

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

Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**Surfactantproteine A und D
im Serum und in Bronchoalveolärer Lavage
bei Patienten mit Cystischer Fibrose**

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

vorgelegt von

Eva Bielecki

aus

Berlin

2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Griese
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. P. Angerer Prof. Dr. F. Krombach
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. P. Latzin
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	22.03.2007

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	7
1.1 Surfactant	7
1.2 Surfactantproteine A und D	8
1.3 Surfactantproteine in der kranken Lunge	11
1.4 Surfactantproteine bei Cystischer Fibrose	14
1.5 Fragestellung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Patienten und gesunde Kontrollgruppe	16
2.1.1 BEAT-Studie	16
2.1.2 Kontrollgruppe	19
2.2 Probengewinnung und Verarbeitung	22
2.2.1 Durchführung von bronchoalveolärer Lavage und Verarbeitung der Proben	22
2.2.2 Serumproben	22
2.3 Bestimmung der Konzentration von Surfactantprotein A und D	23
2.3.1 ELISA zur Messung von SP-A	23
2.3.2 ELISA zur Messung von SP-D	32
2.4 Statistik	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Charakterisierung der Patientengruppen	37
3.1.1 CF-Gesamtgruppe	37
3.1.2 CF-Patienten (Kontrollgruppe)	38
3.1.3 CF-Patienten (ohne Pulmozyme)	38
3.1.4 CF-Patienten (mit Pulmozyme)	38
3.1.5 Kontrollpersonen	39

3.2	Surfactantproteine im Serum bei CF-Patienten und gesunden Kontrollen	40
3.2.1	SP-A	40
3.2.2	SP-D	44
3.3	Zeitlicher Verlauf der Werte bei einigen Patienten	46
3.3.1	SP-A	46
3.3.2	SP-D	49
3.4	Zusammenhang von SP-A und SP-D in Serum und BAL	51
3.4.1	SP-A in Serum und BAL	52
3.4.2	SP-D in Serum und BAL	55
3.4.3	Zusammenhang zwischen SP-A im Serum und SP-D in der BAL	58
3.4.4	Zusammenhang zwischen SP-D im Serum und SP-A in der BAL	59
3.5	Korrelationen von SP-A und SP-D im Serum	60
3.6	Zusammenhang zwischen der Menge an Surfactantproteinen im Serum und den Lungenfunktionswerten der Patienten	63
3.6.1	FEV 1	63
3.6.2	Andere Werte der Lungenfunktion	67
3.7	Zusammenhang von SP-A und SP-D Werten im Serum mit klinischen Parametern der Patienten	68
3.8	Zusammenhang von Serumwerten der Surfactantproteine mit Messwerten im Blut und in der BAL der Patienten	69
3.8.1	SP-A und SP-D und der Zusammenhang mit Entzündungswerten	69
3.8.2	Zusammenhang zwischen SP-A und SP-D im Serum und der Zellzahl in der Bronchoalveolären Lavage	72
3.9	SP-A und SP-D Werte in der BAL und klinische bzw. Laborparameter der Patienten	74
3.9.1	Zusammenhang zwischen SP-A und SP-D in der BAL	74
3.9.2	Zusammenhang zwischen SP-A und SP-D Werten in der BAL und IgM Werten im Blut der Patienten	76

4	Diskussion	80
4.1	Messung mit ELISA	80
4.2	Vergleiche der Messungen bei Gesunden in verschiedenen Arbeitsgruppen	82
4.2.1	SP-A Normalwerte	83
4.2.2	SP-D Normalwerte	84
4.3	Surfactantproteine im Serum bei CF-Patienten	85
4.4	Auftreten von Surfactantproteinen im Serum	87
4.5	Korrelationen zwischen Serumkonzentrationen und anderen Patientendaten	88
4.6	Zukünftige Untersuchungen	90
5	Zusammenfassung	91
6	Literatur	92
7	Anhang	97
7.1	Tabellen	97
7.2	Danksagung	126
7.3	Lebenslauf	127

Abkürzungsverzeichnis

ABPA	Allergische bronchopulmonale Aspergillose
ARDS	Adult respiratory distress syndrome
BAL / BALF	Bronchoalveoläre Lavage / Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BEAT	Bronchoalveolar Lavage for Evaluation of Early Antiinflammatory Treatment
BMI	Body-Mass-Index
BSA	bovines Serumalbumin
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CRD	Carbohydrate recognition domain
CRP	C-reaktives Protein
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FEV1	Forced expiratory volume in the first second (Einsekundenkapazität)
FVC	Forced vital capacity (Forcierte Vitalkapazität)
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL 8	Interleukin 8
IPF	Idiopathic pulmonary fibrosis (Idiopathische Lungenfibrose)
MBL	Mannan-binding Lektin
MEF	Maximal expiratory flow (Maximaler expiratorischer Fluss)
PAP	Pulmonale Alveolarproteinose
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
SP-A	Surfactantprotein A
SP-B	Surfactantprotein B
SP-C	Surfactantprotein C
SP-D	Surfactantprotein D
TBS	Tris buffered saline

1 Einleitung

1.1 Surfactant

Lungensurfactant ist ein wesentlicher Bestandteil des Flüssigkeitsfilmes, der die innere Oberfläche der Lunge auskleidet. Es wird im endoplasmatischen Retikulum von Typ II-Pneumozyten synthetisiert und über den Golgi-Apparat zu den Lamellenkörperchen transportiert. Diese werden durch Exozytose in den Alveolarraum sezerniert (Chander and Fisher, 1990, L241-L253).

Die Ausschüttung von Lamellenkörperchen wird vor allem stimuliert durch Hyperventilation. Hemmend auf die Ausschüttung wirken z. B. Surfactantprotein A, andere Lektine und verschiedene Phospholipide (Griese, Gobran, and Rooney, 1991, L434-L442).

Im Alveolarraum entfalten sich die Lipidschichten der Lamellenkörperchen und formen durch die Anwesenheit von Kalziumionen oberflächenaktives, tubuläres Myelin. Von diesem aus adsorbieren die Lipide rasch an die Luft-Wasser-Grenzfläche und bilden den Surfactantfilm (Jobe, 1993, 861-868;van Golde, Batenburg, and Robertson, 1988, 374-455).

Der Abbau von Surfactant kann auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen. Entweder es wird durch Alveolarmakrophagen phagozytiert oder durch Endozytose wieder von den Typ II-Pneumozyten aufgenommen. Hier wird das Surfactant teilweise in den Lamellenkörperchen wiederverwendet oder in den Lysosomen abgebaut.

Es gibt zwei Hauptaufgaben, die Surfactant in der Lunge erfüllt. Seine biophysikalische Funktion ist das Offenhalten der Alveolen während der Expiration durch eine Reduktion der Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze (Jobe, 1993, 861-868).

Zusätzlich hat Surfactant auch eine immunologische Funktion, indem es zur Abwehr von Erregern beiträgt, die in die Lunge gelangen. Dies geschieht z.B. durch eine Modulation der Phagozytose durch spezielle Proteine (Surfactantproteine) oder auch durch eine Opsonisierung verschiedener Erreger (Crouch, 1998, 177-201;Griese, 1992, 57-61).

Surfactant besteht zu 90% aus Lipiden und zu 10% aus Proteinen (Griese, 1999, 1455-1476).

Der Lipidanteil wird hauptsächlich von Phospholipiden gebildet. Den größten Anteil nimmt hierbei Phosphatidylcholin ein, was größtenteils in seiner gesättigten Form als Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) vorliegt. Die Hauptfunktion der Phospholipide besteht darin, die Oberflächenspannung in den Lungenalveolen zu senken.

Die enthaltenen Proteine sind hauptsächlich Plasmaproteine. Nur etwa die Hälfte sind spezifische Surfactantproteine. Diese werden Surfactantproteine A,B,C und D genannt. Man kann sie unterteilen in die hydrophilen Surfactantproteine A und D (SP-A und SP-D) und in die lipophilen Surfactantproteine B und C (SP-B und SP-C).

1.2 Surfactantproteine A und D

Die hydrophilen Surfactantproteine A und D (SP-A und SP-D) gehören zur Gruppe der Kollektine. Dies sind Proteine, die im Plasma und auf Schleimhäuten vorkommen und zum angeborenen Immunsystem gehören (Holmskov, Thiel, and Jensenius, 2003, 547-578). Außer SP-A und SP-D gehören in diese Gruppe auch das Mannan-binding Lektin (MBL), das bovine Conglutinin und das Collectin-43.

Die Collectine bestehen, wie in Abb. 1-1 dargestellt, aus einer N-terminalen, cysteinreichen Region, aus einer „Neck-Region“ und der Kohlenhydratbindungsstelle (carbohydrate recognition domain, CRD) Mit dieser Kohlenhydratbindungsstelle können die Collectine kalziumabhängige Bindungen mit Kohlenhydratoberflächen bilden (Eggleton and Reid, 1999, 28-33). Dabei zeigen die verschiedenen Proteine Präferenzen für bestimmte Kohlenhydrate. SP-A bindet zum Beispiel besonders gut an Mannose, während SP-D eher Bindungen mit Maltose bildet (Haurum and others, 1993, 873-878).

Die aus drei Teilen bestehende Polypeptidkette wird als Trimer angeordnet und bildet so die Grundstruktur der Collectine. Die Collectine liegen dann als Oligomere dieser Trimer-Einheiten vor.

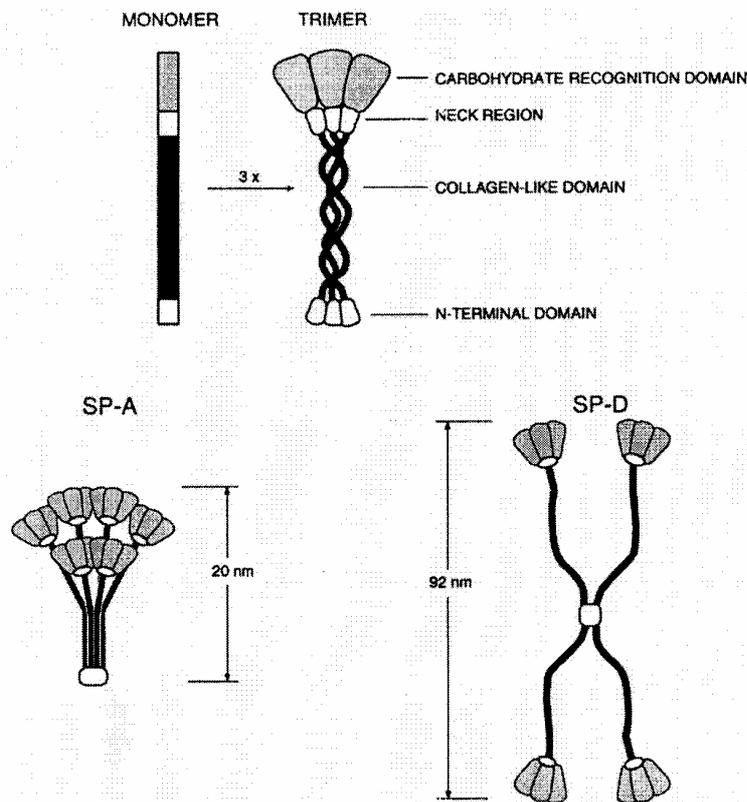


Abb. 1-1: Struktur von SP-A und SP-D

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 hier aus 4 Collectin-Untereinheiten.

Aus: (Haagsman and Diemel, 2001, 91-108)

SP-A ist ein Hexamer, besitzt dann also 18 CRDs, während SP-D als Tetramer vorliegt. Bei SP-D sind jedoch auch Multimere beschrieben worden, bei denen SP-D aus bis zu 12 der genannten Trimere besteht. Hierdurch steigt die Affinität der Surfactantproteine zur Bindung an glykosylierte Oberflächen (Crouch, 1998, 177-201).

Die Gene für SP-A und SP-D befinden sich beide auf Chromosom 10. Dabei existieren zwei Gene für SP-A. Dies führt zur Bildung von SP-A1 und SP-A2, die sich jedoch nur gering in der Aminosäuresequenz unterscheiden. Für SP-D gibt es nur ein Gen. Die Nähe der Genorte zeigt, dass die beiden Proteine wahrscheinlich evolutionsbedingt verwandt sind und eine ähnliche Funktion haben (Bruns and others, 1987, 58-62; Crouch and others, 1993, 2976-2983; Fisher and others, 1987,

503-511;Korfhagen and others, 1991, 463-469;Mason, Greene, and Voelker, 1998, L1-13).

Surfactantprotein A:

Menschliches SP-A ist ein hydrophiles Glykoprotein, das aus 228 Aminosäuren besteht. Es hat eine Größe von ungefähr 32 Kilodalton (Griese, 1999, 1455-1476).

Eine wichtige Aufgabe von SP-A besteht in der Regulation des Surfactantstoffwechsels (Jobe, 1993, 861-868). Hierbei sorgt es dafür, dass die Inaktivierung von Surfactant verhindert wird und es zu einer verstärkten Wiederaufnahme und Wiederverwendung von Phospholipiden in den Typ II-Pneumozyten kommt (Mason, Greene, and Voelker, 1998, L1-13). Zusätzlich kommt es unter der Anwesenheit von SP-A zu einer beschleunigten Ausrichtung der Phospholipide an der Luft-Wasser-Grenzfläche.

Die immunologische Funktion von SP-A besteht in der Stimulation von Makrophagen und damit einer Stimulation der Immunabwehr (Wright, 1997, 931-962).

Bei Studien mit Knockout-Mäusen, denen SP-A fehlte, zeigte sich, dass diese sehr anfällig für Infektionen waren. Ihre Atemfunktion und die Surfactanthomöostase waren dagegen kaum beeinträchtigt (Holmskov, Thiel, and Jensenius, 2003, 547-578).

Surfactantprotein D:

Das hydrophile Polypeptid SP-D ist in seiner Struktur dem SP-A sehr ähnlich. Es hat eine Größe von ungefähr 54 Kilodalton (Griese, 1999, 1455-1476;Wright, 1997, 931-962).

Es wird angenommen, dass SP-D vor allem eine immunologische Funktion hat. Über seine biophysikalische Funktion ist bisher wenig bekannt (Griese, 1999, 1455-1476).

Überraschenderweise hat man herausgefunden, dass bei SP-D-Knockout-Mäusen Störungen in der Surfactanthomöostase auftreten. Es kommt zu einer verstärkten Ansammlung von Surfactantlipiden und teilweise atypischen Alveolarmakrophagen. Langfristig führt dies in Kombination mit anderen Faktoren zum Auftreten von Emphysemen und chronischen Infektionen (Botas and others, 1998, 11869-11874;Wert and others, 2000, 5972-5977).

1.3 Surfactantproteine in der kranken Lunge

Bei vielen Erkrankungen wurden Surfactantproteine bei den Patienten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Surfactantproteine sowohl in ihrer Konzentration als auch in ihrer Funktion bei einigen Erkrankungen verändert vorliegen (Griese, 1999, 1455-1476; Mason, Greene, and Voelker, 1998, L1-13).

Bei den meisten Arbeiten wurden die Surfactantprotein in BAL-Flüssigkeit (BALF) gemessen, aber es liegen auch Messwerte aus dem Serum von Patienten vor (Hoppe and Reid, 1994, 1143-1158; Inoue and others, 1994, 157-164; Kuroki and others, 1993, 723-729).

Gastroösophagealer Reflux:

Hierbei kommt es möglicherweise als direkte Folge der Aspiration von Magensäure zu einer chronischen Entzündung der Lunge. Dies äußert sich durch rezidivierend auftretende Pneumonien, chronischen Husten und häufig vorkommende obstruktive Bronchitiden.

SP-A ist bei Kindern mit dieser Erkrankung signifikant reduziert in der BALF (Griese and others, 2002, 1546-1550). Außerdem liegen die aktiveren Formen der Oligomere mit einem höheren Molekulargewicht in einer verminderten Menge vor (Griese and others, 2002, 1546-1550).

Tracheostomie:

Bei Kindern, die für eine längere Zeit tracheotomiert waren, zeigte sich bei der Messung von SP-A in BALF kein Unterschied zur Gruppe der gesunden Kontrollpersonen. SP-D lag jedoch in der BALF der tracheotomierten Patienten in signifikant verminderter Konzentration vor (Griese and others, 2004, 356-361).

ARDS:

Bei Patienten, die aus verschiedenen Gründen ein Adult Respiratory Distress Syndrom (ARDS) entwickelt hatten oder ein hohes Risiko hierfür hatten, wurden Surfactantproteine im Serum und in der BAL gemessen. Hierbei zeigte sich, dass je nach Untersuchung sowohl ein Anstieg als auch ein Abfall der SP-A und SP-D Konzentration in BALF möglich ist (Doyle, Nicholas, and Bersten, 1995, 307-317; Greene and others, 1999, 1843-1850).

Allerdings wurden bei schweren Verläufen signifikant niedrigere Werte für SP-A und SP-D in BALF gemessen als in der Kontrollgruppe (Greene and others, 1999, 1843-1850).

Im Serum waren die Konzentrationen von SP-A und SP-D nicht erhöht bei Patienten mit einem Risiko zur Entwicklung eines ARDS, aber sie waren deutlich erhöht bei manifestem ARDS und bis zu 14 Tage danach (Greene and others, 1999, 1843-1850).

Pneumonie:

Auch bei Patienten, die an einer bakteriellen Pneumonie erkrankt sind, zeigen sich recht unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Konzentrationen von Surfactantproteinen.

Teilweise wurden im Serum bei erkrankten Patienten die gleichen Werte wie bei gesunden Kontrollproben für SP-A (Kuroki and others, 1993, 723-729) und auch für SP-D (Honda and others, 1995, 1860-1866) gemessen.

In einer Arbeit zeigten sich jedoch auch signifikant erhöhte SP-A und SP-D Werte im Serum von Patienten, die an einer bakteriellen Pneumonie erkrankt waren (Ohnishi and others, 2002, 378-381).

In BALF wurden geringere SP-A Konzentrationen als bei gesunden Kontrollproben gemessen (Gunther and others, 1996, 176-184).

Wenn man den zeitlichen Verlauf von SP-D im Serum während der Erkrankung betrachtet, findet man am Beginn niedrigere Werte als bei Gesunden. Diese steigen jedoch im Verlauf von ca. 5 Tagen auf das Dreifache an und gehen dann langsam auf Normalwerte zurück. Ein Zusammenhang mit der Menge an CRP im Serum ist nicht erkennbar (Leth-Larsen and others, 2003, 29-37).

Pulmonale Alveolarproteinose:

Bei der Pulmonalen Alveolarproteinose (PAP) handelt es sich um eine seltene Erkrankung, bei der es durch verschiedene Pathomechanismen zu einer Störung der Surfactanthomöostase kommt. Das klinische Erkrankungsbild ist beim Neugeborenen durch ein Atemnotsyndrom und Tachy-/Dyspnoe gekennzeichnet. Beim Säugling und Kind hingegen zeigt sich die Erkrankung durch eine Gedeihstörung, Belastungsdyspnoe und Husten und ähnelt dem Bild beim Erwachsenen mit Hypoxämie und Einschränkung der körperlichen Belastbarkeit.

Die Surfactantproteine A und D sind bei dieser Erkrankung sowohl in der BALF als auch im Serum der Patienten in einer hohen Konzentration vorhanden (Honda and others, 1993, 496-499; Honda and others, 1995, 1860-1866; Kuroki and others, 1993, 723-729).

Interstitielle Lungenerkrankungen:

Interstitielle Lungenerkrankungen sind chronisch verlaufende Entzündungen des Lungeninterstitiums mit Einbeziehung der alveolo-kapillären Membranen. Es kann durch die Zunahme des Bindegewebes zu einer Lungenfibrose kommen.

Diese Lungenerkrankungen können zum Beispiel bei einigen Systemerkrankungen, wie der Sarkoidose auftreten.

Aber es gibt auch die sogenannte Idiopathische Lungenfibrose (IPF, interstitial pulmonary fibrosis), bei der keine Ursache bekannt ist.

Bei der Sarkoidose konnte man in der BALF erhöhte Mengen von SP-A messen (Hamm and others, 1994, 1766-1770). Die Menge an SP-D war nicht verändert (Honda and others, 1995, 1860-1866). Im Serum hingegen war die SP-A Konzentration nicht erhöht gegenüber der gesunden Kontrollgruppe (Kuroki and others, 1993, 723-729), während die Konzentration an SP-D erhöht war (Honda and others, 1995, 1860-1866).

Bei der Lungenfibrose mit unbekannter Ursache (IPF) lag SP-A vermindert in BALF und erhöht im Serum vor (Kuroki and others, 1993, 723-729).

Surfactantprotein D kam in BALF weder mehr noch weniger vor als bei gesunden Kontrollproben, während im Serum eine erhöhte Konzentration an SP-D gemessen werden konnte (Honda and others, 1995, 1860-1866).

Die Höhe von SP-A und SP-D im Serum kann hierbei auch als Prognosefaktor verwendet werden (Greene and others, 2002, 439-446). Die Konzentration war zum Beispiel höher bei Patienten, die innerhalb von 3 Jahren gestorben sind (Takahashi and others, 2000, 1109-1114).

1.4 Surfactantproteine bei Cystischer Fibrose

Die cystische Fibrose (CF) ist die häufigste Erbkrankheit der weißen Bevölkerung in Europa und den USA. Sie tritt bei ca. 1:2500 Geburten auf und wird autosomal rezessiv vererbt.

Durch eine Mutation des CFTR-Gens (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) kommt es zum Auftreten eines pathologisch veränderten Proteins (CFTR-Protein). Es handelt sich hierbei um defekte Chloridkanäle, wodurch es in allen exokrinen Drüsen zur Produktion visköser Sekrete kommt. Es sind meist mehrere Organe hiervon betroffen, wozu auch die Lunge gehört.

In der Lunge kommt es durch das visköse Sekret, das schlecht entfernt werden kann zu chronischen Infektionen, häufig durch *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*.

In der BALF von Patienten, die an CF leiden, wurden sowohl Surfactantprotein A als auch D gemessen.

SP-A lag hier weniger oder auch in gleicher Menge wie bei gesunden Proben vor, wenn es sich um klinisch stabile Patienten handelte (Griese, Birrer, and Demirsoy, 1997, 1983-1988).

Bei Patienten, die gerade an einer Infektion und Entzündung litten, war die Konzentration an SP-A erhöht (Hermans and Bernard, 1999, 646-678).

Die Menge an SP-D in der BALF bei CF-Patienten ist je nach Untersuchung unverändert gegenüber der Menge bei Proben von Gesunden (Griese, Birrer, and Demirsoy, 1997, 1983-1988; Griese and others, 2004, 1000-1005) oder auch vermindert in der Menge (Postle and others, 1999, 90-98).

SP-A wurde auch im Sputum von CF-Patienten untersucht. Hierbei zeigten sich erhöhte Konzentrationen (Griese, Birrer, and Demirsoy, 1997, 1983-1988).

Im Serum von CF-Patienten wurde bisher nur SP-D untersucht. Hierbei zeigten sich signifikant erhöhte Werte bei CF-Patienten. Sowohl bei der Gruppe, die an allergischer bronchopulmonaler Aspergillose litt, als auch bei der Gruppe ohne diese zusätzliche Erkrankung waren die Werte signifikant höher als bei Gesunden. Zusätzlich fiel eine negative Korrelation mit Lungenfunktionswerten auf. Patienten mit

hohen SP-D Werten im Serum zeigten schlechte Werte bei der Lungenfunktion (Krane and Griese, 2003, 592-595).

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen der Surfactantproteine A und D bei Patienten untersucht, die an Cystischer Fibrose leiden.

Hierzu wurden mittels ELISA die Konzentrationen von SP-A und SP-D in der BAL und im Serum der Patienten gemessen. Die Messwerte wurden mit Proben von einer gesunden Kontrollgruppe verglichen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die SP-D Konzentration im Serum von CF-Patienten signifikant erhöht ist gegenüber einer Gruppe von gesunden Kontrollpatienten (Krane and Griese, 2003, 592-595). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun auch die Serumkonzentration von SP-A bei CF-Patienten gemessen werden.

Die hier untersuchten Proben wurden während einer Studie gewonnen, bei der einige Patienten mit inhalativer rhDNAse (Pulmozyme) behandelt wurden. Es konnte daher auch untersucht werden, ob sich die Menge an Surfactantprotein A und D je nach Behandlungsart unterscheidet. Außerdem konnten bei einigen Patienten die Konzentrationsveränderungen der Surfactantproteine A und D über einen Zeitraum von 5 Jahren im zeitlichen Verlauf betrachtet werden.

Es wurde weiterhin untersucht, ob Korrelationen bestehen zwischen der Menge an SP-A und SP-D im Serum und in der BAL-Flüssigkeit.

Außerdem wurde die Konzentration von SP-A und SP-D im Zusammenhang mit dem klinischen Zustand der Patienten betrachtet. Hierzu wurden Korrelationen zwischen SP-A und SP-D im Serum und der Lungenfunktion der Patienten sowie einigen Patientendaten und Laborparametern berechnet.

Ziel dieser Arbeit war es, bei einer größeren Patientengruppe einen Vergleich der Konzentrationen von SP-A und SP-D mit einer Gruppe gesunder Kontrollpatienten zu erhalten. Zusätzlich sollte festgestellt werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Menge an Surfactantproteinen im Serum und dem klinischen Zustand von CF-Patienten gibt.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und gesunde Kontrollgruppe

Die Proben von Patienten, die an Cystischer Fibrose leiden, wurden im Rahmen der BEAT – Studie (Bronchoalveolar Lavage for Evaluation of Early Antiinflammatory Treatment) mittels bronchoalveolärer Lavagen gewonnen. Außerdem wurde den Patienten intravenös Blut entnommen.

2.1.1 BEAT-Studie

Ein- und Ausschlusskriterien der BEAT – Studie

Folgende Ein- und Ausschlusskriterien wurden für die Studie festgelegt:

- Alter > 5 Jahre
- Einsekundenkapazität der Lungenfunktion (FEV1) > 80 % des Sollwertes; keine signifikanten Veränderungen im Monat vor Studienbeginn
- keine akute Atemwegsinfektion oder pulmonale Exazerbation während der letzten sechs Wochen vor Studienbeginn
- keine Therapie mit rhDNase zwei Monate vor Studienbeginn
- keine antientzündliche Behandlung z. B. mit Ibuprofen, inhalativen oder systemischen Kortikosteroiden oder α_1 – Antitrypsin
- keine allergische bronchopulmonale Aspergillose
- keine starken pulmonalen oder körperlichen Einschränkungen
- keine schweren Organmanifestationen der zystischen Fibrose wie z.B. Leberzirrhose, Diabetes mellitus

Ablauf der BEAT – Studie

Die Patienten wurden über einen Zeitraum von 5 Jahren (1996 bis 2001) durch Studienzentren in Berlin, Essen, Hannover, Köln und München betreut. Es wurden insgesamt 106 Patienten (52 männlich, 54 weiblich) im Alter von 5 bis 32 Jahren (Mittelwert: 11,7 Jahre) rekrutiert. Den Patienten wurden an 13 Terminen (T1 bis T13) Blutproben entnommen und sie wurden bezüglich des Krankheitsverlaufes befragt und untersucht. Zu 3 Zeitpunkten (T1, T7, T13) im Abstand von jeweils 18 Monaten wurden sie zusätzlich einer bronchoalveolären Lavage unterzogen. Die

Zustimmung der Ethikkommissionen und schriftliche Einverständniserklärungen der Patienten bzw. der Eltern liegen den jeweiligen Studienzentren vor.

Bei einem Anteil von mehr als zehn Prozent neutrophiler Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage nahmen die Patienten an der Randomisierung teil. 20 Patienten hatten eine geringere relative Granulozytenzahl und wurden deshalb nicht randomisiert. Sie nahmen weiterhin an der Studie teil und wurden auch lavagiert (CF-Kontrollgruppe).

Von den 86 randomisierten Patienten wurden 48 dem Behandlungsarm mit inhalativer rhDNAse (Pulmozyme) zugewiesen, 38 Patienten bekamen kein Pulmozyme.

Patientenkollektiv für die Messung der Surfactantproteine im Serum und in BAL

Ziel dieser Arbeit war es, die Surfactantproteine A und D in Lavageflüssigkeit und Serum zu untersuchen. Daher wurden nur die Proben und klinischen Daten der Patienten verwendet, die von einem der Lavageterminen (T1, T7, T13) stammen.

Dazu wurden 3 Patientengruppen gemäß Abb. 2-1 gebildet:

- CF-Kontrollgruppe: Proben von Patienten, die nicht randomisiert wurden (15 Proben, davon 10 Proben vom Termin T1 und 5 Proben vom Termin T7 vorhanden)
- Gruppe ohne Behandlung mit Pulmozyme: Proben von randomisierten Patienten zum Zeitpunkt T1 (noch keine Medikamentengabe) bzw. Proben von Patienten, die kein Pulmozyme bekamen von den Zeitpunkten T7 oder T13 (72 Proben vorhanden: 64 Proben von T1, 6 Proben von T7, 2 Proben von T13)
- Gruppe mit Pulmozyme: Proben von Patienten, die mit Pulmozyme behandelt wurden von den Terminen T7 oder T13 (27 Proben vorhanden: 22 Proben von T7, 5 Proben von T13)

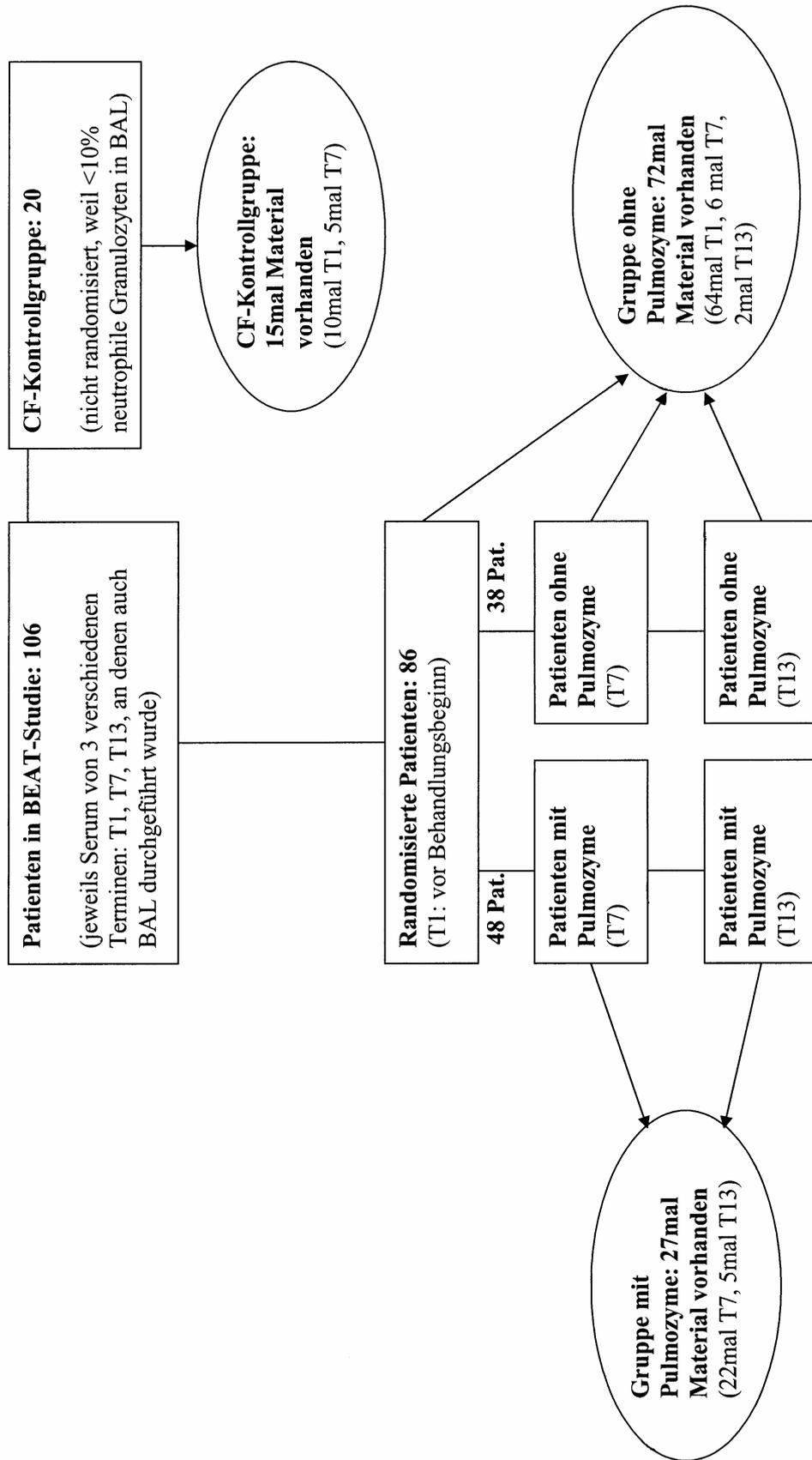


Abb 2-1: Einteilung der Patienten in verschiedene Gruppen je nach Behandlungsart

Für die Darstellung des zeitlichen Verlaufs (siehe Abschnitt 3.3) wurden die Werte der Patienten verwendet, bei denen ausreichend Probenmaterial von allen drei Zeitpunkten vorhanden war.

