

Aus dem Zentrum Innere Medizin  
Abteilung Pneumologie (Prof. Dr. med. T. Welte)  
Medizinische Hochschule Hannover  
und dem Fraunhofer Institut  
für Toxikologie und Experimentelle Medizin  
in Hannover

**Pilotstudie zum Einfluss einer zytostatischen Chemotherapie  
auf Funktion und Zusammensetzung  
des pulmonalen Surfactantsystems  
bei Patienten mit Bronchialkarzinom**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von  
Dieter Specht  
aus Hehlen

Hannover, 2005

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover  
am 27.06.2006

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. D. Bitter-Suermann  
Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. J. M. Hohlfeld  
Referent: Prof. Dr. Olaf Dammann  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Tim Greten

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2006  
Promotionsausschussmitglieder: Prof. Dr. Karl Welte  
Prof. Dr. Dietrich Peest  
Prof. Dr. Sylvia Glüer

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Ausgangspunkt: Die lokale Abwehr in der Alveole	1
1.2.	Das Bronchialkarzinom: Häufigkeit, Einteilung, Therapie	3
1.3.	Pneumonie und Alveolitis nach zytostatischer Therapie	5
1.4.	Das Surfactantsystem	7
1.4.1.	Anatomie und Physiologie des Alveolarsystems	7
1.4.2.	Physikalische Grundlagen zur Oberflächenspannung	8
1.4.3.	Zusammensetzung des Surfactant	9
1.4.4.	Zur Struktur der Surfactantlipide	10
1.4.5.	Rückblick in die Geschichte des Surfactant	11
1.4.6.	Bildung und Resorption der Surfactantlipide	13
1.4.7.	Organisation und Funktion von Monolayer und Multilayer	14
1.4.8.	Aufgaben des Surfactantsystems	15
1.4.9.	Die Surfactantproteine A, B, C und D	17
1.4.10.	Surfactantveränderungen bei verschiedenen Lungenerkrankungen	22
1.5.	Ziele dieser Arbeit	23
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1.	Patienten und Probanden	24
2.2.	Bronchoskopie	28
2.2.1.	Fiberbronchoskopie	28
2.2.2.	Narkosebronchoskopie	29
2.2.3.	Gewinnung und primäre Verarbeitung der BAL	29
2.3.	Zytostatische Chemotherapie	30
2.4.	Aufarbeitung der BAL	30
2.4.1.	Übersicht über die Arbeitsschritte	30
2.4.2.	Gewinnung der Surfactant-Fraktionen, Lipidanalytik	31
2.4.3.	Proteinanalytik	32
2.4.4.	Funktionelle Analytik	33
2.4.5.	Immunmodulation	34
2.5.	Methodenkritische Anmerkungen	35
2.6.	Statistik	35
2.7.	Aufstellung der verwendeten Materialien und Medikamente	37

---

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	41
3.1.	Allgemeine BAL-Daten	41
3.1.1.	Recovery	41
3.1.2.	Zellzahl und Differenzialzytologie	41
3.1.3.	Gesamtprotein	44
3.2.	Surfactanzusammensetzung	45
3.2.1.	Gesamt-Phospholipide	45
3.2.2.	SA und LA	46
3.2.3.	SP-A	49
3.3.	Surfactantfunktion	49
3.4.	Immunmodulation	52
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	55
4.1.	Vorbemerkungen	55
4.2.	Recovery	55
4.3.	Zytologie	56
4.4.	Einflüsse von Geschlecht, Alter und Narkosebronchoskopie	59
4.5.	Gesamtprotein	60
4.6.	SP-A	61
4.7.	Phospholipide und Surfactantfunktion	64
4.8.	Immunmodulation durch Surfactant	68
4.9.	Resümee	70
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	72
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	74
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	91
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	92
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	93
<b>10.</b>	<b>Erklärung</b>	94

---

# 1. Einleitung

## 1.1. Ausgangspunkt: Die lokale Abwehr in der Alveole

Die Lunge besitzt nach dem Gastrointestinaltrakt die größte Oberfläche aller Organe gegenüber der Außenwelt. Jeden Tag werden über 10.000 Liter Luft eingeatmet, die je nach Region 5.000 bis 100.000 Aerosolteilchen/cm<sup>3</sup> Luft enthalten. Atemzug für Atemzug werden einige Millionen Teilchen inhaliert, von inerten Mikropartikeln bis zu potentiell pathogenen Mikroorganismen. Die kleinsten Partikel unter 10 µm Größe können bis in die Endstrecke des Bronchialsystems vordringen [165].

