- und Mannose-haltige Strukturen bindet [5, 11].

In der Lunge werden SP-A und SP-D vor allem in Typ II Pneumozyten gebildet. Dabei findet sich SP-A zum Teil in lamellären Einschlüssen und im Alveolarraum an tubuläres Myelin gebunden, und damit in unmittelbarer Nähe zu den Phospholipiden. SP-D, das ebenfalls von T2-Zellen gebildet wird, ist weniger stark an Lipide assoziiert. Darüber hinaus wird SP-A in trachealen Drüsenzellen und SP-D in sekretorischen Granula von Clara-Zellen exprimiert [5,

12, 13]. Im Gegensatz zu verschiedenen anderen Säugetieren finden sich die beiden Proteine beim Menschen in relativ geringen Mengen in den zuführenden Atemwegen. SP-A und SP-D, bzw. ihre mRNA können ferner in nahezu allen Epithelien innerer Organe nachgewiesen werden [14, 15].

Wesentliche Funktionen von SP-A und SP-D dürften in der sogenannten angeborenen, d.h. vorgefertigten Immunabwehr der Lunge liegen. Die Fähigkeit ein breites Spektrum an Bakterien, Viren, Pilzen und Allergenen zu binden, weist in diese Richtung [16, 17]. Bei beiden Proteinen spielt dabei die CRD eine bedeutende Rolle. An sie können z.B. die Lipopolysaccharide (LPS) von Bakterienoberflächen binden. Ihre oligomere Struktur ermöglicht es ihnen dabei Pathogene zu agglutinieren. SP-A ist darüber hinaus in der Lage Influenza und Herpes simplex Viren über die N-terminale Domäne zu binden. Die Agglutinate erleichtern die Entfernung der Krankheitserreger durch die mukoziliäre Clearance [18, 19].

Beide Collectine sind in der Lage über Rezeptoren an Makrophagen zu binden und so die Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite zu induzieren. Dabei scheint SP-A spezifisch an Alveolarmakrophagen zu binden. Bei einigen Erregern führt SP-A oder SP-D zu einer Zunahme der Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen. Diese Effekte verschwanden aber teilweise vollständig bei Zugabe von Surfactant Phospholipiden [20-23]. Um die Wirkung von SP-A und SP-D in vivo studieren zu können wurden Studien mit Knockout-Mäusen durchgeführt. Interessanterweise zeigten sich bei Mäusen ohne SP-A keinerlei Veränderungen des Lungengewebes, der Lungenfunktion, der alveolären Phospholipide und der Lungencompliance. Allerdings konnte eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen nachgewiesen werden [24]. Man vermutet daher, daß SP-A vor allem dann an Bedeutung gewinnt, wenn das System einem Stressor ausgesetzt ist. Mäuse ohne SP-D zeigten im Gegensatz dazu deutliche Veränderungen. So kam es dort zu einer Akkumulation von Surfactantlipiden, Surfactantproteinen und von Alveolarmakrophagen und



somit zu einer chronischen Inflammationsreaktion mit Fibrose- und Emphysembildung. Diese Beobachtungen zeigen, daß die beiden Proteine sowohl inflammatorische als auch antiinflammatorische Funktionen besitzen [25-28].

### **1.3 Struktur und Funktion der Surfactantproteine B und C**

Anders als bei den hydrophilen Surfactantproteinen A und D, ist eine der herausragenden Eigenschaften der Surfactantproteine B und C ihre ausgeprägte Lipophilie. So besitzt SP-B 52% und SP-C 69% hydrophobe Aminosäuren. Dies läßt den Schluß zu, daß diese beiden Proteine eine enge Beziehung mit den Surfactantlipiden eingehen [29].

SP-B gehört zur Familie der Saposin-ähnlichen Peptide (SAPLIP), zu denen auch die Saposine A, B, C und D, NK-Lysin und die porenformenden Peptide von Entamoeba histolytica zählen. Alle Peptide dieser Gruppe interagieren mit Lipiden [3, 30].

Das Gen für SP-B (Sftp-3) wurde auf dem Chromosom 2, das für SP-C (Sftp-2) auf dem Chromosom 8 lokalisiert [31, 32].

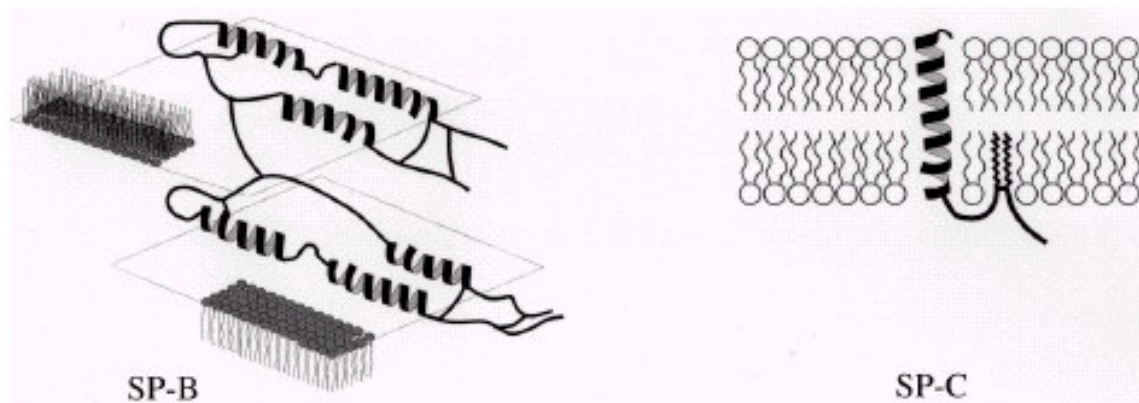
SP-B ist ein Dimer. Die Monomere besitzen  $\alpha$ -helikale Strukturen und sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Da die Dimerisation nicht für die Funktion notwendig erscheint, ist nicht ausgeschlossen, daß SP-B auch in anderen Formen vorliegt. Bisher konnte aber noch kein Nachweis für diese Vermutung erbracht werden [33, 34]. SP-C besteht aus einer transmembranösen  $\alpha$ -Helix und einem kleineren Anteil, aus ebenfalls überwiegend lipophilen Aminosäuren, die unterschiedlich stark palmitoyliert sind. Welchen Einfluß die so entstehende Heterogenität auf die Funktionen des Proteins hat ist nicht geklärt [29, 35].

Beide Surfactantproteine sind in der Lage Membranstrukturen zu verändern. So beschleunigen sie die Ausbildung einer Surfactantschicht in den Lungenbläschen und modulieren diese während der Kompression und Expansion der Lunge bei der normalen Atemarbeit [36, 37].

Untersuchungen an Knockout-Mäusen für SP-C zeigen, daß SP-B diese Funktionen auch alleine erfüllen kann. Umgekehrt sind Mäuse ohne SP-B nicht lebensfähig. Diese Beobachtung dürfte mit der Tatsache zusammenhängen, daß SP-B für die Bildung von reifem SP-C notwendig ist. So kommt es ohne SP-B zur Anhäufung von inkompletten SP-C im Alveolarraum [38-40].

Darüber hinaus spielt SP-B eine große Rolle bei der Bildung und Speicherung des Surfactants. Unter anderem ist es für die korrekte Lagerung der Phospholipide in Form von konzentrischen Lamellen in den Lamellarkörperchen verantwortlich. Die Lamellarkörperchen werden allgemein als die Speicherform des Surfactants angesehen [41].

Neben den hier beschriebenen Funktionen von SP-B bei der Surfactanthomöostase hat das Protein noch entzündungshemmende Eigenschaften und kann die Lunge gegen den schädigenden Einfluß von Sauerstoff schützen [42, 43].



**Abbildung 2** Struktur von SP-B und SP-C

SP-B besteht aus zwei Untergruppen, die  $\alpha$ -helikale Strukturen besitzen und über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. SP-C besitzt eine transmembranöse  $\alpha$ -Helix und einen kleinen Teil unterschiedlich stark palmitoylierter lipophiler Aminosäuren. Beide Proteine sind ausgesprochen lipophil.

(aus Haagsman HP, D.R., *Surfactant-associated proteins: functions and structural variation*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol., 2001 May. **129(1):91-108.**)

## **1.4 Surfactantproteine in der kranken Lunge**

Bei bestimmten Lungenerkrankungen kann es zu typischen Veränderungen des Gehalts an und der Funktion von SP-A, SP-B, SP-C und SP-D kommen [44, 45]. Das Ausgangsmaterial für diese Untersuchungen wird meist durch eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen [5, 46].

So geht die häufigste autosomal rezessive Erbkrankheit der weißen Bevölkerung, die Cystische Fibrose, mit einer Verminderung der Surfactantproteine A und D in der BAL einher [47, 48]. Bei der idiopathischen Lungenfibrose (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) kommt es zu einer Verminderung von SP-A, während sich der Gehalt an SP-D nur wenig verändert [49, 50]. Im Gegensatz dazu ist SP-A bei der Sarkoidose erhöht [51]. Beim akuten Atemnotsyndrom (acute respiratory distress syndrom, ARDS) kann es sowohl zu einem Anstieg als auch zu einem Abfall der SP-A und SP-D Konzentrationen kommen. Allerdings gehen gerade die schweren Verläufe mit einem signifikantem Abfall an SP-A und SP-D einher [52].

Ein angeborener Mangel an SP-B führt nach der Geburt zu einem Lungenversagen mit letalem Ausgang [53, 54]. Dagegen ist ein angeborener Mangel an SP-C mit dem Auftreten interstitieller Lungenerkrankungen vergesellschaftet [55, 56]. Bei der pulmonalen Alveolarproteinose (PAP) kommt es zur Akkumulation aller Surfactantproteine im Alveolarraum [29, 34].

## **1.5 Tracheotomie und die Folgen für die Lunge**

Die häufigsten Ursachen, die eine Tracheotomie im Kindesalter indizieren sind eine Obstruktion der oberen Luftwege und die Notwendigkeit einer Langzeitbeatmung. Beim Erwachsenen hingegen stehen die Atemhilfe, die erleichterte Bronchialtoilette und das Larynxkarzinom im Vordergrund [57].

Eine Tracheotomie führt zu einer funktionellen Ausschaltung des Oropharynx. Die Anfeuchtung und Filterung der Atemluft in den oberen Atemwegen kann nicht mehr erfolgen. Des Weiteren wird die mukoziliäre Clearance behindert und das Abhusten von Schleim erschwert. Dies führt regelmäßig zum Befall der unteren Atemwege durch potentiell pathogene Keime. In der Mehrzahl der Fälle ist die Kolonisation primär endogenen Ursprungs [58, 59].

Interessanterweise werden bei Kindern häufiger potentiell pathogene Keime in den unteren Atemwegen nachgewiesen als bei Erwachsenen. Des Weiteren unterscheiden sie sich auch im Bezug auf die Art der nachgewiesenen Keime. So finden sich bei Erwachsenen überwiegend gramnegative Bakterien, vor allem Pseudomonaden und Serratien, bei Kindern hingegen treten Pneumokokken, Staphylokokkus aureus und Hämophilus influenza gehäuft auf [57]. Regelmäßig lassen sich erhöhte Neutrophilenzahlen in Bronhialsekreten nachweisen, die auf eine chronische Inflammation hinweisen [60].

Über die Frage, ab welchem Zeitpunkt z.B. eine Kolonisation der Atemwege, eine Veränderung des Hustens oder eine Zunahme der Schleimproduktion behandlungsbedürftig ist, gibt es keine einheitlichen Richtlinien und das Vorgehen ist oft der Erfahrung des einzelnen Arztes überlassen [58, 60].

## **1.6 Fragestellung**

Diese Arbeit geht der Frage nach, welche bakteriologischen, virologischen, zytologischen und biochemischen Veränderungen der Lunge nach der Anlage eines Tracheostomas entstehen.

Bislang gibt es nur sehr spärlich Daten über die Veränderungen, die sich in der Lunge nach der Anlage eines Tracheostomas abspielen. So ist die Ausdehnung und das Ausmaß der zellulären und nichtzellulären Reaktion des Organismus durch eine chronische bakterielle Besiedelung, wie sie fast immer bei tracheotomierten Kindern gefunden wird, unbekannt [57].

Auch ist nicht bekannt inwieweit sich Änderungen des oberen Atemtraktes auf den tiefer gelegenen Atemtrakt auswirken.

Es haben sich bisher noch keine Untersuchungen mit den Surfactantproteinen bei tracheotomierten Kindern beschäftigt. Auch ein Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe ist noch nicht durchgeführt worden. Interessant erschien auch die Frage, ob die Surfactantproteine in ihrer Funktion verändert sind. Zu diesem Zweck wurde die Kohlenhydratbindungsfähigkeit und das Agglutinationsvermögen von SP-A und SP-D bestimmt. Auch hier fand ein Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe statt.

## **2 Material und Methoden**

### ***2.1 Patienten und gesunde Kontrollgruppe***

#### **2.1.1 Tracheostoma-Patienten**

Im Dr. von Haunerschen Kinderspital wurden im Zeitraum zwischen März 1998 und Dezember 1999 bei insgesamt 46 konsekutiven, tracheotomierten Kindern, eine bronchoalveoläre Lavage (BAL), im Rahmen einer routinemäßigen Bronchoskopie durchgeführt. Die Kinder waren zwischen 0,4 und 18,7 Jahren alt (Median 3,6). Alle untersuchten Kinder zeigten am Tag der BAL keine Symptome von Seiten der Atemwege. Die Ursachen für die Anlage eines Tracheostomas waren vielfältig. Bei insgesamt 35 Patienten führten angeborene und bei 11 Patienten führten erworbene Erkrankungen zu einem Luftröhrenschnitt. Die Lokalisation, der zur Tracheotomie führenden Erkrankung lag bei 39 Patienten im Hypopharynx und bei drei Patienten in der unteren Trachea. Bei vier Patienten bestand eine respiratorische Insuffizienz aufgrund einer zentralen oder muskulären Erkrankung.

Das Tracheostoma bestand am Tag der bronchoalveolären Lavage zwischen 0,2 und 12,1 Jahren (Median 2,4).

### 2.1.2 Kontrollgruppe lungengesunder Kinder

Als Kontrollgruppe dienten 16 Kinder im Alter zwischen 0,5 und 12,3 Jahren (Median 3,5), die sich im Dr. von Haunerschen Kinderspital einem elektiven chirurgischen Eingriff unterzogen, bzw. bei denen eine Kernspinuntersuchung indiziert war. Die Operation als auch die Bildgebung fanden in Intubationsnarkose statt. Die bronchoalveoläre Lavage erfolgte mittels eines Endloch-Katheters unmittelbar nach der Narkoseeinleitung. Die Eltern wurden über das Vorgehen aufgeklärt und eine schriftliche Einverständniserklärung wurde eingeholt. Die Untersuchung ist von der Münchener Ethikkommission genehmigt worden.

## **2.2 Probengewinnung**

### 2.2.1 Bronchoalveoläre Lavagen

Bei den Kindern mit Tracheostoma wurde am Ende der Bronchoskopie mit Hilfe des Arbeitskanals des Bronchoskops eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. Dazu wurde in den rechten Mittel- oder Unterlappen der Lunge viermal eine auf Körpertemperatur erwärmte 0,9 % ige Kochsalzlösung instilliert und unmittelbar darauf wieder abgesaugt. Die hierbei verwendete Menge an Kochsalzlösung betrug jeweils 1 ml/kg Körpergewicht.

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

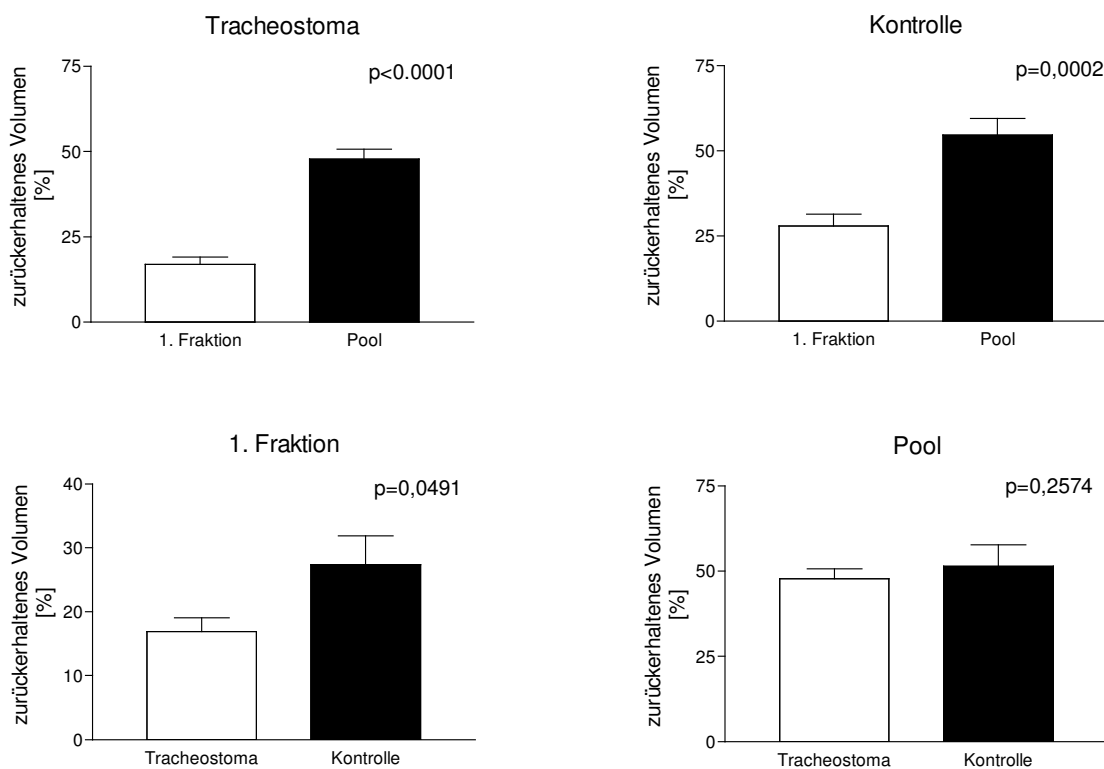
Das zurückerhaltene Volumen der ersten Spülung wurde separat von den übrigen drei Spülungen als 1. Fraktion aufbereitet und untersucht. Die restlichen drei Volumina wurden zu einer Pool-Fraktion zusammengefaßt.

Das zurückerhaltene Volumen an BAL-Flüssigkeit (Recovery) war bei den Pool-Fraktionen mit  $48 \pm 20 \%$  für die Tracheostoma-Patienten, bzw.  $55 \pm 20\%$  für die Kontrollgruppe annähernd identisch. Die 1. Fraktion beider Gruppen unterschied sich signifikant. So erhielt man bei den Kindern mit Tracheostoma durchschnittlich  $17 \pm 15 \%$  und bei den Kindern der Kontrollgruppe durchschnittlich  $28 \pm 14 \%$  der ursprünglichen eingesetzten Kochsalzmenge zurück. Auch die Unterschiede zwischen der 1. Fraktion und der Pool-Fraktion waren signifikant (siehe Abb. 3).

1. Fraktion und Pool-Fraktion wurden separat über sterilisierte Gaze-Filter gereinigt. Dabei wurden nur gröbere Verunreinigungen beseitigt. Viren, Bakterien und Zellen konnten den Filter ungestört passieren. Von der Pool-Fraktion wurde ein Aliquot für mikrobiologische und



virologische Untersuchungen entnommen. Aufgrund der geringeren Rückgewinnung wurde die 1. Fraktion nur mikrobiologisch untersucht, die virologische Untersuchung entfiel. Des Weiteren wurde bei beiden Gruppen Trachealsekret gewonnen und ein Abstrich des intubierten Nasenloches, bzw. des Tracheostomas gemacht. Trachealsekret und Abstrich wurden ebenfalls mikrobiologisch untersucht.



**Abbildung 3** Sowohl bei den Tracheostoma-Patienten, als auch in der Kontrollgruppe unterscheiden sich die 1. Fraktion und die Pool-Fraktion bzgl. dem Prozentsatz an zurückgehaltenem Material signifikant voneinander. Die Pool-Fraktionen beider Gruppen unterscheiden sich nicht.

### **2.3 Zytologische Untersuchung**

Bei der, durch Gaze-Filter gereinigten BAL wurde die Gesamtzellzahl mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Eine 10-minütige Zentrifugation mit 800 U/min diente der Zellgewinnung. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Dieser Überstand wurde später für die Bestimmung der Surfactantproteine im ELISA verwendet. Das Sediment wurde zweimal mit Hank'scher Lösung gewaschen und zentrifugiert. Schließlich wurde das Sediment erneut, zur Anfertigung von Cytospin-Präparaten (Shandon, Pittsburgh, USA), mit Hank'scher Lösung resuspendiert. Dabei wurde die Menge der Lösung so gewählt, daß eine Zellkonzentration von 200.000 Zellen/ml in der Suspension erreicht wurde. Da bei der Cytospin-Präparation pro Objektträger 0,5 ml verwendet wurden, befanden sich auf jedem Objektträger 100.000 Zellen. Diese Zellen wurden zur Zelldifferenzierung nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Diese Untersuchung erfolgte sowohl für die 1. Fraktion, als auch für die Pool-Fraktion.

## ***2.4 Virologische Untersuchung***

Die Untersuchung der Lavage auf Viren wurde lediglich bei der Pool-Fraktion durchgeführt. Bei der 1. Fraktion stand auf Grund der geringen Rückgewinnung nicht genügend Material zur Verfügung. Die BAL wurde auf Respiratory Syncytial Viren, Herpes simplex Viren, Epstein Barr Viren, Zytomegalie Viren, Herpes Viren Typ 6 und Adenoviren untersucht. Mit Ausnahme des Respiratory Syncytial Virus, bei dem das Antigen nachgewiesen wurde, erfolgte bei allen anderen Viren der Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

## **2.5 Bakteriologische Untersuchung**

### 2.5.1 Qualitative Bakteriologie

Für die bakteriologische Untersuchung wurden Kochblut-, Blut- und Mc Conkey-Platten verwendet. Jede Platte wurde mit 50 µl BAL (1. Fraktion, bzw. Pool-Fraktion) beimpft und bei 37°C, 24 Stunden inkubiert. Des weiteren wurde in der Tracheostoma-Gruppe ein Abstrich an der Trachealkanüle und in der Kontrollgruppe ein Abstrich am nicht intubierten Nasenloch angefertigt.

### 2.5.2 Quantitative Bakteriologie

Die 1. Fraktion der Tracheostoma-Patienten wurde 12 mal, die Pool-Fraktion 28 mal quantitativ untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Lavage in fünf Konzentrationen in steriler physiologischer Kochsalzlösung verdünnt (1:4; 1:16; 1:64; 1:256; 1:1024). Aus der jeweiligen Verdünnungsstufe wurde, wie bei der qualitativen Bakteriologie, 50µl Material entnommen und damit die drei verschiedenen Nährplatten beimpft. Die Platten wurden bei 37°C, 24 Stunden inkubiert. Die Keimzahl wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe errechnet.

Bei der Kontrollgruppe wurde keine quantitative Untersuchung durchgeführt.

## **2.6 Immunoassay für Surfactantproteine und Kohlenhydratbindungsfähigkeit**

Sowohl für die Bestimmung der Konzentration der Surfactantproteine A und D (SP-A, SP-D) in der bronchoalveolären Lavage, als auch zum Nachweis des Bindungsvermögens der Surfactantproteine A und D an *Pseudomonas aeruginosa* wurde ein „Sandwich“-ELISA verwendet. Das nachzuweisende Antigen wurde an zwei verschiedene Antikörper (capture- und detector- Antikörper) gebunden und dann mit einem Antiglobulin-Enzym-Konjugat Komplex nachgewiesen.

Zur Bestimmung der Surfactantproteine B und C (SP-B, SP-C) wurde ein ELISA verwendet, bei dem sich die beiden Surfactantproteine aufgrund ihrer ausgeprägten Lipophilie direkt an der Mikrotiterplatte anlagerten. Dieser ELISA unterschied sich erheblich von dem „Sandwich“-ELISA für SP-A und SP-D und wird gesondert beschrieben.

Die verwendeten Geräte waren:

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

### 2.6.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) für Surfactantprotein A

Die verwendeten Puffersysteme waren:

- Carbonatpuffer: 15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6
- Tris-buffered-saline (TBS): 10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0,1% TritonX, pH 7,4
- Blockpuffer: TBS, 1% BSA (bovines Serumalbumin; Paesel+Lorei, Hanau, Deutschland)

1. Coating (1. Antikörper):

Als Festphasenantikörper wurde PC-6 (Dr. Kuroki, International Reagents Corp., Kobe, Japan), ein monoklonaler Maus-Antikörper, der sich gegen humanes SP-A richtet, verwendet. Er wurde auf 1µg/ml in Carbonatpuffer verdünnt und in alle Vertiefungen (wells) einer 96-well Mikrotiterplatte (Maxisorp C96, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei allen Inkubationsschritten wurde die Platte mit Parafilm abgedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern.

2. Blocking:

Am nächsten Tag wurde der Überstand dekantiert. Zur Verhinderung von späteren Proteinbindungen an die Kunststoffplatte wurde in jede Vertiefung 200 µl Blockpuffer pipettiert. Die Platte wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

3. Auftragen von Antigen (Proben- und Standard-Antigen):

Zuerst erfolgte das Dekantieren des Überstandes und dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatte mit TBS-Puffer, um ungebundene Reagenzien zu entfernen. Das Reinigungsverfahren wurde vor allen weiteren Schritten in der gleichen Weise benutzt. Bevor die Proben in die oberste Reihe der Mikrotiterplatte aufgetragen werden konnten, mußten sie, um das SP-A besser aus dem Lipid-Protein-Gemisch zu lösen, weiter aufgearbeitet werden. So wurden sie zuerst in einem TBS-Puffer, der 10mM EDTA (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) enthielt, fünffach verdünnt und in einem Ultraschallbad 1 Minute homogenisiert. Anschließend wurde noch TritonX 22% zugefügt, so daß eine 5,5-fache Verdünnung entstand. Daraufhin wurden die Proben auf dem Vortex einige Sekunden lang gemischt und 10 Minuten lang bei 10.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und der Bodensatz verworfen. Danach wurden die Proben 1:2 mit Blockpuffer verdünnt und auf der Platte nochmals 1:2 sequentiell verdünnt. Auf der Platte erfolgten weitere acht Verdünnungsschritte. So kamen alle Proben im Meßbereich zu liegen.