Die Lungenfunktionswerte der Patienten wurden vor jeder Lungenlavage mittels Bodyplethysmographie und Spirometrie bestimmt. Die in der BEAT-Datei angegebenen Lungenfunktionswerte in Liter (l) bzw. Liter/Sekunde (l/s) wurden mit folgenden Formeln in Prozentangaben vom Sollwert umgerechnet. Der Sollwert wurde für männliche und weibliche Patienten getrennt anhand der Größe nach folgenden Formeln berechnet (Zapletal, 1987).

Berechnung von FEV1:

Männliche Patienten: $\log \text{FEV1 (ml)} = -2,8652 + 2,8729 \cdot \log \text{Größe (cm)}$

Weibliche Patienten: $\log \text{FEV1 (ml)} = -2,6056 + 2,7413 \cdot \log \text{Größe (cm)}$

Berechnung von FVC:

Männliche Patienten: $\log \text{FVC (ml)} = -2,9236 + 2,9360 \cdot \log \text{Größe (cm)}$

Weibliche Patienten: $\log \text{FVC (ml)} = -2,7040 + 2,8181 \cdot \log \text{Größe (cm)}$

Berechnung von MEF25:

Männl./weibl. Patienten: $\log \text{MEF25 (l/s)} = -4,5808 + 2,2116 \cdot \log \text{Größe (cm)}$

Berechnung von MEF75/27:

Männl./weibl. Patienten: $\log \text{MEF75/25 (l/s)} = -4,6651 + 2,3588 \cdot \log \text{Größe (cm)}$

Eine Übersicht über alle Patienten mit klinischen Daten, Laborwerten und Messwerten befindet sich im Anhang.

2.1.2 Kontrollgruppe

Die Kontrollproben (Serum und Lavageflüssigkeit) stammten von achtzehn Kindern und jungen Erwachsenen. Sie wurden teilweise im Rahmen einer kontrollierten Studie zur Impfung gegen *Pseudomonas aeruginosa* gewonnen (Baumann, Mansouri, and von Specht, 2004, 840-847). Die übrigen Proben stammen von

Kindern, die sich im Dr. von Haunerschen Kinderspital elektiven chirurgischen Eingriffen unterzogen, bei denen eine Intubationsnarkose durchgeführt wurde. Die Eltern wurden über das Vorgehen aufgeklärt und eine schriftliche Einverständniserklärung wurde eingeholt. Die Untersuchung wurde von der Ethikkommission der LMU, München genehmigt. Sämtliche Personen waren lungengesund. Die genauen Diagnosen und das Alter der Kontrollpersonen sind in der folgenden Tabelle 2-1 aufgelistet.

Tabelle 2-1: Gesunde Kontrollpatienten

Nr	Geschlecht	Datum der BAL	Geburtsdatum	Alter bei BAL	Diagnose
1	W	7.12.1998	21.4.1997	1	Leistenhernie li
2	M	2.3.1999	1.12.1997	1	Nävus Schulter/Rücken links
3	M	29.5.2001	15.9.1992	8	Anthelixplastik
4	W	4.7.2001	1.1.1995	6	Tonsillektomie
5	W	19.2.2002	19.6.1997	4	Tonsillektomie
6	M	17.12.1998	8.8.1993	5	Ganglion am li Fußrücken
7	W	20.2.2002	19.7.1994	7	Tonsillektomie
8	M	13.2.2002	5.5.1991	10	Tonsillektomie
9	M	7.6.2002	7.8.1997	4	Tonsillektomie
10	M	23.1.2002	30.12.1978	23	Pseudomonas-Impfstudie
11	M	16.1.2002	25.1.1978	23	Pseudomonas-Impfstudie
12	M	19.2.2002	12.7.1976	25	Pseudomonas-Impfstudie
13	M	17.1.2002	4.3.1975	26	Pseudomonas-Impfstudie
14	M	12.2.2002	8.7.1979	22	Pseudomonas-Impfstudie
15	M	18.2.2002	10.5.1977	24	Pseudomonas-Impfstudie
16	M	24.1.2002	13.7.1978	23	Pseudomonas-Impfstudie
17	M	6.2.2002	29.7.1975	26	Pseudomonas-Impfstudie
18	M	7.2.2002	22.11.1977	24	Pseudomonas-Impfstudie

2.2 Probengewinnung und -verarbeitung

2.2.1 Durchführung der bronchoalveolären Lavage und Verarbeitung der Proben

Die Patienten wurden standardisiert in den jeweiligen Studienzentren lavagiert. Es wurden flexible Bronchoskope mit einem Außendurchmesser von 4,9 mm, bzw. 3,5 mm bei Patienten unter 10 Jahren, verwendet. Die Untersuchung wurde je nach Zentrum in Lokalanästhesie unter Gabe von Lidocain, Midazolam und Pethidin oder in Vollnarkose mit Verwendung von Lachgas und Halothan durchgeführt.

Es wurde entweder die zum Oberlappen gehörende Lingula oder eines ihrer Segmente bzw. der rechte Mittellappen lavagiert. Dazu wurden je Fraktion 20 ml (Gesamtvolumen 3 ml/kg Körpergewicht) auf Körpertemperatur erwärmte physiologische Kochsalzlösung eingebracht. Bei Kindern unter 20 kg wurde mit drei mal 1 ml/kg Körpergewicht lavagiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit manuell aspiriert. Die erste gewonnene Fraktion wurde, da sie den großen Atemwegen zuzuordnen war, getrennt behandelt und wird in dieser Arbeit nicht betrachtet. Die anschließend gewonnenen Fraktionen wurden gepoolt und für die Untersuchungen dieser Arbeit verwendet.

Nach der Entnahme des Materials für die mikrobiologische Untersuchung wurde die Lavage durch eine Lage steriler Gaze gefiltert, um Mucus zu entfernen. Zur Entfernung der Zellen wurde die Lavage zehn Minuten lang bei 500 g zentrifugiert. Zur Differenzierung der Zellen wurde ein Zellausstrich in May-Grünwald Färbung angefertigt und es wurden 600 Zellen ausgezählt.

Anschließend wurde die Lavage aliquotiert und bei – 80 °C bis zur jeweiligen Untersuchung eingefroren.

2.2.2 Serumproben

Am Lavagetermin wurde den Patienten zusätzlich venöses Blut entnommen. Aus den Blutproben wurden ein Blutbild angefertigt, eine Blutgasanalyse durchgeführt und es wurden Werte der Immundiagnostik (IgG, IgA, IgM) und der klinischen Chemie bestimmt. Zusätzlich wurde Serum gewonnen, in dem z. B. die Konzentration der Surfactantproteine A und D gemessen werden konnte.

Die Blutwerte wurden in den jeweiligen Labors der Studienzentren bestimmt. Die Serumproben wurden bis zur Messung bei -20°C oder -80°C gelagert.

2.3 Bestimmung der Konzentration von Surfactantprotein A und D

Zur Messung der Konzentration von Surfactantprotein A und D wurde sowohl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit als auch im Serum ein „Sandwich“-ELISA durchgeführt. Bei diesem Immunoassay wird das nachzuweisende Antigen (SP-A und SP-D) in mehreren Schritten an zwei verschiedene Antikörper gebunden und dann mit einem Antiglobulin-Enzym-Konjugat mittels einer Farbreaktion nachgewiesen.

Folgende Geräte wurden benutzt:

- ELISA-Washing Unit (Behring)
- Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 100, Berlin)
- Photometer (anthos HT III, Salzburg)

2.3.1 ELISA zur Messung von SP-A

Das Surfactantprotein A wurde im Serum und in der Lavageflüssigkeit mit den gleichen Antikörpern und Puffersystemen nachgewiesen. Durch die Konzentrationsunterschiede an SP-A in den beiden Flüssigkeiten wurde die Methode nur bei der Probenaufarbeitung etwas verändert.

Die verwendeten Puffersysteme sind:

- Carbonatpuffer: 15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3 , pH 9,6
- Tris-buffered-saline (TBS): 10 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1 % TritonX, pH 7,4
- Blockpuffer: TBS mit 1 % BSA (bovines Serumalbumin, Peasel + Lorei, Hanau)
- Puffer zur Probenaufarbeitung: 1 mM EDTA, 10 mM Tris

1. Coating (1. Antikörper):

Beim Coating wird der erste Antikörper an die Festphase (Mikrotiterplatte) gebunden. Als Festphasenantikörper wird PE 10 (Dr. Kuroki, International

Reagents Corp., Kobe, Japan), ein monoklonaler Maus-Antikörper, der sich gegen humanes SP-A richtet, verwendet. Er wird auf 1 µg/ml in Carbonatpuffer verdünnt und in alle Vertiefungen (wells) einer 96-well Mikrotiterplatte (Maxisorp C96, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) werden jeweils 100 µl pipettiert. Um eine gute Adsorption des Antikörpers zu erreichen, wird die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei allen Inkubationsschritten wird die Platte mit Parafilm abgedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern.

2. Blocking:

Am nächsten Tag wird der Überstand, der Pufferlösung und nicht gebundene Antikörper enthält, dekantiert. Zur Verhinderung von späteren Proteinbindungen an die Kunststoffplatte wird in jede Vertiefung 200 µl Blockpuffer pipettiert. Die Platte wird eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

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

Zuerst erfolgt das Dekantieren des Überstandes und dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatte mit TBS-Puffer, um ungebundene Reagenzien zu entfernen. Das Reinigungsverfahren wird vor allen weiteren Schritten in der gleichen Weise durchgeführt.

Bevor die Proben auf die Mikrotiterplatte aufgetragen werden können, müssen sie aufgearbeitet werden, um das SP-A besser aus dem Lipid-Protein-Gemisch zu lösen.

BAL: Die Proben werden in „Probenpuffer“ fünffach verdünnt und in einem Ultraschallbad 1 Minute homogenisiert. Anschließend wird noch TritonX 22% zugefügt, so dass eine 5,5-fache Verdünnung entsteht. Daraufhin werden die Proben auf dem Vortex-Gerät einige Sekunden lang gemischt und 10 Minuten lang bei 10.000g zentrifugiert. Der Überstand wird weiter verwendet und der Bodensatz verworfen. Danach werden 100µl der Proben und 100µl Blockpuffer ins oberste well der Mikrotiterplatte pipettiert, so dass eine 11fache Verdünnung entsteht. Damit alle Proben im Messbereich liegen, werden die Proben auf der Platte weiter verdünnt. In jedes well werden 100µl Pufferlösung und 100µl Proben-Puffer-Gemisch aus dem darüberliegenden well aufgebracht, so dass 7 weitere Verdünnungsstufen bis zu einer 1408fachen Verdünnung entstehen.

Serum: 100µl der Serumproben werden mit 350µl Probenpuffer, der hier zusätzlich 1 % BSA enthält, und 50µl Triton verdünnt, so dass eine 5fache Verdünnung entsteht. Anschließend werden die Proben wie oben beschrieben im Ultraschallbad und in der Zentrifuge weiterverarbeitet. 100µl hiervon werden dann unverdünnt auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und noch einmal mit 100µl Puffer im darunterliegenden well weiterverdünnt. Um trotz geringerer Verdünnungsschritte ausreichend Messwerte zu erhalten, wurden die Proben als Doppelbestimmung gemessen.

Als Standard-Antigen wird humanes rekombinantes SP-A (rh-SP-A, SPA/00-02, Byk Gulden, Konstanz) verwendet. Mit dem Standard wird ebenso verfahren, wie mit den BAL-Proben, so dass er in Konzentrationen von 100 ng/ml bis 1,5 ng/ml auf der Mikrotiterplatte vorliegt. Der Standard wird parallel in den ersten beiden Reihen der Platte aufgetragen. Auf diese Weise erhält man zwei Standardreihen zur Bestimmung der Standardkurve. Die untersten zwei wells der ersten beiden Reihen werden lediglich mit Blockpuffer gefüllt, um den Leerwert (Blank) zu erhalten.

Die Platte wird anschließend 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und danach wie oben beschrieben gewaschen.

4. Zugabe des zweiten Antikörpers:

Der zweite Antikörper, ein polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes rekombinantes SP-A (Byk-Gulden/Altana, Konstanz, Deutschland), ist schon 1:100 vorverdünnt und wird weiter 1:100 in Blockpuffer verdünnt. In jedes well werden 100 µl pipettiert. Nach dem Auftragen wird die Platte 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend wieder gewaschen.

5. Inkubation mit Antiglobulin-Enzym-Konjugat:

Um den Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Intermediärkomplex) zu detektieren wird ein Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG (Sigma, Saint Louis, USA) 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 wird 1:5000 in Blockpuffer verdünnt aufgetragen. In jedes well werden 100 µl Antikörper-Puffer-Gemisch aufgetragen. Vor dem nächsten Schritt wird die Platte erneut 1 Stunde bei 37°C inkubiert und danach gewaschen.

6. Substratreaktion:

Bei der Substratreaktion wird die Fertigschubstanz ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulphonate-(6)]) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durch die am Antikörper befindliche Meerrettichperoxidase in ein chromogenes Produkt umgewandelt. ABTS wird als Puffer in einer Konzentration von 0,0167 mg/ml angesetzt. Zu 10 ml ABTS-Puffer werden noch 10 µl 30% iges H₂O₂ und zwei ABTS-Tabletten mit einer Konzentration von 5 mg/Tbl. hinzugegeben. In jedes well werden dann 100µl Substrat pipettiert. Um zu verhindern, dass die lichtempfindliche Substratreaktion durch Tageslicht gestört wird, wird die Platte mit Aluminiumfolie abgedeckt und bei Raumtemperatur auf einem Schüttler 30 Minuten inkubiert.

7. Auswertung:

Zur Quantifizierung der Färbung der einzelnen wells wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm mittels eines Photometers gemessen. Die 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).

Für die weitere Auswertung wurden aus den vom Computer gelieferten Daten die ausgewählt, die im optimalen Messbereich des Assays lagen. Die endgültigen Messergebnisse wurden durch Mittelwertsberechnung gebildet. 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.

STANDARD CURVE

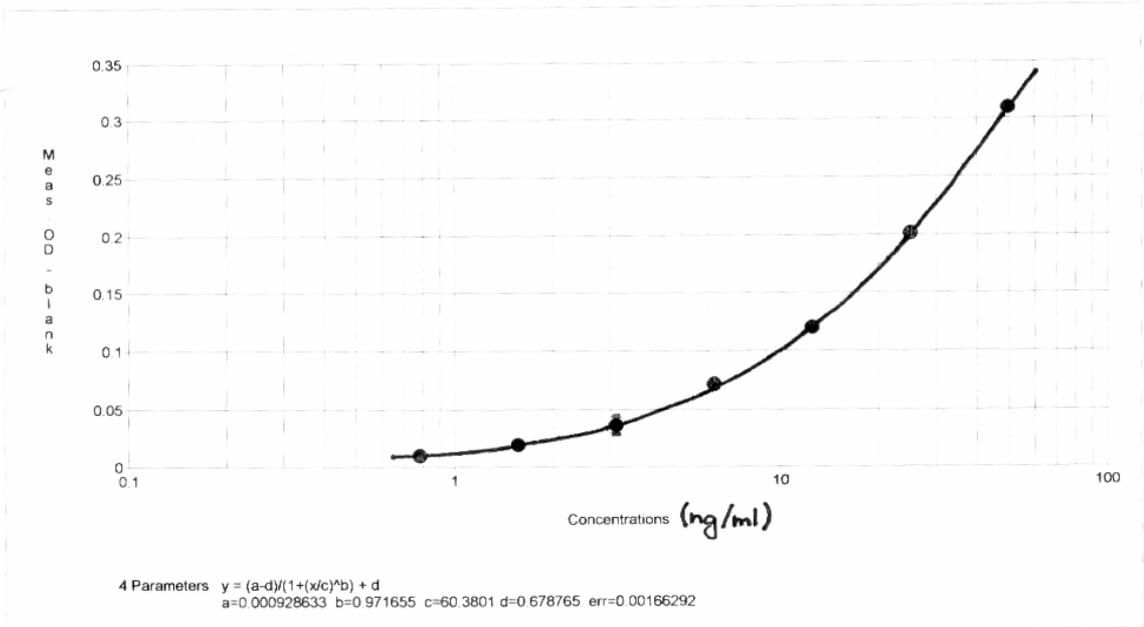


Abb. 2-2: Beispiel für eine Standardkurve bei der SP-A-Messung (Ergebnis Ausdruck)

Um die Zuverlässigkeit des Messverfahrens zu überprüfen, wurden die Intra- und die Inter-Assay-Variabilitäten berechnet.

Hierzu wurden einige Serumproben zum gleichen Termin und auf der gleichen Versuchsplatte zweimal in einer Doppelbestimmung gemessen. Durch die Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten kann man hierbei eine Aussage über die Intra-Assay-Variabilität treffen.

Tab. 2-2: Intra-Assay-Variabilität beim SP-A-ELISA (SP-A in ng/ml)

Probe	1. Messung	2. Messung	Mittelwert	Varianz	Standardabw.	Variationskoeff. (%)
Serum I	20,04	20,57	20,31	0,07	0,26	1,31
Serum II	24,67	21,96	23,32	1,84	1,35	5,81
Serum III	25,64	27,4	26,52	0,77	0,88	3,32
Serum IV	7,19	8,78	7,99	0,63	0,80	9,96
Serum V	21,86	22,18	22,02	0,03	0,16	0,73
Serum VI	21,69	22,24	21,97	0,08	0,27	1,25
Serum VII	15,43	16,2	15,82	0,15	0,39	2,43
Serum VIII	40,31	37,22	38,77	2,39	1,55	3,99
Serum IX	25,83	25,28	25,56	0,08	0,28	1,08
Serum X	19,41	15,69	17,55	3,46	1,86	10,60
Mittelwert					0,78	4,05

Der Variationskoeffizient ergibt je nach gemessener Probe Werte zwischen 0,73% und 10,6%. Im Durchschnitt variieren die Werte beim Intra-Assay-Vergleich um 4%.

Um die Inter-Assay-Variabilität zu überprüfen, wurden einige Serumproben aufgeteilt und in kleinen Mengen eingefroren. Die Aliquots wurden dann an unterschiedlichen Terminen mit dem gleichen Assay gemessen. Aus den verschiedenen Messergebnissen wurden auch hier Standardabweichungen und Variationskoeffizienten berechnet.

Tab. 2-3: Inter-Assay-Variabilität beim SP-A-ELISA (SP-A in ng/ml)

Probe	1. Mess.	2. Mess.	3. Mess.	4. Mess.	5. Mess.	Mittelwert	Varianz	Standardabw.	Variationskoeff. (%)
Serum I	40,34	45,11	31,20	14,01	18,36	29,80	145,53	12,06	40,48
Serum II	53,08	40,77	35,05	17,67	14,60	32,23	207,68	14,41	44,71
Serum III	17,30	9,16	7,72	7,76		10,49	15,82	3,98	37,93
Serum IV	39,83	19,71	14,00	5,22		19,69	161,84	12,72	64,61
Serum V	33,80	22,29	15,95			24,01	54,59	7,39	30,77
Serum VI	14,24	14,62				14,43	0,04	0,19	1,32
Serum VII	25,80	23,91	25,22			24,98	0,62	0,79	3,17
Serum VIII	34,30	46,40	36,29			39,00	28,06	5,30	13,58
Serum IX	420,66	318,64				369,65	2602,02	51,01	13,80
Mittelwert								11,98	27,82

Auch bei diesen Berechnungen ergeben sich je nach Probe große Unterschiede bei der Bestimmung des Variationskoeffizienten. Der errechnete Mittelwert aller Variationskoeffizienten beim Inter-Assay-Vergleich beträgt 27,82%.

Außerdem sollte der Effekt von mehrmaligem Auftauen auf die Menge an SP-A überprüft werden. Hierzu wurde ein Teil der Proben aliquotiert, direkt eingefroren und erst kurz vor dem Versuch wieder aufgetaut. Von den gleichen Proben wurden Aliquots hergestellt, die eingefroren (-20°C) und danach wieder aufgetaut wurden. Dieser Vorgang wurde 5mal wiederholt. Die unterschiedlich behandelten Proben wurden dann jeweils viermal innerhalb von 13 Tagen gemessen. Aus den wiederholten Messungen wurden Mittelwerte gebildet und diese wurden miteinander verglichen. Hierbei zeigten sich nur sehr geringe Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Tab. 2-4: Vergleich der Proben nach mehrmaligem Auftauen oder bei sofortiger Messung (SP-A in ng/ml)

Probe	SP-A-Mittelwert nach mehrmaligem Auftauen	SP-A-Mittelwert bei sofortiger Messung	Variationskoeffizient (%)
Serum I	26,69	26,08	1,16
Serum II	54,13	47,44	6,59
Serum III	21,78	22,38	1,39
Serum IV	18,74	17,37	3,79
Serum V	25,46	20,89	9,86

Um das bestmögliche Messverfahren für die Konzentrationsbestimmung von SP-A im Serum zu erhalten, wurden vor Beginn der Probenmessung verschiedene ELISA-Assays getestet. Hierzu wurden verschiedene Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen, veränderte Probenaufarbeitungen und ein anderes Detektionsverfahren mit biotinierten Antikörpern und Avidin getestet. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper ist in der Tabelle 2-5 dargestellt.

Tab. 2-5: Getestete Antikörper zur Messung von SP-A im Serum

Verwendungszweck	Antikörper
Coaten der Microtiterplatten	PE-10 Anti-SP-A (monoklonal) (zur Probenmessung verwendet) 1/19.4 (monoklonal, Maus-IgG gegen humanes SP-A) 3/13.4 (monoklonal, Maus-IgG gegen humanes SP-A) 4/13.4 (monoklonal, Maus-IgG gegen humanes SP-A) 5/13.4 (monoklonal, Maus-IgG gegen humanes SP-A) B6)1/12D-28 (monoklonal, Maus-IgG gegen humanes SP-A)
2. Antikörper zur Bindung an Antigen	Anti-SP-A 29kD Pool (polyklonal) (zur Probenmessung verwendet) Affinitätsgereinigter Antikörper 29kD (polyklonal) Biotinierter Antikörper B6)1/12D-28 (monoklonal)
Detektionsantikörper	Goat-anti-rabbit-IgG (zur Probenmessung verwendet) Fab-gereinigter Antikörper (goat-anti-rabbit-POX-IgG)

Die Antikörper 1/19.4, 3/13.4, 4/13.4, 5/13.4, B6)1/12D-28 und der affinitätsgereinigte Antikörper 29kD wurden uns freundlicherweise von Byk Gulden, Konstanz zur Verfügung gestellt.

Einen genauere Auflistung der Konzentrationen, in denen die Antikörper verwendet wurden und der daraus resultierenden Ergebnisse enthält die Tabelle A-1 im Anhang.

2.3.2 ELISA zur Messung von SP-D

Die Konzentration an Surfactantprotein D wurde in allen Proben (Serum und BAL) mit einem Kit der Firma Yamasa Corporation (Choshi, Chiba, Japan) gemessen.

1. Coating (1. Antikörper):

Die im Kit enthaltene 96-well Mikrotiterplatte ist bereits mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes SP-D beschichtet. Auch der Schritt des Blockens von freien Bindungsstellen musste hier nicht mehr durchgeführt werden.

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

Das mitgelieferte rekombinante SP-D als Standardlösung ist bereits so verdünnt, dass es in Konzentrationen von 100 ng/ml bis 1,56 ng/ml vorliegt und nur noch als Doppelbestimmung in den Reihen 1 und 2 der Platte aufgetragen werden muss, um daraus eine Standardkurve zu erhalten. Als Leerwert (Blank) wird die Lösung zur Probenaufarbeitung verwendet.

Die beiliegende Lösung zur Probenaufarbeitung wird in destilliertem Wasser gelöst, bevor die Proben hierin verdünnt werden.

Um die SP-D Konzentration in Serumproben zu messen, werden die Proben 11fach verdünnt und als Doppelbestimmung auf die Platte aufgetragen.

Zur Messung in BAL wird die Probe nur einfach aufgetragen und 26fach, 52fach und 104fach verdünnt, damit das Messergebnis im steilen Bereich der Kurve liegt. Um bei jeder Messung eine Validitätskontrolle zu haben, wurden dem Kit beiliegende Proben mitgemessen, von denen die Konzentration an SP-D bekannt war.

Anschließend wird die Platte mit dem aufgebrauchten Antigen 18 bis 24 Stunden bei 2 bis 8 °C inkubiert und danach mit einem im Kit enthaltenen Waschpuffer dreimal gewaschen.

3. Zugabe des zweiten Antikörpers:

Der zweite monoklonale Antikörper gegen humanes SP-D wird in der gleichen Pufferlösung wie die Proben 12fach verdünnt und es werden 100µl dieser Mischung in jedes well pipettiert. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 15 bis 30 °C wird die Platte wiederum gewaschen.

4. Substratreaktion:

Das Substratgemisch aus 1% Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidine (TMBZ) wird auf die Platte aufgebracht und nach 15 Minuten bei 15 bis 30 °C wird die Farbreaktion durch die Zugabe von 1N Schwefelsäure (H₂SO₄) gestoppt.

5. Auswertung:

Zur Quantifizierung der Färbung der einzelnen wells wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm mittels eines Photometers gemessen. Die 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).

Für die weitere Auswertung wurden aus den vom Computer gelieferten Daten die ausgewählt, die im optimalen Messbereich des Assays lagen. Die endgültigen Meßergebnisse wurden durch Mittelwertsberechnung gebildet. 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.

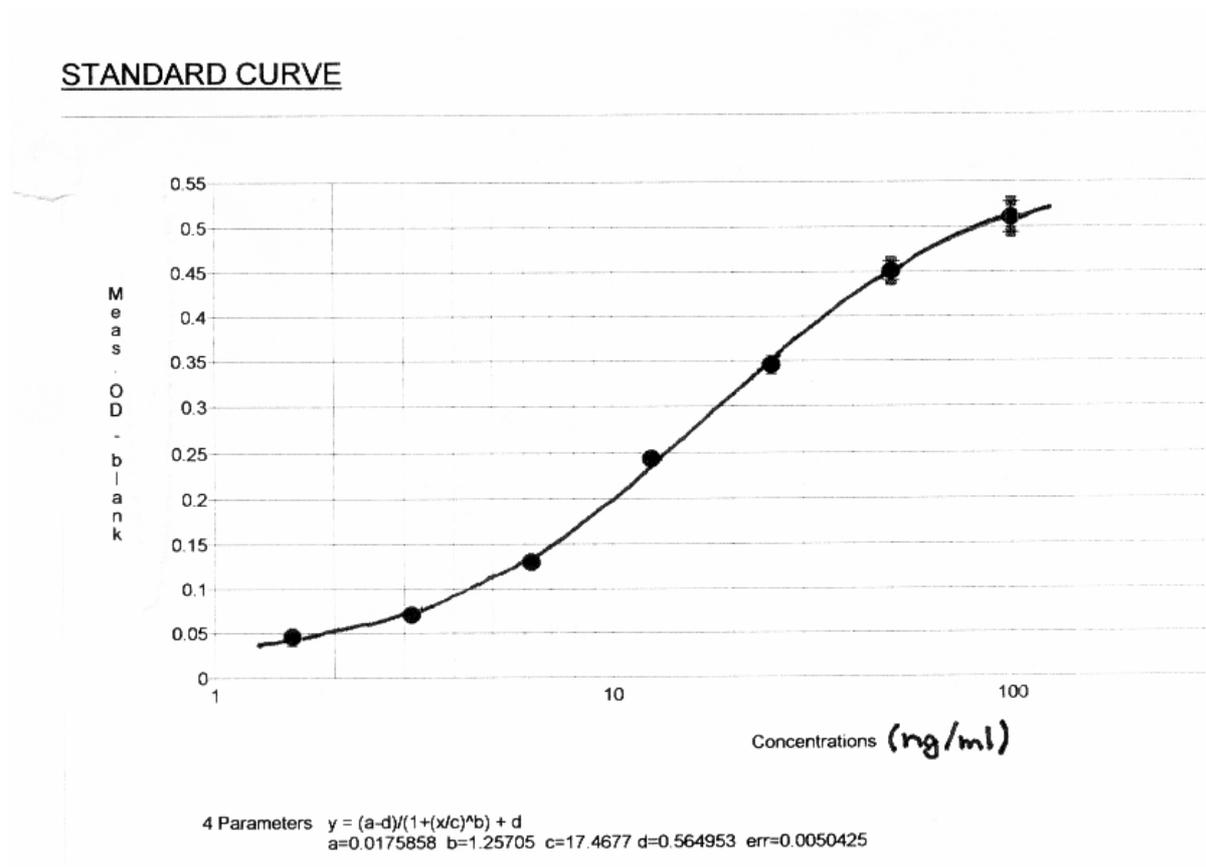


Abb. 2-3: Beispiel für eine Standardkurve bei der SP-D-Messung (Ergebnis Ausdruck)

Auch bei der Messung der SP-D-Konzentration mittels eines ELISA wurde die Zuverlässigkeit der Messergebnisse überprüft. Die dem Kit beiliegenden Kontrollproben (H-, M-, L-Kontrolle) wurden bei jeder Messung mitgemessen und die Ergebnisse des Versuches wurden nur verwendet, wenn die Werte der Kontrollproben in den vom Hersteller festgelegten Bereichen lagen.

Außerdem wurden ebenfalls die Intra- und Inter-Assay-Variabilitäten mittels eines Variationskoeffizienten berechnet.

Tab. 2-6: Intra-Assay-Variabilität beim SP-D-ELISA

Probe	1. Messung	2. Messung	Mittelwert	Varianz	Standardabweichung	Variationskoeffizient(%)
Serum I	144,09	133,36	138,73	28,78	5,36	3,87
Serum II	93,43	97,98	95,71	5,18	2,27	2,38
Serum III	68,72	69,57	69,15	0,18	0,42	0,61
Serum IV	92,19	85,76	88,98	10,34	3,22	3,61
Serum V	24,96	25,45	25,21	0,06	0,24	0,97
Serum VI	37,5	37,99	37,75	0,06	0,24	0,65
Serum VII	171,82	160,8	166,31	30,36	5,51	3,31
Serum VIII	186,07	183,54	184,81	1,60	1,26	0,68
Serum IX	159,43	152,05	155,74	13,62	3,69	2,37
Serum X	112,17	104,12	108,15	16,20	4,02	3,72
Mittelwert				2,63		2,22

Der Wertevergleich innerhalb eines Versuches ergab einheitliche Variationskoeffizienten zwischen 0,68% und 3,87%, deren Durchschnitt 2,2% betrug.