Sie treffen dort in den Alveolen auf eine über 100 m<sup>2</sup> große, aber sehr verletzbare Barriere, die den Körper vor schädlichen Einflüssen schützen soll. Sie ist mit 0,2 - 0,5 µm Breite im Gegensatz zur Haut extrem dünn. Die Partikel müssen nicht, wie im Gastrointestinaltrakt, verschiedene anatomische Abschnitte mit der Möglichkeit unterschiedlicher sequentieller Abwehrmöglichkeiten passieren. Es existiert nur ein kleiner Pool von residenten Abwehrzellen, beispielsweise ein bis zwei Alveolarmakrophagen pro Alveole. Dabei muss auf Grund der Nähe zu den Blutkapillaren ein hohes Maß an lokaler Sterilität gewährleistet werden [92]. Deshalb wird für die Abwehr ein System benötigt, das die Pathogene rasch erkennen und eliminieren kann, das dazu eine Entzündungsreaktion je nach Bedarf diffizil abgestimmt auslösen oder unterdrücken kann. Schließlich soll das fragile Alveolarsystem nicht durch überschießende Inflammation beeinträchtigt werden.

Die Tatsache, dass sich schon bei gesunden Individuen nur selten Infektionen der tiefen Atemwege ereignen, spricht für die Effizienz der bestehenden Abwehrmechanismen. Dabei stellt sich die Frage, ob das Alveolarsystem auch beim immunkompromittierten Patienten, z. B. nach einer zytostatischen Chemotherapie eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms, zur gleichen Abwehrleistung fähig ist, kommt es doch in Folge der Zytostase zu einer Knochenmarkdepression und zur Hemmung immunkompetenter Zellen. Je nach Ausmaß und Dauer der Leukopenie steigt das Risiko für den Organismus, an einer Infektion zu erkranken. Trotzdem akquirieren die meisten der zytostatisch therapierten Tumorpatienten keine Pneumonie. Offensichtlich reicht die Schutzleistung der tiefen Atemwege auch während der Phase der Leukopenie aus, einer Infektion entgegenzuwirken

Es ist deshalb anzunehmen, dass neben der blutgebundenen zellulären, „adaptiven“ Abwehr nicht-zelluläre, ortständige Mechanismen in der Alveole die Infektabwehr aufrecht erhalten, sie nach einer Chemotherapie vielleicht sogar verstärken und so für die niedrige Inzidenz von Pneumonien unter standarddosierter zytostatischer Chemotherapie mit verantwortlich sind.

Tatsächlich konnte in den letzten Jahren belegt werden, dass der alveoläre Surfactant u. a. mit seinen azellulären Bestandteilen wie den Kollektinen einen wichtigen Beitrag zur Infektabwehr leistet. Surfactantproteine A und D sowie Mannosebindendes Protein (MBP) als Lektin-bindende Proteine haben ihre Bedeutung in der unspezifischen Infektabwehr, indem sie z. B. die Phagozytose verschiedener Bakterien beschleunigen und selbst mit Mikroorganismen interagieren können [48,251]. Auch Surfactantlipide, die durch ihren bipolaren Charakter die unmittelbare Grenze an der Flüssigkeits-Luft-Schicht der Atemwege bilden, beeinflussen die unspezifische Abwehr [224]. Die Mitarbeiter um Schürch prägten für den Surfactant deshalb den Begriff der „primary defense barrier“ [79].

Systematische Untersuchungen zum humanen Surfactant unter antitumoröser Chemotherapie *in vivo* sind rar. Deshalb sollten in dieser Arbeit Charakteristika von Surfactant nach einer zytostatischen Chemotherapie beschrieben werden unter besonderer Berücksichtigung seiner zellulären und natürlichen Abwehr, seiner biophysikalischen Funktion und seiner Fähigkeit, immunmodulatorisch zu wirken. Im Vergleich mit den Daten von noch nicht therapierten Trägern eines Bronchialkarzinoms und mit Normalpersonen sollte abgeschätzt werden, ob sogar schon die Träger eines Karzinoms primär Veränderungen in Abwehr und Surfactantfunktion aufweisen.

## 1.2. Das Bronchialkarzinom: Häufigkeit, Einteilung, Therapie

Das Bronchialkarzinom muss auf Grund seiner Häufigkeit zu den großen Volkskrankheiten gezählt werden. In Deutschland starben im Jahr 2002 mehr als 28.700 Männer und fast 10.400 Frauen an Lungenkrebs. Beim Mann stellt es die häufigste Todesursache an einem malignen Organatumor dar. Für die Frau ist es eines der häufigsten Karzinome. Sollte die seit Jahren steigende Inzidenz anhalten, wird es in weniger als zwei Jahrzehnten bei der Frau ebenfalls die häufigste Todesursache an einem Organkrebs sein [131,221]. Brennan und Bray veröffentlichten vor kurzem eine aufwändige statistische Berechnung zur Mortalität des Lungenkrebses in 20 europäischen Ländern, basierend auf Erkrankungsdaten der Jahre 1950 bis 1998. Sie kalkulierten für die nächsten Jahre in den meisten Ländern, so auch in Deutschland, eine langsam abnehmende Lungenkrebsrate bei den Männern. Bei Frauen würden die Erkrankungen auf nicht absehbare Zeit hin weiter deutlich zunehmen [25]. Der Bericht des Epidemiologischen Krebsregisters Niedersachsen aus 2003 bestätigt diese Entwicklung [192]. In den USA erwarten die Epidemiologen der American Cancer Society für das Jahr 2003 171.900 Neuerkrankungen an Lungenkrebs, 157.200 Menschen werden daran sterben. Mit 28 % aller Krebstoten nimmt das Bronchialkarzinom auch in den USA den ersten Rang in der Krebstodstatistik ein [119]. Gerade haben Spira und Ettinger für dieses Jahr 173.700 Neuerkrankungen an Lungenkrebs in USA vorausberechnet, 164.440 werden daran sterben [216].