Als Standard-Antigen wurde humanes rekombinantes SP-A (Byk Gulden, Konstanz, Deutschland) verwendet. Mit dem Standard wurde ebenso verfahren, wie mit den Proben. So lag er in Konzentrationen von 100 ng/ml bis 1,5 ng/ml auf der Mikrotiterplatte vor. Der Standard wurde parallel in den ersten beiden Reihen der Platte aufgetragen. Auf diese Weise erhielt man zwei Standardreihen zur Bestimmung der Standardkurve. Die untersten zwei Wells der ersten beiden Reihen wurden, um den Leerwert (Blank) zu erhalten, lediglich mit Blockpuffer gefüllt. Die Platte wurde 2 Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

4. Zugabe des zweiten Antikörpers:

Der zweite Antikörper, ein polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes rekombinantes SP-A (Chemicon, Temecula, CA, USA), wurde 1:100 in Blockpuffer verdünnt. Jedes Well wurde mit 100 µl beschickt. Nach dem Auftragen wurde die Platte 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

5. Inkubation mit Antiglobulin-Enzym-Konjugat:

Um den Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Intermediärkomplex) zu detektieren wurde ein Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg, Deutschland) verwendet. Dieser Antikörper ist mit Meerrettichperoxidase gekoppelt, einem Enzym, das für die nachfolgende Substratreaktion notwendig ist. Mit Hilfe dieses Enzyms ist die Detektion des Intermediärkomplexes und damit des gesuchten Antigens möglich. Der Antikörper wurde 1:5000 in Blockpuffer verdünnt aufgetragen. Jedes Well wurde mit 100 µl beschickt. Vor dem nächsten Schritt wurde erneut 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

6. Substratreaktion:

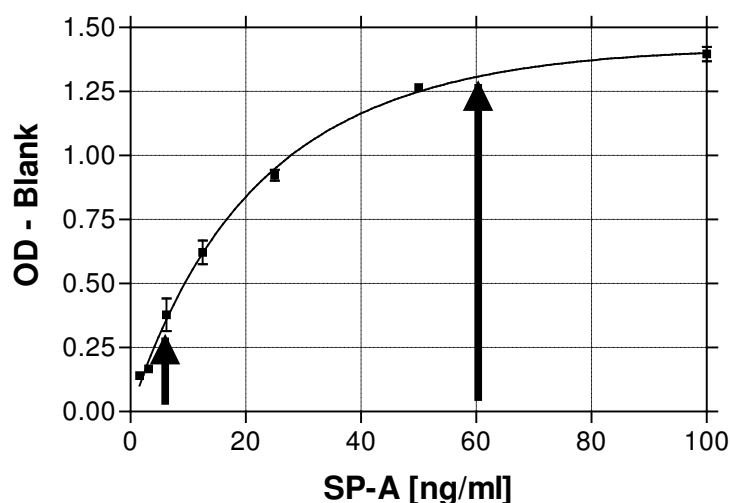
Bei der Substratreaktion wird die Fertigsbstanz ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulphonate-(6)]) (Boehringer GmbH, Mannheim, Deutschland) durch die Meerrettichperoxidase in ein chromogenes Produkt umgewandelt. ABTS wurde als Puffer in einer Konzentration von 0,0167 mg/ml angesetzt. Zu 10 ml ABTS-Puffer wurden noch

10 µl 30% iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und zwei ABTS-Tabletten mit einer Konzentration von 50 mg/Tbl. hinzugegeben und der pH auf 4 eingestellt. In jedes Well wurden dann 100µl Substrat pipettiert. Um zu verhindern, daß die lichtempfindliche Substratreaktion durch Tageslicht gestört wird, wurde die Platte mit Aluminiumfolie umhüllt und bei Raumtemperatur auf einem Schüttler 30-60 Minuten inkubiert.

#### 7. Auswertung:

Zur Quantifizierung der Färbung der einzelnen Wells wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm mittels eines Photometers gemessen. Zur Berechnung der Standardkurve aus den beiden Standardreihen und dem Leerwert, sowie die davon abhängige Bestimmung der Meßwerte, erfolgte mittels einer für diese Zwecke erhältlichen Software (Biolise, Hombrechtikon, Schweiz).

Aus den von dem Computer gelieferten Daten wurden jeweils die ausgewählt, die im optimalen Meßbereich des Assays lagen. Aus ihnen wurden dann die endgültigen Meßergebnisse berechnet. Der optimale Meßbereich wurde definiert als der Bereich, in dem mindestens das doppelte Signal des Leerwertes gemessen werden konnte und in dem die Standardkurve steil anstieg.



**Abbildung 4** Standardkurve des SP-A ELISA. Der Bereich zwischen den Pfeilen markiert den optimalen Meßbereich.



## 2.6.2 ELISA für Surfactantprotein D

Die verwendeten Puffersysteme waren:

- Carbonatpuffer: 15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6
- Tris-buffered-saline (TBS/TC): 10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% TritonX, pH 7,4
- Blockpuffer: TBS/TC, 1% BSA (bovines Serumalbumin; Paesel+Lorei, Hanau, Deutschland)

### 1. Coating (1. Antikörper):

Als Festphasen Antikörper des „Sandwich“-Assays wurde p13, ein polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes SP-D verwendet (Geschenk von Dr. E. Crouch, St. Louis, MO, USA). Er wurde 1:10000 in Carbonatpuffer verdünnt aufgetragen. In jedes Well wurden 100 µl des Gemisches gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

### 2. Blocking:

Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde die Platte mit 200 µl Blockpuffer pro Well beschickt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Vor dem nächsten Schritt wurde die Platte dreimal mit Hilfe der ELISA-Waschstraße und des TBS/TC-Puffer gereinigt. Dieser Waschschrift erfolgte vor allen weiteren Schritten.

### 3. Auftragen von Antigen (Proben- und Standard-Antigen):

Als Standard diente humanes SP-D, das bei bronchoalveolären Lavagen von Kindern mit Proteinose gewonnen wurde und vor der Verwendung als Standard gereinigt wurde. Der Standard wurde auf 100 ng/ml bis 1,5 ng/ml in Blockpuffer verdünnt. Die Proben wurden, wie bei dem ersten SP-D ELISA, sequentiell verdünnt aufgetragen. Auch hier konnte auf die Verdünnungsschritte mit TBS/EDTA-Puffer und TritonX 22% ebenso verzichtet werden wie auf das Ultraschallbad und das Zentrifugieren. Die Proben wurden 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

4. Zugabe des zweiten Antikörpers:

Als zweiter „Sandwich“-Antikörper wurde VIF11, ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen Ratten SP-D (BMA, Augst, Schweiz) verwendet. Er wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml in Carbonatpuffer gelöst aufgetragen. In jedes Well wurden 100 µl pipettiert. Die Platte wurde im Anschluß 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

5. Inkubation mit Antiglobulin-Enzym-Konjugat:

Zur Detektion des Intermediärkomplexes wurde ein Kaninchen-Antikörper benutzt, der sich gegen Maus IgG richtet. Dieser Antikörper ist mit Meerrettichperoxidase gekoppelt und wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockpuffer gelöst aufgetragen. Vor dem nächsten Schritt wurde die Platte erneut 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

6. Substratreaktion:

Die Substratreaktion erfolgte mit 100 mg ABTS auf 10 ml ABTS-Puffer und 10 µl 30 % iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 4. Für die Farbreaktion waren 100 µl Substrat pro Well ausreichend. Die Messung im Photometer erfolgte nach ca. 30 Minuten.

7. Auswertung:

Die Auswertung entsprach der unter 1.6.1.

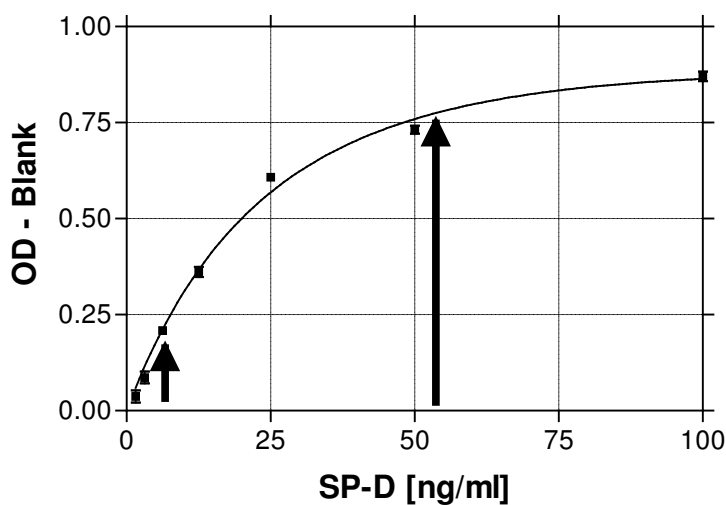


Abbildung 5 Standardkurve des SP-D ELISA

### 2.6.3 Pseudomonas-aeruginosa-Bindungsassay für SP-A

Die verwendeten Puffersysteme waren:

- Carbonatpuffer: 15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6
- Tris-buffered-saline (TBS/TC): 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4
- Phosphate-buffered-saline (PBS): 17,9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 mM NaCl, 56,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- Blockpuffer: PBS, 1% Gelatine (E. Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,1% NaN<sub>3</sub>

#### 1. Coating:

Ein Stamm *Pseudomonas aeruginosa* wurde an den Boden der Mikrotiterplatte adsorbiert. Hierfür wurden die Bakterien am Vortag auf Nähragar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden in Carbonatpuffer, dem 0,3 %iges Paraformaldehyd beigelegt war, in Suspension gebracht. Um eine konstante Konzentration an Bakterien in der Lösung zu erhalten wurde die Extinktion auf 0,1 eingestellt, bei Filter 623nm. Die Bakteriensuspension wurde auf die Mikrotiterplatte pipettiert und nach dem Eintrocknen bei 4°C gelagert.

#### 2. Blocking:

Um zu verhindern, daß sich Bakterien später an den Rand der Mikrotiterplatte binden, wurden die Wells mit 200 µl Blockpuffer pro Well blockiert. Die Platte wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem nächsten und allen weiteren Schritten wurde die Platte dreimal mit TBS/TC-Puffer gewaschen.

#### 3. Auftragen von Antigen:

Da die Bindung von SP-A an die *Pseudomonas aeruginosa* Oberfläche Ca<sup>2+</sup>-abhängig ist wurde ab diesem Schritt TBS/TC-Puffer verwendet. Humanes rekombinantes SP-A in Verdünnungen von 1000 ng/ml bis 15,625 ng/ml wurde als Standard in den ersten beiden Reihen der Mikrotiterplatte aufgetragen. Die untersten Wells der ersten beiden Reihen wurden zur Bestimmung des Leerwertes nicht mit Standard beschickt. Es wurden nur

Proben verwendet, deren SP-A Gehalt bereits durch den oben beschriebenen ELISA bekannt war. Die Proben wurden bereits vor dem Auftragen auf die Mikrotiterplatte so verdünnt, daß die SP-A Konzentration 50 ng/ml betrug. Auf der Platte folgten dann noch vier weitere Verdünnungsschritte. Für alle Verdünnungen wurde Blockpuffer verwendet. Die Platte wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

4. Crosslinking:

Um zu verhindern, daß sich das an die *Pseudomonas aeruginosa* Oberfläche gebundene SP-A wieder löst, wurde, nach erneutem Waschen, die Platte 15 Minuten bei Raumtemperatur mit TBS/TC-Puffer, dem 0,125 % iges Glutaraldehyd zugesetzt war, inkubiert.

5. Blocking:

15 minütige Inkubation mit 200 µl Blockpuffer pro Well

6. Zugabe des ersten Antikörpers:

Schließlich wurde, um das an die Bakterien gebundene SP-A nachzuweisen, polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes rekombinantes SP-A (Chemicon, Tenecula, CA, USA) in gleicher Art und Weise wie bei obigen SP-A ELISA aufgetragen und die Platte 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

7. Zugabe des zweiten Antikörpers:

Um den Intermediärkomplex zu detektieren wurde ein Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg, Deutschland) verwendet. Dieser Antikörper ist mit Meerrettichperoxidase gekoppelt und wurde in einer Verdünnung von 1:5000 aufgetragen. Vor dem nächsten Schritt wurde erneut 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

8. Substratreaktion:

Die Substratreaktion erfolgte mit 100 mg ABTS auf 10 ml ABTS-Puffer und 10 µl 30 % iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 4

9. Auswertung:

Die Auswertung entsprach der unter 1.6.1.

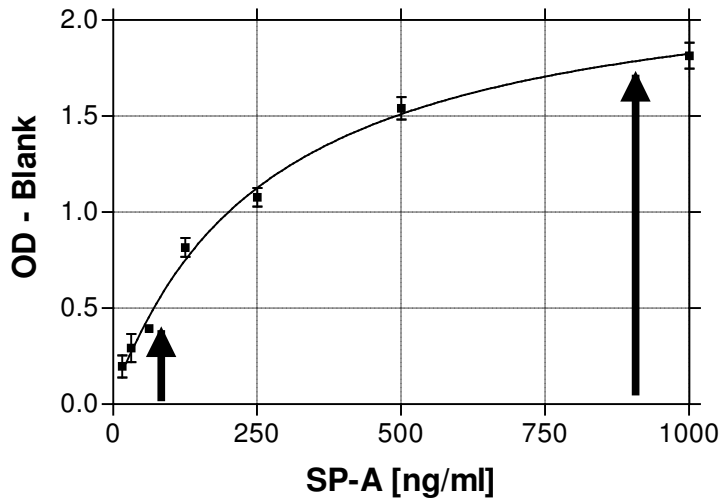


Abbildung 6 Standardkurve des SP-A-Kohlenhydratbindungsassay

2.6.4 Pseudomonas-aeruginosa-Bindungsassay für SP-D

Die verwendeten Puffersysteme waren:

- Carbonatpuffer: 15 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9,6
- Tris-buffered-saline (TBS/TC): 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4
- Phosphate-buffered-saline (PBS): 17,9 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 75 mM NaCl, 56,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- Blockpuffer: PBS, 1% Gelatine (E. Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,1%  $\text{NaN}_3$

1. Coating:

Auch bei dem Bindungsassay für SP-D wurde anstelle des Festphasenantikörpers ein Stamm *Pseudomonas aeruginosa* an den Boden der Mikrotiterplatte adsorbiert. Dies geschah in exakt der selben Weise, wie bei obigen SP-A Bindungsassay.

2. Blocking:

Ebenso wurden die Wells mit 200 µl Blockpuffer blockiert und die Platte 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem nächsten und allen weiteren Schritten wurde die Platte mit TBS/TC-Puffer gewaschen.

3. Zugabe der Proben:

Da auch die Bindung von SP-D an die *Pseudomonas aeruginosa* Oberfläche  $Ca^{2+}$ -abhängig ist, wurde TBS/TC-Puffer verwendet. Als Standard-Antigen wurde rekombinantes Ratten SP-D (Geschenk von Dr. E. Crouch, St. Louis, MO, USA) in Verdünnungen von 200ng/ml bis 3,125 ng/ml in Blockpuffer verwendet. Der SP-D Gehalt der Proben war bereits durch den oben beschriebenen ELISA bekannt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf die Mikrotiterplatte auf 20 ng/ml verdünnt. Auf der Platte folgten dann noch vier weitere Verdünnungsschritte. Für alle Verdünnungen wurde Blockpuffer verwendet. Die Platte wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

4. Crosslinking:

Auch bei dem SP-D Bindungsassay erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit TBS/TC-Puffer, dem 0,125 % iges Glutaraldehyd zugesetzt war.

5. Blocking:

15 minütige Inkubation mit 200 µl Blockpuffer pro Well

6. Zugabe des ersten Antikörpers:

Als Antikörper wurde II E 11-Biotin, ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen Ratten SP-D (BMA, Augst, Schweiz) verwendet. Er wurde in Blockpuffer verdünnt mit einer Konzentration von 1 µg/ml aufgetragen. Anschließend wurde erneut 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

7. Zugabe des AB Komplexes:

Ein 1:50 in Blockpuffer verdünnter Avidin-Peroxidase-Komplex (DAKO, Glostrup, Dänemark) diente dazu, den Intermediärkomplex zu detektieren. Nach dem Auftragen des Komplexes wurde die Platte 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

6. Substratreaktion:

Die Substratreaktion erfolgte mit 100 mg ABTS auf 25 ml ABTS-Puffer und 8,33 µl 30 % iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 4. Zur Verbesserung der Anfärbung wurden 200 µl Substrat pro Well verwendet.

7. Auswertung:

Die Auswertung entsprach der unter 1.6.1.

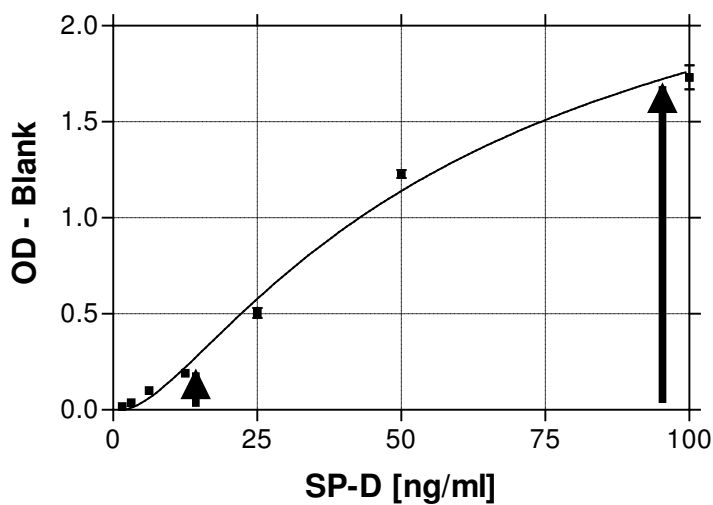


Abbildung 7 Standardkurve des SP-D-Kohlenhydratbindungsassay

Für die Bestimmung der Surfactantproteine B und C (SP-B, SP-C) in der bronchoalveolären Lavage wurde ein ELISA verwendet, der sich die Lipophilie dieser beiden Proteine zunutze machte. Dabei hat sich das nachzuweisende Antigen spontan an die Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden und wurde anschließend mit einem Antikörper markiert. Dieser Komplex wurde dann mit einem Antiglobulin-Enzym-Konjugat nachgewiesen.

## 2.6.5 ELISA für Surfactantprotein B

Die verwendeten Puffersysteme waren:

- Phosphate-buffered-saline (PBS): 75 mM NaCl, 17,9 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 56,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- Waschpuffer: PBS/0,5% Tween 20 (Sigma Chemical Co., München, Deutschland)
- Blockpuffer: 10 mg/ml bovinem Serumalbumin (BSA) (Paesel+Lorei, Hanau, Deutschland), PBS

### 1. Verdünnung von Proben und Standard:

Die Proben und der Standard wurden zuerst mit Propanol im Verhältnis 1:1 vermischt und dann weiter mit PBS/Propanol (1:1, Vol./Vol.) in Polypropylen-Gefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verdünnt. Als Standard diente humanes SP-B, das aus bronchoalveolären Lavagen gesunder Freiwilliger isoliert wurde.

### 2. Auftragen von Proben und Standard:

Aus jedem Gefäß wurden 100 µl auf eine 96-well Mikrotiterplatte (Polysorp F96, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) übertragen. Die Platte wurde bei 37°C evaporiert.

### 3. Optimierung der Absorption:

Um die Absorption von SP-B an die Mikrotiterplatte zu verbessern, wurde in jedes Well 100 µl 1,1,1-Trifluorethanol gegeben und die Platte erneut bei 37°C getrocknet.



4. Entfernung der Phospholipide:

Durch zweimaliges Waschen der Platte mit einem Diisopropylether-Butanol-Gemisches (3:2, Vol./Vol., 100 µl/well) wurden die Phospholipide entfernt. Nach jedem Waschen wurde die Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. An die zweite Inkubationsphase schloß sich ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer an. Die Reinigung der Wells erfolgte auch in den folgenden Schritten auf die hier beschriebene Weise.

5. Blocking:

Um die Bindung von unspezifischen Protein an die Oberfläche der Wells zu verhindern, wurde die Mikrotiterplatte 2 Stunden mit Blockpuffer, bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurden in jedes Well 200 µl Blockpuffer pipettiert. An diesen Schritt schloß sich dreimaliges Waschen an.

6. Zugabe des 1. Antikörpers:

Ein monoklonaler Mausantikörper gegen humanes SP-B wurde in einer Konzentration von 1,5 µg/ml in Blockpuffer verdünnt aufgetragen und die Platte 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. An die Inkubation schloß sich erneut dreimaliges Waschen an.

7. Zugabe des 2. Antikörpers:

An den monoklonalen Antikörper wurde ein Schafantikörper, der gegen Maus IgG gerichtet war (Amersham Buchler GmbH, Braunschweig, Deutschland), gebunden. Nachdem 200 µl des 1:1000 in Blockpuffer verdünnten Antikörpers in jedes Well pipettiert wurden, erfolgte eine 3 stündige Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Vor dem nächsten Schritt wurde die Platte erneut dreimal gewaschen.

8. Detektion des Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplexes:

Nach der Entfernung der freien Antikörper wurde der Platte ein Avidin-Biotin-Meerrettich Peroxidase-Komplex (AB-Komplex; Dakopatts GmbH, Hamburg, Deutschland) zugegeben und sie wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur vorsichtig

geschüttelt. Die Verdünnung des Peroxidase-Komplexes erfolgte nach der Empfehlung des Herstellers. An die Inkubation schloß sich erneut dreimaliges Waschen an.

#### 9. Substratreaktion:

Bei diesem Schritt wurde, wie bereits bei der SP-A und SP-D Bestimmung, ABTS (Boehringer GmbH, Mannheim, Deutschland) als Reagenz verwendet. Die Substratreaktion erfolgte mit 20 mg ABTS auf 30 ml ABTS-Puffer und 10 µl 30 % iges  $H_2O_2$ . In jedes Well wurden 200 µl Substrat gegeben und die Platte über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 10. Auswertung:

Die Extinktion wurde bei 450 nm gemessen.

### 2.6.6 ELISA für Surfactantprotein C

Die verwendeten Puffersysteme waren:

- Waschpuffer: 50 mM Tris-HCl/0,5% Tween 20 (Sigma Chemical Co., München, Deutschland), pH 7,6
- Blockpuffer: 10 mg/ml bovinem Serumalbumin (BSA) (Paesel+Lorei, Hanau, Deutschland), 50 mM Tris-HCl, pH 7,6

#### 1. Verdünnung von Proben und Standard:

Die Proben und der Standard wurden jeweils mit 80% igem Propanol, pH 3,5 vermischt. Der Standard wurde so verdünnt, daß er in Konzentrationen von 3,125 bis 400 ng/ml vorlag. Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit Propanol verdünnt. Alle diese Schritte fanden in Polypropylen-Gefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) statt, um ein Anlagern des SP-C an der Gefäßwand zu minimieren. Als Standard diente rekombinantes humanes SP-C.

2. Auftragen von Proben und Standard:

Aus jedem Gefäß wurden 100 µl auf eine 96-well Mikrotiterplatte (Polysorp F96, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) übertragen. Die Platte wurde bei 37°C über Nacht eingetrocknet.

3. Optimierung der Absorption:

Wie auch bei dem oben beschriebenen SP-B ELISA wurden auch hier 100 µl 1,1,1-Trifluorethanol in jedes Well gegeben, um die Absorption von SP-C an die Gefäßwand zu verbessern. Danach wurde die Platte erneut bei 37°C evaporiert.

4. Entfernung der Phospholipide:

Die Phospholipide wurden durch zweimaliges Waschen der Platte mit Methanol entfernt. Zu diesem Zweck wurde in jedes Well 200 µl Methanol gegeben und die Platte anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur vorsichtig geschüttelt. Nach dem Entfernen des organischen Lösungsmittels wurde dieser Schritt ohne anschließende Inkubation wiederholt. Danach wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

5. Blocking:

Die Bindung von unspezifischem Protein an die Oberfläche der Wells wurde, durch die 2 stündige Inkubation der Mikrotiterplatte mit Blockpuffer, verhindert. Dazu wurden in jedes Well 200 µl Blockpuffer pipettiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

6. Zugabe des 1. Antikörpers:

Ein Kaninchenantikörper gegen humanes rekombinantes SP-C wurde, 1:2000 in Blockpuffer verdünnt, aufgetragen und die Platte 12-15 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. An die Inkubation schloß sich erneut dreimaliges Waschen an.

7. Zugabe des 2. Antikörpers:

Nach dem Waschen wurde die Platte 2 Stunden mit einem Antikörper, der gegen Kaninchen IgG gerichtet war, inkubiert. Dazu wurde der Antikörper zuerst 1:1000 in

Blockpuffer verdünnt. In jedes Well wurden 200 µl des Antikörper-Blockpuffer Gemisches aufgetragen. Vor dem nächsten Schritt wurde die Platte erneut dreimal gewaschen.

8. Detektion des Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplexes:

Nach der Entfernung der freien Antikörper wurde der Platte ein Avidin-Biotin-Meerrettich Peroxidase-Komplex (AB-Komplex; Dakopatts GmbH, Hamburg, Deutschland) zugegeben. Nach der Empfehlung des Herstellers wurde die Ausgangslösung 1:50 in Blockpuffer verdünnt verwendet. Vor dem nächsten Schritt wurde die Platte 2 Stunden lang inkubiert und dreimal gewaschen.

9. Substratreaktion:

Die Substratreaktion erfolgte mit 20 mg ABTS auf 30 ml ABTS-Puffer und 10 µl 30 % iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In jedes Well wurden 200 µl Substrat gegeben und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert.

10. Auswertung:

Die Extinktion wurde bei 450 nm gemessen.

## **2.7 Gesamtproteinbestimmung**

Um den Gesamtproteingehalt der Proben zu ermitteln, wurde ein Bio-Rad Proteinassay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) verwendet. BSA wurde als Standard in PBS verdünnt und in Verdünnungen von 5 mg/ml bis 10 µg/ml bei einem pH von 7,4 benutzt. Die Proben und der Standard wurden auf eine Mikrotiterplatte (niedrigaffin, F-Form, Greiner, München, Deutschland) pipettiert. Nach dem Hinzufügen des Bio-Rad Reagenzes wurde die Platte bei 600 nm im Photometer gemessen. Die Proben wurden jeweils dreimal aufgetragen und von den gemessenen Konzentrationen der Mittelwert gebildet.

## **2.8 Agglutination von *Pseudomonas aeruginosa* durch SP-A und SP-D**

Um die Fähigkeit von SP-A und SP-D, Bakterien zur Agglutination zu bringen, zu überprüfen und die Frage zu klären, ob das Ausmaß der Agglutination von bestimmten Faktoren, wie z.B. der Keimzahl abhängt, wurde eine Methodik entwickelt, die das Agglutinationsvermögen quantitativ erfaßt.

Die verwendeten Puffersysteme waren:

TBS (Tris-buffered-saline: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4)

TBS/TC ( 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4)

### 1. Anzüchten von *Pseudomonas aeruginosa*:

*Pseudomonas aeruginosa* wurde über Nacht bei 37°C auf Nähragar (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) angezüchtet. Für alle Versuche wurde der gleiche Bakterienstamm verwendet.