Tab. 2-7: Inter-Assay-Variabilität beim SP-D-ELISA

Probe	1. Mess.	2. Mess.	3. Mess.	4. Mess.	5. Mess.	Mittelw.	Varianz	Standardabw.	Variationskoeff.(%)
H-Kontrolle	22,50	23,61	28,15	26,40	26,07	25,35	4,12	2,03	8,01
M-Kontrolle	13,33	12,90	17,39	15,23	14,78	14,73	2,53	1,59	10,80
L-Kontrolle	7,89	6,92	9,49	8,82	8,78	8,38	0,79	0,89	10,62
Mittelwert							1,50		9,81

Auch die Variationskoeffizienten beim Inter-Assay-Vergleich befinden sich in einem engen Bereich und liegen im Durchschnitt bei 9,8%.

2.4 Statistik

Sämtliche Lokalisationsmaße (Median, arithmetisches Mittel etc.), Streuungsmaße (Spannweite, Standardabweichung etc.) und statistische Tests wurden mit der Software Prism der Firma GraphPad berechnet. Es wurden bevorzugt verteilungsfreie Maße wie Median und Spannweite angegeben, da nicht bei allen Parametern von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte.

Bei Vergleichen von Lagemaßen verschiedener Gruppen wurde bei mehreren unabhängigen Gruppen der nichtparametrische Test nach Kruskal-Wallis verwendet. Beim Vergleich von nur zwei Gruppen wurden nichtparametrische Tests nach Mann-Whitney verwendet. Die Korrelationen wurden mit dem nicht parametrischen Spearman Test auf Signifikanz geprüft. Die Nullhypothese wurde jeweils bei p – Werten $< 0,05$ verworfen (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

Mediane, Spannweiten und p – Werte sind an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil wiedergegeben. Die Abbildungen wurden mit Hilfe der Software Prism von GraphPad und mit Excel bzw. Word von Microsoft erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Patientengruppen und Kontrollen

Im folgenden Abschnitt werden Daten der untersuchten Patientengruppen in Tabellenform dargestellt. Weitere Angaben und auch die gemessenen Werte können in den Tabellen A-2 bis A-6 im Anhang nachgelesen werden.

3.1.1 CF-Gesamtgruppe

Tab. 3-1: Patientendaten aller CF-Patienten

Merkmal	Werte
Alter	11 (8; 14) [5 – 32] 106
Geschlecht	W: 54 Patienten (50,9%) M: 52 Patienten (49,1%)
BMI	16,4 (14,7; 19,0) [12,5 – 31,4] 106

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:

Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

Die Altersverteilung aller betrachteten CF-Patienten wird in der folgenden Abbildung dargestellt.

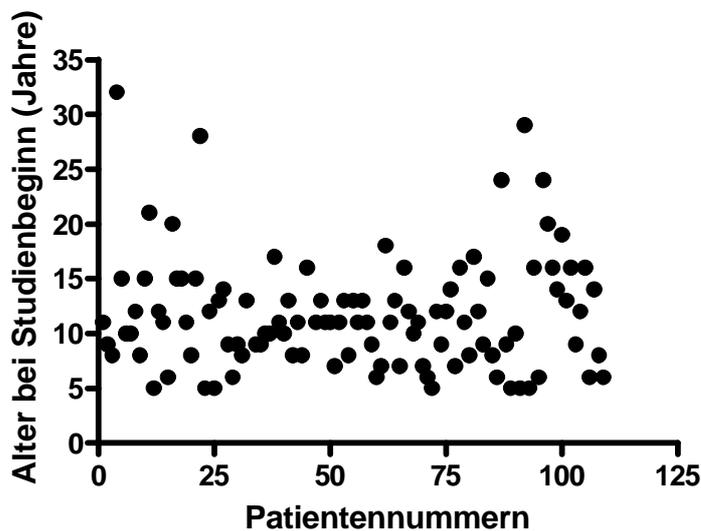


Abb. 3-1: Altersverteilung der CF-Patienten

3.1.2 CF-Patienten (Kontrollgruppe)

Tab. 3-2: Patientendaten der CF-Kontrollgruppe

Merkmal	Werte
Alter	12 (7; 16) [5 – 29] 15
Geschlecht	W: 6 Patienten (40%) M: 9 Patienten (60%)
BMI	17,2 (14,8; 20,4) [14,4 – 31,4] 15

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:
Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

3.1.3 CF-Patienten (ohne Pulmozyme)

Tab. 3-3: Patientendaten der CF-Patienten ohne Pulmozyme

Merkmal	Werte
Alter	11 (8,5; 14) [5 - 32] 72
Geschlecht	W: 39 Patienten (54,2%) M: 33 Patienten (45,8%)
BMI	15,9 (14,7; 18,6) [12,5 – 30,5] 72

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:
Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

3.1.4 CF-Patienten (mit Pulmozyme)

Tab. 3-4: Patientendaten der CF-Patienten mit Pulmozyme

Merkmal	Werte
Alter	13 (10; 15) [7 – 26] 27
Geschlecht	W: 15 Patienten (55,6%) M: 12 Patienten (44,4%)
BMI	15,7 (14,1; 18,5) [12,5 – 22,8] 27

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:
Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

3.1.5 Kontrollpersonen

Tab. 3-5: Patientendaten aller gesunden Kontrollpersonen

Merkmal	Werte
Alter	16 (4,5; 24) [1 – 26] 18
Geschlecht	W: 4 Personen (22,2%) M: 14 Personen (77,8%)

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:
Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

Tab. 3-6: Patientendaten der gesunden Kontrollpersonen nach Alter aufgeteilt

Gruppe	Merkmal	Werte
Kinder	Alter	5 (2,5; 7,5) [1 - 10] 9
	Geschlecht	W: 4 Personen (44,4%) M: 5 Personen (55,6%)
Erwachsene	Alter	24 (23; 25,5) [22 - 26] 9
	Geschlecht	W: 0 Personen (0%) M: 9 Personen (100%)

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:
Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

Die Altersverteilung in der Gruppe der Kontrollpatienten wird in der folgenden Abbildung graphisch dargestellt.

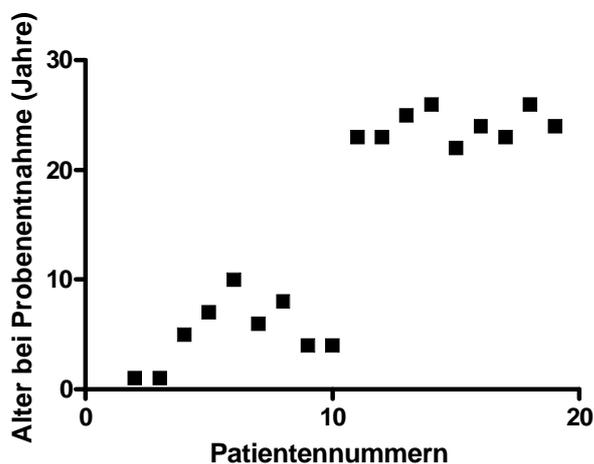


Abb. 3-2: Altersverteilung der gesunden Kontrollpersonen

3.2 Surfactantproteine im Serum bei CF-Patienten und gesunden Kontrollen

3.2.1 SP-A

Tab. 3-7: SP-A im Serum bei CF-Patienten und Kontrollen

Patientengruppe	SP-A Werte (ng/ml)
Gesunde Kontrollgruppe	23,9 (16,4; 33,0) [12,6 – 48,7] 17
CF-Patienten (Gesamtgruppe)	25,8 (20,3; 33,9) [9,5 – 49,0] 114
CF-Patienten (Kontrollgruppe)	23,5 (15,8; 30,8) [11,1 – 45,9] 15
CF-Patienten (ohne Pulmozyme)	25,7 (20,7; 33,9) [9,5 – 49,0] 72
CF-Patienten (mit Pulmozyme)	27,2 (21,5; 36,0) [11,5 – 48,6] 27

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:

Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

Die Medianwerte der einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests miteinander verglichen. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

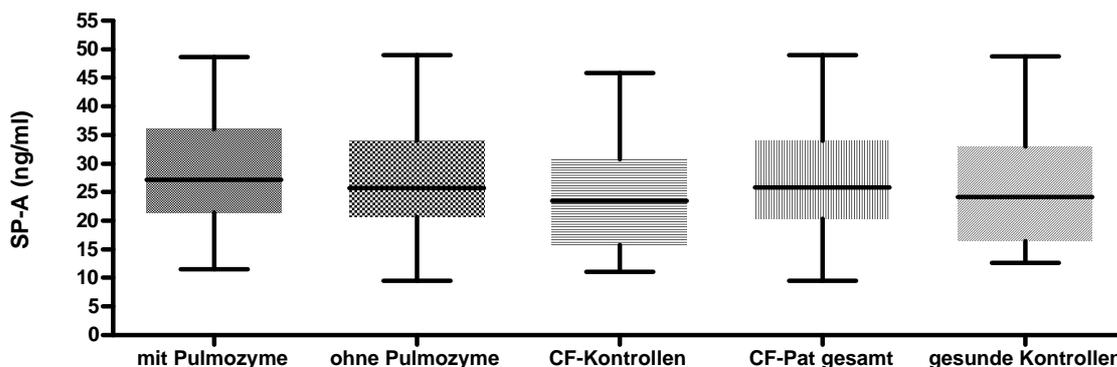


Abb. 3-3: Vergleich der SP-A Werte im Serum bei Patienten mit CF und gesunden Kontrollpatienten (dargestellt sind Median, 25% und 75% Perzentile und Minimal- bzw. Maximalwerte)

Da in der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen sowohl Kinder als auch Erwachsene berücksichtigt wurden, wird im folgenden Abschnitt betrachtet, ob es einen Konzentrationsunterschied zwischen diesen beiden Altersgruppen gibt.

Tab. 3-8: Vergleich der SP-A Werte im Serum von gesunden Personen zwischen Kindern und Erwachsenen

Patientengruppe	SP-A Werte (ng/ml)
Kontrollgruppe der Kinder (Altersdurchschnitt: 5 Jahre)	16,9 (14,5; 21,0) [12,6 – 26,5] 8
Kontrollgruppe der Erwachsenen (Altersdurchschnitt: 24 Jahre)	31,9 (23,0; 38,9) [16,1 – 48,7] 9

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:

Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

Die beiden Medianwerte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,0037$).

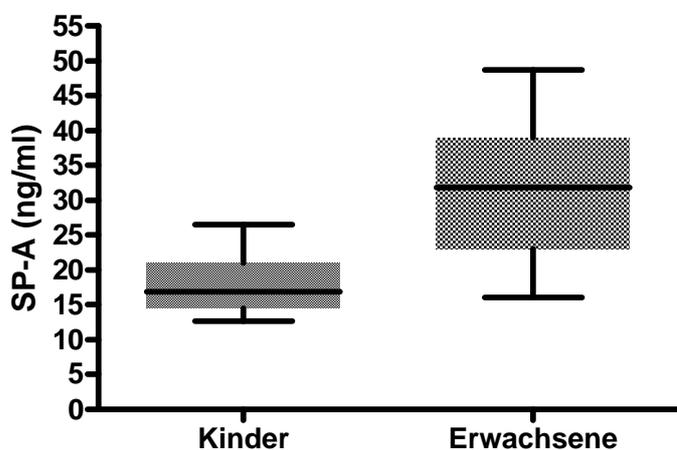


Abb. 3-4: Vergleich der SP-A Werte im Serum bei Kindern und Erwachsenen (dargestellt sind Median, 25% und 75% Perzentile und Minimal- bzw. Maximalwerte)

Auch in der Gruppe der CF-Patienten waren hauptsächlich Kinder. Der Altersdurchschnitt beträgt 11,7 Jahre, wobei der jüngste Patient 5 Jahre alt war und der älteste Patient 32 Jahre alt.

Beim Vergleich von dieser Patientengruppe mit der Gruppe der Kontrollpersonen im Kindesalter ergibt sich auch hier mit dem Mann-Whitney-Test ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,0061$).

Auch in der graphischen Darstellung wird dieser Unterschied deutlich.

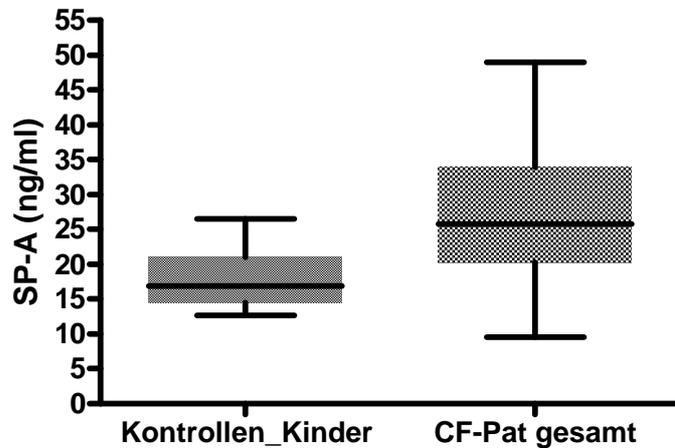


Abb. 3-5: Vergleich der SP-A Werte im Serum bei Patienten mit CF und gesunden Kontrollpatienten im Kindesalter (dargestellt sind Median, 25% und 75% Perzentile und Minimal- bzw. Maximalwerte)

Auch bei der Berechnung des Spearman-Korrelationskoeffizienten fiel in der Gruppe der Kontrollpersonen ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter der Kontrollpersonen und den gemessenen SP-A Werten im Serum und in der BAL auf. Die Ergebnisse sind in den Tabellen A-19 und A-21 im Anhang dargestellt.

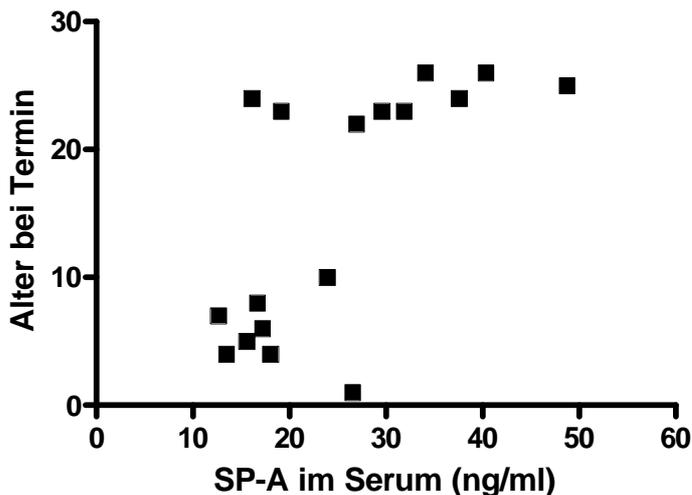


Abb. 3-6: Zusammenhang zwischen SP-A Werten im Serum und Alter bei Probenentnahme in der Gruppe der Kontrollpatienten ($p=0,0023$)

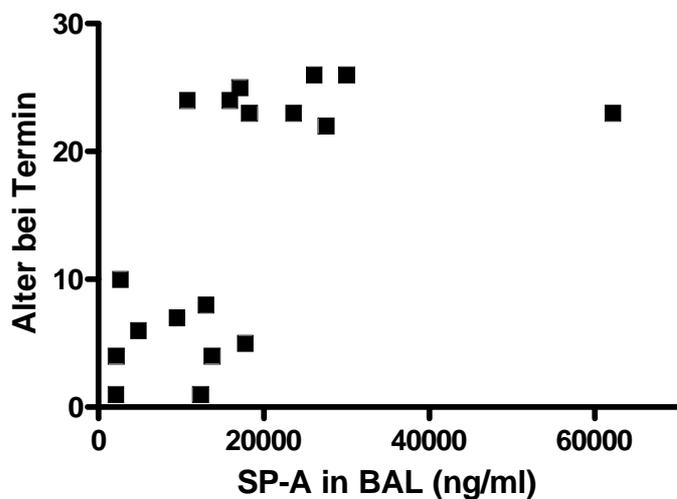


Abb. 3-7: Zusammenhang zwischen SP-A Werten in der BAL und dem Alter bei Probenentnahme in der Gruppe der Kontrollpatienten ($p=0,0051$)

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe konnte jedoch in keiner der betrachteten Patientengruppen ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und den gemessenen SP-A Werten im Serum und in der BAL gezeigt werden (Tabellen A-7 bis A-9 und A-13 bis A-15).

3.2.2 SP-D

Tab. 3-9: SP-D im Serum bei CF-Patienten und Kontrollen

Patientengruppe	SP-D Werte (ng/ml)
Gesunde Kontrollgruppe	78,2 (41,6 ;89,7) [34,8 – 147,3] 18
CF-Patienten (Gesamtgruppe)	95,7 (62,3; 130,2) [17,5 – 392,3] 114
CF-Patienten (Kontrollgruppe)	112,1 (55,5; 126,9) [55,5 – 126,9] 15
CF-Patienten (ohne Pulmozyme)	92,4 (59,0; 132,7) [17,5 – 392,3] 72
CF-Patienten (mit Pulmozyme)	96,51 (81,0; 130,5) [37,8 – 253,3] 27

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:

Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

Beim Vergleich der Medianwerte mit dem Kruskal-Wallis-Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der SP-D – Werte zwischen den einzelnen Gruppen.

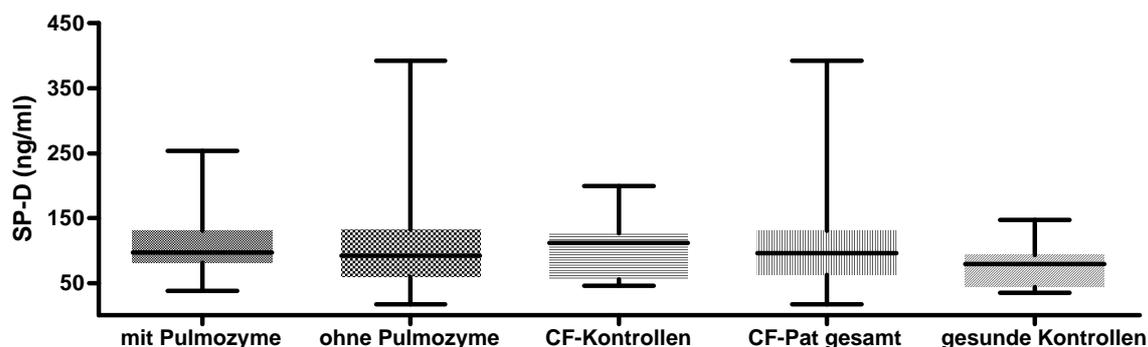


Abb. 3-8: Vergleich der SP-D Werte im Serum bei Patienten mit CF und gesunden Kontrollpatienten (dargestellt sind Median, 25% und 75% Perzentile und Minimal- bzw. Maximalwerte)

Auch die Messwerte von SP-D im Serum von gesunden Kontrollpersonen wurden je nach Altersgruppe getrennt betrachtet.

Hierbei zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied.

Die Werte werden in der folgenden Tabelle aufgelistet und in der Abbildung auch graphisch dargestellt.

Tab. 3-10: Vergleich der SP-D Werte im Serum von gesunden Personen zwischen Kindern und Erwachsenen

Patientengruppe	SP-D Werte (ng/ml)
Kontrollgruppe der Kinder (Altersdurchschnitt: 5,1 Jahre)	57,0 (41,2; 84,5) [35,6 – 119,9] 9
Kontrollgruppe der Erwachsenen (Altersdurchschnitt: 24 Jahre)	79,8 (41,6; 113,4) [34,8 – 147,3] 9

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:

Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

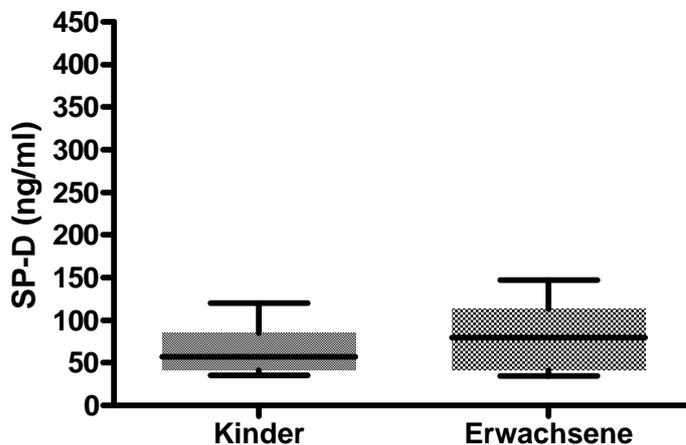


Abb. 3-9: Vergleich der SP-D Werte im Serum bei Kindern und Erwachsenen (dargestellt sind Median, 25% und 75% Perzentile und Minimal- bzw. Maximalwerte)

Es wurden außerdem die Patientengruppen im Hinblick auf Altersabhängigkeiten der Messwerte betrachtet. Auch hier zeigte sich in keiner Patientengruppe ein signifikanter Zusammenhang zwischen den gemessenen SP-D Werten im Serum und in der BAL und dem Alter der Patienten bei der Probenentnahme. Die entsprechenden Korrelationswerte sind im Anhang in den Tabellen A-10 bis A-12 und A-16 bis A-18 dargestellt.

3.3 Zeitlicher Verlauf der Werte bei einigen Patienten

3.3.1 SP-A

Um beurteilen zu können, wie sich die Werte der Surfactantproteine im Laufe der Zeit verändern, wurden bei einigen Patienten die Werte von allen 3 Untersuchungszeitpunkten graphisch dargestellt. Da jedoch nicht von jedem Patienten die Proben von allen 3 Untersuchungszeitpunkten verfügbar waren, konnten teilweise nur sehr kleine Gruppen gebildet werden.

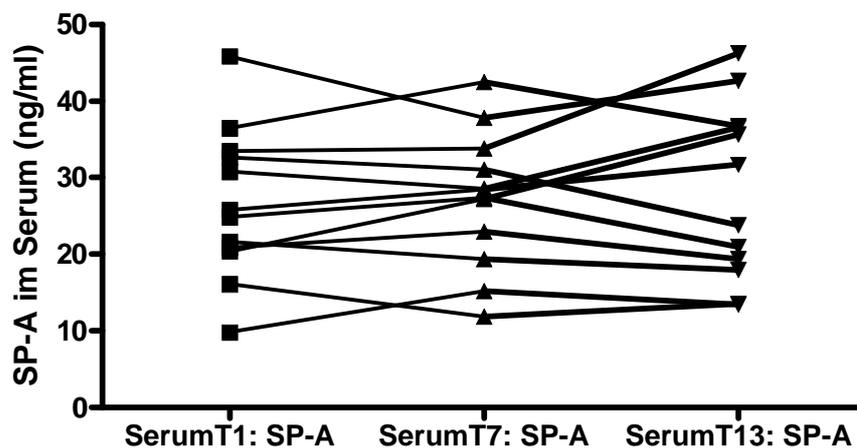


Abb. 3-10: Veränderungen der SP-A Werte im zeitlichen Verlauf bei allen CF-Patienten

Hierbei zeigen sich keine starken Schwankungen in der Höhe der SP-A Werte bei den meisten Patienten. Bei Patienten mit höheren Ausgangswerten werden auch an den nachfolgenden Terminen höhere Werte gemessen als bei Patienten, bei denen sich die Werte über den ganzen Zeitraum hinweg auf einem niedrigeren Niveau bewegen.

Zusätzlich wurden auch die Veränderungen der Werte in den einzelnen Patientengruppen betrachtet. Hierzu wurden die Patienten wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben in 3 Gruppen unterteilt.

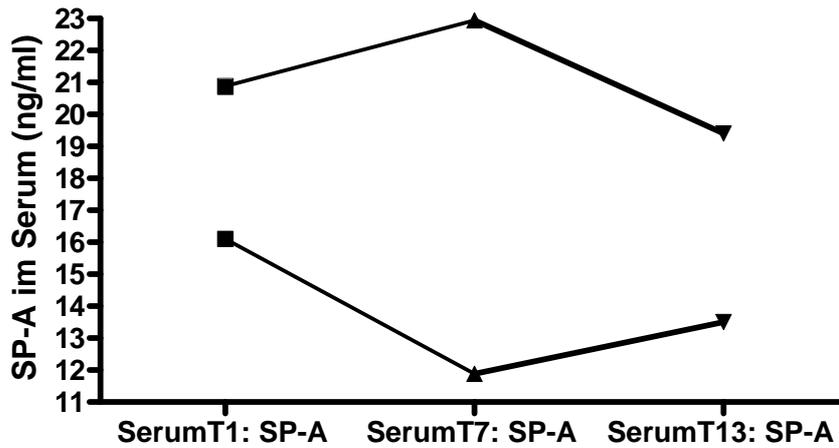
Gruppe ohne Pulmozyme:

Abb. 3-11: Veränderungen der SP-A Werte im zeitlichen Verlauf bei Patienten, die kein Pulmozyme erhalten haben

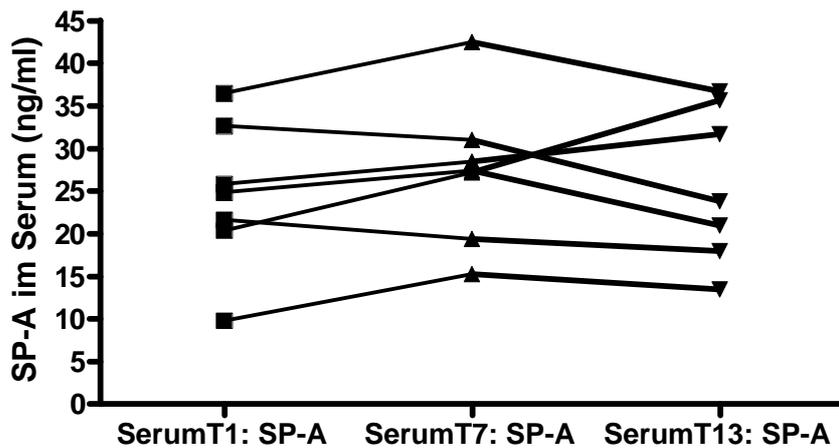
Gruppe mit Pulmozyme:

Abb. 3-12: Veränderungen der SP-A Werte im zeitlichen Verlauf bei Patienten, die Pulmozyme erhalten haben

CF-Kontrollgruppe:

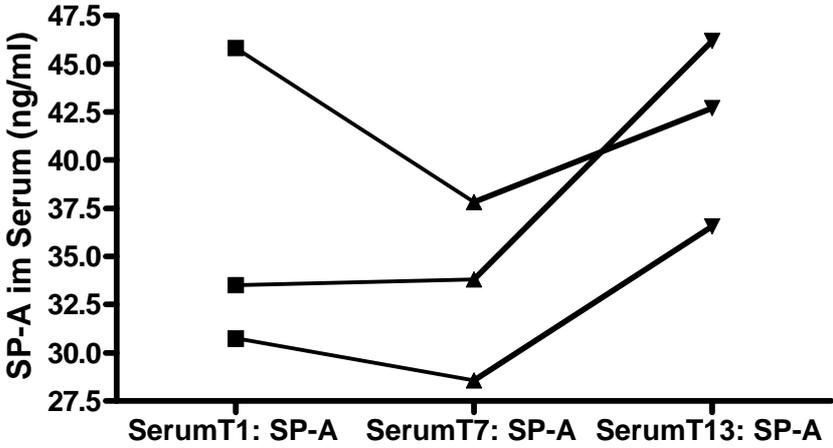


Abb. 3-13: Veränderungen der SP-A Werte im zeitlichen Verlauf bei CF-Kontrollpatienten

3.3.2 SP-D

Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, wurden auch die Veränderungen von Surfactantprotein D im zeitlichen Verlauf betrachtet.

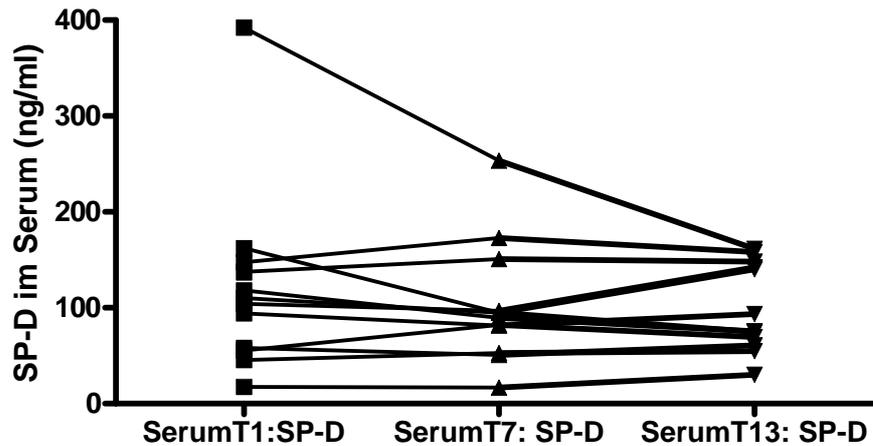


Abb. 3-14: Veränderungen der SP-D Werte im zeitlichen Verlauf bei allen CF-Patienten

Bis auf eine Ausnahme bleiben auch die SP-D Werte bei den einzelnen Patienten auf einer individuell verschiedenen Höhe im Laufe der Zeit fast konstant.

Verlauf der Werte in den einzelnen CF-Gruppen:

Gruppe ohne Pulmozyme:

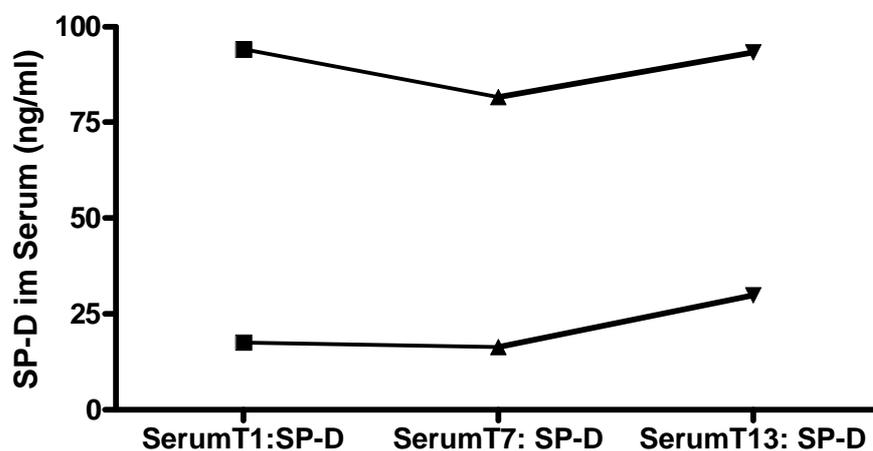


Abb. 3-15: Veränderungen der SP-D Werte im zeitlichen Verlauf bei Patienten, die kein Pulmozyme erhalten haben

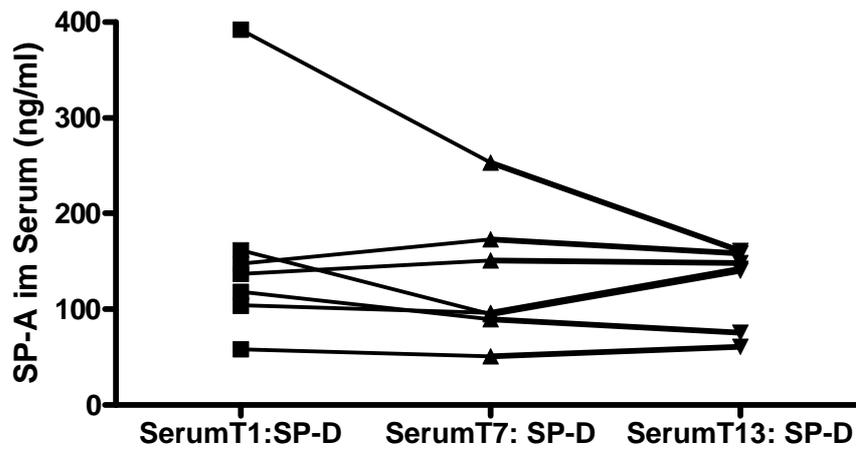
Gruppe mit Pulmozyme:

Abb. 3-16: Veränderungen der SP-D Werte im zeitlichen Verlauf bei Patienten, die Pulmozyme erhalten haben

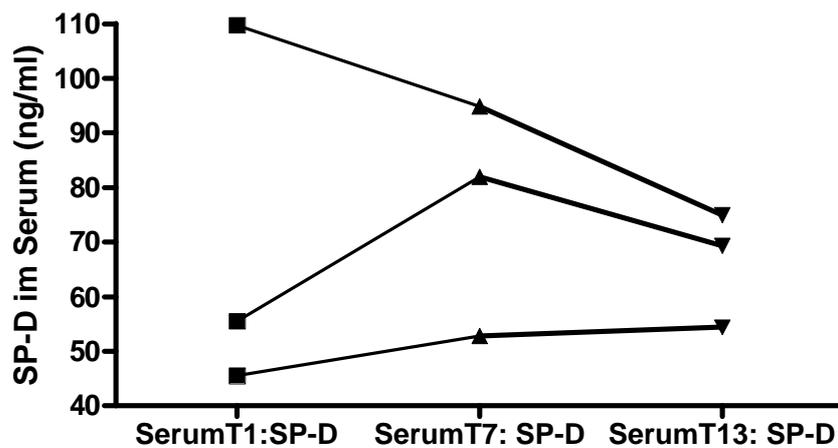
CF-Kontrollgruppe:

Abb. 3-17: Veränderungen der SP-D Werte im zeitlichen Verlauf bei CF-Kontrollpatienten

3.4 Zusammenhang von SP-A und SP-D in Serum und BAL

Außerdem sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Menge an SP-A bzw. SP-D im Serum und in der BAL-Flüssigkeit der Patienten gibt. Hierzu wurden die Messwerte beider Proben vom gleichen Zeitpunkt gegenübergestellt.