### 2. Erstellen einer Bakteriensuspension:

Die Bakterien wurden von der Platte geerntet und in ein 50 ml Polypropylen-Gefäß (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland) mit 20 ml TBS-Puffer gegeben. Das Gefäß wurde so lange geschüttelt bis eine homogene Suspension entstand. Um eine konstante Konzentration an Bakterien zu erzielen wurde die Extinktion der Suspension in einem Photometer (Eppendorf Gerätebau GmbH, Hamburg, Deutschland) bei 623 nm gemessen und auf 2,0 eingestellt.

### 3. Reinigung von *Pseudomonas aeruginosa*:

Um die Suspension von eventuellen Verunreinigungen, wie z.B. Nähragarresten zu säubern wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert (4000 U/min, 10 Minuten) (Heraeus,

Hanau, Deutschland), der Überstand verworfen. Das Sediment wurde erneut mit 20 ml TBS-Puffer in Suspension gebracht. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

4. Konzentrierung von *Pseudomonas aeruginosa*:

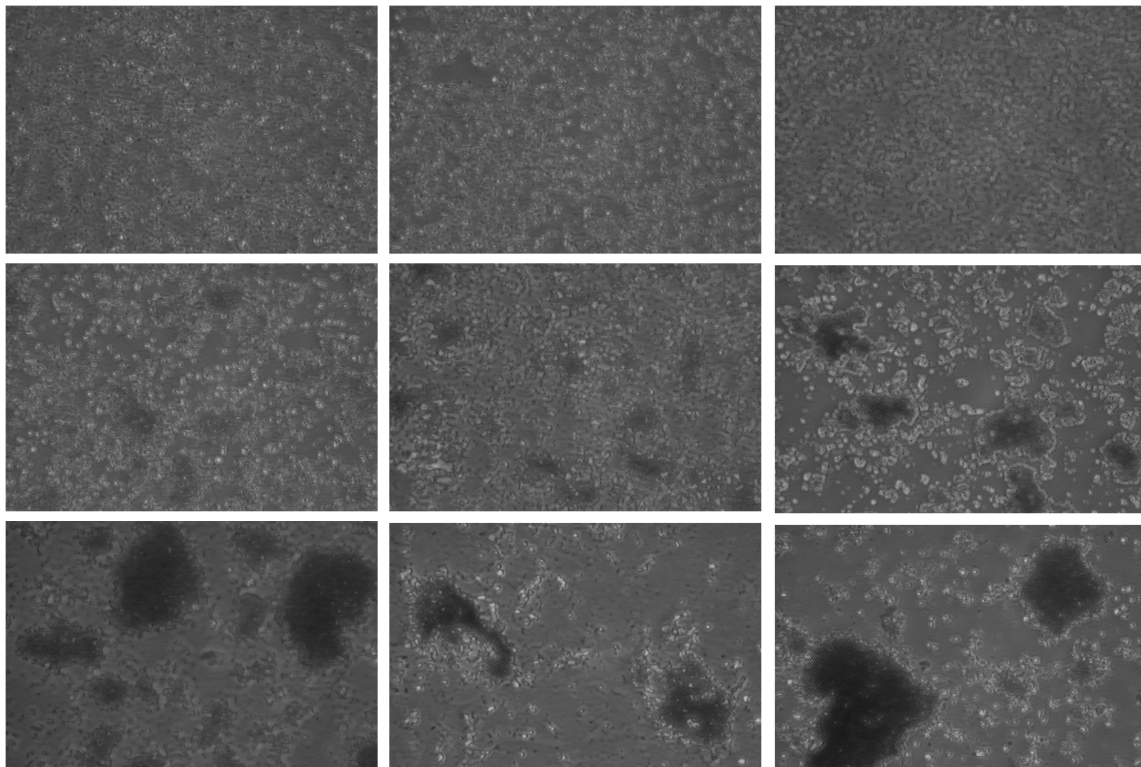
Nach der Reinigung der Bakterien wurde die Suspension erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert und das Sediment in 800 µl TBS/TC-Puffer aufgelöst, so daß eine Extinktion von 50 erzielt werden konnte.

5. Bestimmung der Agglutination:

Es wurde versucht durch Vermischung der Bakteriensuspension mit rekombinantem humanem SP-A (Byk Gulden, Konstanz, Deutschland) (Standard SP-A), mit rekombinantem humanem SP-D (Dr. E. Crouch, St. Louis, MO, USA) (Standard SP-D) und mit bronchoalveolären Lavagen eine Agglutination der Pseudomonaden herbeizuführen. Um eine gleichmäßige Verteilung beider Komponenten zu gewährleisten wurden sie in einem 1,5 ml Polypropylen-Gefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vermischt und erst danach auf einen Objektträger pipettiert. Standard SP-A und Standard SP-D waren in TBS-Puffer, dem 10 mM EDTA zugegeben wurde, gelöst. Von der Bakteriensuspension wurden jeweils 1,5 µl, vom Standard SP-A, vom Standard SP-D und von der BAL wurden jeweils 13,5 µl eingesetzt. Um zu kontrollieren, daß es nicht zu einer spontanen Agglutination von Pseudomonaden kommt, wurde 1,5 µl Bakteriensuspension mit 13,5 µl TBS-Puffer, dem 10 mM EDTA zugegeben war, vermischt und ebenso auf einen Objektträger pipettiert. Es zeigte sich hierbei aber in keinem Fall eine spontane Agglutination.

6. Auswertung:

Nach 4 Minuten wurde der Objektträger unter dem Mikroskop (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland) betrachtet und das Ergebnis digital gespeichert (Paint Shop Pro 6, Jasc Software Inc., Eden Prairie, MN, USA). Die Agglutination wurde in 8 Grade eingeteilt.



**Abbildung 8** Agglutinationsstärke

links oben: Agglutinationsgrad 0 (keine Agglutination)

rechts unten: Agglutinationsgrad VIII (sehr starke Agglutination)



## **2.9 Statistik**

Die Werte, die als Median (25.;75.Perzentile) [Minimum-Maximum] angegeben wurden, sind bei ungepaarten Werten mit dem parameterfreien Testverfahren nach Mann-Whitney, bei Paarvergleichen mit dem Testverfahren nach Wilcoxon ausgewertet worden. Korrelationen sind nach Spearman berechnet worden.

Normalverteilte Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Sie wurden mit gepaartem bzw. ungepaartem t-Tests verglichen.

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

Für die statistischen Berechnungen wurden die Statistik- und Tabellenkalkulationssoftware Prism (Graph Pad, San Diego, CA, USA) und Excel (Microsoft, Redmont, Washington, USA) verwendet.

## **3 Ergebnisse**

### ***3.1 Patientenkollektiv***

#### **3.1.1 Tracheostoma-Patienten**

Während des Untersuchungszeitraumes von 20 Monaten wurde bei insgesamt 46 tracheotomierten Kindern eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. Das Alter betrug im Mittel  $4,4 \pm 3,8$  Jahre. Alle Kinder hatten 4 Wochen vor der Untersuchung keine akuten Symptome von Seiten der Atemwege. Die klinischen Parameter sind im Einzelnen in der Tabelle 3.1 zusammengefaßt.

**Tabelle 3.1.** Klinische Parameter der 46 untersuchten Patienten

Nr	Genus	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	TS-Dauer (Jahre)	Ursache für Tracheotomie	Grunderkrankung
1	w	7,3	13	6,8	Mikrolarynx, Laryngomalazie	multiple Fehlbildungen, Krampfleiden
2	w	0,7	5	0,4	proximale Larynxstenose	Laryngomalazie, chronische Laryngitis
3	w	1,5	10	1,1	Larynxspalte	Tracheomalazie
4	m	13,5	20	12,1	ehemaliges FG, Trachealstenose	Zellweger-Syndrom
5	m	4,3	11	3,9	Mikrognathie	Smith-Lemli-Opitz-Syndrom
6	m	1,9	10	1,5	Stimmlippenparese links	bronchopulmonale Dysplasie
7	m	4,2	15		Gefäßkompression der distalen Trachea	Minderwuchs
8	w	2,2	9	1,9	ehemaliges FG, Tracheomalazie	Z.n. Herz-OP bei PDA, Choanalatresie
9	w	8,1	14	7,8	langstreckige Cricoidstenose	ASD, VSD, LKG-Spalte
10	w	1,2	9	0,7	subglottische Stenose nach Intubation	rez. Atemwegsinfektionen, sonst o.B.
11	m	1	7		Larynxspalte	Duodenalatresie, Gallengangsfehlbildung
12	m	1,2	9	0,9	subglottisches Hämangiom	sonst o.B.
13	w	1,5	9	1,4	infantiler Larynx	sonst o.B.
14	w	3,5	14	2,2	Pharynxstriktur (Laugenverätzung)	Gastrostoma
15	w	5,9	18	5,7	distale Trachealstenose	ASD, VSD
16	w	2,8	15	2,6	subglottische Stenose	sonst o.B.
17	w	4,9	11	4,4	Muskeldystrophie	Dysmorphie-Syndrom, Lungenhypoplasie
18	w	6,2	15	4,9	ehemaliges FG, Larynxstenose	sonst o.B.
19	m	2,3	15		Ateminsuffizienz	Arthrogryposis multiplex congenita Typ I
20	m	2,3	11	2,2	Larynxanomalie	Mikrozephalus
21	m	6,5	17	6,2	Larynxanomalie	Dysostosis mandibulofacialis
22	w	4,5	11	4,5	Gaumenspalte	Pierre-Robin-Syndrom
23	w	2,5	12	2,1	rezidivierende, stenosierende Laryngitis	sonst o.B.
24	w	0,8	7,5	0,7	glottische und subglottische Hämangiome	rez. Bronchopneumonien, VSD
25	m	3,8	15	2,2	Larynxdiaphragma	Fraser-Syndrom
26	w	11,5	25	10,9	Laryngomalazie	Z.n. Herz-OP bei PDA, VSD
27	m	0,5	5	0,4	Laryngomalazie, Larynxstenose	Mikrodeletion 22q11
28	m	4	17	3,8	Gaumenspalte	Pierre-Robin-Syndrom
29	w	6,2	10,5	3,3	subglottische Stenose, dysplastischer Larynx	Goldenhar-Syndrom, Epilepsie
30	m	10,8	25	10,5	ehemaliges FG, Larynxstenose	Schluckstörung, Hirnschaden
31	m	18,8	25	1,5	hoher Querschnitt nach neurochirurgischer OP	Mukopolysaccharidose Typ IV
32	m	9,8	25	7,2	Larynxstenose	Schwerhörigkeit
33	w	9,2	22	7,7	subglottisches Hämangiom	Aortenisthmusstenose
34	w	2,8	12	2,5	subglottisches Hämangiom	VSD
35	m	1,8	14	0,2	Rhabdomyosarkom Unterkiefer links	sonst o.B.
36	m	5,2	20	5,1	Laryngomalazie	Spina bifida, Hydrozephalus
37	w	2,2	10	2,1	Undine-Syndrom	Hypothyreose, Tracheobronchiomalazie
38	m	3,9	12	3,5	Trachealstenose	Ösophagusatresie Vogt IIIb
39	m	4,8	15	3,4	Stimmlippenparese	Ösophaguseingangsstenose
40	w	1,6	9	1,4	Stimmbandsynechie, Trachealstenose	sonst o.B.
41	m	3,2	14	3,0	Larynxstenose, hypoplastischer Larynx	Mikrognathie, Mikrozephalus
42	w	1,6	7,5	1,2	ehemaliges FG, subglott. Zysten	hypoxischer Hirnschaden
43	w	4,2	15	2,3	ehemaliges FG, Cricoidstenose, Glottisstenose	bronchopulmonale Dysplasie
44	m	0,9	9	0,8	Larynxstenose bei Lymphangiomatose	Lymphangiom, Z.n. Extirpation
45	m	0,8	7	0,4	ehemaliges FG, infantiler Larynx	Unterkieferhypoplasie
46	w	5	12	4,6	glottische und subglottische Trachealstenose	Morbus Recklinghausen

Abkürzungen: TS-Dauer (Bestehen des Tracheostomas bei Lavage), FG (Frühgeborenes), OP (Operation), PDA (persistierender Ductus arteriosus), ASD (Vorhofseptum-defekt), VSD (Ventrikelseptumdefekt), LKG-Spalte (Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte)

### 3.1.2 Kontrollgruppe

Um die Veränderungen des Surfactantsystems der Lunge bei tracheotomierten Kindern identifizierbarer zu machen, wurden zum Vergleich bronchoalveoläre Lavagen bei lungengesunden Kindern durchgeführt. Diese wurden bei insgesamt 16 Kindern, die sich einer elektiven Untersuchung oder einem operativen Eingriff in Allgemeinanästhesie wegen nicht-pulmonaler Probleme unterziehen mußten, mittels einem Endlochkatheters gewonnen. Das Alter betrug im Mittel  $4,5 \pm 3,9$  Jahre. Die klinischen Parameter sind in folgender Tabelle festgehalten.

**Tabelle 3.2.** Klinische Daten der 16 Kinder der Kontrollgruppe

Nr	Genus	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Grund des Eingriffes	Atemwegserkrankung	Atopie
1	w	1,63	13	Leistenhernie links	negativ	negativ
2	m	5,36	20	Ganglion linker Fußrücken	negativ	negativ
3	m	4,25	16	schnellender Daumen	negativ	negativ
4	m	0,77	9	Tierzellnävus linkes Knie	negativ	negativ
5	m	2,84	11	Phimose	negativ	negativ
6	w	1,46	11	Hämangiomentfernung	negativ	negativ
7	m	0,59	8,5	Zirkumzision	negativ	negativ
8	w	0,50	7	Entfernung rechter Doppeldaugen	negativ	negativ
9	m	1,25	10	Nävuszellnävus linke Scapula	negativ	negativ
10	m	2,26	11	NMR	negativ	negativ
11	m	10,57	36	TE	negativ	negativ
12	w	12,27	60	TE	negativ	negativ
13	m	9,18	35	TE	negativ	negativ
14	m	8,71	25	TE	negativ	negativ
15	w	6,50	25	TE	negativ	negativ
16	w	4,08	17	TE	negativ	negativ

Abkürzungen: NMR (Kernspintomographie), TE (Tonsillektomie)

### **3.2 Zytologische Ergebnisse**

Um den Grad der Entzündungsreaktion bei tracheotomierten Kindern bestimmen zu können, wurden die bronchoalveolären Lavagen zytologisch untersucht. Bei 26 Lavagen war die Rückgewinnung der 1. Fraktion und bei 2 Lavagen war die Rückgewinnung der Pool-Fraktion so gering, daß nicht alle zytologischen Untersuchungen durchgeführt werden konnten. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse dargestellt.

**Tab. 3.3.** Zytologische Untersuchung der Tracheostoma-Patienten

Nr	1. Fraktion								Pool-Fraktion							
	Ges. Zellzahl [Zellen/ml]	Zellvitalität	Mak	Lym	Neut	Eo	Baso	Rec	Ges. Zellzahl [Zellen/ml]	Zellvitalität	Mak	Lym	Neut	Eo	Baso	Rec
1								0	75000	66	86	7	3	2	1	27
2								20	175000	67	85	6	8	0	0	50
3	40000		48	39	9	1	1	40	200000		83	16	1	0	0	60
4								0	65000	83	84	4	6	5	1	30
5	1570000	87	15	1	84	0	0	36	313000	76	86	3	11	0	0	76
6	68000	25	40	40	20	0	0	10	138000	80	84	13	2	1	0	83
7	330000	80	6	2	92	0	0	27	358000	74	37	25	37	1	0	73
8	70000	76						11	135000	18	77	8	3	12	0	42
9								21	147000	90	16	24	56	2	1	31
10	130000	77	61	8	28	2	0	22	365000	86	87	10	3	0	0	52
11	255000	90	30	18	29	21	2	29	1150000	95	41	19	27	11	1	33
12								11	275000	95	42	35	21	2	0	44
13	95000	70	38	7	54	1	0	44	107000	70	75	16	9	0	0	63
14	113000	87	21	25	52	2	0	21	636000	93	11	12	67	10	0	64
15								0	196000	93	36	12	51	1	0	41
16	238000	81	27	8	59	6	0	27	201000	69	57	28	11	4	0	82
17								0	215000	74	68	24	8	0	0	24
18	45000	56						47	75000	90	94	4	1	1	0	78
19								0	240000	90	86	6	7	1	0	33
20	307000	44	25	72	1	1	1	27	285000	72	65	34	1	0	0	52
21								0	94000	76	74	18	4	4	0	43
22	340000	34	68	5	24	3	0	36	191000	80	85	12	2	1	0	76
23								0	370000	85	63	26	11	0	0	85
24	50000	35	69	10	20	0	0	31	105000	70	80	19	1	0	0	36
25								0	184000	64	41	40	16	3	0	27
26								4	128000	79	90	2	8	0	0	43
27	98000	70						30	150000	80						50
28	120000	69	36	6	58	0	0	21	143000	95	35	3	61	1	0	29
29								0	34000	67						13
30	25000	20						20	60000	83	92	6	2	0	0	44
31	385000	75	79	4	17	0	0	37	300000	90	96	1	2	0	0	49
32								4	130000	60	29	50	19	1	0	24
33	390000	80	4	16	75	5	0	9	185000	80	48	9	42	1	0	42
34	34000	78						46	100000	69	79	20	1	0	0	78
35	495000	74	85	9	6	0	0	32	401000	80	92	6	2	0	0	76
36								8	180000	85	90	9	1	0	0	38
37								0	810000	100	28	5	66	1	0	57
38	131000	63	55	8	37	0	0	17	135000	83	81	15	4	0	0	64
39	2700000	78	18	21	61	0	0	10	560000	79	45	9	45	1	0	22
40	38000	70						22	184000	73	80	11	9	0	0	28
41	19000	100	68	10	22	0	0	14	360000	83	76	22	2	0	0	42
42	263000	80	8	5	86	1	0	7	473000	86	67	5	28	0	0	38
43								0	113000	80	84	4	12	0	0	36
44			85	1	14	0	0	6	529000	93	73	13	13	1	0	37
45			73	4	22	1	0	7	68000	11	57	1	42	0	0	14
46	1515000	93						25	720000	90	21	26	50	3	0	69

**Abkürzungen:** Ges.Zellzahl (Gesamtzellzahl), Mak (Makrophagen), Lym (Lymphozyten), Neut (neutrophile Granulozyten), Eo (eosinophile Granulozyten), Baso (basophile Granulozyten), Rec (Recovery, bzw. zurückerhaltenes Volumen)

Die Differentialzytologie, die Zellvitalität und das zurückerhaltene Volumen sind in Prozent angegeben, die Gesamtzellzahl als Absolutwert.

Um die Unterschiede des Zellbildes zwischen tracheotomierten und lungengesunden Kindern erfassen zu können, wurden die BAL's der Kontrollgruppe ebenso zytologisch untersucht (s. Tab. 3.4.). Die unzureichende Rückgewinnung ist auch hier die Ursache, daß bei 6 Lavagen die 1. Fraktion und bei 2 Lavagen die Pool-Fraktion nicht untersucht werden konnte.

**Tabelle 3.4.** Zytologische Untersuchung der Kontrollgruppe

Nr	1. Fraktion								Pool-Fraktion							
	Ges. Zellzahl [Zellen/ml]	Zellvitalität	Mak	Lym	Neut	Eo	Baso	Rec	Ges. Zellzahl [Zellen/ml]	Zellvitalität	Mak	Lym	Neut	Eo	Baso	Rec
1	34000	100						19	49000	77	90	10	0	0	0	31
2	56000							20	263000							79
3								0	330000	83	91	8	1	0	0	47
4	124000	79	58	5	37	0	0	39								0
5	45000	42	86	12	2	0	0	32	83000	68	91	7	2	0	0	52
6	130000	57	89	11	0	0	0	36	109000	72	89	9	2	0	0	64
7	64000	50	99	1	0	0	0	47	173000	83	95	4	1	0	0	82
8	41000	73	64	35	0	1	0	50	203000	85	84	14	1	1	0	60
9	56000	53						35	109000	76	98	2	0	0	0	47
10	19000	60	95	5	0	0	0	23	53000	64	94	5	1	0	0	52
11								2,7	70000	100	81	15	4	0	0	60
12	562000	98	28	2	70	0	0	25	167000	99	88	10	2	0	0	44
13	115000	87	90	9	1	0	0	29	100000	100	85	14	1	0	0	52
14	130000	69	83	13	3	1	0	20	180000	84	83	13	3	1	0	57
15	70000	86	81	18	1	0	0	40	72500	93	92	8	0	0	0	69
16	30000	85						29	80000	94	77	23	0	0	0	77

**Abkürzungen:** Ges.Zellzahl (Gesamtzellzahl), Mak (Makrophagen), Lym (Lymphozyten), Neut (neutrophile Granulozyten), Eo (eosinophile Granulozyten), Baso (basophile Granulozyten), Rec (Recovery, bzw. zurückerhaltenes Volumen)

Die Differentialzytologie, die Zellvitalität und das zurückerhaltene Volumen sind in Prozent angegeben, die Gesamtzellzahl als Absolutwert.

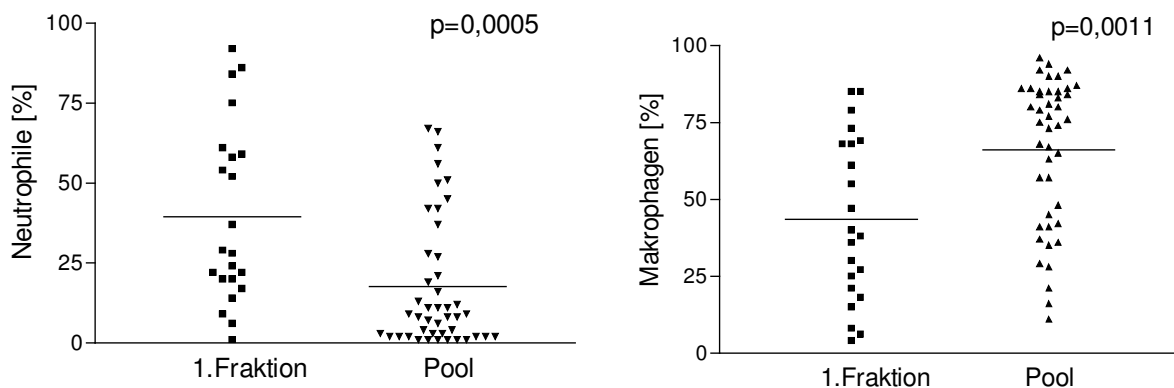
### 3.2.1 Vergleich zwischen 1. Fraktion und Pool-Fraktion

Die 1. Fraktion und die Pool-Fraktion der Tracheostoma-Patienten unterscheiden sich im Bezug auf die Makrophagen und die Neutrophilen signifikant (s. Tab. 3.5.). Dabei ist in der 1. Fraktion der Anteil der Neutrophilen gegenüber der Pool-Fraktion gesteigert, bei den Makrophagen verhält es sich umgekehrt. Für die Zellvitalität, die Gesamtzellzahl, die Lymphozyten, die Eosinophilen und die Basophilen konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

**Tabelle 3.5.** Zellgehalt der BAL's der Tracheostoma-Patienten

<b>Tracheostoma-Patienten</b>			
	1.Fraktion	Pool-Fraktion	p
Anzahl	22-28/46	44-46/46	
Recovery [%]	15,5 (2;28) [0-47] 46	43,0 (32-64) [13-85] 46	<0.0001
Zellvitalität [%]	75,5 (59,5;80,5) [20-100] 26	80 (71;90) [11-100] 45	0,0577
Gesamtzellzahl [*10 <sup>4</sup> /ml]	13 (5,9;36,3) [1,9-270] 28	18,5 (12,1;35,9) [3,4-115] 46	0,2370
Makrophagen [%]	39 (19,5;68,5) [4-85] 22	75,5 (43,5;85) [11-96] 44	0,0011
Lymphozyten [%]	8 (4,5;19,5) [1-72] 22	12 (6;21) [1-50] 44	0,3839
Neutrophile [%]	28,5 (18,5;60) [1-92] 22	8,5 (2;27,5) [1-67] 44	0,0005
Eosinophile [%]	0,5 (0;2) [0-21] 22	1 (0;1,5) [0-12] 44	0,9835
Basophile [%]	0 (0;0) [0-2] 22	0 (0;0) [0-1] 44	0,89

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

**Abbildung 9**

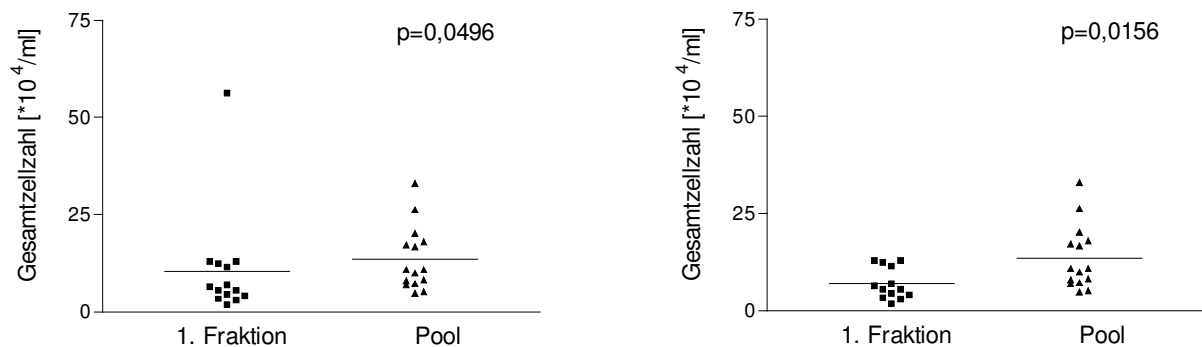
Im Gegensatz zu den Tracheostoma-Patienten fanden sich in der Kontrollgruppe, beim Vergleich der 1. Fraktion und der Pool-Fraktion ein signifikanter Unterschied in der Gesamtzellzahl, die in der Pool-Fraktion erhöht ist. Noch deutlicher wird der Unterschied, wenn der Ausreißer nicht berücksichtigt wird (s. Tab. 3.6.).