Alle berechneten Korrelationen sind im Anhang in Tabellenform in den Tabellen A-7 bis A-18 dargestellt.

Tab. 3-11: SP-A in der BALF bei CF-Patienten und Kontrollen

Patientengruppe	SP-A Werte (ng/ml)
Gesunde Kontrollgruppe	16261 (4801;23541) [181 – 62132] 19
CF-Patienten (Gesamtgruppe)	3850 (2305; 5711) [65 – 21811] 256
CF-Patienten (Kontrollgruppe)	2409 (1631;4180) [372 – 6460] 15
CF-Patienten (ohne Pulmozyme)	4075 (2579;6426) [65 – 21811] 66
CF-Patienten (mit Pulmozyme)	4868 (2805;6874) [298 – 13048] 24

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:

Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

Tab. 3-12: SP-D in der BALF bei CF-Patienten und Kontrollen

Patientengruppe	SP-D Werte (ng/ml)
Gesunde Kontrollgruppe	835 (626 ;1082) [271 – 1180] 16
CF-Patienten (Gesamtgruppe)	578 (370; 872) [76 – 1959] 132
CF-Patienten (Kontrollgruppe)	670 (353; 1165) [93 – 1256] 14
CF-Patienten (ohne Pulmozyme)	536 (356; 850) [76 – 1959] 62
CF-Patienten (mit Pulmozyme)	485 (310; 813) [121 – 1248] 23

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:

Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

Die Werte von SP-A und SP-D, die im Serum gemessen wurden, sind im Abschnitt 3.2 in Tabellenform wiedergegeben.

3.4.1 SP-A in Serum und BAL

Um eine Korrelation der beiden Werte zu zeigen, wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient berechnet. Es handelt sich um eine signifikante Korrelation bei p-Werten, die kleiner als 0,05 sind.

Zusätzlich wurden die Wertepaare graphisch dargestellt.

Auch hierbei wurden wieder alle CF-Patienten erst als Gesamtgruppe betrachtet und anschließend wurden die Patienten je nach Behandlungsart (mit oder ohne Pulmozyme-Gabe) in Gruppen aufgeteilt.

Gesamtgruppe:

Es zeigte sich in der Gesamtgruppe der CF-Patienten keine signifikante Korrelation. Der p-Wert beträgt 0,162.

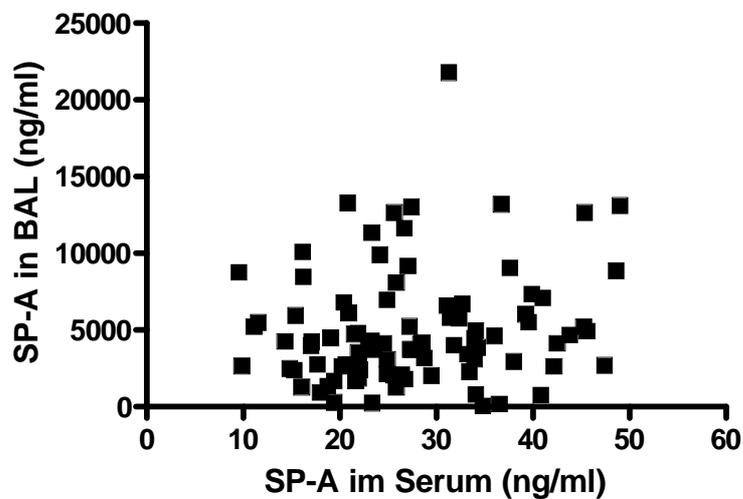


Abb. 3-18: Zusammenhang von SP-A im Serum und in der BAL bei allen Patienten

Patientengruppe ohne Pulmozyme:

Auch bei der Einzelbetrachtung der Patientengruppe, die kein Pulmozyme erhalten hat, zeigt sich keine signifikante Korrelation. ($p=0,8788$)

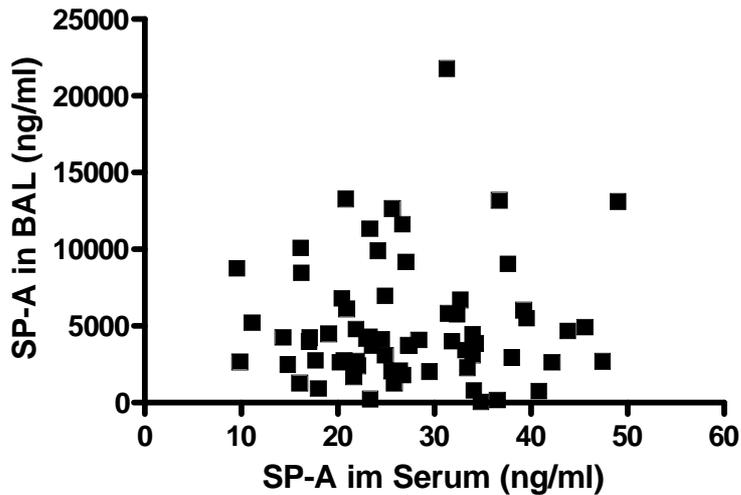


Abb. 3-19: Zusammenhang von SP-A im Serum und in der BAL bei Patienten, die kein Pulmozyme erhalten haben.

Patientengruppe mit Pulmozyme:

In der Gruppe der Patienten, die Pulmozyme zur Therapie erhalten haben, beträgt der berechnete p-Wert 0,0114 und zeigt somit eine signifikante Korrelation der SP-A-Konzentration im Serum und in der BAL bei diesen Patienten.

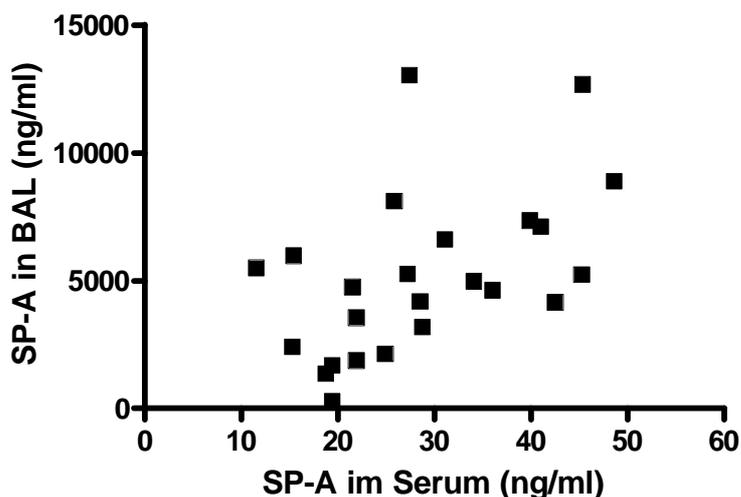


Abb. 3-20: Zusammenhang von SP-A im Serum und in der BAL bei Patienten, die Pulmozyme bekommen haben

Kontrollgruppe:

In der Gruppe der untersuchten Kontrollpatienten konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an SP-A im Serum und in der Bronchoalveolären Lavage gezeigt werden. Der p-Wert beträgt 0,0523.

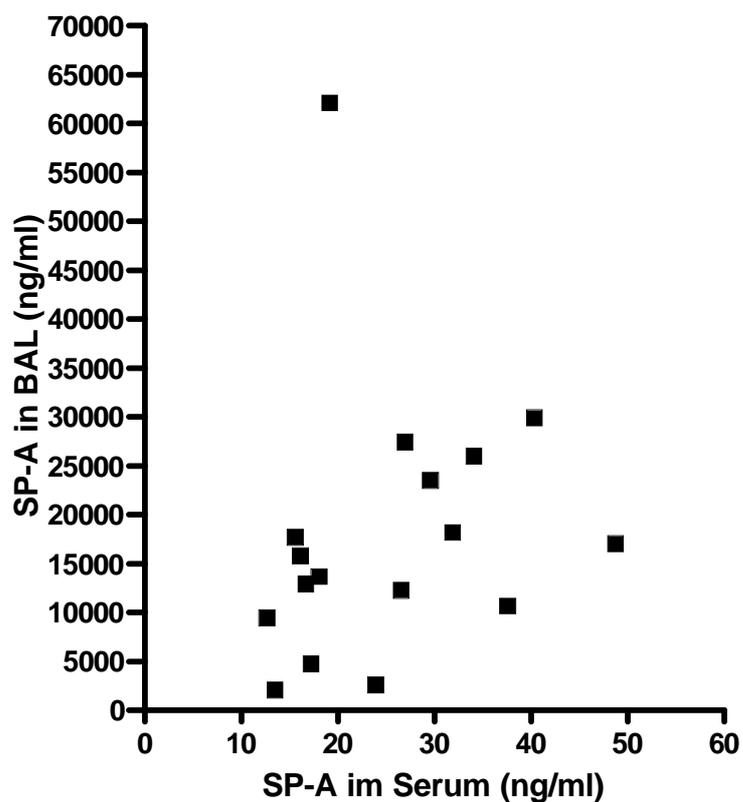


Abb. 3-21: Zusammenhang von SP-A im Serum und in der BAL in der Kontrollgruppe

3.4.2 SP-D in Serum und BAL

Auch der Zusammenhang zwischen den SP-D Messwerten im Serum und in der BAL der Patienten wurde durch graphische Darstellung und die Berechnung von Spearman-Korrelationskoeffizienten verdeutlicht.

Hierbei zeigte sich bei der statistischen Berechnung weder in der Gesamtgruppe noch bei der Betrachtung der beiden Behandlungsgruppen eine signifikante Korrelation.

Gesamtgruppe der CF-Patienten:

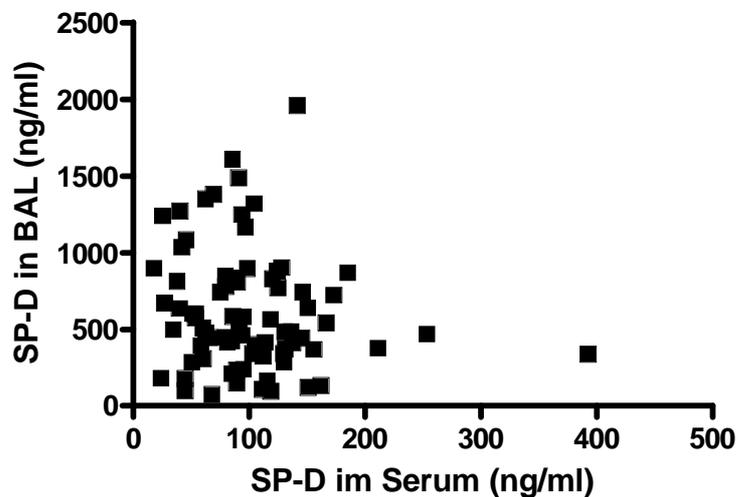


Abb. 3-22: Zusammenhang zwischen SP-D im Serum und in BAL bei allen Patienten

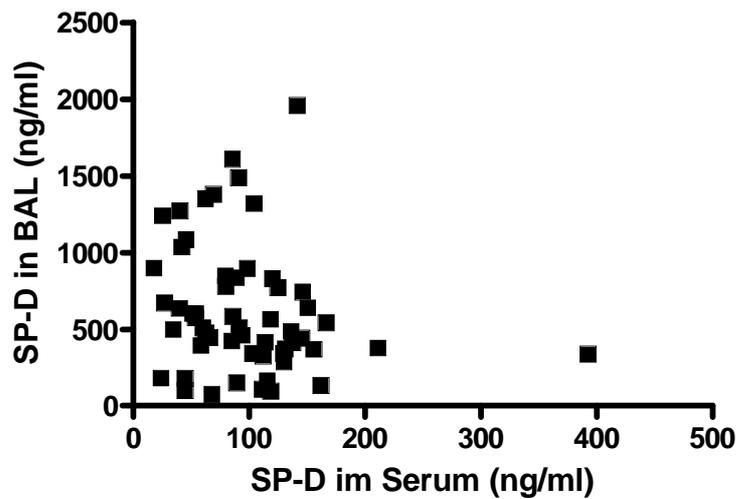
Patientengruppe ohne Pulmozyme:

Abb. 3-23: Zusammenhang von SP-D im Serum und in BAL bei Patienten, die kein Pulmozyme bekommen haben

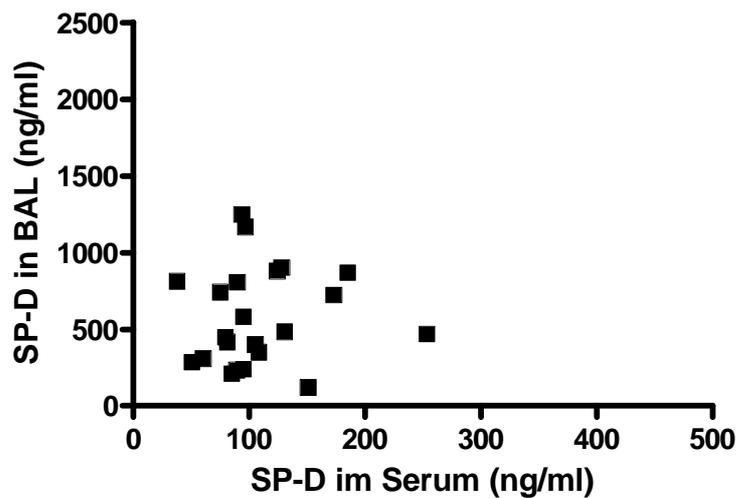
Patientengruppe mit Pulmozyme:

Abb. 3-24: Zusammenhang von SP-D im Serum und in BAL bei Patienten, die Pulmozyme bekommen haben

Kontrollgruppe:

Auch in der Gruppe der Kontrollpersonen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an SP-D im Serum und in der bronchoalveolären Lavage gezeigt werden.

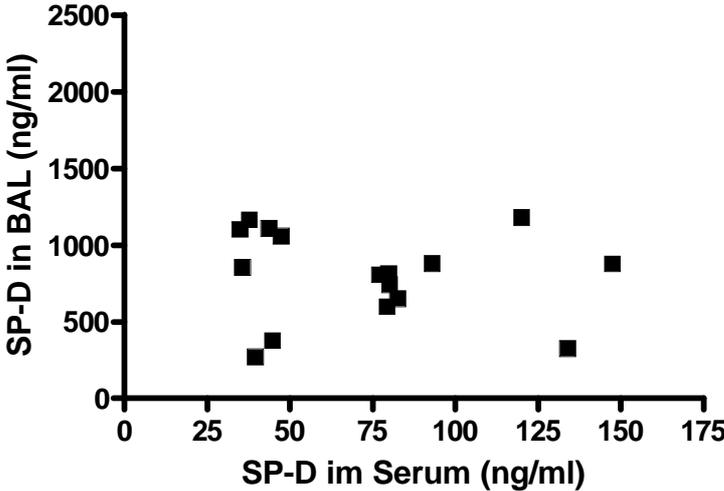


Abb. 3-25: Zusammenhang von SP-D im Serum und in der BAL in der Kontrollgruppe

3.4.3 Zusammenhang zwischen SP-A im Serum und SP-D in der BAL

Es wurde auch untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen den Mengen der verschiedenen Surfactantproteine im Serum und in der BAL gibt.

Gesamtgruppe der CF-Patienten:

In der Gesamtgruppe der CF-Patienten zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an SP-A im Serum und der Menge an SP-D in der Bronchoalveolären Lavage. Der p-Wert beträgt 0,0030.

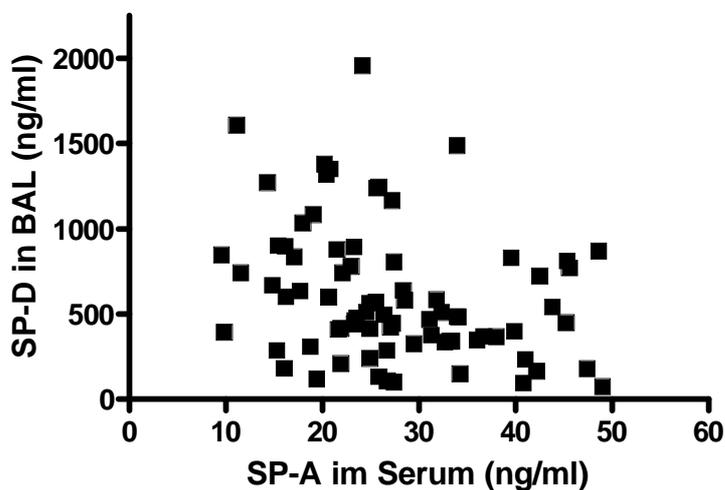


Abb. 3-26: Zusammenhang zwischen SP-A im Serum und SP-D in der BAL bei allen CF-Patienten

Patientengruppe ohne Pulmozyme:

Auch in der Patientengruppe, die kein Pulmozyme erhalten hat, ließ sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an SP-A im Serum und SP-D in der BALF nachweisen ($p < 0,0001$).

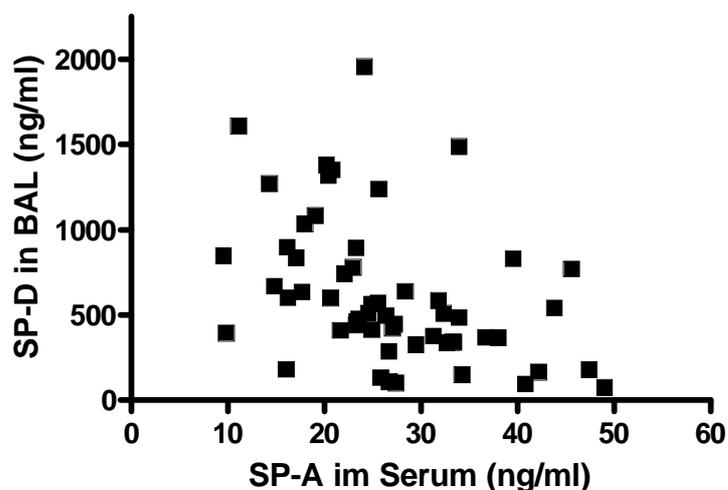


Abb. 3-27: Zusammenhang zwischen SP-A im Serum und SP-D in der BAL in der Gruppe der Patienten, die kein Pulmozyme bekommen haben

In der **Patientengruppe, die Pulmozyme erhalten hat**, und in der **Kontrollgruppe** zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen der Menge an SP-A im Serum und der Menge an SP-D in der BAL.

3.4.4 Zusammenhang zwischen SP-D im Serum und SP-A in der BAL

Weder in der Kontrollgruppe noch in einer der Patientengruppen ließ sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an SP-D im Serum und der Menge an SP-A in der bronchoalveolären Lavage nachweisen.

3.5 Korrelationen von SP-A und SP-D im Serum

Eine weitere Fragestellung war, ob es im Serum von CF-Patienten einen Zusammenhang zwischen der Menge an SP-A und an SP-D gibt.

Auch hierzu wurden die Werte graphisch dargestellt. Zusätzlich wurde wieder der Spearman-Korrelationskoeffizient berechnet.

Gesamtgruppe:

Es zeigt sich eine signifikante Korrelation der beiden Werte. Der p-Wert beträgt 0,0002.

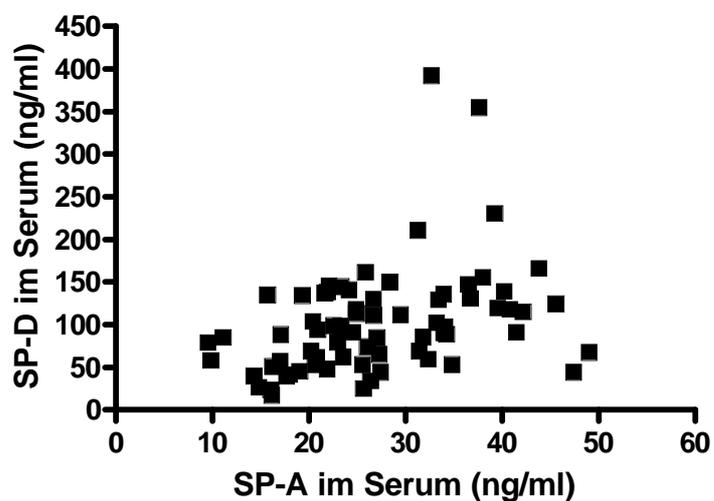


Abb. 3-28: Zusammenhang von SP-A und SP-D im Serum bei allen CF-Patienten

Gruppe ohne Pulmozyme:

Auch in der Gruppe der Patienten, die nicht mit Pulmozyme behandelt wurden, zeigt sich bei einem p-Wert von 0,0002 eine signifikante Korrelation zwischen der Menge an SP-A und SP-D im Serum.

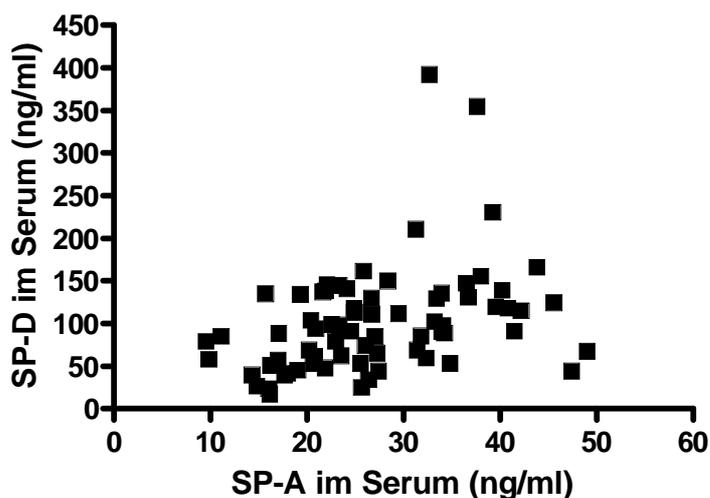


Abb. 3-29: Zusammenhang zwischen SP-A und SP-D im Serum bei Patienten, die kein Pulmozyme erhalten haben

Gruppe mit Pulmozyme:

Nur in der Patientengruppe, die Pulmozyme erhalten hat, beträgt der p-Wert 0,2782 und macht damit deutlich, dass es keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Menge an SP-A und SP-D im Serum dieser Patienten gibt.

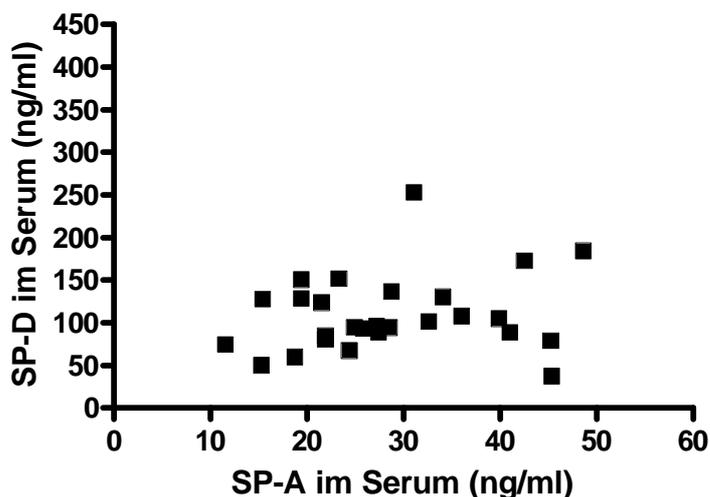


Abb. 3-30: Zusammenhang zwischen SP-A und SP-D im Serum bei den Patienten, die Pulmozyme erhalten haben

Kontrollgruppe:

Auch in der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an SP-A und SP-D im Serum gezeigt werden.

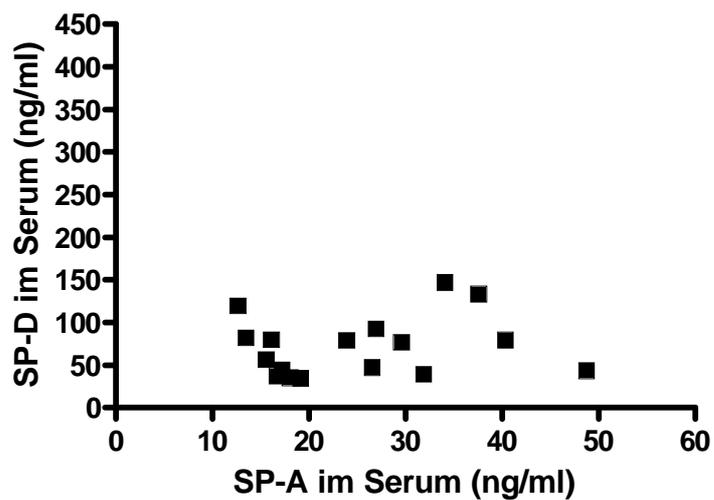


Abb. 3-31: Zusammenhang zwischen SP-A und SP-D im Serum in der Kontrollgruppe

3.6 Zusammenhang zwischen der Menge an Surfactantproteinen im Serum und den Lungenfunktionswerten der Patienten

Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Konzentration an Surfactantproteinen im Serum und den Lungenfunktionswerten von CF-Patienten gibt, wurden die gemessenen Werte von SP-A und SP-D im Serum mit den ermittelten Lungenfunktionsparametern vom gleichen Zeitpunkt verglichen.

Ein eventueller Zusammenhang wurde durch die Berechnung des Spearman-Korrelationskoeffizienten untersucht.

Diese Werte konnten nur für die Patientengruppen berechnet werden, da von den gesunden Kontrollpersonen keine Lungenfunktionswerte vorlagen.

3.6.1 FEV 1 (% des Sollwertes)

Die forcierte Expiration in der ersten Sekunde (FEV1-Wert) wurde, wie in Abschnitt 2.1.1 dargestellt, in Prozent des Sollwertes umgerechnet. Der Sollwert ergibt sich für die einzelnen Patienten aus der Körpergröße.

Diese berechneten Werte wurden mit den gemessenen Werten von SP-A und SP-D im Serum verglichen.

Surfactantprotein A:

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an SP-A im Serum und der Höhe der FEV1 Werte gezeigt werden.

Die Ergebnisse in den einzelnen Patientengruppen werden im Folgenden graphisch dargestellt.

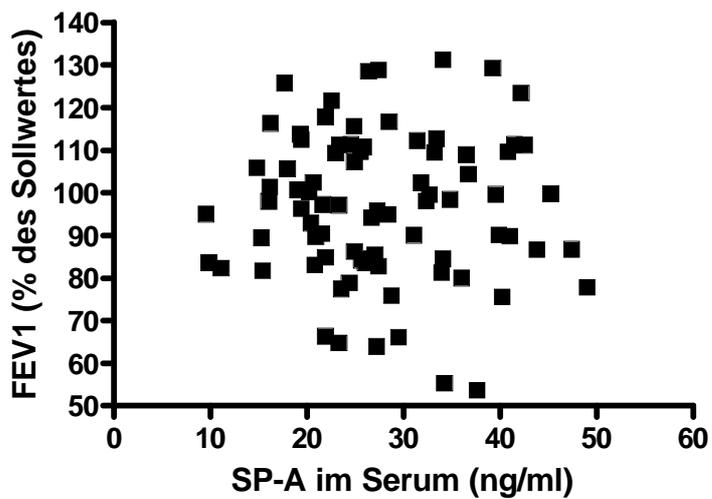
Gesamtgruppe:

Abb. 3-32: Zusammenhang von SP-A im Serum und FEV1 bei allen Patienten

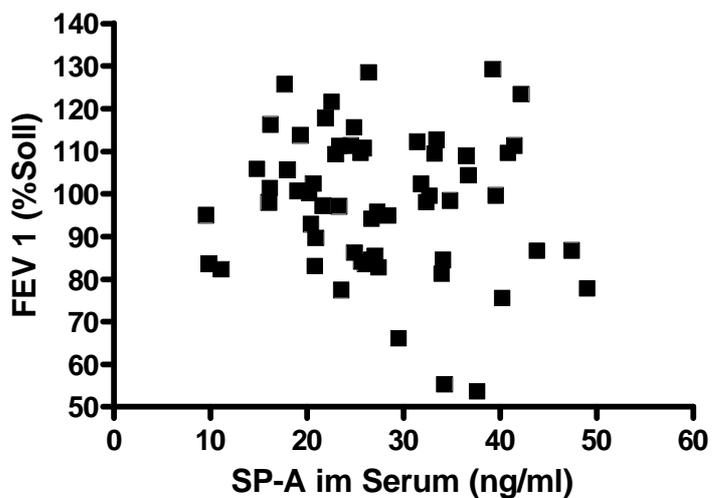
Gruppe ohne Pulmozyme:

Abb. 3-33: Zusammenhang zwischen SP-A im Serum und FEV1 bei Patienten, die kein Pulmozyme erhalten haben

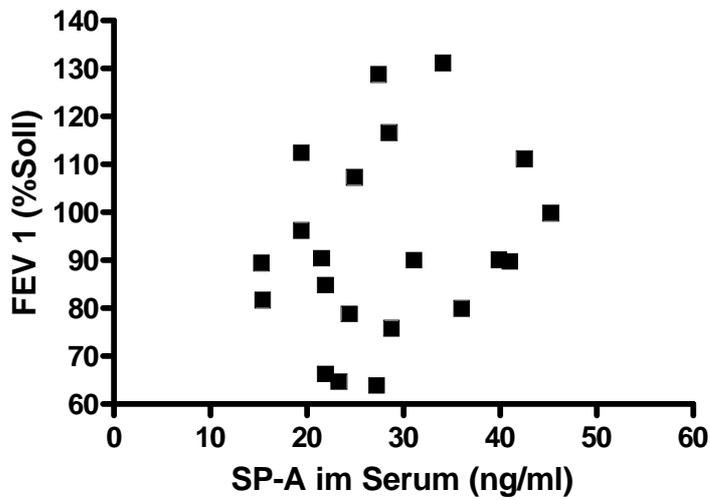
Gruppe mit Pulmozyme:

Abb. 3-34: Zusammenhang zwischen SP-A im Serum und FEV1 bei Patienten, die Pulmozyme erhalten haben

Surfactantprotein D:

Auch zwischen den Messwerten von SP-D im Serum und den FEV1 Werten in der Lungenfunktion konnte in keiner Patientengruppe ein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden.

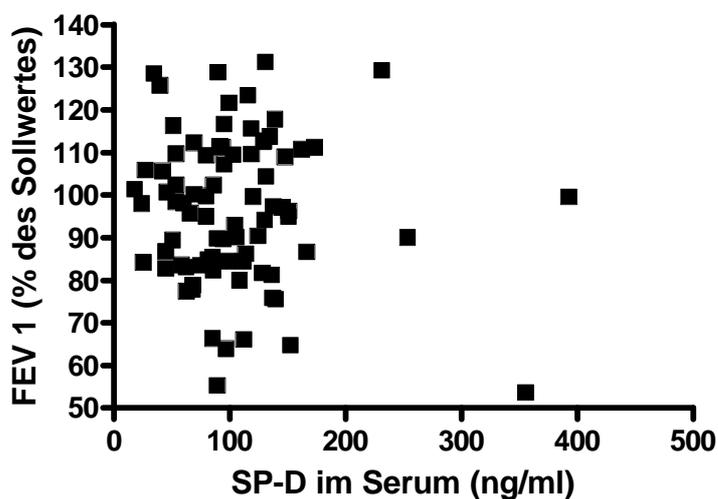
Gesamtgruppe:

Abb. 3-35: Zusammenhang zwischen SP-D im Serum und FEV1 bei allen Patienten

Gruppe ohne Pulmozyme:

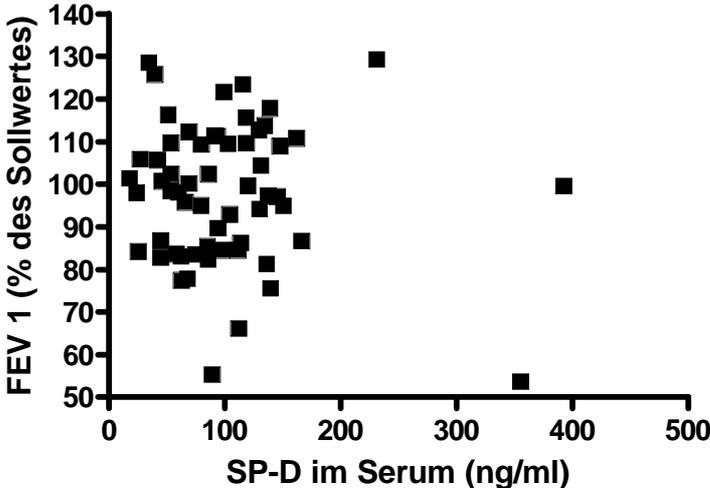


Abb. 3-36: Zusammenhang zwischen SP-D im Serum und FEV1 bei Patienten, die kein Pulmozyme erhalten haben

Gruppe mit Pulmozyme:

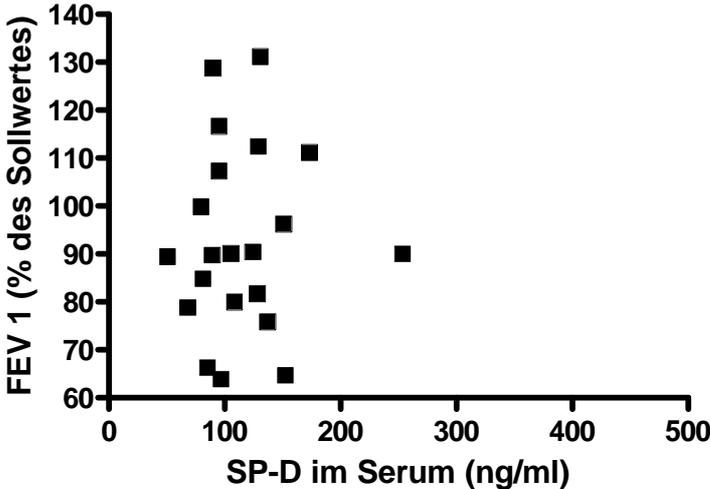


Abb. 3-37: Zusammenhang zwischen SP-D im Serum und FEV1 bei Patienten, die Pulmozyme erhalten haben

3.6.2 Andere Werte der Lungenfunktion

Es wurde auch untersucht, ob sich zwischen einigen anderen Lungenfunktionsparametern und den Serumkonzentrationen von SP-A und SP-D ein Zusammenhang finden lässt.

Hierzu wurden folgende Lungenfunktionswerte betrachtet: die forcierte Vitalkapazität (FVC), der maximale expiratorische Flow zwischen der Entleerung von 25% und 75% der Vitalkapazität (MEF 75/25) und der maximale expiratorische Flow bis zu 25% Entleerung der Vitalkapazität (MEF 25). Diese Werte wurden wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben in Prozent ihres Sollwertes umgerechnet und mit Hilfe des Spearman-Korrelationskoeffizienten mit den entsprechenden Werten von SP-A und SP-D im Serum verglichen.

Es zeigte sich hierbei nur in einer Patientengruppe ein signifikanter Zusammenhang: In der Gruppe der Patienten, die Pulmozyme bekommen haben, besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an SP-A im Serum und dem Lungenfunktionswert MEF25. Der p-Wert beträgt 0,0226.

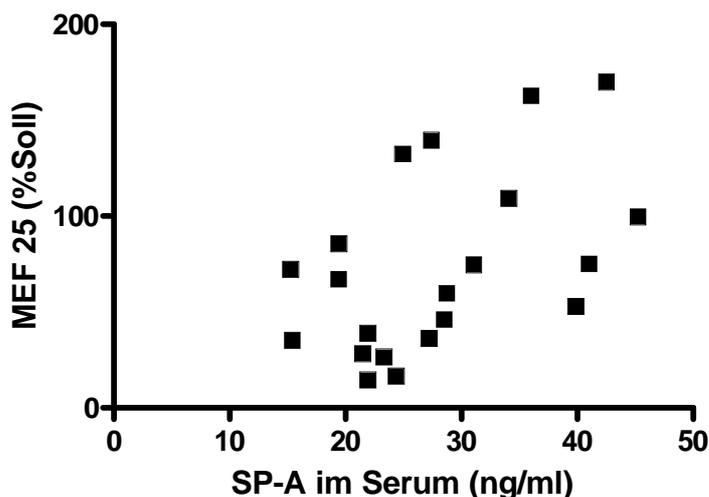


Abb. 3-38: Zusammenhang zwischen SP-A im Serum und MEF 25 bei den Patienten, die Pulmozyme bekommen haben

3.7 Zusammenhang von SP-A und SP-D Werten im Serum mit klinischen Parametern der Patienten

Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen den Konzentrationen an SP-A und SP-D im Serum und einigen Patientendaten gibt, wurden das Alter, der Body-Mass-Index (BMI) und das Geschlecht der Patienten mit den gemessenen Werten verglichen.

Auch hier wurden die gerade genannten Werte und die SP-A und D Werte mit Hilfe des Spearman-Korrelationskoeffizienten miteinander verglichen.

Nur in der Patientengruppe, die kein Pulmozyme erhalten hat, zeigte sich ein schwacher signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration an SP-A im Serum und dem Geschlecht. Bei den männlichen Patienten findet man mehr SP-A im Serum als bei den weiblichen Patienten. Der p-Wert dieser Korrelation beträgt 0,0372.

In allen anderen Patientengruppen, ließ sich mit Hilfe des Spearman-Korrelationskoeffizienten kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Werten von SP-A und SP-D im Serum und den betrachteten Parametern nachweisen.

In der Gruppe der betrachteten Kontrollpersonen fiel ein Zusammenhang zwischen der Menge an SP-A im Serum und dem Alter der Kontrollpersonen auf. Dieser Zusammenhang wurde bereits in Abschnitt 3.2.1 betrachtet und in Abbildung 3-6 graphisch dargestellt.

3.8 Zusammenhang von Serumwerten der Surfactantproteine mit Messwerten im Blut und in der BAL der Patienten

In den Patientengruppen wurde weiterhin betrachtet, ob es Zusammenhänge zwischen den gemessenen SP-A und SP-D Werten im Serum und anderen Blutwerten der Patienten gibt. Außerdem wurden z.B. Zellzahlen in der gewonnenen BAL bestimmt. Auch hier wurde untersucht, ob ein Zusammenhang mit der Menge an Surfactantproteinen im Serum besteht.

Alle betrachteten und berechneten Werte sind im Anhang in den Tabellen A-7 bis A-12 dargestellt.

In der Gruppe der Kontrollpersonen konnten diese Untersuchungen nicht durchgeführt werden, da die entsprechenden Messwerte aus Blut- und Lavageuntersuchungen nicht vorliegen.

3.8.1 SP-A und SP-D und der Zusammenhang mit Entzündungsparametern (CRP und IL 8)

Es zeigte sich sowohl bei SP-A und SP-D ein Zusammenhang zwischen der Höhe der gemessenen Werte und den im Blut bestimmten Entzündungsparametern. Allerdings konnte dieser Zusammenhang nicht durchgehend in allen Patientengruppen gezeigt werden.

Gesamtgruppe:

In der Gesamtgruppe der Patienten zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der gemessenen Menge an SP-A und dem im Blut bestimmten Entzündungsparameter Interleukin 8 (IL 8). Der p-Wert dieser Korrelation beträgt 0,0023.

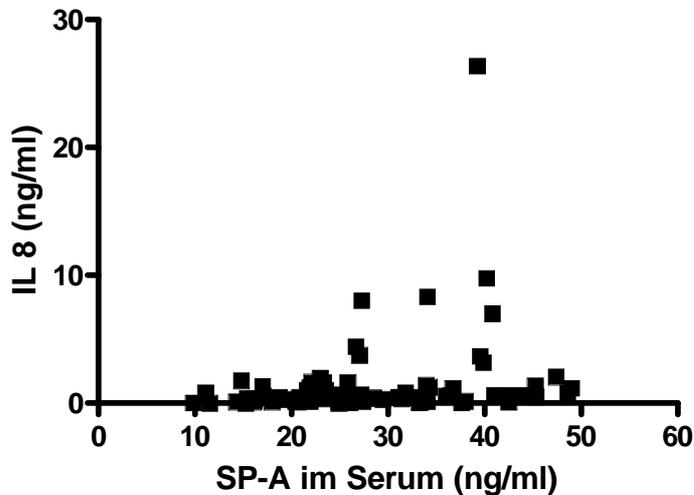


Abb. 3-39: Zusammenhang zwischen SP-A im Serum und IL 8 in der Gesamtgruppe der Patienten

Zwischen der Menge an SP-D und der IL 8 Menge ließ sich in der Gesamtgruppe der Patienten kein Zusammenhang nachweisen.

Gruppe ohne Pulmozyme:

Auch in der Patientengruppe, die kein Pulmozyme bekommen hat, fiel ein signifikanter Zusammenhang zwischen der SP-A Menge und der IL 8 Menge im Serum auf.

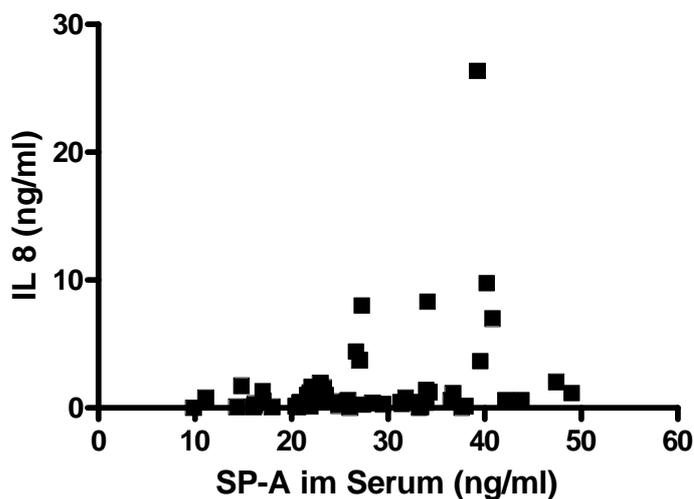


Abb. 3-40: Zusammenhang zwischen SP-A im Serum und IL 8 in der Patientengruppe, die kein Pulmozyme erhalten hat

Auch in dieser Gruppe war ein signifikanter Zusammenhang nur bei den SP-A Werten sichtbar. Zwischen SP-D im Serum und IL 8 trat kein statistisch signifikanter Zusammenhang auf.

Gruppe mit Pulmozyme:

In der Gruppe der Patienten, die Pulmozyme bekommen haben, war keine Korrelation zwischen den SP-A bzw SP-D Mengen und der Menge an IL 8 zu erkennen. Allerdings fiel in dieser Patientengruppe ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an SP-D im Serum und den im Blut gemessenen CRP Werten auf. Der p-Wert dieser Korrelation beträgt 0,0043.

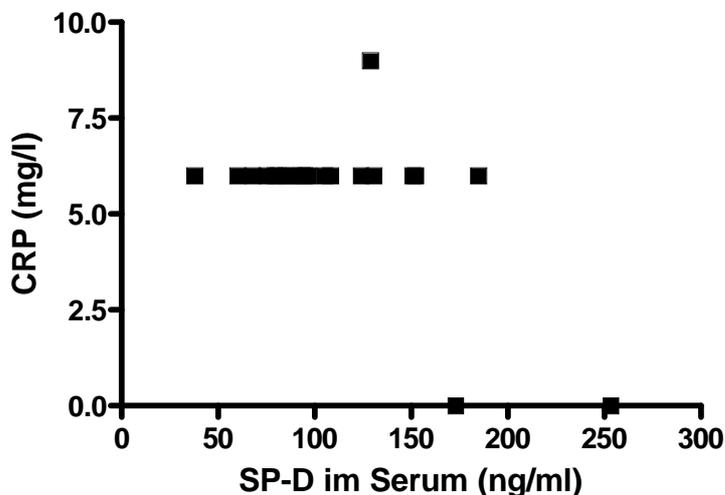


Abb. 3-41: Zusammenhang zwischen SP-D im Serum und CRP im Blut in der Patientengruppe, die Pulmozyme bekommen hat

Da die CRP Werte jedoch bei einigen Studienzentren in Stufen angegeben wurden, liegt ein Großteil der Werte auf einer Linie, so dass dieser errechnete Zusammenhang wohl kritisch zu betrachten ist.

3.8.2 Zusammenhang zwischen SP-A und SP-D im Serum und der Zellzahl in der Bronchoalveolären Lavage

Bei der Betrachtung von eventuellen Zusammenhängen in den Patientengruppen, kann kein Zusammenhang zwischen der Menge an gemessenem SP-D im Serum und der bestimmten Zellzahl in der BAL festgestellt werden.

Auch die SP-A Werte korrelieren nur in zwei der betrachteten Patientengruppen mit der Menge der Zellen in der BAL. In der Gruppe der Patienten, die Pulmozyme bekommen haben, lässt sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zeigen.

Gesamtgruppe:

Der berechnete p-Wert beträgt in dieser Patientengruppe 0,0199.

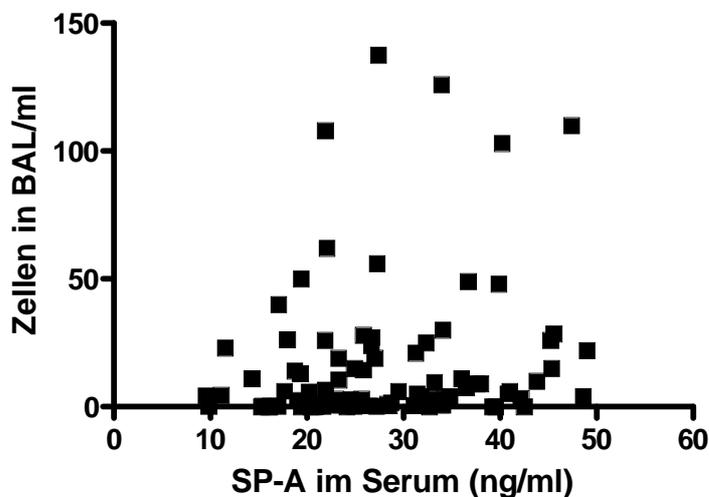


Abb. 3-42: Zusammenhang zwischen Menge an SP-A im Serum und Zellzahl in der BAL in der Gesamtgruppe der Patienten

Gruppe ohne Pulmozyme:

Auch in der Gruppe der Patienten, die kein Pulmozyme bekommen haben, lässt sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an SP-A im Serum und der Zellzahl in der BAL zeigen. ($p=0,0278$)

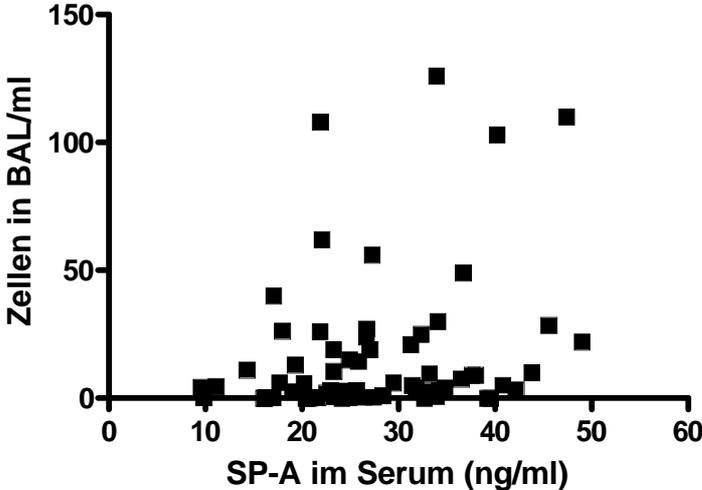


Abb. 3-43: Zusammenhang zwischen Menge an SP-A im Serum und Zellzahl in der BAL in der Patientengruppe, die Pulmozyme erhalten hat

3.9 SP-A und SP-D Werte in der BAL und klinische bzw. Laborparameter der Patienten

Abschließend wurde noch untersucht, ob es untereinander Zusammenhänge gibt zwischen den Werten der Surfactantproteine, die in der BAL gemessen wurden. Außerdem wurden diese gemessenen Werte noch mit einigen klinischen Parametern und Laborparametern der Patienten verglichen. Die genauen Werte der Berechnungen können im Anhang in den Tabellen A-13 bis A-22 betrachtet werden.

3.9.1 Zusammenhang zwischen SP-A und SP-D in der Bronchoalveolären Lavage

In allen drei Patientengruppen wurde hier ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an SP-A und der Menge an SP-D, die sich in der BAL befinden, nachgewiesen.

Nur in der Gruppe der betrachteten gesunden Kontrollpersonen konnte keine signifikante Korrelation gezeigt werden.

Gesamtgruppe der Patienten:

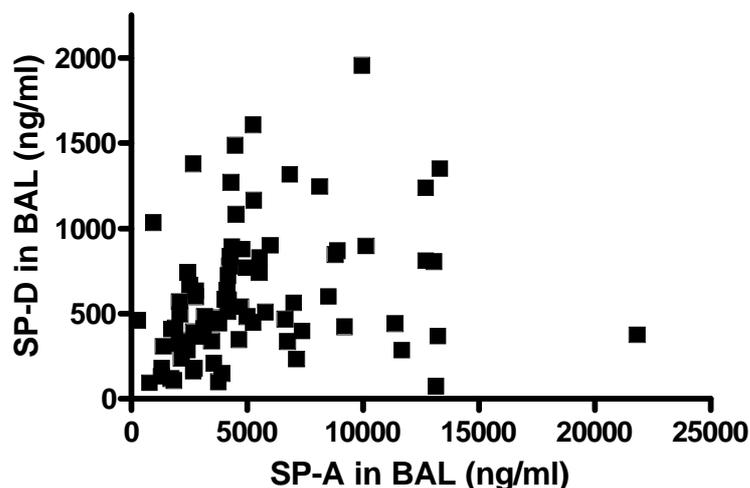


Abb. 3-44: Zusammenhang zwischen SP-A und SP-D in der BAL in der Gesamtgruppe der Patienten ($p=0,0004$)

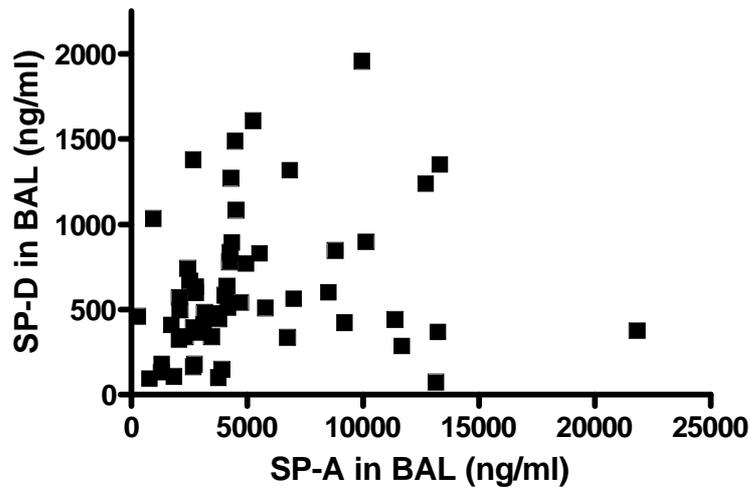
Patientengruppe ohne Pulmozyme:

Abb. 3-45: Zusammenhang zwischen SP-A und SP-D in der BAL in der Patientengruppe, die kein Pulmozyme erhalten hat ($p=0,0154$)

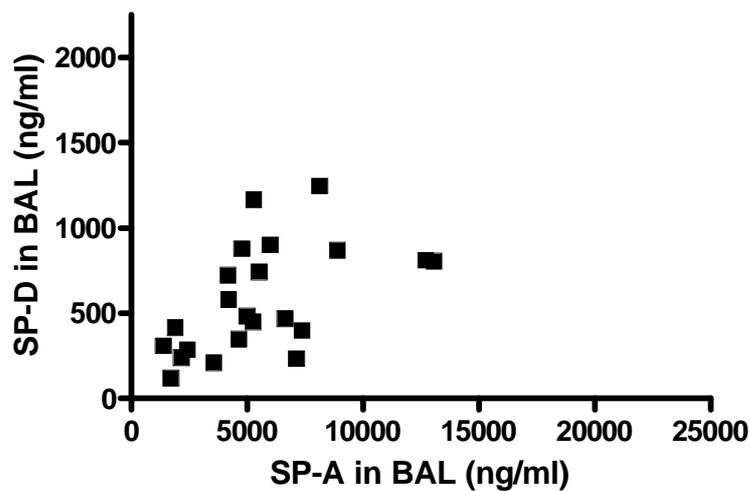
Patientengruppe mit Pulmozyme:

Abb. 3-46: Zusammenhang zwischen SP-A und SP-D in der BAL in der Patientengruppe, die Pulmozyme erhalten hat ($p=0,0035$)

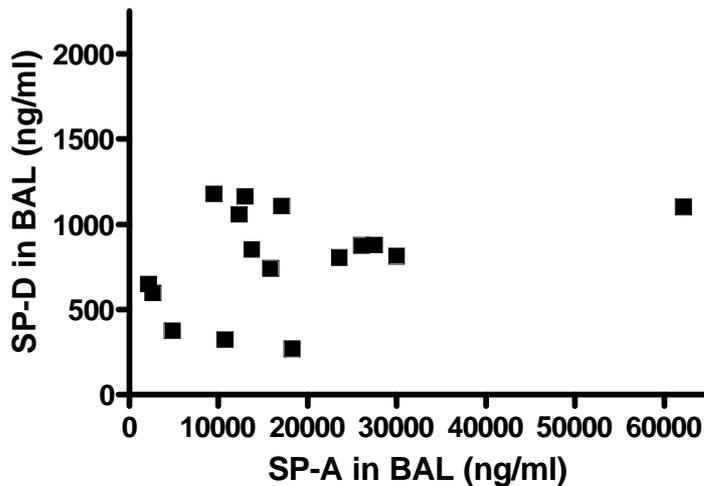
Kontrollgruppe:

Abb. 3-47: Zusammenhang zwischen SP-A und SP-D in der BAL in der Gruppe der Kontrollpersonen ($p=0,2647$), da die SP-A Werte höher lagen als bei den Kontrollgruppen, wurde ein anderer Maßstab für die Abbildung gewählt

Detaillierte Untersuchungen zur Menge an SP-A und SP-D in BAL-Flüssigkeit bei Gesunden und CF-Patienten wurden bereits in einer anderen Arbeit durchgeführt (Griese and others, 2004, 1000-1005) und waren nur am Rande Thema dieser Arbeit.

3.9.2 Zusammenhang zwischen SP-A und SP-D Werten in der BAL und IgM Werten im Blut der Patienten

Wie bereits oben erwähnt wurden auch Zusammenhänge zwischen SP-A bzw SP-D in der BAL und klinischen Parametern bzw. Laborparametern der Patienten betrachtet. Hierzu wurden Spearman-Korrelationskoeffizienten berechnet.

Bei der Betrachtung von klinischen Daten wie Alter, BMI und Geschlecht fiel in keiner der Patientengruppen ein signifikanter Zusammenhang auf.

Auch bei den untersuchten Laborparametern traten kaum statistisch signifikante Korrelationen auf. Nur die Menge an IgM, die im Blut der Patienten bestimmt wurde, scheint im Zusammenhang zu stehen mit der Menge an SP-A bzw SP-D, die in der BAL gemessen wurde. Dieser Zusammenhang wird hier graphisch dargestellt.

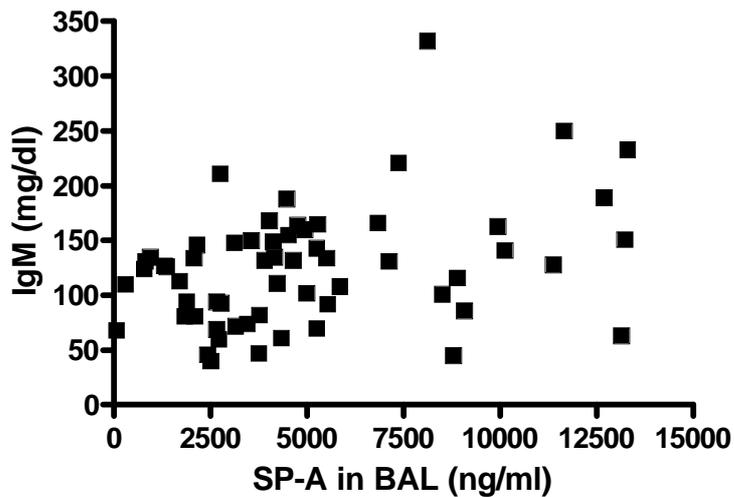
*Surfactantprotein A:***Gesamtgruppe der Patienten:**

Abb. 3-48: Zusammenhang zwischen SP-A in BAL und IgM im Blut in der Gesamtgruppe der Patienten ($p=0,0076$)

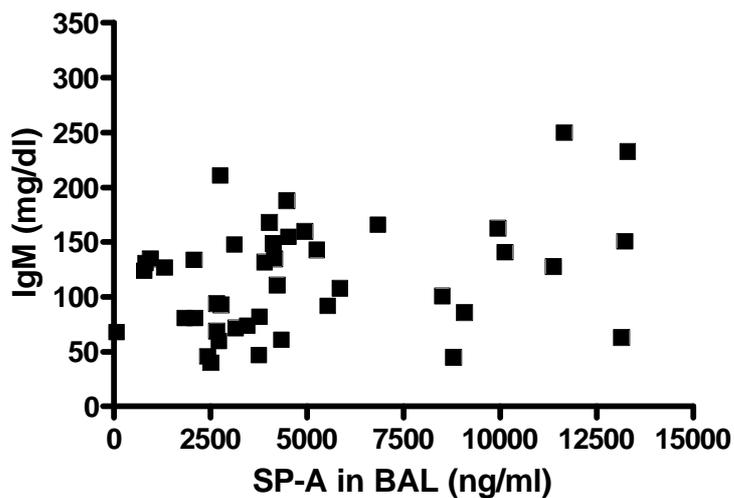
Patientengruppe ohne Pulmozyme:

Abb. 3-49: Zusammenhang zwischen SP-A in der BAL und IgM im Blut in der Patientengruppe, die kein Pulmozyme erhalten hat ($p=0,0235$)

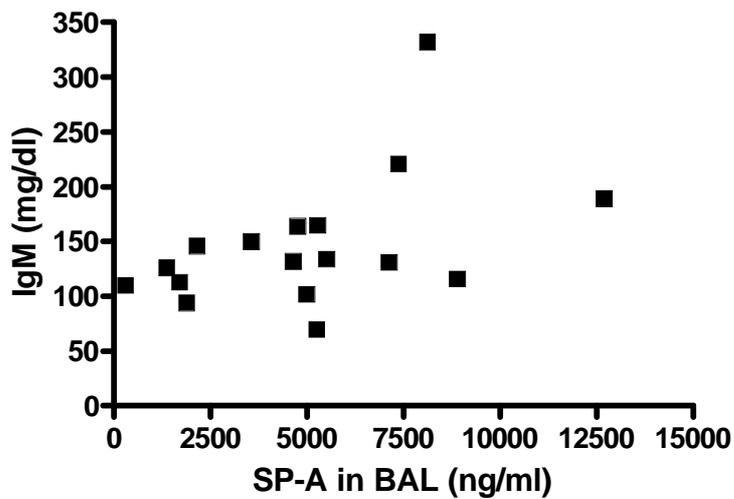
Patientengruppe mit Pulmozyme:

Abb. 3-50: Zusammenhang zwischen SP-A in der BAL und IgM im Blut in der Patientengruppe, die Pulmozyme erhalten hat ($p=0,0421$)

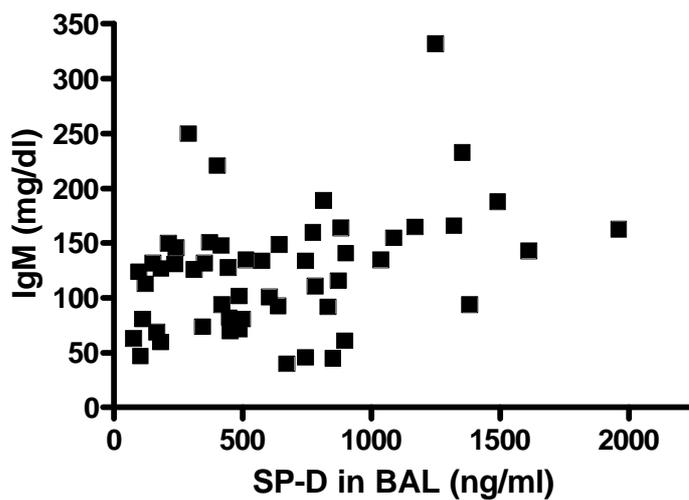
*Surfactantprotein D:***Gesamtgruppe der Patienten:**

Abb. 3-51: Zusammenhang zwischen SP-D in der BAL und IgM im Blut in der Gesamtgruppe der Patienten ($p=0,0087$)

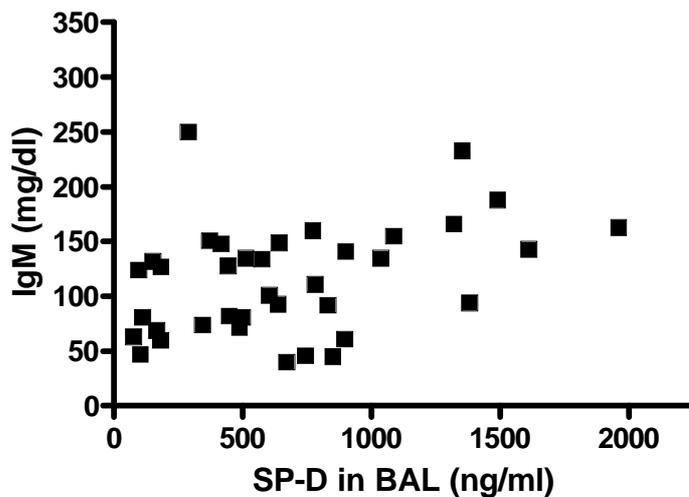
Patientengruppe ohne Pulmozyme:

Abb. 3-52: Zusammenhang zwischen SP-D in der BAL und IgM im Blut in der Patientengruppe, die kein Pulmozyme erhalten hat ($p=0,0191$)

Patientengruppe mit Pulmozyme:

Nur in der Gruppe der Patienten, die kein Pulmozyme erhalten haben, konnte kein Zusammenhang zwischen der Menge an SP-A in der BAL und der Menge an IgM im Blut festgestellt werden. Der p -Wert beträgt hier 0,1800.