**Tabelle 3.6.** Zellgehalt der BAL's der Kontrollgruppe

<b>Kontrollgruppe</b>			
	1.Fraktion	Pool-Fraktion	p
Anzahl	10-14/16	10-15/16	
Recovery [%]	29 (20-37,5) [0-50] 16	54,9 (47-66,7) [0-82] 16	0,0002
Zellvitalität [%]	73 (55;86,5) [42-100] 13	83,5 (74;96,5) [64-100] 14	0,1454
Gesamtzellzahl [*10 <sup>4</sup> /ml]	6 (3,8;12,7) [1,9-56,2] 14	10,9 (7,6;19,2) [4,9-33] 15	0,0496
Makrophagen [%]	84,5 (61;92,5) [28-99] 10	89,5 (83,5;93,3) [77-98] 14	0,2534
Lymphozyten [%]	10 (3,5;15,4) [1-35] 10	9,5 (6;14) [2-23] 14	0,8605
Neutrophile [%]	0,8 (0;20) [0-71] 10	1 (0;2) [0-4] 14	1
Eosinophile [%]	0 (0;0,5) [0-1] 10	0 (0;0) [0-1] 14	0,8291
Basophile [%]	0 (0;0) [0-0] 10	0 (0;0) [0-0] 10	

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

**Abbildung 10**

### 3.2.2 Vergleich zwischen Tracheostoma-Patienten und Kontrollgruppe

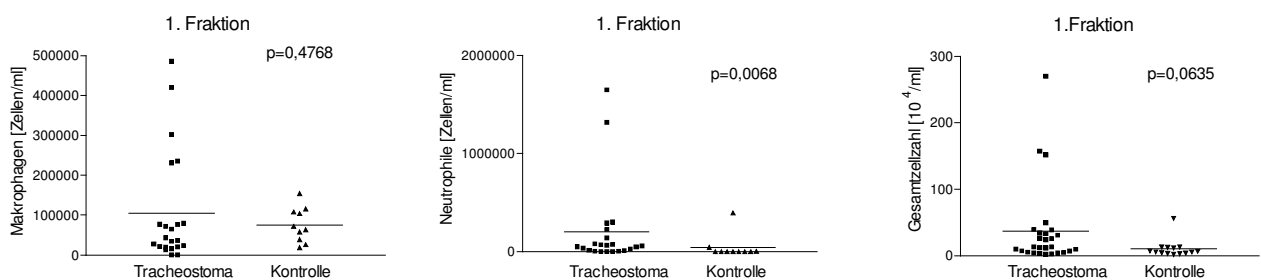
Die Gruppe der Tracheostoma-Kinder hatte erwartungsgemäß sowohl einen deutlich höheren prozentualen als auch absoluten Anteil an Neutrophilen in der 1. Fraktion (s. Tab. 3.7. und Abb. 11). Im Gegensatz dazu sind die Makrophagen in der Kontrollgruppe prozentual vermehrt. Die Abbildung 11 macht allerdings deutlich, daß es sich hierbei nur um eine

relative, nicht aber absolute Vermehrung von Makrophagen in der Gruppe der Kontroll-Kinder handelt.

**Tabelle 3.7.** Vergleich der Zytologien von Tracheostoma-Patienten und Kontrollgruppe, bzgl. der 1. Fraktion

	Tracheostoma-Patienten		Kontrollgruppe		p
	1.Fraktion		1.Fraktion		
Anzahl	22-26/46		10-14/16		
Recovery [%]	15,5 (2;28) [0-47] 46		29 (20-37,5) [0-50] 16		0,0491
Zellvitalität [%]	75,5 (59,5;80,5) [20-100] 26		73 (55;86,5) [42-100] 13		0,8646
Gesamtzellzahl [*10 <sup>4</sup> /ml]	13 (5,9;36,3) [1,9-270] 27		6 (3,8;12,7) [1,9-56,2] 14		0,0635
Makrophagen [%]	39 (19,5;68,5) [4-85] 22		84,5 (61;92,5) [28-99] 10		0,0019
Lymphozyten [%]	8 (4,5;19,5) [1-72] 22		10 (3,5;15,4) [1-35] 10		0,9514
Neutrophile [%]	28,5 (18,5;60) [1-92] 22		0,8 (0;20) [0-71] 10		0,0019
Eosinophile [%]	0,5 (0;2) [0-21] 22		0 (0;0,5) [0-1] 10		0,1124
Basophile [%]	0 (0;0) [0-2] 22		0 (0;0) [0-0] 10		

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**



**Abbildung 11**

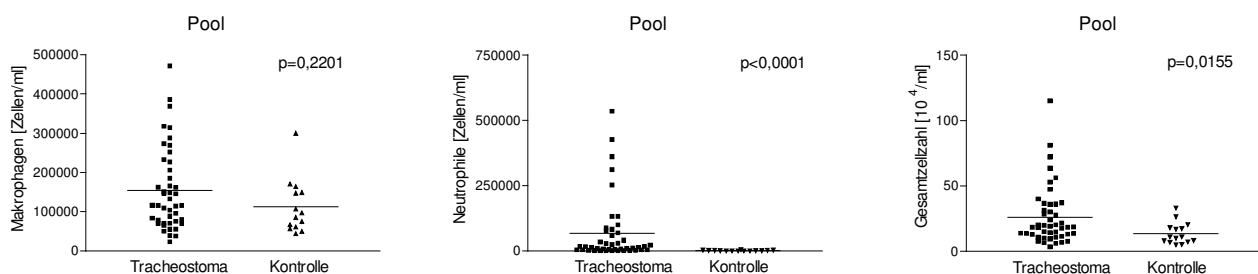
Die Pool-Fractionen der Tracheostoma-Patienten und der Kontrollgruppe unterscheiden sich weitgehend in der gleichen Weise wie die 1. Fraktionen. D.h. der Anteil der Neutrophilen ist in der Gruppe der Tracheostoma-Patienten signifikant erhöht. Die Makrophagen sind

ebenfalls relativ, nicht aber absolut in der Kontrollgruppe vermehrt. Anders als bei der 1. Fraktion kann man bei den Eosinophilen eine signifikante Erhöhung innerhalb der Tracheostoma-Patienten erkennen (s. Tab. 3.8. und Abb. 12).

**Tabelle 3.8.** Vergleich der Zytologien von Tracheostoma-Patienten und Kontrollgruppe, bzgl. der Pool-Fraktion

	Tracheostoma-Patienten		Kontrollgruppe		
	Pool-Fraktion		Pool-Fraktion		p
Anzahl	44-46/46		14-15/16		
Recovery [%]	43,0 (32-64) [13-85] 46		54,9 (47-66,7) [0-82] 16		0,2574
Zellvitalität [%]	80 (71;90) [11-100] 45		83,5 (74;96,5) [64-100] 14		0,2396
Gesamtzellzahl [*10 <sup>4</sup> /ml]	18,5 (12,1;35,9) [3,4-115] 46		10,9 (7,6;19,2) [4,9-33] 15		0,0155
Makrophagen [%]	75,5 (43,5;85) [11-96] 44		89,5 (83,5;93,3) [77-98] 14		0,0003
Lymphozyten [%]	12 (6;21) [1-50] 44		9,5 (6;14) [2-23] 14		0,3447
Neutrophile [%]	8,5 (2;27,5) [1-67] 44		1 (0;2) [0-4] 14		<0.0001
Eosinophile [%]	1 (0;1,5) [0-12] 44		0 (0;0) [0-1] 14		0,0194
Basophile [%]	0 (0;0) [0-1] 44		0 (0;0) [0-0] 14		

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

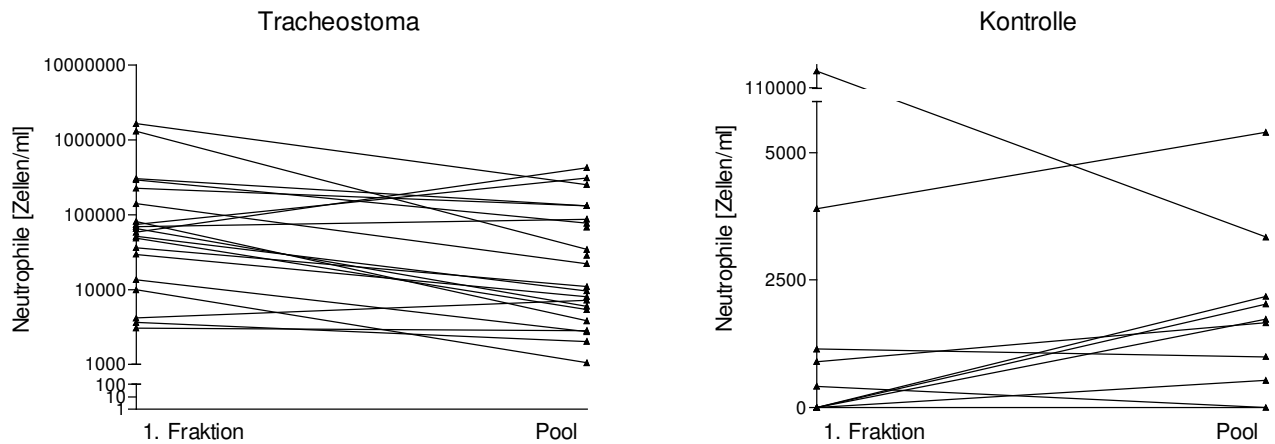


**Abbildung 12**

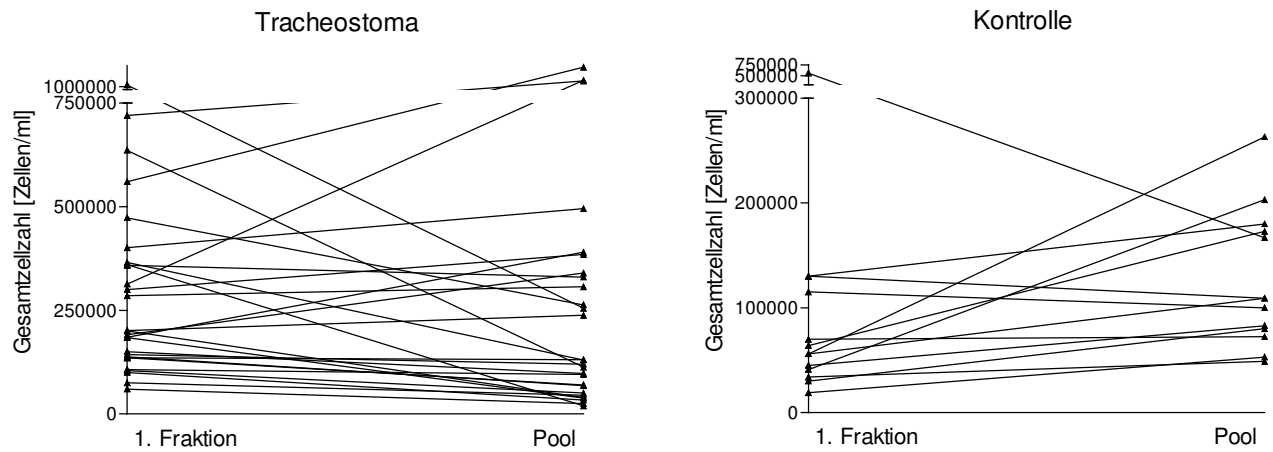
### 3.2.3 Zusammenhang zwischen 1. Fraktion und Pool-Fraktion

Um die Frage zu klären, inwieweit die 1. Fraktion und die Pool-Fraktion sich gegenseitig beeinflussen, wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen beiden Fraktionen gefunden werden kann. Für die Anzahl der Neutrophilen konnte in der Gruppe der Tracheostoma-Patienten gezeigt werden, daß eine Korrelation zwischen beiden Fraktionen besteht. Für die Kontrollgruppe gelang dieser Nachweis nicht (s. Abb. 13).

Für die Anzahl der gefundenen Zellen pro ml Lavage konnte ebenso nur für die Tracheostoma-Patienten eine Korrelation gefunden werden (s. Abb. 14).



**Abbildung 13** Beim Vergleich der 1. Fraktionen mit den Pool-Fraktionen bezüglich der Konzentration an Neutrophilen konnte für die Tracheostoma-Patienten eine Korrelation gefunden werden (Spearman  $r=0,5586$ ;  $p=0,0069$ ;  $n=22$ ). Bei der Kontrollgruppe (Spearman  $r=0,3307$ ;  $p=0,3853$ ;  $n=9$ ) gelang dieser Nachweis nicht.



**Abbildung 14** Beim Vergleich der 1. Fraktionen mit den Pool-Fractionen bezüglich der Gesamtzellzahl, konnte nur für die Tracheostoma-Patienten (Spearman  $r= 0,6094$ ;  $p= 0,0007$ ;  $n= 27$ ) eine Korrelation gefunden werden. Die beiden Fraktionen der Kontrollgruppe (Spearman  $r= 0,4359$ ;  $p= 0,1365$ ;  $n= 13$ ) korrelierten nicht signifikant.

### ***3.3 Surfactantproteine in bronchoalveolären Lavagen***

Sowohl für die Mehrzahl der Tracheostoma Patienten, als auch für die Mehrzahl der Kinder der Kontrollgruppe, gelang die Bestimmung der Surfactantproteine A, B, C und D. Da in der Pool-Fraktion mehr Material zur Verfügung stand, konnten hier insgesamt mehr Proben untersucht werden. Dies gilt im besonderen Maße für die Bestimmung der Bindungsfähigkeit an Pseudomonadenoberflächen. Sie wurde aus diesem Grund nur für die Pool-Fraktion durchgeführt.

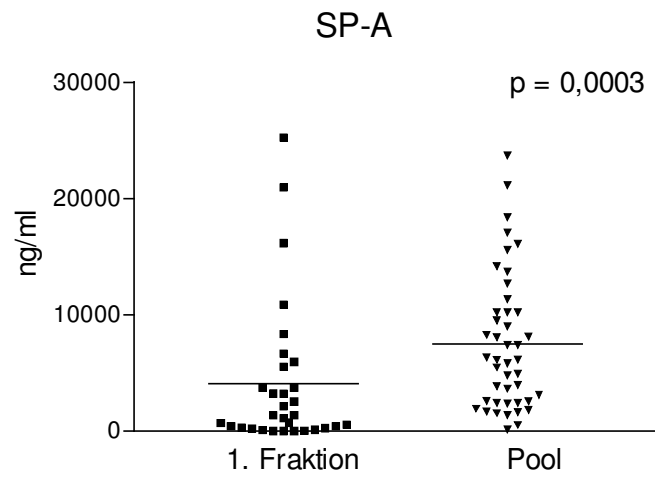
### 3.3.1 Vergleich zwischen 1. Fraktion und Pool-Fraktion

Die SP-A-Bestimmung mittels ELISA ergab für die Pool-Fraktion der Tracheostoma-Patienten hochsignifikant höhere Werte als für die 1. Fraktion (s. Tab. 3.9. und Abb. 15). Das Gesamtprotein, SP-B, SP-C und SP-D waren in keiner Fraktion signifikant verändert.

**Tab 3.9.** Vergleich des Gesamtproteins und der Surfactantproteine A, B, C, D zwischen der 1. Fraktion und der Pool-Fraktion der Tracheostoma-Patienten

<b>Tracheostoma-Patienten</b>				
	1. Fraktion		Pool-Fraktion	p
Anzahl	27-31/46		25-44/46	
Gesamtprotein [µg/ml]	77,1 (45,7;137,7) [0-715,4]	28	103,8 (72,0;172,4) [31,6-354,5]	44 0,1505
SP-A [ng/ml]	1330 (258,5;5742) [0-25240]	31	6126 (2478;10220) [108,7-23690]	44 0,0003
SP-B [ng/ml]	298,5 (171,8;942,6) [0-3515]	31	384,7 (249;642,1) [82,5-3712]	44 0,2655
SP-C [ng/ml]	259,7 (171,2;390,4) [0-6916]	31	243,4 (171,3;320,3) [50,9-4721]	44 0,5649
SP-D [ng/ml]	10,2 (0;15,1) [0-80,1]	27	9,2 (6,7;13,0) [0-25,5]	44 0,594
SP-A			18,6 (9,3;29,8) [3,3-43,7]	25
Bindung [%]				
SP-D			174,8 (63,8;246,3) [24,4-568,6]	22
Bindung [%]				

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**



**Abbildung 15** Der Gehalt an SP-A ist in der 1. Fraktion signifikant niedriger.



In der Kontrollgruppe konnte, anders als bei den Tracheostoma Patienten, ein Unterschied bezüglich dem Gehalt an SP-D gefunden werden. SP-D ist in der 1. Fraktion signifikant erhöht, beim Weglassen des Ausreißers in der 1. Fraktion, kehrt sich das Ergebnis allerdings um. So erscheinen die Unterschiede für SP-D insgesamt doch zweifelhaft. (s. Tab. 3.10. und Abb. 16). Weitere Unterschiede fanden sich nicht.

**Tab. 3.10.** Vergleich des Gesamtproteins und der Surfactantproteine A, B, C, D zwischen der 1. Fraktion und der Pool-Fraktion der Kontrollgruppe

		<b>Kontrollgruppe</b>		
		1.Fraktion	Pool-Fraktion	p
Anzahl		11/16	3-11/16	
Gesamtprotein	76,76 (34,4;98,8) [18,2-236,8] 11	77,1 (53,3;89,0) [46,5-97,3] 11		0,8438
[µg/ml]				
SP-A [ng/ml]	5763 (935,3;11880) [0-13800] 11	8068 (3809;11290) [2091-17730] 11		0,2643
SP-B [ng/ml]	411,7 (183,0;1011) [114,7-1895] 11	498,5 (383;984,5) [253,1-1726] 11		0,5114
SP-C [ng/ml]	193,9 (166,9;600,9) [60,2-4812] 11	314,0 (228,9;851,4) [151,9-2073] 11		0,3247
SP-D [ng/ml]	10,54 (6,72;14,72) [0-246,7] 11	18,64 (13,9;30,5) [10,34-39,3] 11		0,0181
SP-A		24,7 (7,0;36,7) [2,7-63,5] 8		
Bindung [%]				
SP-D		75,1 ( ) [51,9-484,2] 3		
Bindung [%]				
Darstellungsform: <b>Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl</b>				

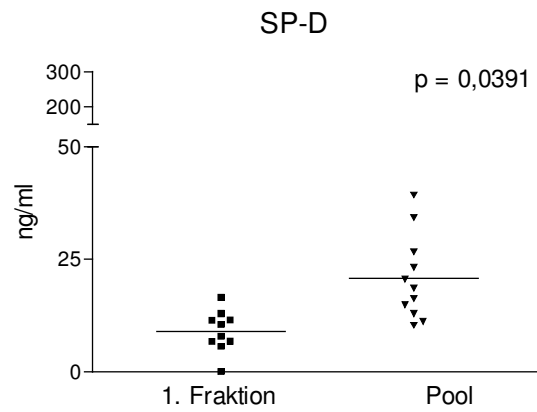
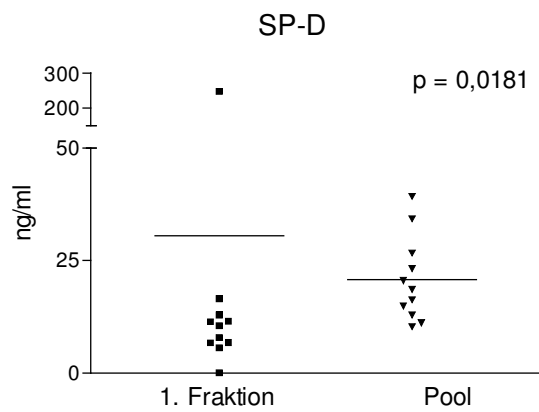


Abbildung 16

Der Gesamtproteingehalt der BAL´s wurde bestimmt, um ein Verhältnis von SP-A, -B, -C, bzw. -D zum Proteingehalt zu bilden.

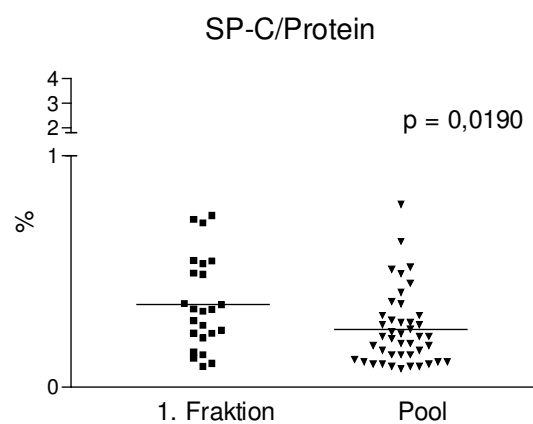
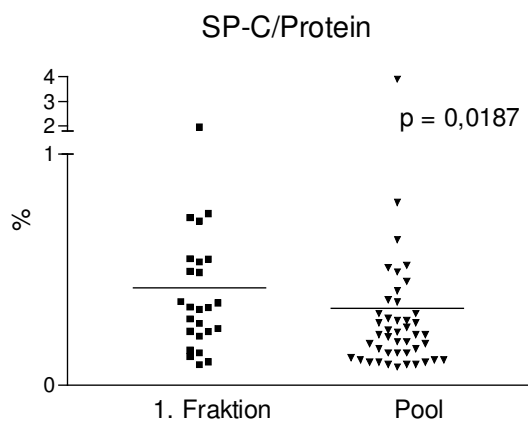
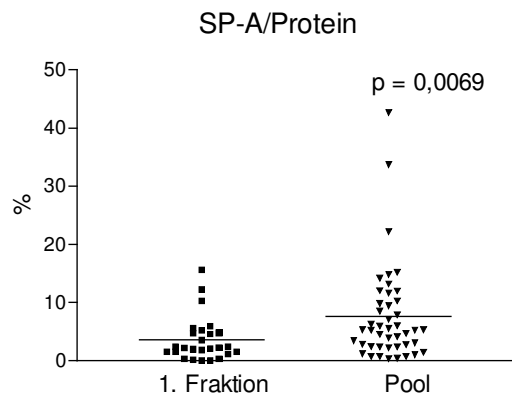
Dabei unterschied sich der Proteingehalt der BAL´s beider Gruppen nicht signifikant voneinander (s. Tab. 3.11. und Abb. 17). Allerdings ist der SP-A/Gesamtprotein-Quotient in der Pool-Fraktion signifikant erhöht zur 1. Fraktion. Dies stimmt mit den Ergebnissen in Tabelle 3.9. überein.

Anders als in der Tabelle 3.9. zeigt sich hier für den SP-C/Gesamtprotein-Quotienten eine signifikante Erhöhung für die 1. Fraktion, die auch nach Entfernung der Ausreißer bestehen bleibt.

**Tab 3.11.** Vergleich der Surfactantproteine A, B, C, D zwischen der 1. Fraktion und der Pool-Fraktion im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt der Tracheostoma-Patienten

<b>Tracheostoma-Patienten</b>				
	1.Fraktion		Pool-Fraktion	p
Anzahl	22-28/46		40-44/46	
Gesamtprotein [µg/ml]	77,1 (45,7;137,7) [0-715,4]	28	103,8 (72,0;172,4) [31,6-354,5]	44 0,1505
SP-A/Protein [%]	2,18 (1,32;4,98) [0-15,58]	26	5,29 (2,41;10,08) [0,34-42,66]	44 0,0069
SP-B/Protein [%]	0,36 (0,21;0,58) [0,08-1,65]	25	0,34 (0,19;0,54) [0,09-3,08]	44 0,8466
SP-C/Protein [%]	0,34 (0,22;0,54) [0,09-1,94]	25	0,22 (0,13;0,31) [0,08-3,91]	44 0,0187
SP-D/Protein [%]	0,01 (0;0,02) [0-0,08]	24	0,01 (0,01;0,02) [0-0,04]	40 0,5097

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**



**Abbildung 17** Der Gehalt an SP-A im Bezug zur Gesamteproteinkonzentration ist für die 1. Fraktion bei der Tracheostoma-Gruppe signifikant erniedrigt. Für SP-C verhält es sich genau umgekehrt. Dies ändert sich auch nach Entfernung der Ausreißer nicht.

Für die Kontrollgruppe bestätigt der Surfactantprotein/Gesamtprotein-Quotient die in Tabelle 3.10. genannten Ergebnisse. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der 1. Fraktion und der Pool-Fraktion gefunden.

**Tab 3.12.** Vergleich der Surfactantproteine A, B, C, D zwischen der 1. Fraktion und der Pool-Fraktion im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt der Kontrollgruppe

		<b>Kontrollgruppe</b>		
		1.Fraktion	Pool-Fraktion	p
		10-11/16	12/16	
Anzahl				
Gesamtprotein	76,8 (34,4;98,8) [18,2-236,8] 11	77,1 (53,3;89,0) [46,5-97,3] 11		0,8438
	[µg/ml]			
SP-A/Protein [%]	7,0 (1,51;13,77) [0,48-17,98] 10	10,1 (4,58;14,04) [0-30,83] 12		0,6209
SP-B/Protein [%]	0,74 (0,52;1,17) [0,31-1,21] 11	0,67 (0,51;1,30) [0-2,25] 12		0,8777
SP-C/Protein [%]	0,48 (0,36;0,73) [0,16-2,03] 11	0,44 (0,29;0,63) [0-2,50] 12		0,7818
SP-D/Protein [%]	0,01 (0,01;0,03) [0,001-0,1] 10	0,02 (0,02;0,04) [0-0,07] 12		0,2226

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

### 3.3.2 Vergleich zwischen Tracheostoma-Patienten und Kontrollgruppe

Die ersten Fraktionen der Tracheostoma Patienten und der Kontrollgruppe zeigen keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf den Gesamtproteingehalt oder die Konzentrationen der Surfactantproteine A, B, C oder D (s. Tab. 3.13.). Die Bindungsfähigkeit von SP-A und SP-D an Pseudomonadenoberflächen wurde, wie oben bereits erwähnt, für die 1. Fraktion nicht untersucht.