Zusammenfassend zeigen diese Korrelationen, dass es wohl einen Zusammenhang zwischen einer Entzündungsreaktion des Körpers und erhöhten Werten von SP-A bzw. SP-D gibt. Da diese Korrelationen jedoch nicht in allen Patientengruppen und nicht in der Kontrollgruppe nachzuweisen waren, müssen hier wohl noch genauere Untersuchungen folgen, um einen wirklichen Zusammenhang zu zeigen. Einige Aussagen zu Surfactantproteinmengen in der BALF und Entzündungsreaktionen wurden bereits in einer anderen Studie gemacht (Griese and others, 2004, 1000-1005).

Die Korrelationen zwischen SP-A bzw. SP-D in der BAL und den Laborparametern konnten nur in den Patientengruppen und nicht in der Kontrollgruppe berechnet werden, da die entsprechenden Messwerte in der Kontrollgruppe nicht vorlagen.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Serum von gesunden Kindern signifikant weniger SP-A vorhanden ist als im Serum von gesunden Erwachsenen. Außerdem zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der SP-A Konzentration zwischen der Gruppe der CF-Patienten und der Kontrollgruppe der Kinder. Die CF-Patienten zeigten höhere SP-A-Konzentrationen.

Bei der Messung von SP-D im Serum konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Gruppen gezeigt werden.

Zwischen der Menge an SP-A bzw SP-D im Serum und der Menge in der BAL-Flüssigkeit konnte kein Zusammenhang gezeigt werden. Allerdings gibt es einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Menge an SP-A und SP-D im Serum.

Auch zwischen den gemessenen Surfactantproteinkonzentrationen und dem klinischen Zustand der Patienten konnte kein deutlicher Zusammenhang nachgewiesen werden.

4.1 Messung mit ELISA

Surfactantprotein A:

Da bisher das Surfactantprotein A mit dem bei uns verwendeten ELISA nur in BAL-Flüssigkeit gemessen werden konnte, musste der bekannte ELISA-Aufbau zunächst verändert werden. Nur so war es möglich, die sehr viel geringeren Konzentrationen der Surfactantproteine im Serum zu messen.

Eine Übersicht über die verschiedenen Versuchsvarianten befindet sich in der Tabelle A-1 im Anhang.

Zunächst wurden unterschiedliche Antikörper zum Coaten der ELISA-Platten verwendet. Allerdings zeigten sich hier keine verbesserten Messwerte gegenüber den bisher verwendeten Antikörpern.

Außerdem wurde eine andere Methode der Detektion getestet. Mit Biotin markierte Antikörper wurden mit Hilfe von Avidin detektiert. Auch hierbei verbesserten sich jedoch die Messwerte nicht.

Die besten Ergebnisse konnten schließlich erzielt werden, indem die gleichen Antikörper und Detektionsverfahren verwendet wurden wie zur Messung von SP-A in

BAL-Flüssigkeit. Allerdings wurden die Proben in einer etwas anderen Art und in anderen Konzentrationsverhältnissen aufgearbeitet. Das Ergebnis von verschiedenen Versuchen mit unterschiedlichen Pufferlösungen und verwendeten Konzentrationsverhältnissen ist in Tabelle 4-1 dargestellt.

Tab. 4-1: Unterschiedliche Probenaufarbeitung zur Messung von SP-A in Serum und BAL

Messung von SP-A in BAL	Messung von SP-A im Serum
<ul style="list-style-type: none"> • 50 µl Probe mit 200 µl Probenpuffer mischen • 1 min Ultraschallbad • 25 µl Triton X 22% zugeben • 10 min bei 10000 g zentrifugieren • Überstand auf Mikrotiterplatte auftragen und 7mal verdünnen 	<ul style="list-style-type: none"> • 100 µl Probe mit 350 µl Probenpuffer mit 1% BSA mischen • 1 min Ultraschallbad • 50 µl Triton X 22% zugeben • 10 min bei 10000 g zentrifugieren • Überstand auf Mikrotiterplatte auftragen und 3mal verdünnen

Um die Reproduzierbarkeit dieses veränderten ELISA zu testen und um Intra- und Inter-Assay-Variabilitäten beurteilen zu können, wurden einige Serumproben mehrfach gemessen.

Bei der mehrfachen Messung einer Probe am gleichen Tag und auf der gleichen ELISA-Platte (Intra-Assay-Variabilität) zeigten sich relativ einheitliche Variationskoeffizienten, die zwischen 0,73% und 10,6% schwankten (siehe Tab. 2-2 im Abschnitt 2.3.1).

Die Messungen von Proben an verschiedenen Terminen (Inter-Assay-Variabilität) zeigten jedoch sehr stark schwankende Variationskoeffizienten, die im Durchschnitt auch deutlich höher lagen als bei der Intra-Assay-Variabilität. Es zeigten sich Werte zwischen 1,32% und 64,61% (siehe Tabelle 2-3 im Abschnitt 2.3.1).

Eine mögliche Erklärung für die stark schwankenden Messwerte bei wiederholten Messungen könnten Veränderungen im Serum sein, die durch wiederholtes Auftauen entstanden sind. Um diesen Effekt zu überprüfen, wurden einige Proben sowohl direkt nach dem Auftauen gemessen, als auch wiederholt aufgetaut und wieder eingefroren und danach gemessen. Allerdings zeigten sich hierbei keine größeren

Unterschiede in der Höhe der gemessenen Werte (siehe Tabelle 2-4 in Abschnitt 2.3.1).

Um eventuell trotzdem vorhandene Effekte auszuschließen, wurden die Serumproben für die weiteren Messungen in kleinen Mengen aliquotiert und nur direkt vor der Messung aufgetaut.

Trotz aller Veränderungen am Versuchsaufbau zeigte sich im Verlauf der Messungen, dass es sich bei der Messung mit diesem ELISA um eine Methode handelt, bei der zwar die Größenordnung einer Konzentration angegeben werden kann, bei der aber eine relativ schlechte Reproduzierbarkeit vorliegt.

Surfactantprotein D:

Die Messungen von SP-D erfolgten mit Hilfe eines ELISA-Kits der Firma Yamasa Corporation. Um bei jedem Versuch die Güte der Messung zu überprüfen, wurden jeweils mitgelieferte Kontrollproben (H, M, L) in verschiedenen Konzentrationsbereichen verwendet. Hierbei zeigte sich, dass bei jedem Versuch mindestens 2 der 3 Kontrollproben im vorgeschriebenen Konzentrationsbereich lagen.

Bei der Reproduzierbarkeit der Messungen zeigten sich bessere Werte als beim oben beschriebenen ELISA für SP-A. Beim Berechnen der Intra-Assay-Variabilität erhielt man einen Variationskoeffizienten von 2,2% und auch der Variationskoeffizient der Inter-Assay-Variabilität betrug nur 9,8% (vgl. Tabelle 2-6 und 2-7 in Abschnitt 2.3.2).

4.2 Vergleiche der Messungen bei Gesunden in verschiedenen Arbeitsgruppen

Wenn man die gemessenen Konzentrationen der Surfactantproteine A und D im Serum von gesunden Personen betrachtet, wird deutlich, dass die gemessene Höhe auch stark zwischen den verschiedenen Labors schwankt.

4.2.1 SP-A Normalwerte

So wurden zum Beispiel bei gesunden erwachsenen Personen in der Arbeit von Doyle et al in Adelaide, Australien, Konzentrationen von durchschnittlich 175 ng/ml SP-A im Serum gemessen (Doyle, Nicholas, and Bersten, 1995, 307-317).

Bei einer japanischen Arbeitsgruppe wurden hingegen nur Werte von ca. 45 ng/ml (Kuroki and others, 1993, 723-729) bzw. 30 ng/ml (Kuroki and others, 1998, 334-345; Takahashi and others, 1995a, 213-215) gemessen.

Die von uns gemessenen Werte von durchschnittlich 24 ng/ml in der Gruppe aller Kontrollpersonen und ca. 32 ng/ml in der Gruppe der erwachsenen Kontrollpersonen liegen ungefähr im gleichen Bereich wie die Messungen in den japanischen Arbeiten.

Besonders deutlich wird die Abhängigkeit von der Messmethode bei Daten der Arbeitsgruppe von Greene et al in Denver, USA. Dort wurden 1999 mit einem ELISA, der mit den beiden monoklonalen Antikörpern 9.5 und 22.7 arbeitet, Werte von durchschnittlich nur 14 ng/ml SP-A im Serum gemessen (Greene and others, 1999, 1843-1850; Takahashi and others, 1995d, 213-215). Bei Messungen mit Hilfe eines ELISA des Teijin Institutes in Hino, Japan, wurden jedoch im Jahr 2002 Werte von 40 ng/ml bzw. 22 ng/ml je nach Personengruppe gemessen (Greene and others, 2002, 439-446; Takahashi and others, 1995b, 213-215).

Was jedoch in der Untersuchung von K.E. Greene et al auch deutlich wird ist, dass die Serumkonzentration von SP-A auch von der Bevölkerung oder dem Umfeld, in dem die Personen leben, abhängig sein könnte. Es wurden hier nämlich für eine Personengruppe in Denver (39,6 ng/ml) und eine Gruppe in Iowa (22,2 ng/ml) signifikant unterschiedliche Werte gemessen (Greene and others, 2002, 439-446).

Es wurde bisher jedoch noch nicht weiter untersucht, ob es Unterschiede in der Serumkonzentration von SP-A in verschiedenen Bevölkerungsgruppen gibt.

Außerdem scheint die Serumkonzentration an SP-A auch vom Alter abhängig zu sein.

In einer Studie von Al-Salmi wurden z. B. bei Kindern durchschnittlich Werte von 21 ng/ml gemessen (Al Salmi and others, 2005, 403-407). Die Messung erfolgte hierbei mit einem kommerziell erhältlichem Kit einer japanischen Firma. Dieser Wert liegt etwas unterhalb der oben genannten Messwerte bei Erwachsenen.

Auch bei unseren Messungen fiel auf, dass die Messwerte bei Kindern mit 17 ng/ml SP-A im Serum signifikant niedriger waren als die Messwerte in der Gruppe der Erwachsenen. Da betrug der SP-A Wert im Serum 32 ng/ml.

Allerdings waren die beiden Gruppen in unserer Messung mit jeweils 9 Personen ziemlich klein. Außerdem waren die Altersverteilungen in den Gruppen nicht repräsentativ. In der Gruppe der Erwachsenen waren z. B. nur Personen zwischen 22 und 26 Jahren.

Um genauere Aussagen über die Veränderungen der Serumkonzentration von SP-A in verschiedenen Altersgruppen machen zu können, müssen die Messungen in größeren Gruppen wiederholt werden. Außerdem erscheint es sinnvoll, die Gruppe der Kinder noch einmal in verschiedene Altersstufen zu unterteilen, um weitere Differenzierungen vornehmen zu können.

4.2.2 SP-D Normalwerte

Auch bei der Messung von SP-D im Serum von gesunden Kontrollpersonen wurden je nach Arbeitsgruppe sehr unterschiedliche Werte gemessen.

Die meisten Untersuchungen erfolgten auch hier bei erwachsenen gesunden Personen, so dass sich diese Werte am besten vergleichen lassen.

In einigen japanischen Arbeitsgruppen wurden mit Hilfe eines kommerziell vorhanden Kits Werte von ca. 66 ng/ml gemessen (Ishii and others, 2003, 52-57; Takahashi and others, 1995c, 213-215).

Unsere Werte, die ebenfalls mit einem ELISA-Kit der japanischen Firma Yamasa gemessen wurden, liegen mit einem Durchschnittswert von 79 ng/ml SP-D im Serum auch ungefähr in diesem Bereich.

Wie auch bei der Messung von SP-A beschrieben, findet man in Studien von Greene et al aus den USA sehr unterschiedliche Messwerte. In einer Studie aus dem Jahr 1999 wurde die SP-D Konzentration bei Gesunden mit einem eigenen ELISA-Verfahren gemessen und man erzielte Werte von ca. 9 ng/ml (Greene and others, 1999, 1843-1850). Im Jahr 2002 wurden jedoch mit dem gleichen ELISA Werte von 87 ng/ml und 97 ng/ml je nach Personengruppe gemessen (Greene and others, 2002, 439-446).

Sehr viel höhere Werte wurden von einer dänischen Arbeitsgruppe im Jahr 2003 gemessen. Der Normalwert für SP-D im Serum bei gesunden Erwachsenen liegt hier

bei 743 ng/ml (Leth-Larsen and others, 2003, 29-37). Die Messungen erfolgten nicht mit einem japanischen ELISA-Kit, sondern mit einem selbst erstellten ELISA.

Bei den gerade beschriebenen großen Schwankungen der Werte ist es schwierig festzustellen, ob die Werte bei Kindern höher oder niedriger als bei Erwachsenen sind. In der Studie von Al-Salmi wurde bei Kindern im Durchschnitt ein Wert von 75 ng/ml SP-D im Serum gemessen (Al Salmi and others, 2005, 403-407).

Auch in der Studie von Krane wurde die Konzentration von SP-D im Serum bei Kindern gemessen. Die durchschnittliche Konzentration beträgt 66 ng/ml und befindet sich damit ungefähr im gleichen Bereich wie andere Messungen (Krane and Griese, 2003, 592-595).

Der von uns gemessene Wert lag in der Gruppe der Kinder bei 68 ng/ml und in der Gruppe der Erwachsenen bei 80 ng/ml. Es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Auch hierzu müssen noch Studien mit größeren Personengruppen durchgeführt werden, um genauere Aussagen treffen zu können.

4.3 Surfactantproteine im Serum bei CF-Patienten

Bisher gibt es nur eine Studie, die sich mit der Messung von Surfactantproteinen im Serum bei Patienten beschäftigt, die an Cystischer Fibrose leiden. In der Arbeit von Krane und Griese wurde SP-D bei 11 Patienten gemessen, die an CF erkrankt sind aber keine Zeichen von allergischer bronchopulmonaler Aspergillose zeigen (Krane and Griese, 2003, 592-595). Die durchschnittlich gemessene SP-D Konzentration liegt hier bei 120 ng/ml.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei einer Gruppe von 114 CF-Patienten die SP-D Konzentration im Serum gemessen. Hierbei ließ sich ein durchschnittlicher Wert von 96 ng/ml errechnen.

Die Messung erfolgte in beiden Fällen mit Hilfe eines ELISA-Kits der Firma Yamasa, Japan.

Während in der Arbeit von Krane und Griese ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen und der Gruppe der CF-Patienten festgestellt wurde (Krane and Griese, 2003, 592-595), konnte bei den jetzt

durchgeführten Messungen kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Dies kann zum einen an der jetzt deutlich größeren Messgruppe liegen, aber auch unterschiedliche Krankheitsstadien der betrachteten Patienten könnten für die Konzentrationsunterschiede von SP-D verantwortlich sein.

Zur Serumkonzentration von SP-A bei CF-Patienten liegen bisher noch keine Arbeiten vor. In der hier vorliegenden Arbeit wurde in der Gruppe aller 114 CF-Patienten eine SP-A Konzentration von 26 ng/ml gemessen. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe aller Personen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied mit dem dort gemessen Wert von 24 ng/ml.

Da der Altersdurchschnitt in der Gruppe der CF-Patienten jedoch mit 11,7 Jahren im Kindesalter liegt, wurde die Gruppe der Kontrollpersonen in eine Gruppe der Kinder (jünger als 18 Jahre) und in eine Erwachsenengruppe (älter als 18 Jahre) aufgeteilt.

Beim Vergleich der Kontrollgruppe der Kinder mit der Gruppe der CF-Patienten zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Medianwerte. Die Gruppe der CF-Patienten hatte mit 26 ng/ml eine deutlich höhere SP-A Konzentration im Serum als die Gruppe der Kontrollpersonen im Kindesalter mit einer Konzentration von 17 ng/ml.

Als Grund für das bei CF-Patienten vermehrt vorhandene SP-A im Serum kann das vermehrte Auftreten von chronischen Infektionen bei den Patienten im Gegensatz zu Gesunden angenommen werden. Man nimmt an, dass SP-A bei Patienten mit chronisch vorhandenen Infektionen vermehrt in die Zirkulation gelangt. So konnte z. B. in einer Arbeit gezeigt werden, dass die SP-A Konzentration bei Patienten, die an einer bakteriellen Pneumonie erkrankt waren, im Serum erhöht war (Ohnishi and others, 2002, 378-381).

Interessanterweise wurde in BAL-Flüssigkeit von CF-Patienten eine geringere Menge SP-A gemessen als bei einer Gruppe gesunder Kontrollpersonen (Griese, Birrer, and Demirsoy, 1997, 1983-1988). Als Ursache hierfür wurde eine gestörte Synthese durch die Entzündungsreaktion oder ein Verlust von SP-A durch Bindung an Mukus und andere Bestandteile der Inflammationsreaktion vermutet.

Auch bei Untersuchungen der BAL-Flüssigkeit von CF-Patienten der BEAT-Studie, deren Proben auch hier gemessen wurden, zeigte sich eine signifikant verminderte Konzentration von SP-A in der BALF (Griese and others, 2004, 1000-1005).

Auch SP-D hat eine immunologische Funktion und man konnte zeigen, dass SP-D bei Infektionen vermehrt vorhanden ist (Ohnishi and others, 2002, 378-381). Bei CF-Patienten konnte in einer Studie eine Konzentrationserhöhung an SP-D im Serum gezeigt werden (Krane and Griese, 2003, 592-595).

Ein Grund, warum in der vorliegenden Arbeit keine signifikant erhöhte Konzentration von SP-D im Serum nachgewiesen werden konnte, kann das Erkrankungsstadium der betrachteten Patienten sein. Wie in 2.1.1 beschrieben, zeigten die in die BEAT-Studie aufgenommenen Patienten keine schweren Komplikationen der Cystischen Fibrose und litten zum Untersuchungszeitpunkt nicht an akuten Atemwegsinfektionen.

Dies ist auch eine Erklärung für den sehr geringen und statistisch nicht signifikanten Konzentrationsunterschied an SP-A zwischen gesunden Personen und CF-Patienten in dieser Arbeit.

4.4 Auftreten von Surfactantproteinen im Serum

Nachdem Chida und Mitarbeiter gezeigt hatten, dass die Surfactantproteine auch im Serum vorhanden sind (Chida and others, 1991, 84-89), wurden verschiedene Ursachen diskutiert, die hierbei eine Rolle spielen (Kuroki and others, 1998, 334-345):

Unter der Annahme eines einfachen Konzentrationsgradienten könnten Veränderungen in der Surfactantproduktion von Alveolar-Typ II Zellen bei einem verstärkten Konzentrationsgefälle zu einem vermehrten Übertritt von Proteinen ins Serum führen. Dies könnte z. B. bei der Erkrankung der Pulmonalen Alveolarproteinose der Fall sein, bei der sowohl in BAL-Flüssigkeit als auch im Serum erhöhte Werte der Surfactantproteine nachgewiesen wurden (Honda and others, 1993, 496-499; Honda and others, 1995, 1860-1866; Kuroki and others, 1993, 723-729).

Auch eine verminderte Clearance von Surfactantproteinen aus dem Blutkreislauf bei entzündlichen Erkrankungen wird als Ursache angenommen.

Die wichtigste Rolle spielt aber wohl eine verstärkte Durchlässigkeit der Lungengefäße, was zu einem vermehrten Übertritt von Surfactantproteinen aus dem Alveolarraum ins Serum führt.

In einem Experiment von Robertson et al wurde bei Kaninchen ein Übertritt von SP-A aus den Alveolen ins Serum gezeigt (Robertson and others, 1995, 185-190).

Der Übertritt von Proteinen ins Serum geschieht entweder direkt über die Luft-Blut-Grenze oder die Surfactantproteine können auch durch lymphatische Drainage ins venöse System gelangen (Hermans and Bernard, 1999, 646-678).

Bei bestimmten Krankheiten, z.B. bei ARDS, ist die Luft-Blut-Grenze durchlässiger, was zu einer deutlich erhöhten Konzentration von SP-A und SP-D im Serum dieser Patienten führt (Greene and others, 1999, 1843-1850).

4.5 Korrelationen zwischen Serumkonzentrationen und anderen Patientendaten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war festzustellen, ob Zusammenhänge zwischen den Werten von SP-A und SP-D im Serum und in der BALF der Patienten bestehen. In der von uns betrachteten Patientengruppe zeigte sich hierbei jedoch weder bei SP-A noch bei SP-D eine statistisch signifikante Korrelation.

In bisher vorliegenden Untersuchungen zeigten sich verminderte Surfactantproteinkonzentrationen in der BAL-Flüssigkeit bei CF-Patienten (Griese, Birrer, and Demirsoy, 1997, 1983-1988) und eine erhöhte Konzentration im Serum, direkte Lavage-Serum-Paare sind jedoch bisher nicht untersucht worden. Die in der Gruppe der CF-Patienten aufgrund der oben genannten Daten erwartete negative Korrelation konnten wir jedoch nicht nachweisen. Allerdings handelte es sich bei den hier untersuchten Patienten um klinisch stabile Patienten mit einer normalen Lungenfunktion, so dass wahrscheinlich aus diesem Grund die Konzentrationsunterschiede zu gesunden Personen recht gering und statistisch nicht signifikant waren.

Allerdings zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine positive Korrelation zwischen der Menge an SP-A im Serum und der Menge an SP-D im Serum. Dies weist darauf hin, dass die beiden Surfactantproteine wohl funktionell in ähnlicher Weise im Serum reguliert werden könnten.

Eine Erklärung könnte auch eine individuell verschiedene Höhe der Surfactantproteinkonzentration sein, die sich auf beide hydrophile Surfactantproteine bezieht. Dies wird in den hier durchgeführten Verlaufsbeobachtungen bei einigen

Patienten (siehe Abschnitt 3.3) deutlich. Ein individuell unterschiedliches Niveau der Surfactantproteinkonzentration liegt vor und das ändert sich auch im Zeitverlauf kaum. Dies könnte mit genetisch determinierten Variationen zusammenhängen und wird zur Zeit untersucht. Eine Kreuzreaktion der Antikörper zwischen beiden Proteinen scheidet aus, wie Vorexperimente mittels Western-Blotting gezeigt haben.

Auch bei der Untersuchung der Korrelationen zwischen den Serumkonzentrationen von SP-A und SP-D und den zugehörigen Lungenfunktionswerten der CF-Patienten konnten in dieser Arbeit keine statistisch signifikanten Korrelationen festgestellt werden. In der Arbeit von Krane und Griese (Krane and Griese, 2003, 592-595) konnte zwar eine positive Korrelation zwischen SP-D im Serum und den einigen Lungenfunktionswerten (forcierte Vitalkapazität und FEV1) festgestellt werden. Allerdings war diese Korrelation nur bei CF-Patienten vorhanden, die zusätzlich an ABPA erkrankt waren und deswegen schlechtere Lungenfunktionswerte zeigten. Die in die BEAT-Studie aufgenommenen Patienten hatten alle einen FEV1 Wert von mehr als 80% des Sollwertes, zeigten also eine recht gute Lungenfunktion. Außerdem zeigten die Patienten keine starken pulmonalen oder körperlichen Einschränkungen und keine schweren Organmanifestationen der zystischen Fibrose. Es war also zu erwarten, dass die untersuchten Patienten fast altersnormale Lungenfunktionswerte im Verlauf der Studie haben würden. Einen Zusammenhang von veränderten Lungenfunktionswerten und der Konzentration der Surfactantproteine scheint es jedoch nur bei krankhaften Veränderungen der Lunge zu geben, die dann sowohl die Lungenfunktion als auch die Surfactantkonzentration betreffen (Krane and Griese, 2003, 592-595).

Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der gemessenen Menge an SP-A und SP-D im Serum und einigen Patientendaten (z. B. Alter, BMI, Geschlecht) und Laborparametern gibt. Es konnten in der Gruppe der CF-Patienten nur signifikante Korrelationen mit Entzündungsparametern im Blut (CRP, IL 8, IgM) und in der BAL (Zellzahl) nachgewiesen werden. Wie bereits in Abschnitt 4.3 erläutert, scheint also ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Surfactantproteinen im Serum und einer Entzündungsreaktion des Körpers zu bestehen.

4.6 Zukünftige Untersuchungen

Um deutlichere Unterschiede in der Serumkonzentration von Surfactantproteinen bei CF-Patienten und bei gesunden Kontrollpersonen herauszuarbeiten, sollten Messungen bei Patienten durchgeführt werden, die z. B. stärkere pulmonale Einschränkungen zeigen. Außerdem sollten weitere Untersuchungen folgen, um altersspezifische Normalwerte zu bekommen und somit eine bessere Grundlage zum Vergleich mit krankhaft veränderten Werten zu haben.

Um festzustellen, ob man aus der Höhe der Serumkonzentration von SP-A und SP-D Rückschlüsse auf den zukünftigen klinischen Verlauf eines Patienten ziehen kann, werden gerade Lungenfunktionswerte im Langzeitverlauf mit den gemessenen Surfactantproteinkonzentrationen verglichen. Dies wäre eine hilfreiche Anwendungsmöglichkeit der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen im Serum.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen der Surfactantproteine A und D bei Patienten untersucht, die an Cystischer Fibrose leiden.

Hierzu wurden mittels ELISA die Konzentrationen von SP-A und SP-D in der BAL und im Serum der Patienten gemessen. Die Messwerte wurden mit Proben von einer gesunden Kontrollgruppe verglichen.

Die untersuchten Proben wurden während einer Studie gewonnen, bei der einige Patienten mit inhalativer rhDNAse (Pulmozyme) behandelt wurden. Es konnte daher auch untersucht werden, ob sich die Menge an Surfactantprotein A und D je nach Behandlungsart unterscheidet. Außerdem wurden bei einigen Patienten die Konzentrationsveränderungen der Surfactantproteine A und D über einen Zeitraum von 5 Jahren im zeitlichen Verlauf betrachtet.

Es wurde weiterhin untersucht, ob Korrelationen bestehen zwischen der Menge an SP-A und SP-D im Serum und in der BAL-Flüssigkeit.

Außerdem wurde die Konzentration von SP-A und SP-D im Zusammenhang mit dem klinischen Zustand der Patienten betrachtet. Hierzu wurden Korrelationen zwischen SP-A und SP-D im Serum und in der BAL und den Lungenfunktionswerten der Patienten sowie einigen Patientendaten (BMI, Alter und Geschlecht) und Laborparametern berechnet.

Es konnte gezeigt werden, dass im Serum von gesunden Kindern signifikant weniger SP-A vorhanden ist als im Serum von gesunden Erwachsenen. Außerdem zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der SP-A Konzentration zwischen der Gruppe der CF-Patienten und der Kontrollgruppe der Kinder. Die CF-Patienten zeigten höhere SP-A-Konzentrationen.

Bei der Messung von SP-D im Serum konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Gruppen nachgewiesen werden.

Zwischen der Menge an SP-A bzw SP-D im Serum und der Menge in der BAL-Flüssigkeit konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Allerdings gibt es einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Menge an SP-A und SP-D im Serum.

Auch zwischen den gemessenen Surfactantproteinkonzentrationen und dem klinischen Zustand der Patienten konnte kein deutlicher Zusammenhang nachgewiesen werden.

6 Literatur

1. Al Salmi, Q. A., Walter, J. N., Colasurdo, G. N., Sockrider, M. M., Smith, E. O., Takahashi, H., and Fan, L. L., 2005, Serum KL-6 and surfactant proteins A and D in pediatric interstitial lung disease: *Chest*, 127, 403-407.
2. Baumann, U., Mansouri, E., and von Specht, B. U., 2004, Recombinant OprF-OprI as a vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infections 2: *Vaccine*, 22, 840-847.
3. Botas, C., Poulain, F., Akiyama, J., Brown, C., Allen, L., Goerke, J., Clements, J., Carlson, E., Gillespie, A. M., Epstein, C., and Hawgood, S., 1998, Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95, 11869-11874.
4. Bruns, G., Stroh, H., Veldman, G. M., Latt, S. A., and Floros, J., 1987, The 35 kd pulmonary surfactant-associated protein is encoded on chromosome 10: *Hum.Genet.*, 76, 58-62.
5. Chander, A. and Fisher, A. B., 1990, Regulation of lung surfactant secretion: *Am.J.Physiol*, 258, L241-L253.
6. Chida, S., Phelps, D. S., Soll, R. F., and Taeusch, H. W., 1991, Surfactant proteins and anti-surfactant antibodies in sera from infants with respiratory distress syndrome with and without surfactant treatment 1: *Pediatrics*, 88, 84-89.
7. Crouch, E., Rust, K., Veile, R., Donis-Keller, H., and Grosso, L., 1993, Genomic organization of human surfactant protein D (SP-D). SP-D is encoded on chromosome 10q22.2-23.1: *J.Biol.Chem.*, 268, 2976-2983.
8. Crouch, E. C., 1998, Collectins and pulmonary host defense: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, 19, 177-201.
9. Doyle, I. R., Nicholas, T. E., and Bersten, A. D., 1995, Serum surfactant protein-A levels in patients with acute cardiogenic pulmonary edema and adult respiratory distress syndrome: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 152, 307-317.
10. Eggleton, P. and Reid, K. B., 1999, Lung surfactant proteins involved in innate immunity: *Curr.Opin.Immunol.*, 11, 28-33.
11. Fisher, J. H., Kao, F. T., Jones, C., White, R. T., Benson, B. J., and Mason, R. J., 1987, The coding sequence for the 32,000-dalton pulmonary surfactant-associated protein A is located on chromosome 10 and identifies two separate restriction-fragment-length polymorphisms: *Am.J.Hum.Genet.*, 40, 503-511.
12. Greene, K. E., King, T. E., Jr., Kuroki, Y., Bucher-Bartelson, B., Hunninghake, G. W., Newman, L. S., Nagae, H., and Mason, R. J., 2002,

- Serum surfactant proteins-A and -D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis: *Eur.Respir.J.*, 19, 439-446.
13. Greene, K. E., Wright, J. R., Steinberg, K. P., Ruzinski, J. T., Caldwell, E., Wong, W. B., Hull, W., Whitsett, J. A., Akino, T., Kuroki, Y., Nagae, H., Hudson, L. D., and Martin, T. R., 1999, Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 160, 1843-1850.
 14. Griese, M., 1992, [Pulmonary surfactant and the immune system]: *Monatsschr.Kinderheilkd.*, 140, 57-61.
 15. Griese, M., 1999, Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art: *Eur.Respir.J.*, 13, 1455-1476.
 16. Griese, M., Birrer, P., and Demirsoy, A., 1997, Pulmonary surfactant in cystic fibrosis: *Eur.Respir.J.*, 10, 1983-1988.
 17. Griese, M., Essl, R., Schmidt, R., Rietschel, E., Ratjen, F., Ballmann, M., and Paul, K., 2004, Pulmonary surfactant, lung function, and endobronchial inflammation in cystic fibrosis: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 170, 1000-1005.
 18. Griese, M., Felber, J., Reiter, K., Strong, P., Reid, K., Belohradsky, B. H., Jager, G., and Nicolai, T., 2004, Airway inflammation in children with tracheostomy: *Pediatr.Pulmonol.*, 37, 356-361.
 19. Griese, M., Gobran, L. I., and Rooney, S. A., 1991, Surfactant lipid uptake and secretion in type II cells in response to lectins and secretagogues: *Am.J.Physiol*, 261, L434-L442.
 20. Griese, M., Maderlechner, N., Ahrens, P., and Kitz, R., 2002, Surfactant proteins A and D in children with pulmonary disease due to gastroesophageal reflux: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 165, 1546-1550.
 21. Gunther, A., Siebert, C., Schmidt, R., Ziegler, S., Grimminger, F., Yabut, M., Temmesfeld, B., Walmrath, D., Morr, H., and Seeger, W., 1996, Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema
9: *Am J Respir.Crit Care Med.*, 153, 176-184.
 22. Haagsman, H. P. and Diemel, R. V., 2001, Surfactant-associated proteins: functions and structural variation
1: *Comp Biochem.Physiol A Mol Integr.Physiol*, 129, 91-108.
 23. Hamm, H., Luhrs, J., Rotaeche, J., Costabel, U., Fabel, H., and Bartsch, W., 1994, Elevated surfactant protein A in bronchoalveolar lavage fluids from sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis patients
1: *Chest*, 106, 1766-1770.
 24. Haurum, J. S., Thiel, S., Haagsman, H. P., Laursen, S. B., Larsen, B., and Jensenius, J. C., 1993, Studies on the carbohydrate-binding characteristics of human pulmonary surfactant-associated protein A and comparison with

- two other collectins: mannan-binding protein and conglutinin: *Biochem.J.*, 293 (Pt 3), 873-878.
25. Hermans, C. and Bernard, A., 1999, Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 159, 646-678.
 26. Holmskov, U., Thiel, S., and Jensenius, J. C., 2003, Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense: *Annu.Rev.Immunol.*, 21, 547-578.
 27. Honda, Y., Kuroki, Y., Matsuura, E., Nagae, H., Takahashi, H., Akino, T., and Abe, S., 1995, Pulmonary surfactant protein D in sera and bronchoalveolar lavage fluids: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 152, 1860-1866.
 28. Honda, Y., Takahashi, H., Shijubo, N., Kuroki, Y., and Akino, T., 1993, Surfactant protein-A concentration in bronchoalveolar lavage fluids of patients with pulmonary alveolar proteinosis: *Chest*, 103, 496-499.
 29. Hoppe, H. J. and Reid, K. B., 1994, Collectins--soluble proteins containing collagenous regions and lectin domains--and their roles in innate immunity: *Protein Sci.*, 3, 1143-1158.
 30. Inoue, T., Matsuura, E., Nagata, A., Ogasawara, Y., Hattori, A., Kuroki, Y., Fujimoto, S., and Akino, T., 1994, Enzyme-linked immunosorbent assay for human pulmonary surfactant protein D: *J.Immunol.Methods*, 173, 157-164.
 31. Ishii, H., Mukae, H., Kadota, J., Kaida, H., Nagata, T., Abe, K., Matsukura, S., and Kohno, S., 2003, High serum concentrations of surfactant protein A in usual interstitial pneumonia compared with non-specific interstitial pneumonia: *Thorax*, 58, 52-57.
 32. Jobe, A. H., 1993, Pulmonary surfactant therapy: *N.Engl.J.Med.*, 328, 861-868.
 33. Korfhagen, T. R., Glasser, S. W., Bruno, M. D., McMahan, M. J., and Whitsett, J. A., 1991, A portion of the human surfactant protein A (SP-A) gene locus consists of a pseudogene: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, 4, 463-469.
 34. Krane, M. and Griese, M., 2003, Surfactant protein D in serum from patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis: *Eur.Respir.J.*, 22, 592-595.
 35. Kuroki, Y., Takahashi, H., Chiba, H., and Akino, T., 1998, Surfactant proteins A and D: disease markers: *Biochim.Biophys.Acta*, 1408, 334-345.
 36. Kuroki, Y., Tsutahara, S., Shijubo, N., Takahashi, H., Shiratori, M., Hattori, A., Honda, Y., Abe, S., and Akino, T., 1993, Elevated levels of lung surfactant protein A in sera from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary alveolar proteinosis: *Am.Rev.Respir.Dis.*, 147, 723-729.

37. Leth-Larsen, R., Nordenbaek, C., Tornoe, I., Moeller, V., Schlosser, A., Koch, C., Teisner, B., Junker, P., and Holmskov, U., 2003, Surfactant protein D (SP-D) serum levels in patients with community-acquired pneumonia small star, filled: *Clin.Immunol.*, 108, 29-37.
38. Mason, R. J., Greene, K., and Voelker, D. R., 1998, Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease: *Am.J.Physiol.*, 275, L1-13.
39. Ohnishi, H., Yokoyama, A., Kondo, K., Hamada, H., Abe, M., Nishimura, K., Hiwada, K., and Kohno, N., 2002, Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 165, 378-381.
40. Postle, A. D., Mander, A., Reid, K. B., Wang, J. Y., Wright, S. M., Moustaki, M., and Warner, J. O., 1999, Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis: *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, 20, 90-98.
41. Robertson, B., Curstedt, T., Herting, E., Sun, B., Akino, T., and Schafer, K. P., 1995, Alveolar-to-vascular leakage of surfactant protein A in ventilated immature newborn rabbits
1: *Biol.Neonate*, 68, 185-190.
42. Takahashi, H., Fujishima, T., Koba, H., Murakami, S., Kurokawa, K., Shibuya, Y., Shiratori, M., Kuroki, Y., and Abe, S., 2000, Serum surfactant proteins A and D as prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis and their relationship to disease extent: *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 162, 1109-1114.
43. Takahashi, H., Honda, Y., Kuroki, Y., Imai, K., and Abe, S., 1995d, Pulmonary surfactant protein A: a serum marker of pulmonary fibrosis in patients with collagen vascular diseases: *Clin.Chim.Acta*, 239, 213-215.
44. Takahashi, H., Honda, Y., Kuroki, Y., Imai, K., and Abe, S., 1995b, Pulmonary surfactant protein A: a serum marker of pulmonary fibrosis in patients with collagen vascular diseases: *Clin.Chim.Acta*, 239, 213-215.
45. Takahashi, H., Honda, Y., Kuroki, Y., Imai, K., and Abe, S., 1995a, Pulmonary surfactant protein A: a serum marker of pulmonary fibrosis in patients with collagen vascular diseases: *Clin.Chim.Acta*, 239, 213-215.
46. Takahashi, H., Honda, Y., Kuroki, Y., Imai, K., and Abe, S., 1995c, Pulmonary surfactant protein A: a serum marker of pulmonary fibrosis in patients with collagen vascular diseases: *Clin.Chim.Acta*, 239, 213-215.
47. van Golde, L. M., Batenburg, J. J., and Robertson, B., 1988, The pulmonary surfactant system: biochemical aspects and functional significance: *Physiol Rev.*, 68, 374-455.
48. Wert, S. E., Yoshida, M., LeVine, A. M., Ikegami, M., Jones, T., Ross, G. F., Fisher, J. H., Korfhagen, T. R., and Whitsett, J. A., 2000, Increased

-
- metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 97, 5972-5977.
49. Wright, J. R., 1997, Immunomodulatory functions of surfactant: Physiol Rev., 77, 931-962.
 50. Zapletal, A.: Lung Function in Children and Adolescents, Karger-Verlag 1987

7 Anhang

7.1 Tabellen

Tab. A-1: Vorversuche zum SP-A-ELISA

Versuchsnr	Datum	Thema	Ergebnis
1.1	19.12.02	Coaten mit verschiedenen AK aus Konstanz (statt PE-10) Konz 1µg/ml: 3/13.4, 1/19.4, 4/13.4, 5/13.4 mit Standard	Schwächere Extinktionen als beim bisherigen AK PE-10
1.2	3.1.03	Coaten mit versch. AK Konz 1µg/ml: B6)1/12D-28 Konz 5µg/ml: B6)1/12D-28, 1/19.4, 4/13.4, 5/13.4 mit Standard	Nur mit B6)1/12D-28 (in beiden Konz.) höhere Extinktionen als bei PE-10, aber höherer Leerwert
2	22.1.03	Affinitätsgereinigter AK (29kD) als 2. AK (mit Standard) Verschiedene Verdünnungen: 1:2500, 1:5000, 1:10000, 1:50000	Schwächere Extinktionen als bei bisherigem 29kD-AK in allen Verdünnungen
3.1 bis 3.3	30.1.03, 14.2.03, 22.2.03	Biotinylierter AK B6)1/12D-28 als 2. AK (versch. Verdünnungen von AK und Avidin) AK: 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:25000 Avidin: 1:500, 1:750, 1:1000, 1:2500	Stark schwankende Werte• schlechte Standardkurven sehr hohe Leerwerte noch am besten: AK 1:1000 und Avidin 1:1000
4.1 und 4.2	3.3.03, 6.3.03	Unterschiedliche Serum- Aufarbeitung im alten Assay mit alten Antikörpern Verschiedene Serumverdünnungen und veränderte Aufarbeitung 5,5fache Verd : alte Aufarbeitung, ohne Zentrifugation, ohne Zentrifugation und ohne Triton, Verdünnung in TBS statt EDTA mit Tris 2,5fach Verd : alte Aufarbeitung, ohne Zentrifugation, versch. Puffer- bzw. Tritonmengen (250µl Puffer mit 50µl Triton bzw. 200µl Puffer mit 100µl Triton)	Werte ohne Zentrifugation sind nicht so einheitlich. Werte ohne Triton und in TBS verdünnt sind niedriger. Tritonmenge ist nicht so wichtig.
4.3 und 4.4	7.3.03, 15.3.03	Verschiedene Verdünnungen, alte Aufarbeitung 5,5 fache, 5fache, 4fache, 3fache, 2fache Verdünnung	Werte ohne Zentrifugation sind nicht so einheitlich beim Verdünnen und bei Doppelbestimmungen
5	29.5.03	Fab-gereinigten AK als Detektionsantikörper (goat-anti-rabbit-POX) verwendet	Werte ungefähr im Bereich wie beim alten AK, aber beim Verdünnen nicht so gut reproduzierbar

Tab. A-2: Patientencharakterisierung

Patientennummer	Geburtsjahr	Alter bei Studienbeginn (Jahre)	Geschlecht	BMI (kg/m ²)	Pulmozyme
101	1985	11	W	15,98	ja
102	1987	9	W	13,77	ja
103	1988	8	M	15,98	nein
104	1964	32	M	24,78	ja
105	1981	15	W	23,55	nein
106	1986	10	W	15,68	ja
107	1986	10	W	16,57	CF-Kontrolle
108	1984	12	W	15,82	nein
109	1988	8	W	15,45	nein
110	1981	15	M	20,42	CF-Kontrolle
111	1975	21	W	27,25	ja
112	1991	5	M	16,35	CF-Kontrolle
113	1984	12	M	14,72	nein
114	1985	11	M	14,39	CF-Kontrolle
115	1990	6	W	14,88	ja
116	1976	20	M	31,35	CF-Kontrolle
117	1981	15	M	15,79	nein
118	1981	15	W	19,53	ja
119	1985	11	W	16,86	nein
120	1988	8	W	19,83	nein
121	1981	15	M	18,17	ja
122	1969	28	W	19,95	nein
123	1991	5	M	15,66	CF-Kontrolle
124	1984	12	M	17,6	nein
125	1992	5	M	14,61	CF-Kontrolle
126	1984	13	M	18,31	nein
201	1983	14	W	19,04	nein
202	1987	9	W	13,44	ja
203	1990	6	M	13,66	ja
204	1987	9	M	14,14	ja
205	1988	8	M	14,52	ja
206	1983	13	W	18,87	ja
207	1985		W		ja
208	1988	9	M	14,93	nein
209	1988	9	M	16,19	nein
210	1987	10	M	12,51	ja
211	1987	10	M	13,72	nein
212	1980	17	M	20,57	nein
213	1986	11	W	15,68	nein
214	1987	10	W	14,49	nein
215	1984	13	M	15,17	ja
216	1989	8	M	17,15	CF-Kontrolle
217	1986	11	W	18,45	ja
218	1989	8	M	14,72	nein
219	1981	16	W	20,7	ja
220					
221	1986	11	M	18,06	ja
222	1984	13	W	21	ja

223	1981	11	M	20,44	ja
224	1987	11	M	16,46	ja
225	1991	7	W	13,8	ja
301	1986	11	W	16,96	nein
302	1984	13	M	16,33	CF-Kontrolle
303	1989	8	M	15,83	ja
304	1984	13	W	16,88	ja
305	1986	11	W	14,28	nein
306	1984	13	M	16,97	ja
307	1986	11	M	14,06	ja
308	1988	9	M	15,93	nein
309	1991	6	W	13,95	nein
310	1990	7	M	15,71	ja
311	1979	18	W	24,13	ja
312	1986	11	M	14,18	ja
313	1984	13	M	20,13	CF-Kontrolle
314	1990	7	M	16,71	ja
315	1981	16	W	30,47	nein
316	1985	12	W	17,94	ja
401	1986	10	M	17,28	nein
402	1985	11	M	15,33	nein
403	1989	7	W	14,06	ja
404	1990	6	W	14,62	nein
405	1991	5	W	15,39	nein
406	1985	12	W	15,72	ja
407	1988	9	W	14,45	ja
408	1985	12	W	21,3	ja
409	1983	14	W	17,85	ja
410	1990	7	W	16,35	ja
411	1981	16	W	18,36	CF-Kontrolle
412	1986	11	W	17,36	nein
413	1989	8	M	13,43	ja
414	1980	17	W	21,77	CF-Kontrolle
415	1985	12	M	18,43	CF-Kontrolle
416	1988	9	M	15,61	
417	1982	15	M	18,31	nein
418	1989	8	M	15,02	nein
419	1991	6	W	14,61	CF-Kontrolle
420	1973	24	W	20,38	ja
421	1988	9	M	13,82	ja
422	1992	5	W	13,1	ja
423	1987	10	W	14,8	CF-Kontrolle
424	1992	5	W	14,61	CF-Kontrolle
425	1968	29	W	23,18	CF-Kontrolle
426	1992	5	M	17,47	CF-Kontrolle
427	1981	16	W	17,58	nein
428	1991	6	M	14,96	CF-Kontrolle
429	1973	24	W	16,3	CF-Kontrolle
430	1978	20	M	23,7	nein

501	1981	16	M	19,98	ja
502	1983	14	W	20,02	ja
503	1978	19	M	19,9	nein
504	1984	13	M	16,66	ja
505	1981	16	M	25,47	nein
506	1988	9	M	17,31	ja
507	1985	12	W	14,7	nein
508	1981	16	M	22,82	ja
509	1991	6	W	14,05	ja
510	1983	14	W	19,61	nein
511	1989	8	W	15,48	ja
512	1992	6	W	15,43	nein

Tab. A-3: Messwerte von SP-A in Serum und BAL zu den Zeitpunkten T1, T7 und T13
(Angaben in ng/ml, bei fehlenden Werten war kein Material vorhanden)

Patientennummer	Serum T1	Serum T7	Serum T13	BAL T1	BAL T7	BAL T13
101	26,6			11653	7423	129
102	23,3			11370	3597	3479
103	36,7			13218	5453	5400
104	47,4			2714	783	
105	27,3			3761	2831	1090
106	11,1			5244	7651	3782
107				8354	948	3849
108	33,2			3448	5199	1858
109	24,5			4151	2561	4355
110	11,1			3491	5447	4422
111	23,0			4225	1287	724
112	27,8			3761	3491	3496
113	40,2				1249	2086
114	45,3			3501	6431	5012
115	42,2			2653	1236	
116	26,1			2405	2380	2063
117	34,1			815		
118	40,8			777	2091	
119				2482	11153	7335
120	18,0			940	3043	
121	45,6			4940	1355	
122				995		
123				4229		
124				5523	10622	
125				5133	3404	7234
126				6041	4186	3144
201	21,9	26,1		2748	6254	2579
202	31,4	41,0		5845	7123	5942
203	25,6	45,3		12686	12686	
204	43,8	48,6		4707	8888	4707
205	38,0	36,0		2966	4636	13020
206	17,0	25,8		4258	8114	
207						
208		37,6	29,4	2190	9067	2190
209	31,3			21811	21811	
210	14,3	18,7		4287	1366	4287
211	34,2	42,5		3896	3712	3890
212	22,0	46,2		2424	1889	2424
213	24,9	17,8		3110	3110	1766
214	33,4	30,7		2309	2309	5843
215	31,8	24,9		4027	2148	
216	12,2			4180	5362	
217		11,5		5504	5504	
218	23,3	24,3		4326	6241	
219	21,9			4814	2763	
220				4971		

221	49,0	45,2		13135	5242	
222	33,9	39,9		4471	7360	4471
223	28,4			4124	5942	4444
224	32,3			5777	3670	640
225	29,4			2043	6009	
301	25,5		22,7	2067	1432	8109
302	15,8			1408		
303				2595	3494	
304	39,5			5528	3839	
305	41,5				1832	
306	14,8			2504	1643	
307	26,7	28,7		1825	3197	8915
308	20,2			2657	3563	
309	26,4			2089	2641	
310	22,5				3577	
311	17,6			2771		
312	34,8			65	185	
313						
314	9,5			8791		
315	19,0			4510	245	
316	19,3		19,4		3078	298
401	16,1	11,9	13,5	10122	9080	3624
402		27,4	24,9	14635	3734	3097
403	17,0			4018	1334	1551
404		20,6	25,4	4598	2752	5179
405	24,1		36,1	9934	9916	9393
406	20,4	27,2	35,6	6827	5269	13624
407	20,8		23,3	13294	10897	
408			21,9	1936	2435	3552
409			21,9	2135	1542	1876
410		34,1	25,6	4912	4985	2732
411	30,8	28,6	36,6	2409	5706	4581
412		16,1	20,2	3633	1301	9827
413		21,5	19,5	4781	4752	2252
414		14,6		3204	1436	4442
415	16,0	19,9		1815	1843	1244
416		18,7	22,4	223	3094	
417	20,9	23,0	19,4	6129	6184	6204
418		33,9	31,8	3850	3144	5715
419	33,5	33,8	46,2	6460	8922	7371
420		24,4		1112		6162
421		15,4	23,4	3566	5979	2818
422	21,6	19,4	18,0	1719	1700	3895
423		23,5	20,3	4446	4243	5532
424		23,0	23,5	4128	2219	3502
425	45,9	37,8	42,7	371	1077	
426		25,7	21,5	4141	4908	
427		26,0		2300		
428		18,3		3151	1631	
429				1689		

430				5568		
501				136		2792
502	25,8	28,5	31,7	1279	4191	
503	27,0			9190		
504	32,6	31,0	23,8	6722	6625	12074
505	39,2		27,8	6061		
506	9,8	15,2	13,4	2669	2413	4807
507			15,7	1462		
508	24,9	27,4	20,9	6999	13048	15028
509	23,3		32,6	267	4347	
510			23,5	9993	2288	3747
511	36,5	42,5	36,7	207	4162	
512	16,2	29,5		8496	3921	4356

Abb. A-4: Messwerte von SP-D in Serum und BAL zu den Zeitpunkten T1, T7 und T13
(Angaben in ng/ml; bei fehlenden Werten war kein Material vorhanden bzw. die BAL Werte wurden nur gemessen, wenn auch Serumwerte vom gleichen Termin vorhanden waren)

Patientennummer	Serum T1	Serum T7	Serum T13	BAL T1	BAL T7	BAL T13
101	129,9			288		
102	145,1			443		
103	131,1			371		
104	44,6			181		
105	65,6			447		
106	85,4			1610		
107						
108	102,7			343		
109	91,3			512		
110	143,0			1110		
111	79,5			780		
112	115,3			407		
113	139,2					
114	120,4			673		
115	115,4			165		
116	48,8			540		
117	97,6					
118	118,5			96		
119						
120	41,7			1036		
121	124,7			772		
122						
123						
124						
125						
126						
201	138,7	95,7		837	1161	
202	69,2	89,0			235	
203	25,2	37,8		1240	813	
204	166,3	184,8		542	870	
205	155,7	108,2		369	350	
206	88,8	93,4		837	1248	
207						
208		355,0	236,2		1053	
209	211,0			378		
210	40,1	60,0		1272	310	
211	89,1	103,8		150		
212	146,0	167,4		743	302	
213	113,6	138,5		415		
214	129,4	151,6		342	243	
215	85,6	94,9		585	241	
216	45,8			783		
217		74,9			743	
218	98,3	124,0		896	558	

219	48,3			529		
220						
221	67,5	79,4		76	449	
222	90,8	105,0		1489	401	
223	150,3			640		
224	59,8			510		
225	111,8			327		
301	53,6		91,4	573		1311
302	112,9			667		
303						
304	120,0			831		
305	91,3					
306	26,7			671		
307	111,2	136,9		110		
308	69,1			1381		
309	34,3			498		
310	99,0					
311	39,7			637		
312	53,6					
313						
314	79,3			849		
315	45,5			1085		
316	134,4		128,8			
401	17,5	16,4	30,0	899	965	707
402		44,6	39,9		102	149
403	57,5			1162		
404		53,5	67,6		600	279
405	141,3		151,3	1959		760
406	104,1	96,5	142,1	1319		1136
407	62,2		152,1	1352		738
408			84,9			211
409			81,0			418
410		130,5	125,9		485	241
411	55,5	82,0	69,3		933	758
412		23,9	19,4		182	827
413		123,9	105,0		880	328
414		85,4			582	
415	126,9	193,4		1128	564	
416		46,6	65,7		524	1066
417	94,2	81,7	93,3	851	484	504
418		136,1	146,6		487	265
419	109,7	94,8	74,9	1256	962	684
420		67,8				
421		128,0	117,7		903	1126
422	137,3	150,8	148,3	411	121	784
423		112,1	150,7		1233	493
424		61,8	74,8		1220	889
425	45,5	52,8	54,4	93	378	614
426		127,0	114,4		1034	334
427		74,5			91	

428		199,1			298	
429						
430						
501						
502	161,9	94,8	140,1	134	583	
503	84,8			415		
504	392,3	253,3	161,2	336	469	874
505	231,0		217,1			
506	58,1	50,4	60,9	394	287	582
507			135,0			
508	118,2	89,6	75,5	565		737
509	93,4		101,8	462		
510			62,5			478
511	147,5	172,9	158,3		724	
512	51,0	73,1		603	383	

Tab. A-5: Lungenfunktionswerte (FEV1 und FVC) zu den Zeitpunkten T1, T7 und T13
(Angaben in % des Sollwertes, bei fehlenden Werten waren keine Daten vorhanden)

Patientennummer	T1: FEV1	T7: FEV1	T13: FEV1	T1: FVC	T7: FVC	T13: FVC
101	94,2	84,7	79,4	95,9	82,5	81,3
102	97,2	88,7	102,0	95,6	89,7	98,3
103	104,4	62,2	68,5	112,2	79,9	82,4
104	86,8	108,8		89,8	110,8	
105	95,8	89,0	91,9	91,5	86,9	89,3
106	82,4	81,2	76,1	84,9	86,1	87,6
107	99,6	115,9	105,0	115,0	118,9	113,6
108	109,5	109,2	109,7	102,4	99,8	102,5
109	111,4	93,1	93,5	107,6	96,7	92,0
110	125,0	120,6	125,3	127,3	116,3	117,5
111	109,4	111,2	106,3	101,4	101,4	102,1
112	118,8	88,6	111,1	109,4	114,7	113,5
113	75,6	63,5	66,1	77,9	72,0	75,3
114	104,4	88,3	85,6	102,4	88,1	82,9
115	123,4	119,5	93,1	124,3	111,0	97,1
116	98,9	101,4	99,8	96,2	98,6	96,0
117	84,6			90,9		
118	109,7	112,7		117,1	114,0	
119	102,5	75,2	78,3	103,1	76,2	87,6
120	105,7	90,1		102,7	90,6	
121		86,5			98,6	
122	104,3			118,0		
123	77,5			81,8		
124	101,1	101,9		102,3	107,2	
125	100,5	106,6	89,5	100,3	113,6	99,4
126	99,8	125,5	126,9	100,2	126,5	126,5
201	117,9	134,3		115,3	123,1	
202	112,3	89,9	86,1	107,8	94,3	82,9
203	84,2			76,4		
204	86,7		86,0	83,4		90,4
205		80,0	91,3		78,4	78,4
206						
207						
208	67,6	53,7	61,3	105,3	79,3	84,4
209		67,7	106,5		90,3	100,5
210			108,4			96,9
211	55,4	73,3	63,1	72,5	89,2	87,6
212						
213	86,3	83,0		91,4	86,5	
214	112,7	89,3		110,3	95,7	
215	102,4	107,4	97,4	92,7	92,3	69,5
216		92,2	97,9		94,8	101,7
217						
218						
219		105,4			76,4	

220						
221	77,9	99,9	63,9	83,1	100,4	76,8
222		90,2			98,0	
223	94,9	102,0		66,4	74,0	
224	98,1	93,6	83,3	93,6	87,2	84,4
225	66,2	79,3	47,4	74,7	82,7	59,1
301	109,7	99,7	83,9	109,6	103,4	100,2
302	88,1			84,5		
303	105,4	128,4	114,1	108,8	116,7	109,0
304	99,7	109,5		92,8	101,1	
305	111,4	124,1		107,1	109,0	
306	106,0	109,3		100,1	98,7	
307	84,5	75,9	72,3	75,5	66,8	68,0
308	100,2	115,4		97,6	108,3	
309	128,5	112,9		116,7	109,9	
310	121,6	99,1		119,3	119,9	
311	125,8			127,9		
312	98,5	102,3		104,4	101,9	
313	96,2			119,9		
314	95,0			97,3		
315	100,7	102,8		100,0	106,5	
316	113,8	107,6	112,5	106,3	104,4	103,0
401	101,4	112,7	93,7	91,7	108,7	96,9
402	93,6	82,8	67,6	92,3	95,0	89,9
403		92,4	83,0		85,4	78,7
404	78,0	102,4	98,9	68,9	92,8	86,5
405		92,6	69,4		97,8	73,3
406	93,0	64,0	79,8	86,2	62,7	70,5
407	83,1	62,1	64,8	78,1	53,6	53,8
408	96,0	84,8	66,4	96,7	89,5	78,5
409	99,6	77,2	84,9	87,8	80,2	82,9
410	118,0	131,3	116,4	114,5	114,0	110,5
411	95,4	93,9	102,2	75,9	83,5	90,5
412	119,2	98,1	101,6	113,0	92,7	96,8
413	109,5	90,5	94,9	99,8	96,8	93,8
414	122,7	102,8	98,9	127,5	114,1	115,7
415	88,1	79,8	86,5	98,5	95,0	105,0
416	110,7	110,1	73,1	95,2	107,5	98,5
417	89,7	89,0	65,6	93,2	100,1	87,2
418	79,2	81,3	62,2	78,4	78,1	64,6
419	87,5	109,4	77,0	76,4	98,4	89,3
420	91,3	78,9	60,3	103,8	97,5	87,8
421	84,3	81,8	65,1	95,3	87,8	65,7
422	97,3	96,3	91,6	85,2	96,9	79,2
423	88,1	88,2	91,0	86,1	82,1	87,7
424	86,1	85,7	81,2	77,4	74,0	91,5
425	96,1	99,5	85,2	100,4	111,1	95,1
426	100,2	102,1	94,9	103,4	92,3	92,0
427	98,5	83,6		89,3	87,3	
428	94,4	99,8		94,6	99,9	

429	97,3			100,2		
430	135,9			127,6		
501	93,8	100,0	96,5	109,0	107,6	101,9
502	110,8	116,7		126,4	129,4	
503	85,4	31,1		103,9	63,6	
504	99,6	90,1	83,6	81,6	87,5	97,6
505	129,3			104,6		
506	83,6	89,5	103,2	77,7	83,1	111,5
507	99,6	99,2		105,1	98,6	
508	115,7	128,9	126,2	114,1	120,1	123,7
509	111,3	101,5		96,6	89,5	
510	82,2	54,9	77,5	86,3	70,2	85,6
511	109,0	111,2		100,9	98,1	
512	116,3	105,7	85,5	103,9	105,8	79,9

Tab. A-6: Lungenfunktionswerte (MEF25 und MEF75/25) zu den Zeitpunkten T1, T7 und T13
(Angaben in % des Sollwertes, bei fehlenden Werten waren keine Daten vorhanden)

Patientennr	T1: MEF25	T7: MEF25	T13: MEF25	T1: MEF75/25	T7: MEF75/25	T13: MEF 75/25
101	47,7	57,6	28,5	70,1	73,5	63,6
102	62,5	42,9	62,9	85,4		93,4
103	55,0	17,9	22,7	72,1		36,8
104	31,1	60,8		59,7	92,9	
105	84,5	64,7	66,4	113,8	97,3	102,1
106	52,9	40,8	29,8	58,0	59,3	42,8
107	51,5	81,0	71,4	59,2	83,5	73,8
108	107,2	117,2	103,6	141,9	142,1	131,8
109	79,9	39,5	55,9	94,6	71,2	83,9
110	92,9	103,0	112,2	100,1	107,7	115,7
111	92,5	119,0	110,9	108,9	133,3	112,9
112	84,9	36,7	63,9	96,1	47,4	90,0
113	29,4	20,9	18,8	53,7	36,7	37,8
114	68,9	55,2	56,6	95,0	78,6	85,1
115	98,7	124,6	55,5	112,9	127,7	71,6
116	77,4	72,6	92,5	91,4	94,3	95,8
117	48,3			62,5		
118	49,5	66,5		73,8	91,7	
119	70,8	37,8	28,3	91,1	66,9	50,4
120	81,9	58,7		92,3	79,6	
121		32,9			50,7	
122	39,0			61,6		
123	26,3			41,3		
124	52,6	49,3			75,6	
125	100,0	26,9	37,1	99,8	64,4	57,0
126	99,8	72,2	87,1	99,9	109,3	115,5
201	132,8	162,7		115,2		
202	114,1	75,3	68,5	125,6		
203	174,9			123,8		
204	48,3		63,2	66,8		
205		162,9	92,7			
206						
207						
208	28,2	49,0	37,6	39,5		
209		143,3	91,2		122,3	
210			107,3			
211	26,8	45,2	27,3	32,0		
212						
213	58,3	41,0		64,4	57,9	
214	86,2	83,3		123,3	61,1	
215	129,1	132,5	92,7	123,5	128,4	
216		52,1	92,7			
217						
218						
219		82,9			92,4	

220						
221	47,6	99,8	31,1	62,3		
222		53,0				
223	98,5	110,0		82,9		
224	91,7	73,6	51,2	116,1	103,6	
225	55,9	44,6	23,0			
301	63,2	69,7	37,7	81,2	71,0	47,5
302	80,0			86,2		
303	76,4	153,6	99,2	73,8	152,4	110,7
304	88,9	96,0		110,0	128,1	
305	90,5	176,8		117,0	141,4	
306	91,7	111,5		99,7		
307	96,6	60,0	41,8	129,0	98,0	74,0
308	71,2	97,1		90,8		
309	124,3	74,1		139,3	99,1	
310	89,3	55,5		90,5	56,3	
311	94,1			99,4		
312	53,4	65,7		99,5	88,0	
313	22,5			37,7		
314	51,9			62,5		
315	80,8	62,9		114,8	80,8	
316	114,0	92,0	85,8	139,2	114,5	126,7
401	149,4	80,8	47,2	49,7	88,8	63,2
402	54,0	34,8	13,1	70,1	48,0	21,0
403		76,9	56,3		95,4	63,3
404	78,8	118,8	103,4	58,2	110,5	92,3
405		35,5	21,5		50,0	32,7
406	91,0	36,4	67,1	97,4	53,5	85,3
407	40,7	14,2	26,8	58,8	32,2	42,7
408	57,3	38,0	14,8	73,1	56,6	23,8
409	99,5	20,8	39,1	103,7	38,6	65,0
410	96,7	109,5	55,5	113,5	129,7	80,2
411	139,2	132,1	123,8	126,9	124,2	135,5
412	93,1	108,3	82,3	103,9	111,5	88,5
413	89,9	28,5	68,1	101,5	56,2	80,7
414	76,4	45,0	43,9	92,2	60,8	56,0
415	49,9	48,8	49,2	57,8	52,1	
416	84,9	47,5	28,0	106,7	73,3	
417	41,9	22,9	14,4	62,5	42,3	23,8
418	46,3	30,3	99,7	60,8	45,1	
419	91,8	53,8	25,7	98,4	83,7	37,4
420	46,6	16,7	14,8	58,4	31,6	21,0
421	44,6	35,4	30,8	52,4	50,5	41,4
422	102,7	67,3	69,0	111,1	80,6	83,7
423	60,2	50,2	63,7	61,7	308,5	84,7
424	63,8	70,0	39,1		78,2	48,1
425	56,9	55,1	31,1	75,3	71,0	47,7
426	49,5	73,0	50,0	73,7	100,3	84,8
427	51,1	53,5		73,2	70,5	
428	70,0	100,2		66,2	99,9	