**Tab. 3.13.** Vergleich des Gesamtproteingehalts und der Konzentration der Surfactantproteine A, B, C und D zwischen Tracheostoma-Patienten und Kontrollgruppe, bzgl. der 1. Fraktion

	<b>Tracheostoma-Patienten</b>		<b>Kontrollgruppe</b>		
	1.Fraktion		1.Fraktion		p
Anzahl	27-31/46		10-11/16		
Gesamtprotein [µg/ml]	77,1 (45,7;137,7) [0-715,4]	28	76,76 (34,4;98,8) [18,2-236,8]	11	0,4633
SP-A [ng/ml]	1330 (258,5;5742) [0-25240]	31	5763 (935,3;11880) [0-13800]	11	0,2030
SP-B [ng/ml]	298,5 (171,8;942,6) [0-3515]	31	411,7 (183,0;1011) [114,7-1895]	11	0,5672
SP-C [ng/ml]	259,7 (171,2;390,4) [0-6916]	31	193,9 (166,9;600,9) [60,2-4812]	11	0,9544
SP-D [ng/ml]	10,2 (0;15,1) [0-80,1]	27	10,54 (6,72;14,72) [0-246,7]	11	0,5842

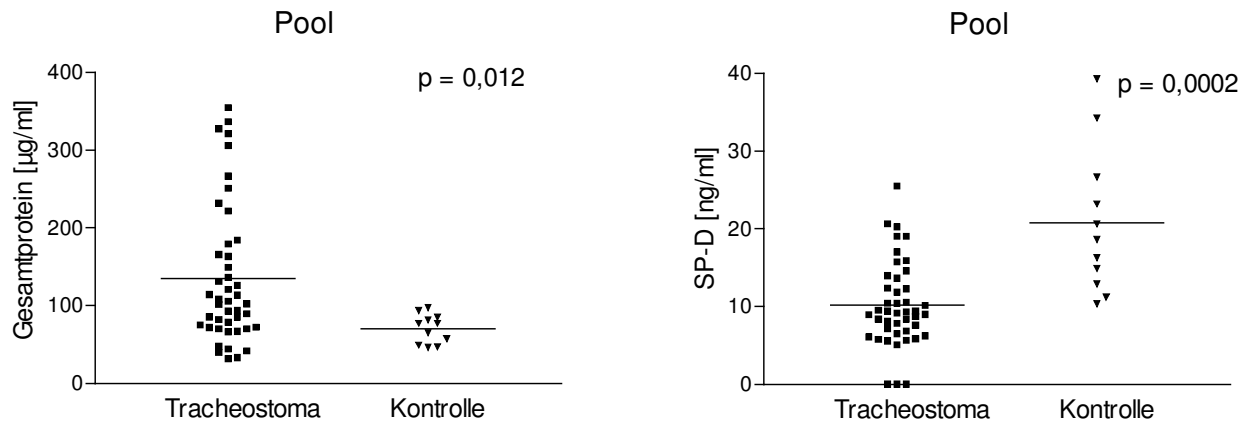
Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

Der Gesamtproteingehalt in der Pool-Fraktion der Tracheostoma Patienten ist signifikant höher als in der Pool-Fraktion der Kontrollgruppe. Die SP-D Konzentration ist in der Pool-Fraktion der Kontrollgruppe signifikant erhöht (s. Tab. 3.14. und Abb. 18).

**Tab. 3.14.** Vergleich des Gesamtproteingehalts und der Konzentration der Surfactantproteine A, B, C und D zwischen Tracheostoma-Patienten und Kontrollgruppe, bzgl. der Pool-Fraktion

	<b>Tracheostoma-Patienten</b>		<b>Kontrollgruppe</b>		
	Pool-Fraktion		Pool-Fraktion		p
Anzahl	22-44/46		3-11/16		
Gesamtprotein [µg/ml]	103,8 (72,0;172,4) [31,6-354,5]	44	77,1 (53,3;89,0) [46,5-97,3]	11	0,012
SP-A [ng/ml]	6126 (2478;10220) [108,7-23690]	44	8068 (3809;11290) [2091-17730]	11	0,6062
SP-B [ng/ml]	384,7 (249;642,1) [82,5-3712]	44	498,5 (383;984,5) [253,1-1726]	11	0,1122
SP-C [ng/ml]	243,4 (171,3;320,3) [50,9-4721]	44	314,0 (228,9;851,4) [151,9-2073]	11	0,1030
SP-D [ng/ml]	9,2 (6,7;13,0) [0-25,5]	44	18,64 (13,9;30,5) [10,34-39,3]	11	0,0002
SP-A Bindung [%]	18,6 (9,3;29,8) [3,3-43,7]	25	24,7 (7,0;36,7) [2,7-63,5]	8	0,7848
SP-D Bindung [%]	174,8 (63,8;246,3) [24,4-568,6]	22	75,1 ( ) [51,9-484,2]	3	0,9002

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**



**Abbildung 18** Der Gesamtproteingehalt ist in der Tracheostoma-Gruppe signifikant erhöht. Dagegen ist die Konzentration an SP-D erniedrigt.

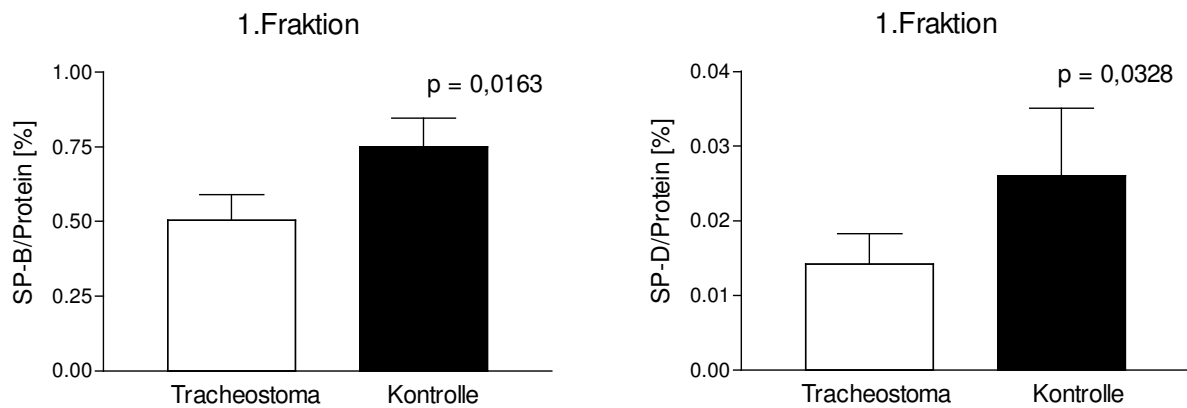


Betrachtet man die Konzentrationen der Surfactantproteine im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt, fällt beim Vergleich der beiden 1. Fraktionen von Tracheostoma- und Kontrollgruppe auf, daß sie sich bezüglich ihrer SP-B und SP-D/Gesamtprotein-Quotienten unterscheiden (s. Tab. 3.15.). So zeigen sich in der Kontrollgruppe leicht signifikant erhöhte Werte. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den Ergebnissen in Tabelle 3.13., da sich dort keine Unterschiede für die SP-A und SP-D Konzentrationen fanden.

**Tab 3.15.** Vergleich der Surfactantproteine A, B, C, D im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt zwischen den beiden 1. Fraktionen der Tracheostoma- und der Kontrollgruppe

	<b>Tracheostoma-Patienten</b>		<b>Kontrollgruppe</b>		
	1.Fraktion		1.Fraktion		p
Anzahl	22-27/46		10-11/16		
Gesamtprotein [µg/ml]	77,1 (45,7;137,7) [0-715,4]	28	76,8 (34,4;98,8) [18,2-236,8]	11	0,3506
SP-A/Protein [%]	2,18 (1,3;4,98) [0-15,58]	26	7,0 (1,51;13,77) [0,48-17,98]	10	0,0500
SP-B/Protein [%]	0,36 (0,21;0,57) [0,08-1,65]	25	0,74 (0,52;1,17) [0,31-1,21]	11	0,0163
SP-C/Protein [%]	0,34 (0,22;0,54) [0,09-1,94]	25	0,48 (0,36;0,73) [0,16-2,03]	11	0,0993
SP-D/Protein [%]	0,01 (0;0,02) [0-0,08]	24	0,01 (0,01;0,03) [0,001-0,1]	10	0,0328

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**



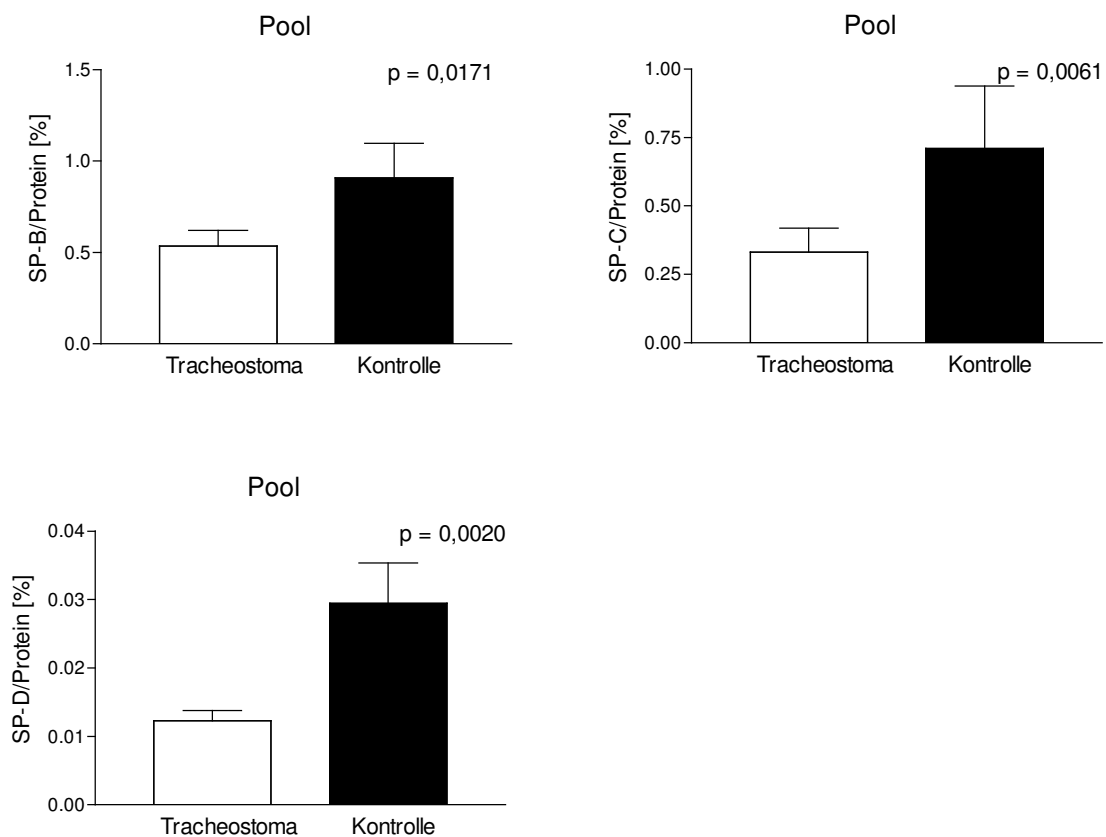
**Abbildung 19** Für den SP-A und SP-D/Gesamtprotein-Quotienten zeigte sich eine Erhöhung der Werte in der Kontrollgruppe.

Betrachtet man die beiden Pool-Fractionen von Tracheostoma- und Kontrollgruppe bezüglich ihres Surfactantprotein/Gesamtprotein-Quotienten, so unterscheiden sie sich ebenfalls signifikant in Bezug auf SP-D. Dieses ist, wie bei den Absolutwerten für SP-D (s. Tab. 3.14.), in der Kontrollgruppe erhöht. In den Pool-Fractionen finden sich darüber hinaus noch Unterschiede bzgl. SP-B und SP-C, die jeweils in der Kontrollgruppe signifikant erhöht sind (s. Tab. 3.16.).

**Tab 3.16.** Vergleich der Surfactantproteine A, B, C, D im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt zwischen den beiden Pool-Fraktionen der Tracheostoma- und der Kontrollgruppe

	Tracheostoma-Patienten		Kontrollgruppe		
	Pool-Fraktion		Pool-Fraktion		p
Anzahl	40-44/46		11-12/16		
Gesamtprotein [µg/ml]	103,8 (72,0;172,4)	[31,6-354,5] 44	77,1 (53,3;89,0)	[46,5-97,3] 11	0,0120
SP-A/Protein [%]	5,29 (2,41;10,08)	[0,34-42,66] 44	10,1 (4,58;14,04)	[0-30,83] 12	0,1369
SP-B/Protein [%]	0,34 (0,19;0,54)	[0,09-3,08] 44	0,67 (0,51;1,30)	[0-2,25] 12	0,0171
SP-C/Protein [%]	0,22 (0,13;0,31)	[0,08-3,91] 44	0,44 (0,29;0,63)	[0-2,50] 12	0,0061
SP-D/Protein [%]	0,01 (0,01;0,02)	[0-0,04] 40	0,02 (0,02;0,04)	[0-0,07] 12	0,0020

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

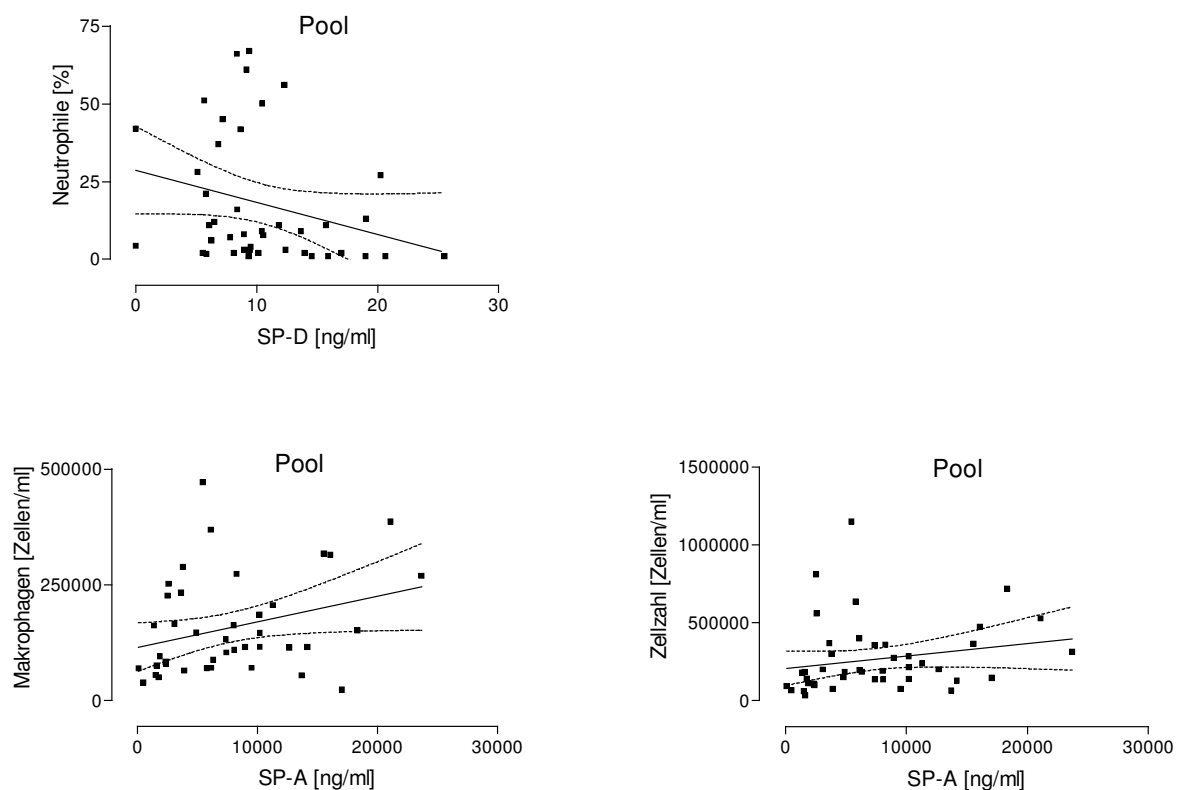


**Abbildung 20** Der SP-B, der SP-C und SP-D/Gesamtprotein-Quotient ist in der Tracheostoma-Gruppe signifikant geringer.

### 3.3.3 Zusammenhang zwischen Zellbild und Surfactantproteinen

Um eventuell bestehende Zusammenhänge zwischen dem Zellbild und den Konzentrationen an Surfactantproteinen in der BAL erkennen zu können, wurden diese beiden Komponenten für die Tracheostoma Gruppe gezielt miteinander verglichen.

Dabei zeigte sich ein Zusammenhang bezüglich der SP-D Konzentration und dem Anteil der Neutrophilen in der Lavage. Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen SP-A und der Anzahl der Makrophagen, bzw. SP-A und der Zellzahl in der BAL nachgewiesen werden. Diese Korrelationen konnten allerdings lediglich in der Pool-Fraktion gefunden werden, für die 1. Fraktion zeigten sich keinerlei signifikante Übereinstimmungen (s. Abb. 21).



**Abbildung 21** Bei dem Vergleich des Zellbildes mit den Surfactantproteinen konnte ein Zusammenhang zwischen SP-D und dem Anteil der Neutrophilen in der BAL (Spearman  $r = -0,3455$ ;  $p = 0,0250$ ;  $n = 42$ ) gefunden werden. Dieser Nachweis gelang ebenfalls für SP-A und die Makrophagenanzahl (Spearman  $r = 0,3378$ ;  $p = 0,0287$ ;  $n = 42$ ), bzw. SP-A und die Zellzahl (Spearman  $r = 0,3855$ ;  $p = 0,0098$ ;  $n = 44$ ).

### 3.3.4 Agglutinationsvermögen der bronchoalveolären Lavagen

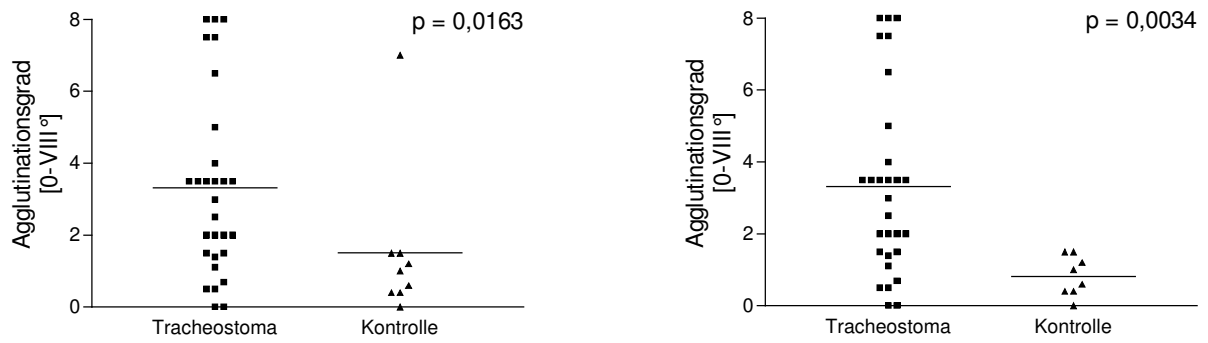
Um herauszufinden, ob sich die bronchoalveolären Lavagen der Tracheostoma Patienten von denen der Kontrollgruppe hinsichtlich ihres Bindungsvermögens an Pseudomonaden-Oberflächen unterscheiden, wurde auf einem Objektträger eine Pseudomonaden-Suspension mit einer BAL vermischt und die sich einstellende Agglutination beobachtet (s. Tab. 3.17.). Dieser Versuch ist ausführlich im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Da für diesen Versuch sehr viel Material notwendig war, wurden nur die Pool-Fraktionen verwendet.

**Tab. 3.17.** Vergleich der Agglutinationsstärke der BAL's

	<b>Tracheostoma-Patienten</b>	<b>Kontrollgruppe</b>	
	Pool-Fraktion	Pool-Fraktion	p
Anzahl	29/46	9/16	
Agglutinations- stärke [0-VIII°]	3,0 (1,45;4,5) [0-8] 29	1 (0,4;1,5) [0-7] 9	0,0163

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden, miteinander verglichenen Gruppen gefunden werden. Die Lavagen der Kinder mit Tracheostoma sind in der Lage Pseudomonaden stärker zu agglutinieren als die Lavagen der Kontrollgruppe. Die folgende Abbildung verdeutlicht dies.



**Abbildung 22** Vergleich der Agglutinationsstärke der BAL´s von Tracheostoma Patienten und Kontrollgruppe. In der rechten Abbildung ist der Ausreißer der Kontrollgruppe entfernt. Es ist nur die Pool-Fraktion dargestellt.

### **3.4 Virologische Ergebnisse**

Um die Frage zu klären, ob ein Tracheostoma einen Einfluß auf den Befall des unteren Atemtraktes mit Viren hat, wurde bei 43 Tracheostoma-Patienten und bei 14 Kindern der Kontrollgruppe die Pool-Fraktion der BAL virologisch untersucht (s. Tab. 3.18.). Dabei wurden die Viren (Respiratory Syncytial Virus, Herpes simplex Virus, Epstein Barr Virus, Zytomegalie Virus, Herpes Virus Typ 6 und Adenovirus) mittels Antigennachweis, bzw. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen.

Da man für die Durchführung der Tests mindestens 2 ml Lavage benötigte, wurde auf eine Untersuchung der 1. Fraktion verzichtet. Es fanden sich bei 23,3 % der Tracheostoma-Patienten und bei 14,3 % der gesunden Kontrollgruppe Viren in der BAL (s. Tab. 3.19.).

**Tabelle 3.18. Virologie**

Tracheostoma-Patienten			Kontrollgruppe		
Nr	Virologie	Nr	Virologie	Nr	Virologie
1	0	24	1	1	0
2	4, 6	25	0	2	0
3	0	26	0	3	0
4	0	27	0	4	nicht bestimmt
5	0	28	0	5	0
6	0	29	nicht bestimmt	6	0
7	4	30	0	7	0
8	6	31	0	8	0
9	0	32	0	9	0
10	4, 6	33	4	10	0
11	nicht bestimmt	34	0	11	nicht bestimmt
12	0	35	0	12	0
13	0	36	0	13	0
14	0	37	0	14	4
15	0	38	4, 5, 6	15	4
16	6	39	0	16	0
17	0	40	0		
18	0	41	0		
19	0	42	0		
20	3, 4	43	0		
21	0	44	0		
22	4	45	nicht bestimmt		
23	0	46	0		

**Viren:** 0 = kein Nachweis  
 1 = Adenovirus  
 2 = Respiratory syncytial Virus (RSV)  
 3 = Herpes simplex Virus (HSV)  
 4 = Epstein Barr Virus (EBV)  
 5 = Cytomegalie Virus (CMV)  
 6 = Humanes Herpes Virus Typ 6 (HHV-6)

**Tabelle 3.19. Anzahl der gefundenen Viren**

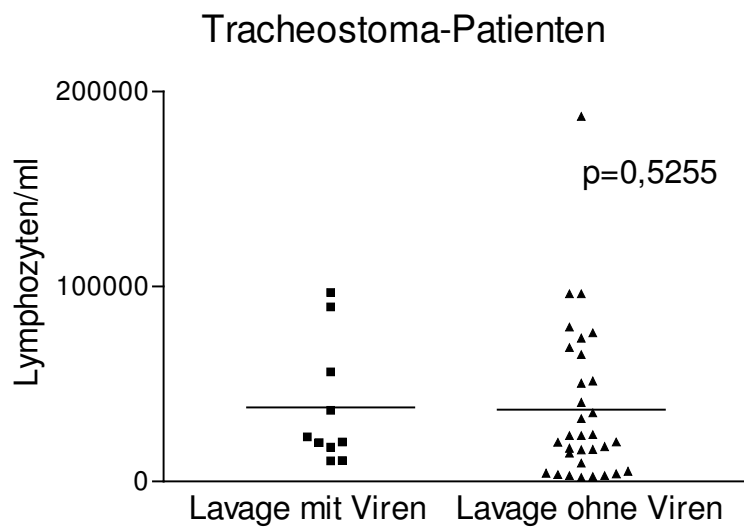
Tracheostoma-Patienten		Kontrollgruppe		p
Untersuchte Patienten:	43	Untersuchte Patienten:	14	
mit positiver Virologie:	10 (23,3% +)	mit positiver Virologie:	2 (14,3% +)	0,7098
ohne positive Virologie:	33	ohne positive Virologie:	12	
<b>gefundene Viren:</b>		<b>gefundene Viren:</b>		
Adenoviren:	1	Adenoviren:	0	
Respiratory syncytial Virus (RSV):	0	Respiratory syncytial Virus (RSV):	0	
Herpes simplex Virus (HSV):	1	Herpes simplex Virus (HSV):	0	
Epstein Barr Virus (EBV):	7	Epstein Barr Virus (EBV):	2	
Zytomegalie Virus (CMV):	1	Zytomegalie Virus (CMV):	0	
Humanes Herpes Virus Typ 6 (HHV-6):	4	Humanes Herpes Virus Typ 6 (HHV-6):	0	

Die Häufigkeit des Auftretens von Viren in der BAL unterschied sich innerhalb der beiden untersuchten Gruppen nicht (Fisher Exact Test  $p=0,7098$ ).



### 3.4.1 Vergleich von Lavagen mit und ohne Virusnachweis

Um die Auswirkungen einer positiven Virologie auf das Zellbild zu klären, wurde sowohl die Zytologie der Tracheostoma-Patienten als auch die Zytologie der Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der Virologie miteinander verglichen (s. Abb. 23). Dabei konnten aber keine signifikanten Unterschiede im Zellbild festgestellt werden.



**Abbildung 23** In der Differentialzytologie konnten keine Hinweise gefunden werden, daß ein Virenbefall der BAL Auswirkungen auf das Zellbild hat. Da bei der Kontrollgruppe lediglich bei zwei Patienten ein Nachweis von Viren gelang, erschien eine statistische Auswertung nicht sinnvoll.

Des weiteren fand sich auch kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Viren in der Lavage und der Zeitdauer des Bestehens eines Tracheostomas (s. Tab. 3.20.).

**Tabelle 3.20.** Virennachweis in der BAL im Bezug auf die Tracheostomadauer

	Lavagen mit Viren	Lavagen ohne Viren	p
Dauer des Tracheostomas [Tage]	814 (249,5;1461) [154,0-2799] 10	910 (535,5;1964) [83,0-4408] 33	0,3485
Darstellungsform: <b>Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl</b>			

### **3.5 Bakteriologische Ergebnisse**

Es wurde eine bakteriologische Untersuchung der bronchoalveolären Lavagen durchgeführt, um das Ausmaß der Keimbesiedelung bei tracheotomierten Kindern im unteren Atemtrakt zu klären. Außerdem interessierte, welche Keime bevorzugt anzutreffen sind und ob Unterschiede zu einer lungengesunden Kontrollgruppe existieren.

In der Tracheostoma-Gruppe wurde bei 19 Patienten die 1. Fraktion und bei 41 Patienten die Pool-Fraktion der Lavagen auf Bakterien untersucht. In der Kontrollgruppe gelang 12, bzw. 15 mal eine bakteriologische Untersuchung (s. Tab. 3.21.). Es fanden sich bei 84 %, bzw. 83 % der Lavagen der Tracheostoma-Patienten und bei 17 %, bzw. 20 % der Lavagen der gesunden Kontrollgruppe Bakterien (s. Tab. 3.22. und 3.23.).