429	51,6			71,9		
430	123,6			156,4		
501	38,8	49,4	33,2	52,8	73,4	60,0
502	33,6	46,2		59,3	75,9	
503	28,6	9,8		42,9	10,9	
504	82,0	74,7	46,7	89,4	77,7	52,6
505	183,0			156,7		
506	24,9	72,4	33,2	53,9	94,0	77,0
507	54,0	63,0		77,8	93,8	
508	117,8	139,8	104,0	100,3	128,1	119,4
509	156,1	110,0		176,3	108,7	
510	45,5	10,8	21,9	61,4	19,0	43,0
511	114,2	170,0		145,3	147,9	
512	108,6	75,6	69,9	138,7	116,3	87,2

Tab. A-7: Korrelationen von SP-A im Serum mit klinischen Daten, Werten in BAL und Blutwerten (Gesamtgruppe)

Merkmal	Anzahl der Paare (N)	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-A in BAL (ng/ml)	90	0,1486	0,1620	nein
SP-D im Serum (ng/ml)	72	0,4298	0,0002	ja
SP-D in BAL (ng/ml)	78	-0,3321	0,0030	ja
Geschlecht	99	-0,1956	0,0524	nein
Alter bei Termin	99	0,0406	0,6902	nein
BMI (kg/m ²)	99	-0,0687	0,4995	nein
Blut: Leukozyten/nl	95	0,0769	0,4586	nein
Blut: % Eosinophile	75	-0,0497	0,6717	nein
Blut: IgG (mg/dl)	64	0,1193	0,3479	nein
Blut: IgA (mg/dl)	63	0,0426	0,3479	nein
Blut: IgM (mg/dl)	63	-0,0673	0,6003	nein
Blut: Elastase (U)	50	0,1030	0,4767	nein
Blut: Spez. IgE (CAP-KI)	45	-0,0322	0,8334	nein
Blut: Gesamt IgE (kU/l)	49	-0,0024	0,9867	nein
Blut: CRP (mg/l)	80	0,0325	0,7747	nein
Blut: IL 8 (ng/ml)	82	0,3318	0,0023	ja
BAL: Zellen/ml	92	0,2424	0,0199	ja
BAL: PMN/ml	48	0,2515	0,0846	nein
BAL: % PMN	51	0,2386	0,0918	nein
BAL: % Lymphozyten	51	-0,0689	0,6307	nein
BAL: % Eosinophile	47	-0,0054	0,9715	nein
BAL: % Basophile	41	0,0000	1,0000	nein
FEV (%Soll)	81	-0,0340	0,7629	nein
FVC (%Soll)	81	0,0178	0,8747	nein
MEF75/25 (%Soll)	75	0,1135	0,3324	nein
MEF25 (%Soll)	81	0,0106	0,9255	nein

Tab. A-8: Korrelationen von SP-A im Serum mit klinischen Daten, Werten in BAL und Blutwerten (Gruppe ohne Pulmozyme)

Merkmal	Anzahl der Paare	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-A in BAL (ng/ml)	66	-0,0191	0,8788	nein
SP-D im Serum (ng/ml)	72	0,4298	0,0002	ja
SP-D in BAL (ng/ml)	56	-0,5260	<0,0001	ja
Geschlecht	72	-0,2461	0,0372	ja
Alter bei Termin	72	0,0938	0,4334	nein
BMI (kg/m ²)	72	-0,0794	0,5075	nein
Blut: Leukozyten/nl	70	0,0315	0,7957	nein
Blut: % Eosinophile	56	-0,0148	0,9140	nein
Blut: IgG (mg/dl)	47	0,0894	0,5499	nein
Blut: IgA (mg/dl)	47	-0,0089	0,9523	nein
Blut: IgM (mg/dl)	46	-0,1001	0,5080	nein
Blut: Elastase (U)	31	0,3159	0,0834	nein
Blut: Spez. IgE (CAP-KI)	29	0,0495	0,7986	nein
Blut: Gesamt IgE (kU/l)	32	0,1337	0,4658	nein
Blut: CRP (mg/l)	59	0,1211	0,3607	nein
Blut: IL 8 (ng/ml)	58	0,3213	0,0139	ja
BAL: Zellen/ml	67	0,2688	0,0278	ja
BAL: PMN/ml	37	0,3138	0,0586	nein
BAL: % PMN	40	0,2817	0,0783	nein
BAL: % Lymphozyten	40	-0,0604	0,7112	nein
BAL: % Eosinophile	39	0,1514	0,3575	nein
BAL: % Basophile	36	0,0244	0,8876	nein
FEV (%Soll)	60	-0,1184	0,3675	nein
FVC (%Soll)	60	-0,0626	0,6348	nein
MEF75/25 (%Soll)	58	0,0130	0,9230	nein
MEF25 (%Soll)	60	-0,1916	0,1425	nein

Tab. A-9: Korrelationen von SP-A im Serum mit klinischen Daten, Werten in BAL und Blutwerten (Gruppe mit Pulmozyme)

Merkmal	Anzahl der Paare	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-A in BAL (ng/ml)	24	0,5071	0,0114	ja
SP-D im Serum (ng/ml)	27	0,2165	0,2782	nein
SP-D in BAL (ng/ml)	22	0,1175	0,6026	nein
Geschlecht	27	-0,0861	0,6692	nein
Alter bei Termin	27	-0,1524	0,4478	nein
BMI (kg/m ²)	27	-0,0109	0,9566	nein
Blut: Leukozyten/nl	25	0,1229	0,5584	nein
Blut: % Eosinophile	19	-0,1269	0,6047	nein
Blut: IgG (mg/dl)	17	0,2489	0,3353	nein
Blut: IgA (mg/dl)	16	0,2504	0,3497	nein
Blut: IgM (mg/dl)	17	0,0809	0,7575	nein
Blut: Elastase (U)	19	-0,1045	0,6704	nein
Blut: Spez. IgE (CAP-KI)	16	-0,2056	0,4448	nein
Blut: Gesamt IgE (kU/l)	17	-0,1422	0,5860	nein
Blut: CRP (mg/l)	21	-0,2772	0,2238	nein
Blut: IL 8 (ng/ml)	24	0,3859	0,0626	nein
BAL: Zellen/ml	25	0,1843	0,3778	nein
BAL: PMN/ml	11	0,1507	0,6583	nein
BAL: % PMN	11	0,2415	0,4744	nein
BAL: % Lymphozyten	11	-0,1507	0,6583	nein
BAL: % Eosinophile	8	-0,7243	0,0422	ja
BAL: % Basophile	keine			
FEV (%Soll)	21	0,2228	0,3317	nein
FVC (%Soll)	21	0,2410	0,2926	nein
MEF75/25 (%Soll)	17	0,4243	0,0896	nein
MEF25 (%Soll)	21	0,5158	0,0167	ja

Tab. A-10: Korrelationen von SP-D im Serum mit klinischen Daten, Werten in BAL und Blutwerten (Gesamtgruppe)

Merkmal	Anzahl der Paare	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-D in BAL (ng/ml)	78	-0,1571	0,1697	nein
SP-A im Serum (ng/ml)	99	0,3629	0,0002	ja
SP-A in BAL (ng/ml)	90	0,0836	0,4334	nein
Geschlecht	99	-0,0486	0,6327	nein
Alter bei Termin	99	-0,0557	0,5841	nein
BMI (kg/m ²)	99	-0,1223	0,2278	nein
Blut: Leukozyten/nl	95	0,0673	0,5166	nein
Blut: % Eosinophile	75	-0,0107	0,9276	nein
Blut: IgG (mg/dl)	64	0,0571	0,6538	nein
Blut: IgA (mg/dl)	63	-0,0086	0,9466	nein
Blut: IgM (mg/dl)	63	0,1357	0,2888	nein
Blut: Elastase (U)	50	0,0532	0,7136	nein
Blut: Spez. IgE (CAP-KI)	45	-0,0280	0,8553	nein
Blut: Gesamt IgE (kU/l)	49	0,0065	0,9645	nein
Blut: CRP (mg/l)	80	-0,0146	0,8975	nein
Blut: IL 8 (ng/ml)	82	0,0705	0,5288	nein
BAL: Zellen/ml	92	-0,0046	0,9654	nein
BAL: PMN/ml	48	0,0003	0,9982	nein
BAL: % PMN	51	-0,0876	0,5412	nein
BAL: % Lymphozyten	51	-0,0848	0,5541	nein
BAL: % Eosinophile	47	0,0495	0,7410	nein
BAL: % Basophile	41	-0,2405	0,1298	nein
FEV (%Soll)	81	0,0049	0,9650	nein
FVC (%Soll)	81	-0,0595	0,5976	nein
MEF75/25 (%Soll)	75	0,0525	0,6547	nein
MEF25 (%Soll)	81	-0,0208	0,8535	nein

Tab. A-11: Korrelationen von SP-D im Serum mit klinischen Daten, Werten in BAL und Blutwerten (Gruppe ohne Pulmozyme)

Merkmal	Anzahl der Paare	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-D in BAL (ng/ml)	56	-0,2577	0,0552	nein
SP-A im Serum (ng/ml)	72	0,4298	0,0002	ja
SP-A in BAL (ng/ml)	66	0,0951	0,4473	nein
Geschlecht	72	-0,0872	0,4665	nein
Alter bei Termin	72	-0,0234	0,8450	nein
BMI (kg/m ²)	72	-0,0637	0,5952	nein
Blut: Leukozyten/nl	70	0,0557	0,6468	nein
Blut: % Eosinophile	57	-0,0667	0,6221	nein
Blut: IgG (mg/dl)	47	0,2123	0,1519	nein
Blut: IgA (mg/dl)	47	0,0284	0,8497	nein
Blut: IgM (mg/dl)	46	0,1905	0,2048	nein
Blut: Elastase (U)	31	0,0866	0,6431	nein
Blut: Spez. IgE (CAP-KI)	29	-0,0717	0,7115	nein
Blut: Gesamt IgE (kU/l)	32	0,1135	0,5362	nein
Blut: CRP (mg/l)	59	0,0461	0,7286	nein
Blut: IL 8 (ng/ml)	58	0,1297	0,3318	nein
BAL: Zellen/ml	67	0,1291	0,2977	nein
BAL: PMN/ml	37	0,0939	0,5805	nein
BAL: % PMN	40	-0,0243	0,8817	nein
BAL: % Lymphozyten	40	-0,0888	0,5856	nein
BAL: % Eosinophile	39	0,1078	0,5134	nein
BAL: % Basophile	36	-0,2522	0,1378	nein
FEV (%Soll)	60	0,0087	0,9476	nein
FVC (%Soll)	60	-0,0387	0,7689	nein
MEF75/25 (%Soll)	58	0,0338	0,8013	nein
MEF25 (%Soll)	60	-0,0648	0,6228	nein

Tab. A-12: Korrelationen von SP-D im Serum mit klinischen Daten, Werten in BAL und Blutwerten (Gruppe mit Pulmozyme)

Merkmal	Anzahl der Paare	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-D in BAL (ng/ml)	22	0,1824	0,4166	nein
SP-A im Serum (ng/ml)	27	0,2165	0,2782	nein
SP-A in BAL (ng/ml)	24	-0,0191	0,9293	nein
Geschlecht	27	0,0382	0,8497	nein
Alter bei Termin	27	-0,2651	0,1814	nein
BMI (kg/m ²)	27	-0,2509	0,2068	nein
Blut: Leukozyten/nl	25	0,0300	0,8866	nein
Blut: % Eosinophile	19	0,0979	0,6900	nein
Blut: IgG (mg/dl)	17	-0,4289	0,0858	nein
Blut: IgA (mg/dl)	16	-0,2958	0,2660	nein
Blut: IgM (mg/dl)	17	-0,1593	0,5414	nein
Blut: Elastase (U)	19	0,0237	0,9233	nein
Blut: Spez. IgE (CAP-KI)	16	0,0896	0,7414	nein
Blut: Gesamt IgE (kU/l)	17	-0,3922	0,1195	nein
Blut: CRP (mg/l)	21	-0,5965	0,0043	ja
Blut: IL 8 (ng/ml)	24	-0,0507	0,8139	nein
BAL: Zellen/ml	25	-0,3651	0,0727	nein
BAL: PMN/ml	11	-0,0547	0,8732	nein
BAL: % PMN	11	-0,1364	0,6893	nein
BAL: % Lymphozyten	11	-0,2323	0,4918	nein
BAL: % Eosinophile	8	-0,5033	0,2036	nein
BAL: % Basophile	keine			
FEV (%Soll)	21	0,1065	0,6459	nein
FVC (%Soll)	21	-0,0792	0,7328	nein
MEF75/25 (%Soll)	17	0,2966	0,2477	nein
MEF25 (%Soll)	21	0,1753	0,4472	nein

Tab. A-13: Korrelationen von SP-A in BAL mit klinischen Daten, Werten im Serum und Blutwerten (Gesamtgruppe)

Merkmal	Anzahl der Paare	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-A im Serum (ng/ml)	90	0,1486	0,1620	nein
SP-D im Serum (ng/ml)	66	0,0951	0,4473	nein
SP-D in BAL (ng/ml)	78	0,3890	0,0004	ja
Geschlecht	90	-0,1991	0,0600	nein
Alter bei Termin	90	-0,0135	0,8995	nein
BMI (kg/m ²)	90	0,0487	0,6482	nein
Blut: Leukozyten/nl	89	0,2512	0,0176	ja
Blut: % Eosinophile	71	-0,0013	0,9915	nein
Blut: IgG (mg/dl)	61	0,2026	0,1174	nein
Blut: IgA (mg/dl)	60	-0,0127	0,9234	nein
Blut: IgM (mg/dl)	60	0,3415	0,0076	ja
Blut: Elastase (U)	47	0,2852	0,0520	nein
Blut: Spez. IgE (CAP-KI)	41	0,1268	0,4294	nein
Blut: Gesamt IgE (kU/l)	47	0,1483	0,3199	nein
Blut: CRP (mg/l)	75	0,1478	0,2057	nein
Blut: IL 8 (ng/ml)	78	0,0940	0,4131	nein
BAL: Zellen/ml	88	-0,0154	0,8869	nein
BAL: PMN/ml	44	-0,2620	0,0858	nein
BAL: % PMN	46	-0,2109	0,1594	nein
BAL: % Lymphozyten	46	-0,2032	0,1756	nein
BAL: % Eosinophile	42	-0,3498	0,0232	ja
BAL: % Basophile	37	-0,1873	0,2669	nein
FEV (%Soll)	74	-0,1601	0,1729	nein
FVC (%Soll)	74	-0,0998	0,3976	nein
MEF75/25 (%Soll)	68	-0,1950	0,1111	nein
MEF25 (%Soll)	74	-0,0344	0,7713	nein

Tab. A-14: Korrelationen von SP-A in BAL mit klinischen Daten, Werten im Serum und Blutwerten (Gruppe ohne Pulmozyme)

Merkmal	Anzahl der Paare	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-A im Serum (ng/ml)	66	-0,0191	0,8788	nein
SP-D im Serum (ng/ml)	66	0,0951	0,4473	nein
SP-D in BAL (ng/ml)	56	0,3224	0,0154	ja
Geschlecht	66	-0,2175	0,0793	nein
Alter bei Termin	66	-0,0171	0,8915	nein
BMI (kg/m ²)	66	0,0557	0,6569	nein
Blut: Leukozyten/nl	66	0,2363	0,0561	nein
Blut: % Eosinophile	53	0,1042	0,4576	nein
Blut: IgG (mg/dl)	44	0,2212	0,1490	nein
Blut: IgA (mg/dl)	44	-0,0033	0,9830	nein
Blut: IgM (mg/dl)	43	0,3449	0,0235	ja
Blut: Elastase (U)	30	0,3065	0,0995	nein
Blut: Spez. IgE (CAP-KI)	26	0,1068	0,6037	nein
Blut: Gesamt IgE (kU/l)	31	0,1711	0,3575	nein
Blut: CRP (mg/l)	56	0,2487	0,0646	nein
Blut: IL 8 (ng/ml)	56	0,0212	0,8770	nein
BAL: Zellen/ml	64	-0,0974	0,4439	nein
BAL: PMN/ml	34	-0,2195	0,2124	nein
BAL: % PMN	36	-0,1738	0,3108	nein
BAL: % Lymphozyten	36	-0,2130	0,2124	nein
BAL: % Eosinophile	35	-0,3062	0,0736	nein
BAL: % Basophile	32	-0,1848	0,3113	nein
FEV (%Soll)	55	-0,2309	0,0899	nein
FVC (%Soll)	55	-0,1981	0,1472	nein
MEF75/25 (%Soll)	53	-0,2190	0,1151	nein
MEF25 (%Soll)	55	-0,0820	0,5523	nein

Tab. A-15: Korrelationen von SP-A in BAL mit klinischen Daten, Werten im Serum und Blutwerten (Gruppe mit Pulmozyme)

Merkmal	Anzahl der Paare	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-A im Serum (ng/ml)	24	0,5071	0,0114	ja
SP-D im Serum (ng/ml)	24	-0,0191	0,9293	nein
SP-D in BAL (ng/ml)	22	0,5946	0,0035	ja
Geschlecht	24	-0,1324	0,5373	nein
Alter bei Termin	24	0,0484	0,8224	nein
BMI (kg/m ²)	24	0,1896	0,3750	nein
Blut: Leukozyten/nl	23	0,3027	0,1603	nein
Blut: % Eosinophile	18	-0,3652	0,1362	nein
Blut: IgG (mg/dl)	17	0,2647	0,3045	nein
Blut: IgA (mg/dl)	16	0,0221	0,9353	nein
Blut: IgM (mg/dl)	17	0,4975	0,0421	ja
Blut: Elastase (U)	17	0,0919	0,7257	nein
Blut: Spez. IgE (CAP-KI)	15	0,1608	0,5670	nein
Blut: Gesamt IgE (kU/l)	16	0,1294	0,6329	nein
Blut: CRP (mg/l)	19	-0,2364	0,3299	nein
Blut: IL 8 (ng/ml)	22	0,4007	0,0646	nein
BAL: Zellen/ml	24	0,2988	0,1562	nein
BAL: PMN/ml	10	-0,4802	0,1601	nein
BAL: % PMN	10	-0,4303	0,2145	nein
BAL: % Lymphozyten	10	-0,0547	0,8807	nein
BAL: % Eosinophile	7	-0,4491	0,3121	nein
BAL: % Basophile	keine			
FEV (%Soll)	19	0,0053	0,9829	nein
FVC (%Soll)	19	0,1509	0,5375	nein
MEF75/25 (%Soll)	15	-0,1643	0,5585	nein
MEF25 (%Soll)	19	0,0263	0,9148	nein

Tab. A-16: Korrelationen von SP-D in BAL mit klinischen Daten, Werten im Serum und Blutwerten (Gesamtgruppe)

Merkmal	Anzahl der Paare	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-A im Serum (ng/ml)	78	-0,3321	0,0030	ja
SP-D im Serum (ng/ml)	78	-0,1571	0,1697	nein
SP-A in BAL (ng/ml)	78	0,3890	0,0004	ja
Geschlecht	78	0,0365	0,7511	nein
Alter bei Termin	78	-0,0657	0,5675	nein
BMI (kg/m ²)	78	0,0639	0,5784	nein
Blut: Leukozyten/nl	77	0,0282	0,8073	nein
Blut: % Eosinophile	61	-0,0270	0,8362	nein
Blut: IgG (mg/dl)	54	-0,0022	0,9873	nein
Blut: IgA (mg/dl)	53	-0,1475	0,2918	nein
Blut: IgM (mg/dl)	53	0,3572	0,0087	ja
Blut: Elastase (U)	41	0,0301	0,8518	nein
Blut: Spez. IgE (CAP-KI)	36	0,0378	0,8267	nein
Blut: Gesamt IgE (kU/l)	41	0,1561	0,3297	nein
Blut: CRP (mg/l)	67	-0,1055	0,3956	nein
Blut: IL 8 (ng/ml)	69	-0,0383	0,7544	nein
BAL: Zellen/ml	76	-0,0793	0,4959	nein
BAL: PMN/ml	41	-0,3202	0,0413	ja
BAL: % PMN	43	-0,2783	0,0707	nein
BAL: % Lymphozyten	43	0,1531	0,3269	nein
BAL: % Eosinophile	38	-0,1185	0,4786	nein
BAL: % Basophile	34	-0,0444	0,8033	nein
FEV (%Soll)	64	0,1438	0,2569	nein
FVC (%Soll)	64	0,0470	0,7125	nein
MEF75/25 (%Soll)	59	0,0794	0,5501	nein
MEF25 (%Soll)	64	0,2035	0,1068	nein

Tab. A-17: Korrelationen von SP-D in BAL mit klinischen Daten, Werten im Serum und Blutwerten (Gruppe ohne Pulmozyme)

Merkmal	Anzahl der Paare	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-A im Serum (ng/ml)	56	-0,5260	<0,0001	ja
SP-D im Serum (ng/ml)	56	-0,2577	0,0552	nein
SP-A in BAL (ng/ml)	56	0,3224	0,0154	ja
Geschlecht	56	0,0687	0,6150	nein
Alter bei Termin	56	-0,0895	0,5116	nein
BMI (kg/m ²)	56	0,0897	0,5105	nein
Blut: Leukozyten/nl	56	0,0016	0,9904	nein
Blut: % Eosinophile	45	0,0209	0,8914	nein
Blut: IgG (mg/dl)	38	0,0577	0,7309	nein
Blut: IgA (mg/dl)	38	-0,1345	0,4208	nein
Blut: IgM (mg/dl)	37	0,3835	0,0191	ja
Blut: Elastase (U)	24	0,0073	0,9729	nein
Blut: Spez. IgE (CAP-KI)	22	0,0291	0,8979	nein
Blut: Gesamt IgE (kU/l)	26	0,0687	0,7387	nein
Blut: CRP (mg/l)	49	-0,1090	0,4560	nein
Blut: IL 8 (ng/ml)	47	-0,0947	0,5267	nein
BAL: Zellen/ml	54	-0,1453	0,2946	nein
BAL: PMN/ml	32	-0,3142	0,0799	nein
BAL: % PMN	34	-0,2647	0,1304	nein
BAL: % Lymphozyten	34	0,1831	0,3001	nein
BAL: % Eosinophile	33	-0,1242	0,4910	nein
BAL: % Basophile	30	-0,0322	0,8659	nein
FEV (%Soll)	47	0,1194	0,4239	nein
FVC (%Soll)	47	-0,0058	0,9692	nein
MEF75/25 (%Soll)	46	0,1208	0,4238	nein
MEF25 (%Soll)	47	0,3090	0,0346	ja

Tab. A-18: Korrelationen von SP-D in BAL mit klinischen Daten, Werten im Serum und Blutwerten (Gruppe mit Pulmozyme)

Merkmal	Anzahl der Paare	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-A im Serum (ng/ml)	22	0,1175	0,6026	nein
SP-D im Serum (ng/ml)	22	0,1824	0,4166	nein
SP-A in BAL (ng/ml)	22	0,5946	0,0035	ja
Geschlecht	22	-0,0931	0,6801	nein
Alter bei Termin	22	0,0331	0,8837	nein
BMI (kg/m ²)	22	0,0740	0,7436	nein
Blut: Leukozyten/nl	21	0,2001	0,3844	nein
Blut: % Eosinophile	17	-0,0225	0,9317	nein
Blut: IgG (mg/dl)	16	-0,0941	0,7288	nein
Blut: IgA (mg/dl)	15	-0,1162	0,6801	nein
Blut: IgM (mg/dl)	16	0,3529	0,1800	nein
Blut: Elastase (U)	17	-0,0091	0,9725	nein
Blut: Spez. IgE (CAP-KI)	14	0,1412	0,6302	nein
Blut: Gesamt IgE (kU/l)	15	0,4321	0,1077	nein
Blut: CRP (mg/l)	18	-0,1022	0,6865	nein
Blut: IL 8 (ng/ml)	22	0,1385	0,5398	nein
BAL: Zellen/ml	22	0,1101	0,6256	nein
BAL: PMN/ml	9	-0,3682	0,3296	nein
BAL: % PMN	9	-0,2333	0,5457	nein
BAL: % Lymphozyten	9	-0,1255	0,7476	nein
BAL: % Eosinophile	5	-0,1539	0,8048	nein
BAL: % Basophile	keine			
FEV (%Soll)	17	0,1324	0,6126	nein
FVC (%Soll)	17	0,1936	0,4565	nein
MEF75/25 (%Soll)	13	-0,1923	0,5291	nein
MEF25 (%Soll)	17	-0,1176	0,6529	nein

Tab. A-19: Korrelationen in der Kontrollgruppe: SP-A im Serum

Merkmal	Anzahl der Paare	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-D im Serum (ng/ml)	17	0,05392	0,8372	nein
SP-A in BAL (ng/ml)	17	0,4779	0,0523	nein
SP-D in BAL (ng/ml)	16	-0,1500	0,5792	nein
Geschlecht	17	-0,5669	0,0176	ja
Alter bei Termin	17	0,6868	0,0023	ja

Tab. A-20: Korrelationen in der Kontrollgruppe: SP-D im Serum

Merkmal	Anzahl der Paare	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-A im Serum (ng/ml)	17	0,05392	0,8372	nein
SP-A in BAL (ng/ml)	18	-0,1930	0,4429	nein
SP-D in BAL (ng/ml)	16	-0,1441	0,5944	nein
Geschlecht	18	0,2833	0,2546	nein
Alter bei Termin	18	0,1813	0,4714	nein

Tab. A-21: Korrelationen in der Kontrollgruppe: SP-A in BAL

Merkmal	Anzahl der Paare	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-A im Serum (ng/ml)	17	0,4779	0,0523	nein
SP-D im Serum (ng/ml)	18	-0,1930	0,4429	nein
SP-D in BAL (ng/ml)	16	0,2647	0,3218	nein
Geschlecht	18	-0,6697	0,0024	ja
Alter bei Termin	18	0,6301	0,0051	ja

Tab. A-22: Korrelationen in der Kontrollgruppe: SP-D in BAL

Merkmal	Anzahl der Paare	Spearman-Korrelationskoeffizient	p-Wert	signifikant
SP-A im Serum (ng/ml)	16	-0,1500	0,5792	nein
SP-D im Serum (ng/ml)	16	-0,1441	0,5944	nein
SP-A in BAL (ng/ml)	16	0,2647	0,3218	nein
Geschlecht	16	-0,05211	0,8480	nein
Alter bei Termin	16	-0,07687	0,7772	nein

7.2 Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. M. Griese ganz herzlich für die Überlassung des Themas und seine sehr gute persönliche Betreuung meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im Labor der Forschungsgruppe Lunge bedanken. Frau Andrea Schams hat mir mit großer Geduld die Grundlagen der Laborarbeit erklärt und mir dadurch die ersten Tage im Labor sehr erleichtert. Auch bei Herrn Dr. Markus Woischnik möchte ich mich für die geduldige Beantwortung aller meiner Computerfragen bedanken. Schließlich möchte ich auch Frau Steffi Gruschka für ihre Hilfe und viele nette gemeinsame Stunden im Labor danken.

Auch meinen Mitdoktoranden Eva Brack, Dominik Hartl, Valerie Kirchberger, Philip Latzin, Asli Pamir, Christian Paschen, Farhad Schabaz, Christiane Sparr, Oliver Tafel, Maria Wassilewa, Katinka Weckerle und Tobias Winter möchte ich für viele hilfreiche Tips und nette Gespräche während der Laborzeit danken. Mein besonderer Dank gilt Vitaliy Starosta, der sich geduldig alle meine Statistikprobleme angehört hat und immer eine Antwort wusste.

Bei den Mitarbeitern in den anderen BEAT-Zentren in Berlin, Hannover, Essen und Köln bedanke ich mich für die Hilfe bei der Beschaffung der Serumproben.

Schließlich danke ich noch meiner Familie und allen Freunden, die mich stets motiviert und unterstützt haben und so sehr zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Bielecki
Vorname	Eva
Geburtsdatum und -ort	07.07.1977, Berlin
Anschrift	Wartbergstraße 43 74076 Heilbronn
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig, keine Kinder

Schulausbildung

1984 bis 1990	Grundschule in Berlin
1990 bis 1997	Gymnasium Neubiberg, Abschluss mit Abitur

Studium

1997 bis 1999	Studium der Betriebswirtschaftslehre an der LMU, München (Mai 1999: Vordiplom)
1999 bis 2005	Studium der Humanmedizin an der LMU, München
Aug. 2001	Ärztliche Vorprüfung
Sept. 2002	1. Staatsexamen
Sept. 2004	2. Staatsexamen
Nov. 2005	3. Staatsexamen
Dez. 2005	Approbation als Ärztin

Promotionsarbeit

seit Nov. 2002	Experimentelle Doktorarbeit im Dr. von Haunerschen Kinderspital in der Forschungsgruppe Lunge Leitung: Prof. Dr. med. Matthias Griese Thema: Surfactantproteine A und D bei Patienten mit Cystischer Fibrose
----------------	--

Famulaturen und Praktika

01.07.1999 bis 30.08.1999	Krankenpflegepraktikum im LMU Klinikum Innenstadt (I. Frauenklinik)
11.02.2002 bis 12.03.2002	Famulatur im Zentrum für Akutgeriatrie und Frührehabilitation im Krankenhaus München Neuperlach
17.02.2002 bis 21.03.2003	Famulatur in der Kinderarztpraxis von Frau Gabi Haus, Hans-Mielich- Straße 35, 81543 München
01.08.2003 bis 30.09.2003	Famulatur im Machame Lutheran Hospital, Tansania (Gebiete: Gynäkologie und Geburtshilfe, Pädiatrie, Chirurgie)

Praktisches Jahr

18.10.2004 bis 06.02.2005	Innere Medizin (Städtisches Krankenhaus Neuperlach, München)
07.02.2005 bis 29.05.2005	Pädiatrie (Kinderklinik des Dritten Ordens, München)
30.05.2005 bis 30.08.2005	Chirurgie (Norrlands Universitetssjukhus, Umea, Schweden)

Berufliche Tätigkeiten

seit April 2006	Assistenzärztin in der Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin der SLK-Kliniken, Heilbronn
-----------------	--

Praktische Tätigkeiten

01.04.1998 bis 24.04.1998	Praktikum bei der Taxpayers Association of Europe in Brüssel
24.08.1998 bis 09.10.1998	Praktikum bei der Deutschen Bank AG, (Bereiche: Privates Anlagemanagement, Firmenkundenbetreuung)
Aug. 2000 bis Okt. 2000	Work & Travel USA Programm: Verschiedene Tätigkeiten im High Hampton Inn & Country Club (z. B. Kinderprogramm und Service)
1997 bis 2001	wiederholte Teil- oder Vollzeitbeschäftigung bei der Siemens AG, Standort Neuperlach, im Fachinformationszentrum Wirtschaft
01.01.2002 bis 30.06.2002	Tätigkeit beim Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes
01.12.2002 bis 31.08.2004	Tätigkeit als studentische Aushilfe beim Elsevier Urban und Fischer Verlag im Lektorat Medizin
April 2005 und Okt. 2005	Tätigkeit als Tutorin im Rahmen des MeCuM-Studienganges an der Medizinischen Fakultät der LMU, München

Sonstiges

Fremdsprachen	Englisch (sehr gute Kenntnisse) Französisch, Schwedisch (Grundkenntnisse)
Computerkenntnisse	Word, Excel, Access
Maschinenschreiben	Prüfung vom 27.07.1994 am Gymnasium Neubiberg