**Tabelle 3.21. Bakteriologie**

Tracheostoma-Patienten				Kontrollgruppe			
Nr	Bakteriologie			Nr	Bakteriologie		
	1. Fraktion	Pool-Fraktion	Abstrich Tracheostoma		1. Fraktion	Pool-Fraktion	Abstrich Nasenloch
1	1	1	1	1	0	0	1
2	1	1	1	2	0	0	1
3	1,10,11	1,10,11	1,7	3	nicht bestimmt	0	1
4	nicht bestimmt	1,3,11	1	4	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
5	1,3,4	1,3	1	5	0	0	1
6	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	6	0	0	1,4,5
7	1,3,5	1,3,5	1,3	7	0	0	1
8	nicht bestimmt	1,5,7	1,7	8	0	0	1
9	1,5	5	1,4,5	9	0	0	1
10	1,10	1,10	1,4	10	nicht bestimmt	0	1
11	1,4	1	1,4	11	nicht bestimmt	1	1
12	nicht bestimmt	1,3,10	1,10	12	1,4	1	1
13	1,10	1,10	1,4,10	13	0	0	1
14	nicht bestimmt	nicht bestimmt	1	14	0	0	nicht bestimmt
15	nicht bestimmt	1,4	1,3	15	0	0	1,4
16	1,10	1,10	1	16	1	1	1,4,5
17	nicht bestimmt	0	1				
18	0	0	1,4				
19	nicht bestimmt	1,2,6	1				
20	1,2,8	1,2,8	1				
21	nicht bestimmt	0	1,4				
22	1,4,9	1,4,9	1,9				
23	nicht bestimmt	1,3	1				
24	1	4	1				
25	nicht bestimmt	2	1,2				
26	nicht bestimmt	1	1				
27	nicht bestimmt	1	1				
28	1	1	1,4				
29	nicht bestimmt	0	1,2				
30	0	0	1,4				
31	1	1,4	1,4				
32	nicht bestimmt	10	1				
33	nicht bestimmt	nicht bestimmt	1,3,5				
34	0	0	1,7				
35	1,11	1	1				
36	nicht bestimmt	0	1				
37	nicht bestimmt	1,4,6	1,4				
38	nicht bestimmt	1,2,3,5	1,5				
39	nicht bestimmt	1,5	1,4,5				
40	nicht bestimmt	1,2,4	1,4				
41	nicht bestimmt	1,2,3,5,9	1,2,9				
42	nicht bestimmt	1	1				
43	nicht bestimmt	1,2	1,4				
44	nicht bestimmt	nicht bestimmt	1,2,6				
45	nicht bestimmt	1	1				
46	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt				

**Bakterien:**  
**0** = kein Nachweis  
**1** = normale Keimflora des oberen Atemtraktes  
**2** = *Pseudomonas aeruginosa*  
**3** = *Hämophilus influenza*  
**4** = *Staphylokokkus aureus*  
**5** = *Pneumokokken*

**6** = *E. coli*  
**7** = *Klebsiella oxytoca*  
**8** = *Serratia marcescens*  
**9** = *Proteus mirabilis*  
**10** = *Moraxella catharalis*  
**11** = aerobe Sporenbildner

**Tabelle 3.22.** Anzahl und Art der gefundenen Bakterien in der 1. Fraktion

1. Fraktion		Tracheostoma-Patienten	Kontrollgruppe	p
untersuchte Patienten:		19	12	
mit positiver Bakteriologie:		16 (84% +)	2 (17%+)	0,0005
ohne positive Bakteriologie:		3	10	
mit potentiell pathogenen Keimen:		11 (58% +)	1 (8% +)	0,0084
ohne potentiell pathogene Keime:		8	11	
<b>normale Keime des oberen Atemtraktes:</b>				
Pseudomonas spp.:		8	0	
vergrünende Streptokokken:		10	1	
hämolysierende Streptokokken:		0	0	
Neisseria spp.:		5	0	
Hämophilus spp.:		3	1	
koagulase neg. Staphylokokken:		4	0	
<b>potentiell pathogene Keime des oberen Atemtraktes:</b>				
Pseudomonas aeruginosa:		1	0	
Hämophilus influenza.:		2	0	
Staphylokokkus aureus:		3	1	
Pneumokokken:		2	0	
E. coli:		0	0	
Klebsiella oxytoca:		0	0	
Serratia marcescens:		1	0	
Proteus mirabilis:		1	0	
Moraxella catharalis:		3	0	
aerobe Sporenbildner:		2	0	

In der 1. Fraktion fand sich in der Tracheostoma-Gruppe, sowohl ein bakterieller Befall der Lavage, als auch ein Befall mit potentiell pathogenen Keimen, signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe (Fisher Exact Test: bakterieller Befall  $p=0,0005$ ; potentiell pathogene Keime  $p=0,0084$ ).

**Tabelle 3.23.** Anzahl und Art der gefundenen Bakterien in der Pool-Fraktion

Pool-Fraktion	Tracheostoma-Patienten	Kontrollgruppe	p
untersuchte Patienten:	41	15	
mit positiver Bakteriologie:	34 (83% +)	3 (20%+)	<0,0001
ohne positive Bakteriologie:	7	12	
mit potentiell pathogenen Keimen:	25 (61% +)	0 (0% +)	<0,0001
ohne potentiell pathogene Keime:	16	15	
<b>normale Keime des oberen Atemtraktes:</b>			
Pseudomonas spp.:	12	0	
vergrünende Streptokokken:	18	2	
hämolyisierende Streptokokken:	2	0	
Neisseria spp.:	16	0	
Hämophilus spp.:	5	1	
koagulase neg. Staphylokokken:	3	0	
<b>potentiell pathogene Keime des oberen Atemtraktes:</b>			
Pseudomonas aeruginosa:	7	0	
Hämophilus influenza.:	7	0	
Staphylokokkus aureus:	6	0	
Pneumokokken:	6	0	
E. coli:	2	0	
Klebsiella oxytoca:	2	0	
Serratia marcescens:	1	0	
Proteus mirabilis:	2	0	
Moraxella catharalis:	7	0	
aerobe Sporenbildner:	2	0	

In der Pool-Fraktion fand sich in der Tracheostoma-Gruppe, sowohl ein bakterieller Befall der Lavage, als auch ein Befall mit potentiell pathogenen Keimen, signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe (Fisher Exact Test: bakterieller Befall  $p < 0,0001$ ; potentiell pathogene Keime  $p < 0,0001$ ).

**Tabelle 3.24.** Anzahl und Art der gefundenen Bakterien im Abstrich

Abstrich	Tracheostoma-Patienten	Kontrollgruppe	p
untersuchte Patienten:	44	14	
mit positiver Bakteriologie:	44 (100% +)	14 (100% +)	
ohne positive Bakteriologie:	0	0	
mit potentiell pathogenen Keimen:	26 (59% +)	3 (21% +)	0,0295
ohne potentiell pathogene Keime:	18	11	

**potentiell pathogene Keime des oberen Atemtraktes:**

Pseudomonas aeruginosa:	4	0
Hämophilus influenza.:	3	0
Staphylokokkus aureus:	13	3
Pneumokokken:	4	2
E. coli:	1	0
Klebsiella oxytoca:	3	0
Serratia marcescens:	0	0
Proteus mirabilis:	2	0
Moraxella catharalis:	2	0
aerobe Sporenbildner:	0	0

Wie in den beiden vorhergehenden Tabellen findet sich auch im Abstrich ein erhöhter Anteil an potentiell pathogenen Keimen bei den Tracheostoma-Patienten (Fisher Exact Test  $p=0,0295$ ). Da beim Abstrich die normale Keimflora nicht weiter spezifiziert wurde, können dazu keine näheren Angaben gemacht werden.

### 3.5.1 Vergleich von Lavagen mit und ohne Keimnachweis

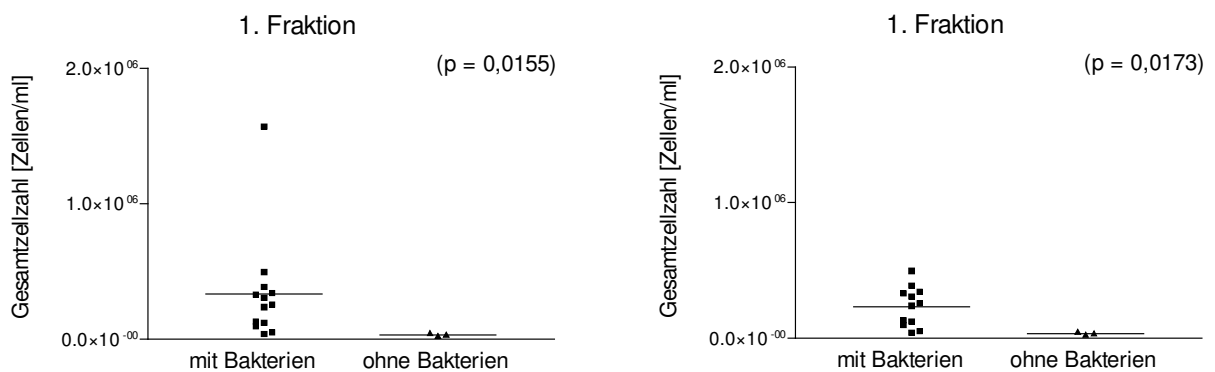
Um die Auswirkungen einer positiven Bakteriologie auf das Zellbild zu klären, wurde sowohl die Zytologie der Tracheostoma-Patienten als auch die Zytologie der Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der Bakteriologie miteinander verglichen.

Da bei keiner 1. Fraktion ohne Keimbefall eine Differentialzytologie gelang, konnte hier leider kein Vergleich durchgeführt werden. Allerdings zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Gesamtzellzahl in den Lavagen mit Keimbefall (s. Tab. 3.25. und Abb. 24). Um die geringe Aussagekraft, bei der kleinen Fallzahl zu verdeutlichen steht das jeweilige Ergebnis in Klammern.

**Tabelle 3.25.** Vergleich der Differentialzytologie von Tracheostoma-Patienten mit und ohne Keimnachweis in der 1. Fraktion der BAL

<b>Tracheostoma-Patienten</b>			
	1.Fraktion mit Keimbefall	1.Fraktion ohne Keimbefall	( p )
Anzahl	12-13/46	3/46	
Zellvitalität [%]	74,5 (56,5;80,5) [34-90] 12	56 (:) [20-78] 3	(0,3482)
Gesamtzellzahl [*10 <sup>4</sup> /ml]	25,5 (10,8;36,3) [4-157] 13	3,4 (:) [2,5-4,5] 3	(0,0155)
Makrophagen [%]	38 (26;68,5) [6-85] 13		
Lymphozyten [%]	8 (4,5;14) [1-72] 13		
Neutrophile [%]	28 (13;58,5) [1-92] 13		
Eosinophile [%]	1 (0;2,5) [0-21] 13		

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**



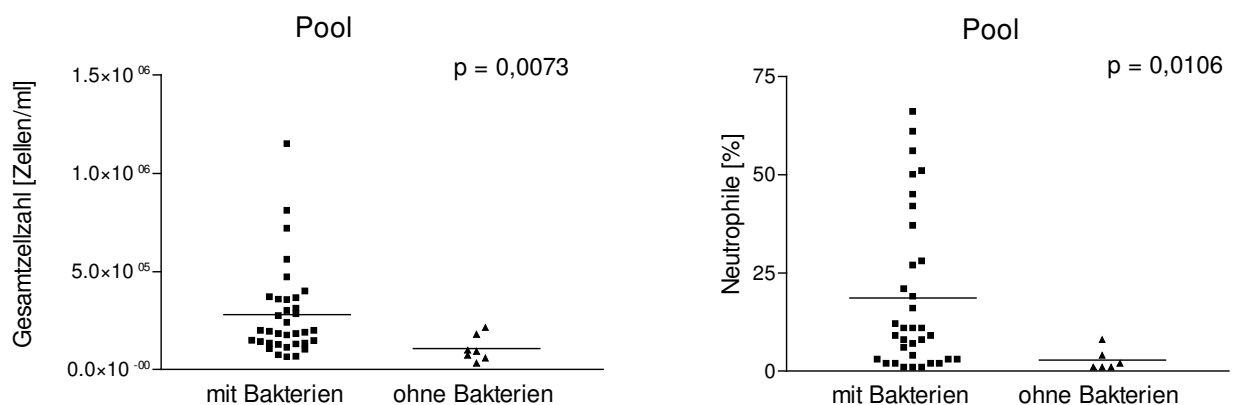
**Abbildung 24**

In der Gruppe der Tracheostoma-Patienten zeigte sich in der Pool-Fraktion mit Keimbefall eine signifikante Erhöhung der Neutrophilenzahlen und der Gesamtzellzahl (s. Tab. 3.26. und Abb. 25). Insgesamt zeigten 19 Patienten (41%) Neutrophilenzahlen größer 10%, bei 13 Patienten (28%) lagen die Neutrophilenzahlen sogar über 20% (s. Tab. 3.3.).

**Tabelle 3.26.** Vergleich der Differentialzytologie von Tracheostoma-Patienten mit und ohne Keimnachweis in der Pool-Fraktion der BAL

Tracheostoma-Patienten			
	Pool-Fraktion mit Keimbefall	Pool-Fraktion ohne Keimbefall	p
Anzahl	34-35/46	6-7/46	
Zellvitalität [%]	80 (71;90) [11-100] 35	76 (71,5;87,5) [67-90] 7	0,6608
Gesamtzellzahl [*10 <sup>4</sup> /ml]	19,6 (13,5;36,3) [6,5-115] 35	9,4 (6,8;19,8) [3,4-21,5] 7	0,0073
Makrophagen [%]	75,5 (41;85) [16-96] 34	84,5 (71;93) [68-94] 6	0,0849
Lymphozyten [%]	11,5 (5;24,5) [1-50] 34	13 (5;22) [4-24] 6	1
Neutrophile [%]	10 (3;32,5) [1-66] 34	1,5 (1;6) [1-8] 6	0,0106
Eosinophile [%]	0,5 (0;2) [0-12] 34	0 (0;2,5) [0-4] 6	0,5431

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**



**Abbildung 25**



Die 1. Fraktion der Kontrollgruppe konnte aus den gleichen Gründen, wie bei den Tracheostoma Patienten nicht verglichen werden.

**Tabelle 3.27.** Vergleich der Differentialzytologie der Kontrollgruppe mit und ohne Keimnachweis in der 1. Fraktion der BAL

	<b>Kontrollgruppe</b>		p
	1.Fraktion mit Keimbefall	1.Fraktion ohne Keimbefall	
Anzahl	1-2/16	7-10/16	
Zellvitalität [%]	91,5 (;) [85-98] 2	69 (51,5;86,5) [42-100] 9	
Gesamtzellzahl [*10 <sup>4</sup> /ml]	29,6 (;) [3-56,2] 2	6 (4,3;12,3) [3,4-13] 10	
Makrophagen [%]	27,5 (;) [27,5-27,5] 1	86 (82,35;94,5) [64-99] 7	
Lymphozyten [%]	2 (;) [2-2] 1	12 (10;26,35) [1-35] 7	
Neutrophile [%]	70,5 (;) [70,5-70,5] 1	0,6 (0;2,5) [0-3] 7	
Eosinophile [%]	0 (;) [0-0] 1	0 (0;1) [0-1] 7	

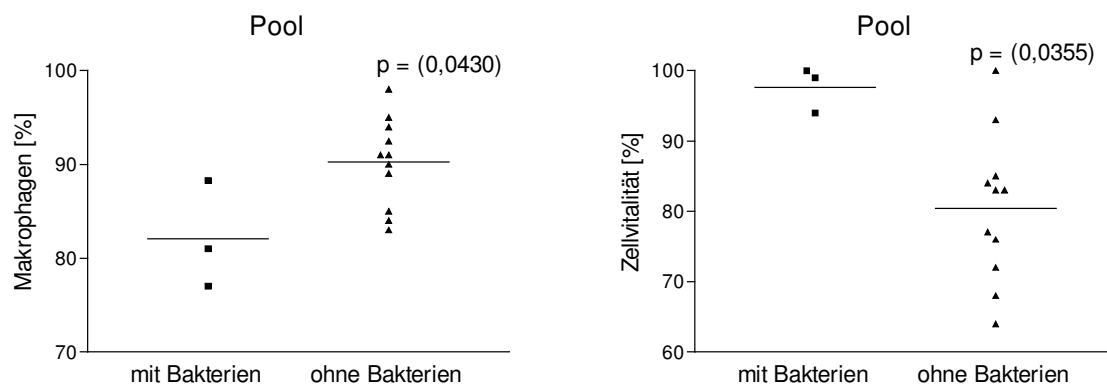
Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

In der Pool-Fraktion der Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf die Neutrophilenzahlen oder die Gesamtzellzahl. Lediglich der Anteil der Makrophagen war in den Lavagen ohne Keimbefall signifikant erhöht (s. Tab. 3.28. und Abb. 26). Aufgrund der geringen Fallzahl steht das Ergebnis in Klammern.

**Tabelle 3.28.** Vergleich der Differentialzytologie der Kontrollgruppe mit und ohne Keimnachweis in der 1. Fraktion der BAL

<b>Kontrollgruppe</b>			
	Pool-Fraktion mit Keimbefall	Pool-Fraktion ohne Keimbefall	( p )
Anzahl			
Zellvitalität [%]	99 ( ; ) [94-100] 3	83 (74;89) [64-100] 11	(0,0355)
Gesamtzellzahl [*10 <sup>4</sup> /ml]	8 ( ; ) [7-16,7] 3	10,9 (7,8;19,2) [4,9-33] 12	(0,4273)
Makrophagen [%]	81 ( ; ) [77-88,29] 3	91 (87;94,5) [83-98] 11	(0,0430)
Lymphozyten [%]	15 ( ; ) [9,51-23] 3	8 (6;13,5) [2-14] 11	(0,0618)
Neutrophile [%]	2 ( ; ) [0-4] 3	1 (0,5;2) [0-3] 11	(0,4817)
Eosinophile [%]	0 ( ; ) [0-0,2] 3	0 (0;0,5) [0-1] 11	(0,8716)

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**



**Abbildung 26**

### 3.5.2 Vergleich zwischen Tracheostoma-Patienten und Kontrollgruppe

Um der Frage nachzugehen, inwieweit sich das Zellbild tracheotomierter und lungengesunder Kinder in Abhängigkeit vom Keimbefall der Lavage unterscheidet, wurden beide Gruppen unter Berücksichtigung der Zytologie miteinander verglichen.

Dabei zeigten sich für die 1. Fraktion keine Unterschiede in der Gesamtzellzahl und Zellvitalität (s. Tab. 3.29.). Da die Zellen in der 1. Fraktion nur sehr selten differentialzytologisch untersucht wurden war ein Vergleich hier nicht möglich.

**Tabelle 3.29.** Vergleich der BAL`s der Tracheostoma- und der Kontrollgruppe ohne Keimnachweis bzgl. der 1. Fraktion

	<b>Tracheostoma-Patienten</b>	<b>Kontrollgruppe</b>	
	1.Fraktion	1.Fraktion	
	ohne Keimbefall	ohne Keimbefall	( p )
Anzahl	3/46	9-10/16	
Zellvitalität [%]	56 ( ; ) [20-78] 3	69 (51,5;86,5) [42-100] 9	(0,4818)
Gesamtzellzahl [*10 <sup>4</sup> /ml]	3,4 ( ; ) [2,5-4,5] 3	6 (4,3;12,3) [3,4-13] 10	(0,0769)

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

**Tabelle 3.30.** Vergleich der BAL`s der Tracheostoma- und der Kontrollgruppe mit Keimnachweis bzgl. der 1. Fraktion

	<b>Tracheostoma-Patienten</b>	<b>Kontrollgruppe</b>	
	1.Fraktion mit Keimbefall	1.Fraktion mit Keimbefall	( p )
Anzahl	12-13/46	2/16	
Zellvitalität [%]	74,5 (56,5;80,5) [34-90] 12	91,5 ( ; ) [85-98] 2	(0,0829)
Gesamtzellzahl [*10 <sup>4</sup> /ml]	25,5 (10,8;36,3) [4-157] 13	29,6 ( ; ) [3-56,2] 2	(0,9323)

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

Für die Pool-Fractionen zeigten sich ebenso keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zytologie. Lediglich die Zellvitalität ist in der Kontrollgruppe mit Keimnachweis höher als in der Tracheostoma-Gruppe (s. Tab. 3.32.). Allerdings ist das Ergebnis bei der geringen Fallzahl nicht sehr aussagekräftig.

**Tabelle 3.31.** Vergleich der BAL's der Tracheostoma- und der Kontrollgruppe ohne Keimnachweis bzgl. der Differentialzytologie der Pool-Fraktion

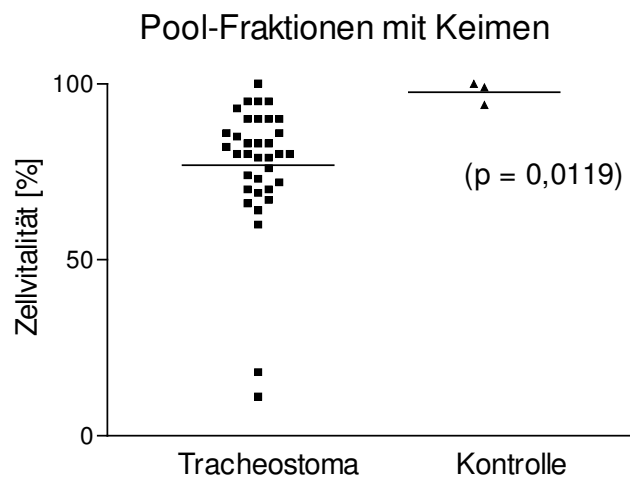
	<b>Tracheostoma-Patienten</b>	<b>Kontrollgruppe</b>	
	Pool-Fraktion	Pool-Fraktion	
	ohne Keimbefall	ohne Keimbefall	p
Anzahl	6-7/46	11-12/16	
Zellvitalität [%]	76 (71,5;87,5) [67-90] 7	83 (73,5;89) [64-100] 11	0,6503
Gesamtzellzahl [*10 <sup>4</sup> /ml]	9,4 (6,8;19,8) [3,4-21,5] 7	10,5 (5,1;19,2) [1,1-33] 12	0,4219
Makrophagen [%]	84,5 (71;93) [68-94] 6	91 (87;94,5) [83-98] 11	0,209
Lymphozyten [%]	13 (5;22) [4-24] 6	8 (6;13,5) [2-14] 11	0,291
Neutrophile [%]	1,5 (1;6) [1-8] 6	1 (0,5;2) [0-3] 11	0,155
Eosinophile [%]	0 (0;2,5) [0-4] 6	0 (0;0,5) [0-1] 11	0,564

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

**Tabelle 3.32.** Vergleich der BAL's der Tracheostoma- und der Kontrollgruppe mit Keimnachweis bzgl. der Differentialzytologie der Pool-Fraktion

	<b>Tracheostoma-Patienten</b>	<b>Kontrollgruppe</b>	
	Pool-Fraktion	Pool-Fraktion	
	mit Keimbefall	mit Keimbefall	( p )
Anzahl	34-36/46	3/16	
Zellvitalität [%]	80 (71;90) [11-100] 35	99 (;) [94-100] 3	(0,0119)
Gesamtzellzahl [*10 <sup>4</sup> /ml]	19,6 (13,5;36,3) [6,5-115] 35	8 (;) [7-16,7] 3	(0,0657)
Makrophagen [%]	75,5 (41;85) [16-96] 34	81 (;) [77-88,29] 3	(0,2779)
Lymphozyten [%]	11,5 (5;24,5) [1-50] 34	15 (;) [9,51-23] 3	(0,6562)
Neutrophile [%]	10 (3;32,5) [1-66] 34	2 (;) [0-4] 3	(0,0515)
Eosinophile [%]	0,5 (0;2) [0-12] 34	0 (;) [0-0,2] 3	(0,358)

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

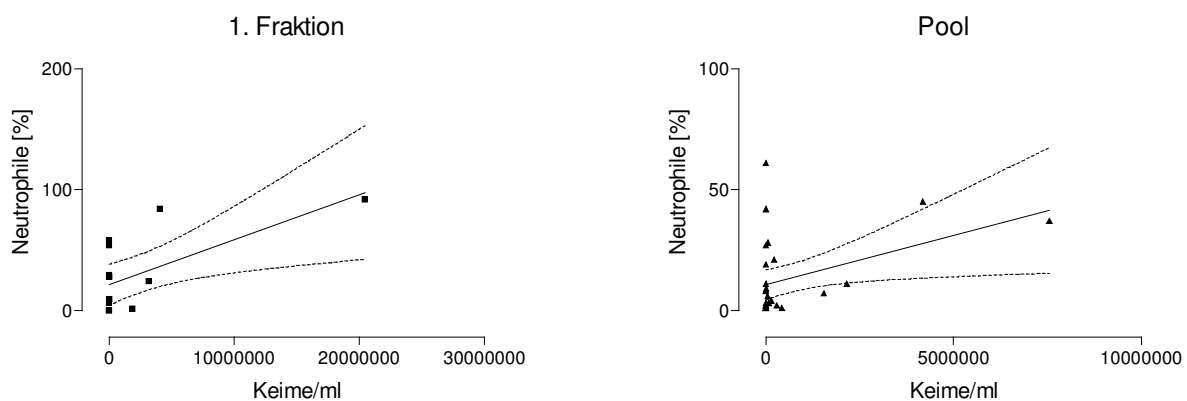


**Abbildung 27**

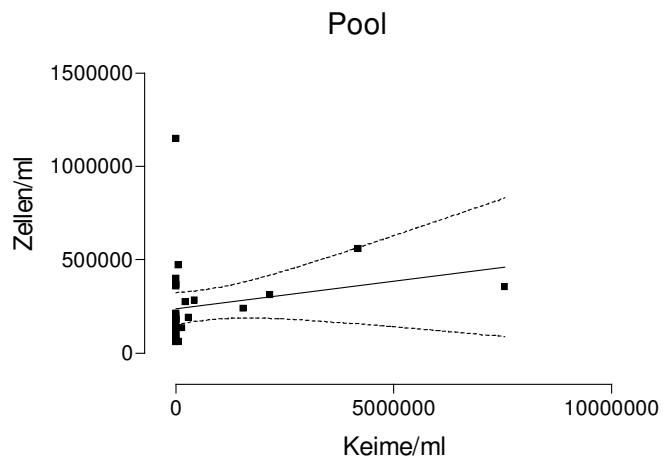
### 3.5.3 Zusammenhang zwischen Zellbild und Keimzahl

Um eventuell bestehende Zusammenhänge zwischen der Keimzahl und dem Zellbild in der BAL erkennen zu können, wurde bei den Tracheostoma Patienten eine quantitative Bakteriologie angestrebt. Dies gelang insgesamt 12 mal bei der 1. Fraktion und 28 mal bei der Pool-Fraktion.

Sowohl für die 1. Fraktion, als auch für die Pool-Fraktion der Tracheostoma-Patienten konnte eine schwache Korrelation zwischen dem Anteil der Neutrophilen in der Lavage und der Keimzahl gefunden werden (s. Abb. 28). Für die Zellzahl gelang dieser Nachweis nur für die Pool-Fraktion (s. Abb. 29).



**Abbildung 28** Bei dem Vergleich des Anteils der Neutrophilen mit der Keimzahl konnte eine schwache Korrelation sowohl für die 1. Fraktion (Spearman  $r=0,6472$ ;  $p=0,0168$ ;  $n=13$ ), als auch für die Pool-Fraktion (Spearman  $r=0,3880$ ;  $p=0,0413$ ;  $n=28$ ) gefunden werden.



**Abbildung 29** Bei dem Vergleich der Zellzahl mit der Keimzahl konnte eine schwache Korrelation für die Pool-Fraktion gefunden werden (Spearman  $r= 0,3815$ ;  $p= 0,0411$ ;  $n= 29$ ).



### 3.5.4 Auswirkungen der Keimzahl auf das Zellbild

Um zu klären, ob es eine Keimzahl gibt, ab der sich der Anteil der Neutrophilen in der Lavage signifikant erhöht, wurden Keimzahlen von 1.000/ml, 10.000/ml und 100.000/ml als Grenzen definiert. Für jede dieser Grenzen wurden die Differentialzytologien der Lavagen, die über dem festgelegten Wert lagen mit denen, die unter diesem Wert lagen, verglichen. Keine dieser Keimzahlen ging mit einer signifikanten Änderung des Zellbildes einher. Dies trifft für beide Fraktionen der BAL zu (s. Tab. 3.33. und Tab. 3.34.).

**Tabelle 3.33.** Anteil der Neutrophilen in der 1. Fraktion der BAL in Abhängigkeit von der Keimzahl

<b>Tracheostoma-Patienten</b>			
	1.Fraktion		p
	> 1.000 Keime/ml BAL	< 1.000 Keime/ml BAL	
Anzahl	7/46	3/46	
Neutrophile [%]	28 (16,5;88) [1-92] 7	29 (;) [6-58] 3	1
	> 10.000 Keime/ml BAL	< 10.000 Keime/ml BAL	
Anzahl	6/46	4/46	
Neutrophile [%]	26 (5;88) [1-92] 6	41,5 (;) [6-58] 4	0,914
	> 100.000 Keime/ml BAL	< 100.000 Keime/ml BAL	
Anzahl	4/46	6/46	
Neutrophile [%]	54 (;) [1-92] 4	28,5 (7,5;56) [6-58] 6	0,762

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

**Tabelle 3.34.** Anteil der Neutrophilen in der Pool-Fraktion der BAL in Abhängigkeit von der Keimzahl

<b>Tracheostoma-Patienten</b>			
	Pool-Fraktion		p
	> 1.000 Keime/ml BAL	< 1.000 Keime/ml BAL	
Anzahl	16/46	12/46	
Neutrophile [%]	6,5 (2,5;24,5) [1-45] 16	6 (1,5;10) [1-61] 12	0,515
	> 10.000 Keime/ml BAL	< 10.000 Keime/ml BAL	
Anzahl	12/46	16/46	
Neutrophile [%]	8 (3,5;24,5) [1-45] 12	3,5 (1,5;10) [1-61] 16	0,245
	> 100.000 Keime/ml BAL	< 100.000 Keime/ml BAL	
Anzahl	8/46	20/46	
Neutrophile [%]	9 (3;29) [1-45] 8	5 (2;10) [1-61] 20	0,415

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

### 3.5.5 Auswirkungen des Keimbefalls auf die Surfactantproteine

Von Interesse erschien auch die Frage, inwieweit Keime Einfluß auf die Surfactantproteinkonzentrationen in der Lavage haben. Aus diesem Grund wurden bei den Tracheostoma-Patienten die Surfactantproteine, in Abhängigkeit vom bakteriologischen Befund, miteinander verglichen. Dabei zeigte sich eine Erhöhung der Konzentration an SP-A in Pool-Fraktionen mit Keimbefall (s. Tab. 3.36.). Allerdings verliert sich diese signifikante Erhöhung wieder, wenn man SP-A in Bezug zur Gesamtproteinkonzentration setzt (s. Tab. 3.38.). Für alle anderen untersuchten Surfactantproteine fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Aufgrund der sehr kleinen Fallzahlen haben die Ergebnisse der 1. Fraktion nur sehr geringe Aussagekraft. Sie wurden aber zur besseren Illustration - allerdings Klammern - mit aufgeführt.

**Tabelle 3.35.** Vergleich der Surfactantproteine A, B, C, D in Abhängigkeit vom Keimnachweis in der 1. Fraktion der BAL bei Tracheostoma-Patienten

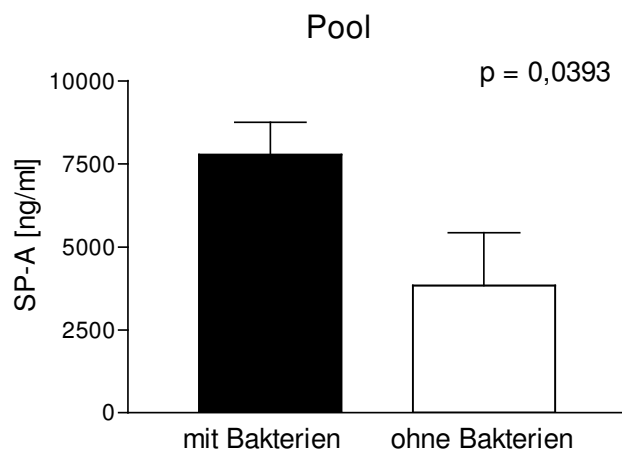
<b>Tracheostoma-Patienten</b>			
	mit Keimbefall		ohne Keimbefall
	1.Fraktion		1.Fraktion
Anzahl	13-14/46		3/46
			( p )
Gesamtprotein [µg/ml]	87,8 (45,7;210,7) [21,1-715,4]	14	57,3 ( ; ) [0-88,8] 3 (0,284)
SP-A [ng/ml]	3466 (915;6303) [406,8-25240]	14	1367 ( ; ) [0-10860] 3 (0,571)
SP-B [ng/ml]	422,8 (163,5;1165) [53,5-1650]	14	242,4 ( ; ) [0-1331] 3 (0,659)
SP-C [ng/ml]	278,6 (171,2;390,4) [103,9-882,7]	14	279,1 ( ; ) [0-484,1] 3 (0,85)
SP-D [ng/ml]	10,5 (1,3;14,5) [0-80,1]	13	10,2 ( ; ) [0-14,8] 3 (0,736)

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

**Tabelle 3.36.** Vergleich der Surfactantproteine A, B, C, D in Abhängigkeit vom Keimnachweis in der Pool-Fraktion der BAL bei Tracheostoma-Patienten

<b>Tracheostoma-Patienten</b>					
	mit Keimbefall		ohne Keimbefall		
	Pool-Fraktion		Pool-Fraktion		p
Anzahl	16-34/46		2-7/46		
Gesamtprotein [µg/ml]	110,7 (73,6;200,3) [33,3-336,6]	34	72 (56,8;160,1) [31,6-184,2]	7	0,107
SP-A [ng/ml]	6126 (2854;11990) [507,3-23690]	34	1651 (1469;9872) [108,7-10220]	7	0,039
SP-B [ng/ml]	410,8 (249;676,1) [154,3-3712]	34	269,9 (161,4;558,7) [82,5-762,9]	7	0,055
SP-C [ng/ml]	250,4 (195;329,2) [110,7-4721]	34	173,9 (141,5;314,5) [50,9-350,1]	7	0,107
SP-D [ng/ml]	9,2 (6,7;12,3) [0-20,6]	34	9 (2,9;22,3) [0-25,7]	7	0,931
SP-A Bindung [%]	18 (9,3;29,1) (3,3-43,7)	21	27,1 (;) (18,6-35,5)	2	0,354
SP-D Bindung [%]	174,8 (81;197,3) (32,6-321)	16	57,7 (;) (24,4-421,9)	3	0,539

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**



**Abbildung 30** Die Konzentration an SP-A ist in den Lavagen mit Keimbefall signifikant erhöht.

**Tabelle 3.37.** Vergleich der Surfactantproteine A, B, C, D im Verhältnis zum Gesamtprotein-  
gehalt in Abhängigkeit vom Keimnachweis in der 1. Fraktion der BAL bei  
Tracheostoma-Patienten

<b>Tracheostoma-Patienten</b>			
	mit Keimbefall		ohne Keimbefall
	1.Fraktion		1.Fraktion ( p )
Anzahl	13-14/46		3/46
Gesamtprotein [µg/ml]	87,8 (45,7;210,7) [21,1-715,4] 14		57,3 (:) [0-88,8] 3 (0,284)
SP-A/Protein [%]	2,4 (2;5) [1,5-15,6] 13		7,3 (:) [2,4-12,2] 2 (0,35)
SP-B/Protein [%]	0,4 (0,3;0,7) [0,2-1,6] 13		1 (:) [0,4-1,5] 2 (0,35)
SP-C/Protein [%]	0,3 (0,2;0,4) [0,1-0,7] 13		0,5 (:) [0,49-0,55] 2 (0,203)
SP-D/Protein [%]	0,01 (0,002;0,02) [0-0,08] 12		0,02 (:) [0,01-0,03] 2 (0,411)

Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

**Tabelle 3.38.** Vergleich der Surfactantproteine A, B, C, D im Verhältnis zum Gesamtprotein-gehalt in Abhängigkeit vom Keimnachweis in der Pool-Fraktion der BAL bei Tracheostoma-Patienten

<b>Tracheostoma-Patienten</b>			
	mit Keimbefall		ohne Keimbefall
	Pool-Fraktion		Pool-Fraktion
			p
Anzahl	16-34/46		2-7/46
Gesamtprotein [µg/ml]	110,7 (73,6;200,3) [33,3-336,6] 34	72 (56,8;160,1) [31,6-184,2] 7	0,107
SP-A/Protein [%]	5,3 (2,6;10,9) [0,4-42,7] 33	3,1 (1,7;9,4) [0,3-13,2] 7	0,155
SP-B/Protein [%]	0,4 (0,2;0,8) [0,1-3,1] 33	0,3 (0,2;0,7) [0,2-1,1] 7	0,488
SP-C/Protein [%]	0,2 (0,1;0,3) [0,08-3,9] 33	0,3 (0,14;0,43) [0,09-0,49] 7	0,957
SP-D/Protein [%]	0,01 (0,01;0,02) [0-0,04] 30	0,01 (0;0,025) [0-0,03] 7	0,756
SP-A Bindung [%]	18 (9,3;29,1) (3,3-43,7) 21	27,1 (;) (18,6-35,5) 2	(0,354)
SP-D Bindung [%]	174,8 (81;197,3) (32,6-321) 16	57,7 (;) (24,4-421,9) 3	(0,539)

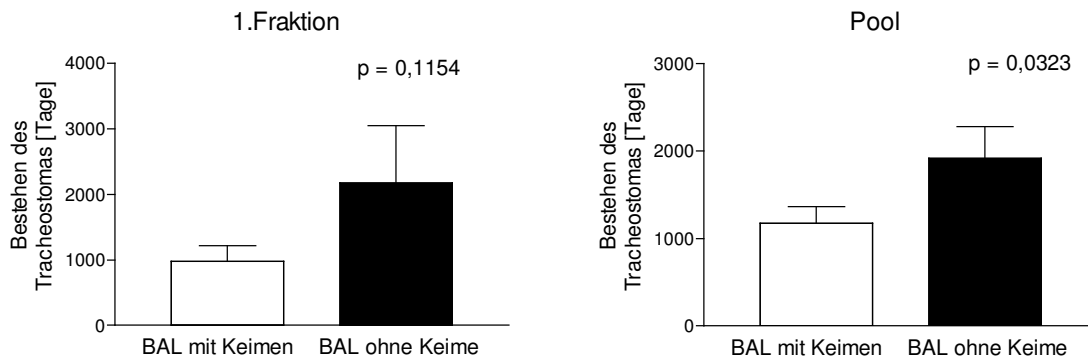
Darstellungsform: **Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) [Minimum-Maximum] Anzahl**

### 3.5.6 Tracheostomadauer und Keimbefall

Zwischen der Bestehensdauer eines Tracheostomas und der Keimzahl konnte weder für die 1. Fraktion (Spearman  $r=-0,1831$ ;  $p=0,5689$ ;  $n=12$ ), noch für die Pool-Fraktion (Spearman  $r=-0,2414$ ;  $p=0,2251$ ;  $n=27$ ) ein Zusammenhang festgestellt werden. Ebenso wenig zeigte sich für die 1. Fraktion (Spearman  $r=-0,09645$ ;  $p=0,7127$ ;  $n=17$ ) oder die Pool-Fraktion (Spearman  $r=-0,08596$ ;  $p=0,6079$ ;  $n=38$ ) eine Korrelation zwischen Tracheostomadauer und der Anzahl potentiell pathogener Keime.

Interessanterweise fiel beim Vergleich der Pool-Fraktionen mit Keimnachweis und den sterilen Pool-Fraktionen auf, daß bei den sterilen Pool-Fraktionen das Tracheostoma

signifikant länger bestand als bei der anderen Gruppe. Für die 1. Fraktionen gelang dieser Nachweis nicht.

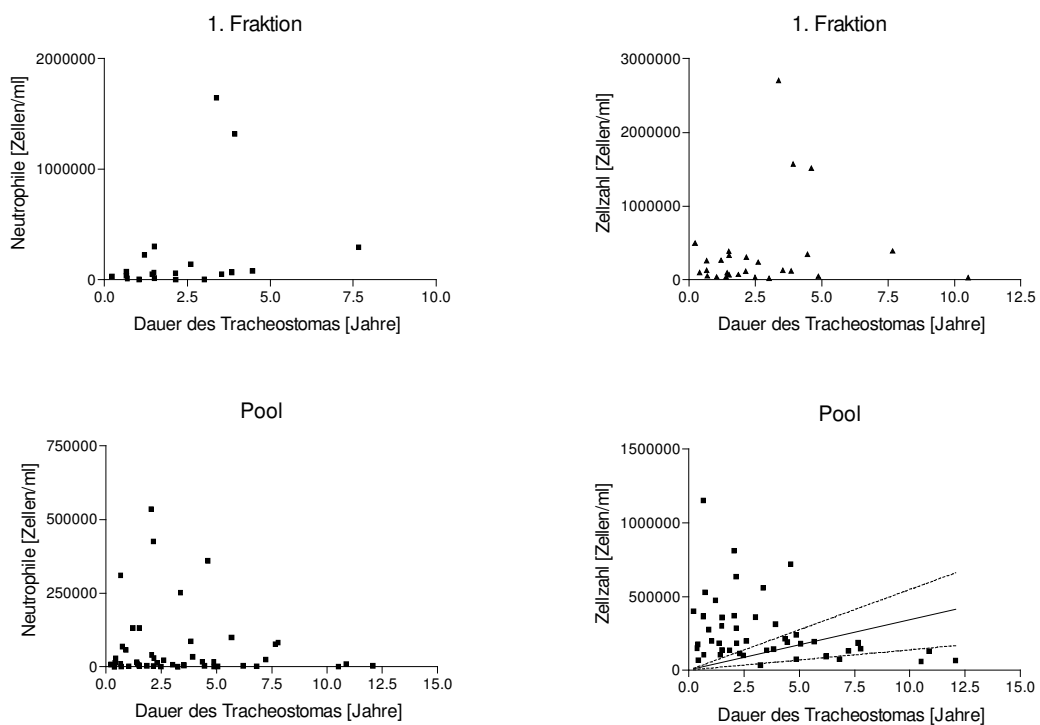


**Abbildung 31** Bestehen des Tracheostomas in Tagen in Bezug auf Keimnachweis in der BAL.

### 3.5.7 Tracheostomadauer und Zellbild

Um eventuelle Zusammenhänge zwischen der Bestehensdauer des Tracheostomas und dem Zellbild erkennen zu können, wurden beide Größen miteinander korreliert.

Dabei fand sich lediglich für die Pool-Fraktion eine schwache Korrelation zwischen der Zellzahl und der Tracheostomadauer.



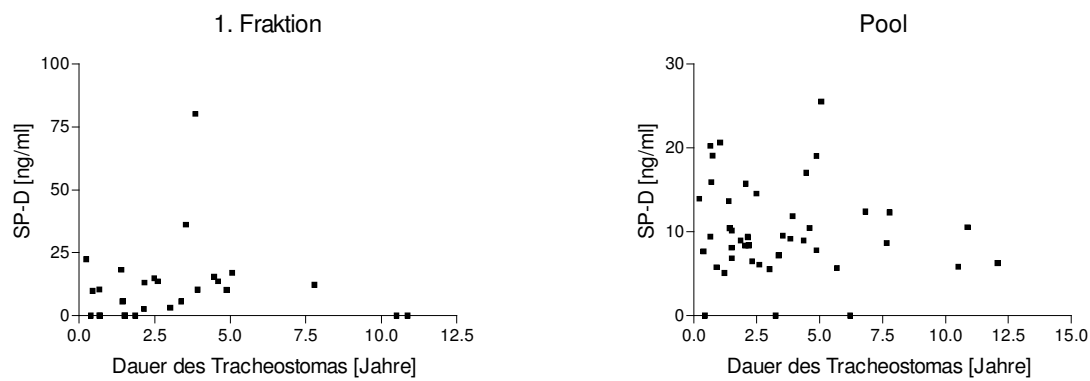
**Abbildung 32** Bei dem Vergleich der Neutrophilenzahl mit der Tracheostoma-Dauer konnte sowohl für die 1. Fraktion (Spearman  $r=0,4236$ ;  $p=0,0627$ ;  $n=20$ ), als auch für die Pool-Fraktion (Spearman  $r=-0,05187$ ;  $p=0,7321$ ;  $n=46$ ) keine Korrelation gefunden werden. Lediglich bei der Pool-Fraktion zeigte sich eine schwache Korrelation zwischen der Zellzahl und der Tracheostoma-Dauer (Spearman  $r=-0,3503$ ;  $p=0,0170$ ;  $n=46$ ). Für die 1. Fraktion (Spearman  $r=0,1029$ ;  $p=0,6095$ ;  $n=27$ ) gelang dieser Nachweis nicht.



### 3.5.8 Tracheostoma-Dauer und SP-D

Ebenso wie bei dem Zellbild wurde nach einem Zusammenhang zwischen Tracheostoma-Dauer und Surfactantprotein D gesucht.

Es konnte aber weder für die 1. Fraktion noch für die Pool-Fraktion eine Korrelation gefunden werden.



**Abbildung 33** Bei dem Vergleich des SP-D mit der Tracheostoma-Dauer konnte sowohl für die 1. Fraktion (Spearman  $r = 0,1808$ ;  $p = 0,3667$ ;  $n = 27$ ), als auch für die Pool-Fraktion (Spearman  $r = -0,09847$ ;  $p = 0,5248$ ;  $n = 44$ ) keine Korrelation gefunden werden.

## 4 Diskussion

### ***4.1 Vergleich zwischen Tracheostoma-Patienten und Kontrollgruppe***

Tracheotomierte Kinder haben häufiger einen Befall der unteren Atemwege mit Bakterien als Kinder ohne Tracheostoma. Dabei ließen sich auch vermehrt potentiell pathogene Keime in der Lavage und im Abstrich nachweisen. Zwischen diesen beiden Gruppen bestanden ebenso Unterschiede im Zellbild.

In den Lavagen tracheotomierter Kinder, bei denen ein Keimnachweis gelang, zeigten sich signifikant erhöhte Werte für neutrophile Granulozyten gegenüber sterilen Lavagen (siehe Tabelle 3.26. und Abbildung 25). Zwischen den wenigen Lavagen tracheotomierter Patienten ohne Keimnachweis (17% d.F.) und den Lavagen der lungengesunden Kontrollgruppe fanden sich keine Unterschiede in der Differentialzytologie (siehe Tabelle 3.31.). Da auch eine quantitative Bakteriologie durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, daß es keine Keimzahl gibt, bei der es zu einer signifikanten Änderung der zytologischen Befunde kommt (siehe Tabelle 3.34.).

Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der BAL war bei den Tracheostoma-Patienten insgesamt gegenüber der lungengesunden Kontrollgruppe erhöht (siehe Tabelle 3.7. und 3.8. sowie Abbildung 11 und 12). Die Daten über die Differentialzytologie von Lavagen lungengesunder Kinder sind rar, die wenigen zur Verfügung stehenden Daten zeigen aber ebenfalls den dominierenden Anteil an Makrophagen und geben deutlich niedrigere Werte für neutrophile Granulozyten an [61-64]. Dies läßt vermuten, daß asymptotische, tracheotomierte Kinder eine signifikante neutrophile Entzündungsreaktion der unteren Atemwege aufweisen und deshalb von einem möglichst frühzeitigem Stomaverschluß profitieren könnten.

Bei den 1. Fraktionen erschwerte oft die zu geringe Menge an zurückerhaltenem Volumen die weiteren Untersuchungen. So ist der Prozentsatz des zurückerhaltenen Volumens in der 1.

Fraktion signifikant niedriger als in der Pool-Fraktion (siehe Abbildung 3). Die Fallzahlen in dieser Gruppe sind deshalb deutlich kleiner und die Ergebnisse dadurch häufig nicht gut beurteilbar. Zwischen den Pool-Fraktionen der Tracheostoma-Patienten und der Kontrollgruppe zeigten sich im Bezug auf die Menge an zurückerhaltenem Volumen keinerlei Unterschiede, so scheinen die unterschiedlichen Methoden der Lavage (Bronchoskopie; Endloch-Katheter) keinen Einfluß auf die BAL-Volumina zu haben. Beide Methoden sind allgemein anerkannt und ihre direkte Vergleichbarkeit kürzlich dokumentiert. Auch ihre Zuverlässigkeit und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind vielfach belegt [65, 66]. Die in den Lavagen gefundenen Konzentrationen an Surfactantprotein D sind in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der Gruppe der tracheotomierten Kinder (siehe Tabelle 3.14. und Abbildung 18). Im Gegensatz dazu ist das Vermögen der Lavagen *Pseudomonas aeruginosa* zur Agglutination zu bringen bei den Tracheostoma-Patienten signifikant zur Kontrollgruppe erhöht (siehe Tabelle 3.17. und Abbildung 22). Außerdem konnte für die Pool-Fraktion der Tracheostoma-Patienten gezeigt werden, daß die Anzahl der neutrophilen Granulozyten invers mit den Konzentrationen an Surfactantprotein D korrelieren (siehe Abbildung 21). Madan et al. [16] konnte nachweisen, daß SP-A und SP-D die Bindung von Makrophagen und Neutrophilen an *Aspergillus fumigatus* verbessern. SP-D schien darüber hinaus die Phagozytoserate zu erhöhen und das Abtöten des Pilzes durch neutrophile Granulozyten zu beschleunigen. Eine andere Arbeitsgruppe machte eine trimere Kohlenhydratbindungsstelle (carbohydrate-recognition-domain, CRD) am C-terminalen Ende des Surfactantproteins D für eine verstärkte chemotaktische Aktivität von neutrophilen Granulozyten verantwortlich [67]. Diese Wirkung von SP-D scheint auf den ersten Blick im Gegensatz zu oben genannten Ergebnissen zu stehen. Niedrige Konzentrationen an SP-D waren ja mit höheren Zahlen an neutrophilen Granulozyten assoziiert. Alternativ könnten auch chronisch unter den Normalwert reduzierte SP-D Konzentrationen oder strukturelle Veränderungen des SP-D bei tracheotomierten Kindern mit zur erhöhten Menge an

neutrophilen Granulozyten beitragen. Die inverse Korrelation zwischen SP-D und Neutrophilen läßt aber folgern, daß SP-D nicht der wichtigste chemotaktische Faktor für neutrophile Granulozyten unter den untersuchten Gegebenheiten ist.

Bronchoalveoläre Lavagen mit Keimbefall zeigten signifikant höhere Werte an SP-A im Vergleich zu sterilen Lavagen (siehe Tabelle 3.36.), allerdings war die Zahl der bronchoalveolären Lavagen ohne Keime verhältnismäßig gering und die SP-A Konzentration der Tracheostoma Patienten mit Keimen lag in der Größenordnung derjenigen der Kontrollgruppe (siehe Tabellen 3.10. und 3.36.). Des weiteren bestand eine Korrelation zwischen dem Anteil an Makrophagen in der Lavage und der Konzentration an SP-A (siehe Abbildung 21). Mariencheck et al.[68] und andere Arbeitsgruppen [69, 70] konnten zeigen, daß SP-A chemotaktisch auf Makrophagen wirkt und deren Phagozytoseaktivität für *Pseudomonas aeruginosa* und apoptotische neutrophile Granulozyten steigert. Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse unterstützen die Rolle von SP-A bei der Makrophagen-abhängigen, unspezifischen Immunabwehr der Lunge.

Unterschiede zwischen beiden untersuchten Gruppen im Bezug auf den Befall der Lavagen mit Viren konnten nicht festgestellt werden (siehe Tabelle 3.19.). Auch ein Einfluß der Viren auf das Zellbild wurde nicht gefunden (siehe Abbildung 23). Während Viren, v.a.

Cytomegalie- und Adenoviren, bei abwehrgeschwächten Patienten eine wichtige Rolle bei Infektionen der Atemwege spielen und dort auch gut untersucht sind, finden sich keine Daten über die Häufigkeit asymptomatischer viraler Infektionen bei lungengesunden oder tracheotomierten Kindern [71, 72]. Unsere Daten geben also einen weiteren Einblick über Art und Häufigkeit der Besiedelung des normalen Atemtraktes mit Viren beim Menschen.

#### **4.2 Vergleich zwischen Abstrich, 1. Fraktion und Pool-Fraktion**

Das bei der Lavage gewonnene Volumen wurde in eine 1. Fraktion und eine Pool-Fraktion aufgeteilt und separat voneinander untersucht (siehe 2.2.1). Es wird allgemein angenommen, daß die 1. Fraktion mehr den Bereich der Bronchien und die Pool-Fraktion mehr den der Alveolen widerspiegelt.

Bei der zytologischen Untersuchung fand sich ein Zusammenhang zwischen der 1. Fraktion und der Pool-Fraktion in Bezug auf den Anteil der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl (siehe Abbildung 12). Des weiteren zeigte sich eine signifikante Vermehrung der neutrophilen Granulozyten in der 1. Fraktion der Tracheostoma-Patienten. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen von lungengesunden Kindern überein [61, 62, 64].

In unserer Kontrollgruppe waren die neutrophilen Granulozyten in der 1. Fraktion zwar auch vermehrt, die Ergebnisse waren aber aufgrund der geringen Fallzahl nicht signifikant. Die genauen Gründe für die Prädominanz von neutrophilen Granulozyten im bronchialen Kompartiment und auch für den sehr geringen Anteil von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen in den Lavagen lungengesunder Kinder sind bisher nicht geklärt, dürften jedoch mit einer gestaffelten, sequentiellen unspezifischen Erregerabwehr von den zentralen Anteilen der Lunge bis in die Peripherie zusammenhängen [63].

Surfactantprotein A fand sich in der Pool-Fraktion in höheren Konzentrationen als in der 1. Fraktion. Obwohl dies bei beiden Probandengruppen beobachtet wurde, waren die Ergebnisse der Kontrollgruppe nicht signifikant (siehe Tabelle 3.9. und 3.10., sowie Abbildung 15).

Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die Produktion an SP-A in den submukösen Drüsenzellen der Atemwege und den Clarazellen quantitativ geringer ist, als in den alveolären Pneumozyten Typ II [5].

Im Gegensatz dazu findet sich SP-D bei Tracheostoma-Patienten in gleicher Konzentration in beiden Fraktionen wieder (siehe Tabelle 3.9.). SP-D wird außer von Pneumozyten Typ II auch von Epithelzellen des oberen Atemtraktes gebildet. Die exakten quantitativen Verhältnisse sind nicht klar, unsere Untersuchungen sprechen gegen Konzentrationsunterschiede beider Kompartimente [12-14].

### **4.3 Bakteriologische Veränderungen in den Lavagen tracheotomierter Kinder**

Um Angaben über die Besiedelung der Lunge von asymptomatischen, tracheotomierten Kindern und von lungengesunden Kindern machen zu können wurden beide Lavage-Fractionen und ein Abstrich, der am Tracheostoma, bzw. am nicht intubierten Nasenloch gewonnen wurde, unabhängig voneinander bakteriologisch untersucht.

Bei den Tracheostoma-Patienten gelang bei ca. 80 % der Lavagen (unabhängig von 1. oder Pool-Fraktion) ein Keimnachweis. Im Abstrich, in der 1. Fraktion und in der Pool-Fraktion fanden sich zu ca. 60 % potentiell pathogene Keime. In der Kontrollgruppe gelang ein Keimnachweis nur in ca. 20 % der untersuchten Lavagen. 21 % der lungengesunden Kinder hatten potentiell pathogene Keime im Abstrich. In der 1. Fraktion fanden sich in 8 %, in der Pool-Fraktion in 0 % potentiell pathogene Keime. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren signifikant (siehe Tabelle 3.22. bis 3.24.).

Um die Frage zu klären, ob es zu einer absteigenden Besiedelung der Atemwege von tracheal nach bronchial kommt, oder ob die Besiedelung der oberen und unteren Atemwege unabhängig von einander geschieht, wurden die bakteriologischen Ergebnisse des Abstrichs und der Pool-Fraktion miteinander verglichen. Die 1. Fraktion wurde, da dort nur bei 19 bzw. 10 Patienten eine bakteriologische Untersuchung, aufgrund von Materialmangel, erfolgen konnte, ausgeklammert. Dabei fand sich die, bei allen 44 untersuchten Tracheostoma-Patienten gefundene normale Keimflora in 75 % d.F. in der Pool-Fraktion wieder. Dahingegen gelang ein Wiederauffinden der normalen Keimflora nur bei 21 % der lungengesunden Kontrollgruppe. Bei 26 der 44 Tracheostoma-Patienten zeigten sich potentiell pathogene Keime im Abstrich. In 50 % d.F. gelang ein Nachweis derselben Keime in der Lavage. Allerdings zeigten sich auch in 12 Fällen (46 %) potentiell pathogene Keime in der BAL, die nicht im Abstrich nachweisbar waren. In der Kontrollgruppe fanden sich bei 3 von 14 untersuchten Patienten potentiell pathogene Keime im Abstrich. Allerdings waren alle

Lavagen frei von potentiell pathogenen Keimen. Dies zeigt, daß eine Tracheotomie die Kolonisation der unteren Atemwege, sowohl durch die normale Keimflora, als auch durch potentiell pathogene Keime, fördert. Allerdings kommt es auch bei vergleichbar vielen Fällen zu einer primären Besiedelung der Lunge durch potentiell pathogene Keime.

Daten über die Kolonisation der Lunge mit Keimen bei tracheotomierten Kindern sind sehr rar und es existiert kein klarer Konsens wann und wie Atemwegsinfekte bei tracheotomierten Kindern behandelt werden sollen [58].

Auch die Arbeiten zu diesem Thema bei Erwachsenen sind spärlich. Barlett et al. stellte fest, daß kaum eine Korrelation zwischen den Bakterien des Rachens und der Trachea besteht und daß es zu deutlichen Veränderungen der Keimflora im zeitlichen Verlauf kommt. Die dominierenden Keime schienen aber zu persistieren. Hier wurden allerdings nur Tracheal-aspirate und keine BAL's untersucht [73]. In einer Arbeit von Harlid et al. konnten bei 83 % der erwachsenen, tracheotomierten Patienten potentiell pathogene Keime in der Trachea nachgewiesen werden. Allerdings waren 70 % der bronchialen Kulturen negativ [75].

Darüber hinaus zeigten sich in einer neueren Arbeit deutliche Unterschiede zwischen Erwachsenen und Kindern bezüglich des Erregerspektrum in den oberen Atemwegen [77].

Eine mögliche Ursache für diese Unterschiede zwischen Erwachsenen und Kindern könnte in einer entwicklungsbedingten Unreife der lokalen zellulären und humoralen Immunabwehr der Lunge bei Kindern liegen [63].

*Streptokokkus pneumoniae*, *Staph. aureus*, *Hämophilus influenza*, *Moraxella catharalis* und *Pseudomonas aeruginosa* gehören zu den am häufigsten gefundenen potentiell pathogenen Keimen [73-76]. Auch in dieser Arbeit dominierten diese Keime sowohl in den Lavagen, als auch in den Abstrichen der Tracheostoma-Patienten (1. Fraktion: *Strept. pneu.*: 11%, *Staph. au.*: 16%, *Häm. infl.*: 11%, *Mor. cat.*: 16%, *Pseu. ae.*: 5%; Pool-Fraktion: *Strept. pneu.*: 15%, *Staph. au.*: 15%, *Häm. infl.*: 17%, *Mor. cat.*: 17%, *Pseu. ae.*: 17%; Abstrich: *Strept. pneu.*: 9%, *Staph. au.*: 30%, *Häm. infl.*: 7%, *Mor. cat.*: 5%, *Pseu. ae.*: 9%; siehe auch Tabelle 3.22.



bis 3.24.). Die in einer Arbeit von Niederman et al. gefundene Häufung von *Pseudomonas aeruginosa* in den unteren Atemwegen konnte allerdings nicht beobachtet werden [59].

Eine Arbeit zeigte bei intubierten Kindern eine sehr rasche Kolonisation der unteren Atemwege. So gelang bei Cubells et al. bereits vier Tage nach endotrachealer Intubation bei 84 % ein positiver Kulturnachweis [78]. Allerdings muß hierbei immer unterschieden werden zwischen ambulanten Patienten, wie in unserem Kollektiv und langzeit-hospitalisierten Patienten, wie in den meisten bisher publizierten Studien.

Patienten mit persistierender tracheobronchialen Kolonisation sind häufiger krank, entwickeln häufiger eine purulente Tracheobronchitis und müssen öfter mit Antibiotika behandelt werden, als Patienten ohne Keimbefall [59]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit unseren Befunden einer signifikanten neutrophilen Inflammationsreaktion, von Patienten mit Keimnachweis im unteren Atemtrakt. Diese Befunde, zusammen mit einem reduzierten Gehalt an SP-D charakterisieren möglicherweise eine Risikogruppe von Kindern mit Tracheostoma, die, bei wiederholtem Nachweis, von einem möglichst frühzeitigen Stomaverschluß profitieren könnten.

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, bronchoalveolären Lavagen (BAL) zytologisch, bakteriologisch, virologisch und bzgl. der Surfactantproteine (SP) A, B, C und D zu untersuchen, um das lokale mikrobiologische und immunologische Milieu in der Lunge bei tracheotomierten Kindern zu beschreiben, um so auf der Basis pathophysiologischer Daten Hinweise für prophylaktische Maßnahmen oder das zeitliche Vorgehen beim definitiven Stomaverschluß zu erlangen.

Bei 41 % der 44 untersuchten, tracheotomierten Kinder fanden sich mehr als 10 % neutrophile Granulozyten in der BAL und bei 84 % war der Keimnachweis positiv. Bei tracheotomierten Kindern fanden sich signifikant häufiger potentiell pathogene Keime im Abstrich und in der BAL. In 50 % d.F. fanden sich dieselben Keime in der BAL wie im Abstrich, bei 46 % gelang ein Nachweis potentiell pathogener Keime nur in der BAL.

Zum quantitativen Nachweis der Surfactantproteine (SP) wurden verschiedene Enzym-Immuno-Assays verwendet. Das Agglutinationsvermögen von SP-A und SP-D wurde mittels eines Agglutinationstests mit *Pseudomonas aeruginosa* quantitativ erfaßt.

Surfactantprotein D war in den BAL's der tracheotomierten Kinder signifikant erniedrigt und korrelierte umgekehrt mit der Anzahl der neutrophilen Granulozyten. Das Gesamtprotein und das Agglutinationsvermögen für *Pseudomonas aeruginosa* war signifikant erhöht. Die Konzentration der übrigen Surfactantproteine (SP-A, SP-B, SP-C) unterschied sich nicht von der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß ein großer Teil der klinisch asymptomatischen tracheotomierten Kinder eine neutrophile Entzündungsreaktion in den unteren Atemwegen hat. Diese Entzündungsreaktion war stark an den Nachweis von Bakterien, nicht aber von Viren geknüpft. Niedriges SP-D scheint, evtl. mit weiteren, bisher nicht charakterisierten Faktoren, eine neutrophil dominierte Entzündungsreaktion zu unterstützen. Kinder mit

Tracheostoma, die klinisch asymptomatisch sind, jedoch eine neutrophile Inflammation zusammen mit Bakterien und niedrigen SP-D Spiegeln im unteren Atemtrakt aufweisen, können eine besondere Untergruppe darstellen. Diese Untergruppe könnte bei wiederholtem Nachweis der genannten Befundkonstellation prädisponierend sein, eine chronische Inflammationsreaktion in unteren Atemtrakt auszubilden und könnte daher vor der Etablierung struktureller bronchopulmonaler Schäden, von einem frühzeitigem Verschuß profitieren.

## 6 Literatur

1. Obladen, M., *History of Surfactant Research*. Pulmonary Surfactant: From Molecular Biology to Clinical Practice, ed. V.G.L. Robertson B., Batenburg J. J. Vol. 9-11. 1992. 1-14.
2. Griese M, *Pulmonary surfactant and the immune system*. Monatsschr Kinderheilkd., 1992 Jan. **140(1):57-61**.
3. Haagsman HP, D.R., *Surfactant-associated proteins: functions and structural variation*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol., 2001 May. **129(1):91-108**.
4. Crouch EC, *Collectins and pulmonary host defense*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998 Aug. **19(2):177-201**.
5. Mason RJ, G.K., Voelker DR., *Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease*. Am J Physiol, 1998 Jul. **275(1 Pt 1):L1-13**.
6. Korfhagen TR, G.S., Bruno MD, McMahan MJ, Whitsett JA., *A portion of the human surfactant protein A (SP-A) gene locus consists of a pseudogene*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1991 May. **4(5):463-469**.
7. Hoover RR, F.J., *Organization of the human SP-A and SP-D loci at 10q22-q23. Physical and radiation hybrid mapping reveal gene order and orientation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998 Mar. **18(3):353-362**.
8. Crouch EC, R.K., Veile R, Donis-Keller H, Grosso L., *Genomic organization of human surfactant protein D (SP-D). SP-D is encoded on chromosome 10q22.2-23.1*. J Biol Chem, 1993 Feb. **268(4):2976-2983**.
9. Mason RJ, N.L., Kuroki Y, Matsuura E, Freed JH, Shannon JM., *A 50-kDa variant form of human surfactant protein D*. Eur Respir J, 1998 Nov. **12(5):1147-1155**.
10. McCormack FX, C.H., Watson PA, Smith DL, Mason RJ, Voelker DR., *The structure and function of surfactant protein A. Hydroxyproline- and carbohydrate-deficient mutant proteins*. J Biol Chem, 1994 Feb. **269(8):5833-5841**.
11. Lim BL, W.J., Holmskov U, Hoppe HJ, Reid KB, *Expression of the carbohydrate recognition domain of lung surfactant protein D and demonstration of its binding to lipopolysaccharides of gram-negative bacteria*. Biochem Biophys Res Commun, 1994 Aug. **202(3):1674-1680**.
12. Crouch EC, P.D., Kuan SF, Persson A., *Surfactant protein D: subcellular localization in nonciliated bronchiolar epithelial cells*. Am J Physiol, 1992 Jul. **263(1 Pt 1):L60-L66**.

13. Voorhout WF, V.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 Oct. **40(10):1589-1597.**
14. Madsen J, K.A., Tornøe I, Skjødt K, Koch C, Holmskov U., *Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues.* J Immunol, 2000 Jun. **164(11):5866-5870.**
15. 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 Jul. **20(4):319-339.**
16. Madan T, E.P., Kishore U, Strong P, Aggrawal SS, Sarma PU, Reid KB., *Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to Aspergillus fumigatus conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages.* Infect Immun, 1997 Aug. **65(8):3171-9.**
17. Vaandrager AB, v.G.L., *Lung surfactant proteins A and D in innate immune defense.* Biol Neonate, 2000 May. **77 Suppl 1:9-13.**
18. Lawson PR, R.K., *The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity.* Immunol Rev, 2000 Feb. **173:66-78.**
19. Eggleton P, R.K., *Lung surfactant proteins involved in innate immunity.* Curr Opin Immunol, 1999 Feb. **11(1):28-33.**
20. Crouch EC, H.K., Ofek I., *Collectins and pulmonary innate immunity.* Immunol Rev, 2000 Feb. **173:52-65.**
21. Wright JR, Z.D., Taylor JC, Zlogar TM, Restrepo CI., *Effects of endotoxin on surfactant protein A and D stimulation of NO production by alveolar macrophages.* Am J Physiol, 1999 Apr. **276(4 Pt 1):L650-L658.**
22. Haagsman HP, *Interactions of surfactant protein A with pathogens.* Biochim Biophys Acta, 1998 Nov. **1408(2-3):264-277.**
23. Hickman-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 Sep. **281(3):L517-23.**
24. LeVine AM, B.M., Huelsman KM, Ross GF, Whitsett JA, Korfhagen TR., *Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection.* J Immunol, 1997 May. **158(9):4336-4340.**

25. 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 Aug. **275(2 Pt 1):L247-54.**
26. Botas C, P.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 U S A, 1998 Sep. **95(20):11869-74.**
27. Wert SE, Y.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 U S A, 2000 May. **97(11):5972-7.**
28. Korfhagen TR, B.M., 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 U S A, 1996 Sep. **93(18):9594-9.**
29. Weaver TE, C.J., *Function of surfactant proteins B and C.* Annu Rev Physiol, 2001. **63:555-78.**
30. Zaltash S, P.M., Curstedt T, Johansson J, Persson B., *Pulmonary surfactant protein B: a structural model and a functional analogue.* Biochim Biophys Acta, 2000 Jun. **1466(1-2):179-86.**
31. Pilot-Matias TJ, K.S., Fox JL, Kropp K, Glasser SW, Whitsett JA., *Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B.* DNA, 1989 Mar. **8(2):75-86.**
32. Fisher JH, E.P., Drabkin HA, Kushnik T, Gerber M, Hofmann T, Jones C., *The gene encoding the hydrophobic surfactant protein SP-C is located on 8p and identifies an EcoRI RFLP.* Am J Hum Genet, 1988 Oct. **43(4):436-441.**
33. Beck DC, I.M., Na CL, Zaltash S, Johansson J, Whitsett JA, Weaver TE., *The role of homodimers in surfactant protein B function in vivo.* J Biol Chem, 2000 Feb. **275(5):3365-3370.**
34. Pryhuber GS, *Regulation and function of pulmonary surfactant protein B.* Mol Genet Metab, 1998 Aug. **64(4):217-28.**
35. Johansson J, *Structure and properties of surfactant protein C.* Biochim Biophys Acta, 1998 Nov. **1408(2-3):161-172.**

36. Nag K, M.J., Inchley K, Schurch S, Petersen NO, Possmayer F., *SP-B refining of pulmonary surfactant phospholipid films*. Am J Physiol, 1999 Dec. **277(6 Pt 1):L1179-L1189**.
37. Oosterlaken-Dijksterhuis MA, H.H., van Golde LM, Demel RA., *Characterization of lipid insertion into monomolecular layers mediated by lung surfactant proteins SP-B and SP-C*. Biochemistry., 1991 Nov. **30(45):10965-71**.
38. Glasser SW, B.M., Korfhagen TR, Na CL, Sly PD, Ross GF, Ikegami M, Whitsett JA., *Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001 May. **98(11):6366-6371**.
39. Clark JC, W.S., Bachurski CJ, Stahlman MT, Stripp BR, Weaver TE, Whitsett JA., *Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995 Aug. **92(17):7794-7798**.
40. Lin S, N.C., Akinbi HT, Apsley KS, Whitsett JA, Weaver TE., *Surfactant protein B (SP-B) -/- mice are rescued by restoration of SP-B expression in alveolar type II cells but not Clara cells*. J Biol Chem, 1999 Jul. **274(27):19168-19174**.
41. Stahlman MT, G.M., Falconieri MW, Whitsett JA, Weaver TE., *Lamellar body formation in normal and surfactant protein B-deficient fetal mice*. Lab Invest, 2000 Mar. **80(3):395-403**.
42. Tokieda K, I.M., Wert SE, Baatz JE, Zou Y, Whitsett JA., *Surfactant protein B corrects oxygen-induced pulmonary dysfunction in heterozygous surfactant protein B-deficient mice*. Pediatr Res, 1999 Dec. **46(6):708-714**.
43. Miles PR, B.L., Rao KM, Baatz JE, Huffman L., *Pulmonary surfactant inhibits LPS-induced nitric oxide production by alveolar macrophages*. Am J Physiol, 1999 Jan. **276(1 Pt 1):L186-L196**.
44. Kuroki Y, T.H., Chiba H, Akino T., *Surfactant proteins A and D: disease markers*. Biochim Biophys Acta, 1998 Nov. **1408(2-3):334-345**.
45. Griese M, *Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art*. Eur Respir J, 1999 Jun. **13(6):1455-1476**.
46. Honda Y, K.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 Dec. **152(6 Pt 1):1860-1866**.
47. Griese M, B.P., Demirsoy A., *Pulmonary surfactant in cystic fibrosis*. Eur Respir J, 1997 Sep. **10(9):1983-1988**.

48. Postle AD, M.A., Reid KB, Wang JY, Wright SM, Moustaki M, Warner JO., *Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999 Jan. **20(1):90-98**.
49. McCormack FX, K.T.J., Voelker DR, Robinson PC, Mason RJ., *Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in the bronchoalveolar lavage content of surfactant protein A*. Am Rev Respir Dis, 1991 Jul. **144(1):160-166**.
50. McCormack FX, K.T.J., Bucher BL, Nielsen L, Mason RJ, McCormack FX., *Surfactant protein A predicts survival in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1996 Sep. **154(3 Pt 1):825-6**.
51. Hamm H, L.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 Dec. **106(6):1766-1770**.
52. Greene KE, W.J., Steinberg KP, Ruzinski JT, Caldwell E, Wong WB, Hull W, Whitsett JA, Akino T, Kuroki Y, Nagae H, Hudson LD, Martin TR., *Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS*. Am J Respir Crit Care Med, 1999 Dec. **160(6):1843-1850**.
53. Nogee LM, W.S., Proffit SA, Hull WM, Whitsett JA., *Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency*. Am J Respir Crit Care Med, 2000 Mar. **161(3 Pt 1):973-981**.
54. Beers MF, H.A., Moxley MA, Gonzales LW, Guttentag SH, Solarin KO, Longmore WJ, Nogee LM, Ballard PL., *Pulmonary surfactant metabolism in infants lacking surfactant protein B*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000 Mar. **22(3):380-391**.
55. Amin RS, W.S., Baughman RP, Tomashefski JF Jr, Nogee LM, Brody AS, Hull WM, Whitsett JA., *Surfactant protein deficiency in familial interstitial lung disease*. J Pediatr, 2001 Jul. **139(1):85-92**.
56. Nogee LM, D.A.r., Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA., *A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease*. N Engl J Med, 2001 Feb. **344(8):573-579**.
57. Morar P, S.V., Jones AS, Hughes J, van Saene R., *Impact of tracheotomy on colonization and infection of lower airways in children requiring long-term ventilation: a prospective observational cohort study*. Chest, 1998 Jan. **113(1):77-85**.



58. Rusakow LS, G.M., Wegner CB, Rice TB, Mischler EH., *Suspected respiratory tract infection in the tracheostomized child: the pediatric pulmonologist's approach*. Chest, 1998 Jun. **113(6):1549-1554**.
59. Niederman MS, F.R., Zeigler A, Merrill WW, Reynolds HY., *Respiratory infection complicating long-term tracheostomy. The implication of persistent gram-negative tracheobronchial colonization*. Chest, 1984 Jan. **85(1):39-44**.
60. Palmer LB, S.G., Simon S, O'Riordan T, Morra L., *Tracheal aspirates in long-term mechanically ventilated patients. A human model of gram-negative infection and airway inflammation*. Chest, 1995 Nov. **108(5):1326-1332**.
61. Ahrens P, Z.S., Kitz R, Hofmann D., *[Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in healthy children in comparison with children colonized by lung-specific pathogens]*. Pneumologie, 1997 Feb. **51(2):99-103**.
62. Riedler J, G.J., Stone C, Tauro G, Robertson CF., *Bronchoalveolar lavage cellularity in healthy children*. Am J Respir Crit Care Med, 1995 Jul. **152(1):163-8**.
63. Grigg J, R.J., *Developmental airway cell biology. The "normal" young child*. Am J Respir Crit Care Med, 2000 Aug. **162(2 Pt 2):S52-5**.
64. Ratjen F, B.M., Brendel M, Meltzer J, Costabel U., *Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in normal children*. Eur Respir J, 1994 Oct. **7(10):1865-70**.
65. Gerbeaux P, L.V., Boussuges A, Molenat F, Jean P, Sainty JM., *Diagnosis of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients: repeatability of the bronchoalveolar lavage*. Am J Respir Crit Care Med, 1998 Jan. **157(1):76-80**.
66. Gauvin F, L.J., Guertin MC, Proulx F, Farrell CA, Moghrabi A, Lebel P, Dassa C., *Reproducibility of blind protected bronchoalveolar lavage in mechanically ventilated children*. Am J Respir Crit Care Med, 2002 Jun. **165(12):1618-23**.
67. Cai GZ, G.G., Senior RM, Longmore WJ, Moxley MA., *Recombinant SP-D carbohydrate recognition domain is a chemoattractant for human neutrophils*. Am J Physiol, 1999 Jan. **276(1 Pt 1):L131-6**.
68. Mariencheck WI, S.J., Dong Q, Tino MJ, Wright JR., *Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of a live, mucoid strain of P. aeruginosa*. Am J Physiol, 1999 Oct. **277(4 Pt 1):L777-86**.
69. Wright JR, Y.D., *Pulmonary surfactant protein A stimulates chemotaxis of alveolar macrophage*. Am J Physiol, 1993 Apr. **264(4 Pt 1):L338-44**.

70. Schagat TL, W.J., Wright JR., *Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils*. J Immunol, 2001 Feb. **166(4):2727-33**.
71. Stephan F, B.J., Cesari D, Fajac A, Grenet D MD, Caubarrere I, Stern M., *Blood and alveolar lymphocyte subsets in pulmonary cytomegalovirus infection after lung transplantation*. BMC Infect Dis, 2001. **1(1):15**.
72. Konoplev S, C.R., Giralt S, Ueno NT, Khouri I, Raad I, Rolston K, Jacobson K, Tarrand J, Luna M, Nguyen Q, Whimbey E., *Cytomegalovirus pneumonia in adult autologous blood and marrow transplant recipients*. Bone Marrow Transplant, 2001 Apr. **27(8):877-81**.
73. Bartlett JG, F.L., Willey S., *Quantitative tracheal bacteriologic and cytologic studies in patients with long-term tracheostomies*. Chest 1978, 1978 Dec. **74(6):635-9**.
74. Brook, I., *Bacterial colonization, tracheobronchitis, and pneumonia following tracheostomy and long-term intubation in pediatric patients*. Chest 1979, 1979 Oct. **76(4):420-4**.
75. Harlid R, A.G., Frostell CG, Jorbeck HJ, Ortqvist AB., *Respiratory tract colonization and infection in patients with chronic tracheostomy. A one-year study in patients living at home*. Am J Respir Crit Care Med, 1996 Jul. **154(1):124-9**.
76. Morar P, M.Z., Jones A, Baines P, Selby A, Hughes J, van Saene R., *Topical antibiotics on tracheostoma prevents exogenous colonization and infection of lower airways in children*. Chest., 2000 Feb. **117(2):513-8**.
77. Gordts F, H.S., Pierard D, Kaufman L, Clement PA., *Microbiology of the middle meatus: a comparison between normal adults and children*. J Laryngol Otol, 2000 Mar. **114(3):184-8**.
78. Luaces Cubells C, F.S.Y., Cambra Lasoasa FJ, Gene Giralt A, Lopez Navarro JA, Gibert Agullo A., *Routes of endotracheal colonization in patients with mechanical ventilation*. An Esp Pediatr, 1997 Jan. **46(1):20-3**.

## **7 Anhang**

### ***Danksagung***

Meinen herzlichen Dank möchte ich an Prof. Dr. M. Griese richten, für die Bereitstellung des Themas, seine hervorragende fachliche Hilfeleistung und exzellenten Ideen, sowie die ständige Unterstützung im Verlauf der Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei PD Dr. T. Nicolai und Veronika Langbein bedanken für die freundliche Unterstützung und die Mehrarbeit bei der Gewinnung der bronchoalveolären Lavagen.

Danken möchte ich auch den anderen Doktoranden in der Arbeitsgruppe, deren fachlichen Anregungen und kollegiale Zusammenarbeit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Nicht zu vergessen Kallisto, die unermüdlich versuchte, einem den Blick für die wirklich wichtigen Dinge zu schärfen.

## **Lebenslauf**

Jörg Felber

geboren am 25.09.1972 in München

### SCHULAUSBILDUNG

1983 bis 1992          Erasmus-Grasser-Gymnasium, München, Abitur

### STUDIUM

1994 bis 2001          Studium der Humanmedizin an der LMU-München

März 1996              Physikum

März 1997              erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

August 1999            zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Juni 2001                dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### BERUF

seit Oktober 2001      Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der nephrologischen Abteilung des städtischen Lehrkrankenhauses München Harlaching