Auf Grund therapeutischer und prognostischer Unterschiede hat sich die histo-zytologische Einteilung in kleinzellige (SCLC = small cell lung carcinoma) und nicht-kleinzellige (NSCLC = non small cell lung carcinoma) Bronchialkarzinome bewährt. Die häufigsten Subtypen des NSCLC beinhalten das Plattenepithelkarzinom (30 - 40 %), das Adenokarzinom (25 - 30 %), das großzellige Karzinom (unter 10 %) und das adeno-squamöse Karzinom (1 - 2 %). Noch seltener werden das Karzinoid und das Bronchialdrüsenkarzinom angetroffen. Das kleinzellige Karzinom betrifft 20 – 25 % der Diagnosen. Die Häufigkeitsangaben schwanken allerdings stark in Abhängigkeit vom Untersuchungsgut. [226,227]. Bei 100 NSCLC fanden Pathologen in 45 % nach sorgfältiger histologischer Aufarbeitung des Resektions- oder Obduktionsmaterials größere Tumorheterogenitäten [196]. Eine eingeschränkte Aussagekraft gilt auch für kleine Biopsien [228]. An der feingeweblich gestellten Diagnose eines kleinzelligen Karzinoms muss dagegen, auch in Anbetracht des Einsatzes immunhistochemischer Methoden, weniger Zweifel gehegt werden. Müller fand in einer

kleinen Serie aufgearbeiteter SCLC 82 % der Tumoren homogen differenziert [73]. Die Häufigkeit, anhand bronchoskopischer Biopsien ein SCLC mit einem NSCLC zu verwechseln, wurde von anderen Pathologen mit unter 10 % angegeben [196,228]. Hierbei spielen sicherlich unterschiedliche Biopsieorte in den offenbar nicht selten heterogen differenzierten Tumoren die Hauptrolle. Feingewebliche Diagnose und klinische Befunde müssen bei der Diagnosestellung zusammen passen.

Für SCLC und NSCLC wird eine Stadieneinteilung von 0 – IV nach dem International System for Staging Lung Cancer empfohlen, deren letzte Revision für die Lungentumoren 1997 erfolgte [169]. Sie beruht auf anatomischen Kriterien zu lokaler Tumorausdehnung, Lymphknotenstatus sowie Fernmetastasen, der sog. TNM-Klassifikation (tumor-node-metastasis) [102,103]. Für das SCLC hat sich wegen der bei Diagnosestellung schon oft fortgeschrittenen Tumorausdehnung eine zusätzliche Unterscheidung in „limited disease“ (auf einen Hemithorax begrenzter Tumor) und „extensive disease“ bewährt. Bei einigen Organstrukturen, z. B. des N. phrenicus, besteht allerdings eine uneinheitliche Einteilung [228,255].

Die Behandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms hat sich als eine Domäne der zytostatischen Polychemotherapie erwiesen, oftmals ergänzt um eine lokoregionäre Bestrahlung. Eine Operation kommt zumeist nicht mehr in Frage. Andere, z. T. noch experimentelle Behandlungsprinzipien wie Hochdosis-Chemotherapie [106], monoklonale Antikörper oder Angiogenese-Hemmer haben die insgesamt schlechte Prognose bisher allenfalls für einzelne Subgruppen günstiger beeinflussen können. Allerdings gibt es hoffnungsvolle Ansätze, mit multimodalen Therapieversuchen einschließlich Operation die Überlebensrate in den Stadien IB – III B deutlich verbessern zu können [62,216].

Die zytostatische Chemotherapie wird in allen Tumorstadien des SCLC als prognoseverbessernde Therapie, gelegentlich sogar in kurativem Ansatz, eingesetzt. Autoren im anglo-amerikanischen Raum bevorzugen als Erstlinientherapie sowohl bei „limited disease“ als auch bei „extensive disease“ Cisplatin oder Carboplatin, kombiniert mit Etoposid [3,216]. In Deutschland kommt häufig zuerst eine Kombination von Adriblastin, Cyclophosphamid und Vincristin zur Anwendung. Die letzten von der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (DGP) im Konsens mit anderen Fachgesellschaften erstellten Empfehlungen zur Therapie des Bronchialkarzinoms nennen ohne Bevorzugung eines Schemas als etablierte Medikamente die obigen Kombinationen, ergänzt um Ifosfamid/Etoposid [120,172,226].

### **1.3. Pneumonie und Alveolitis nach zytostatischer Therapie**

Zu den bedrohlichsten pulmonalen Komplikationen einer zytostatischen Behandlung zählen die Pneumonie während einer Neutropenie und die interstitielle Lungenentzündung (synonym: Pneumonitis, Alveolitis) durch toxisch-allergische Wirkung der Chemotherapeutika.

Maligne Grunderkrankungen und antineoplastische Therapie führen zu einer meist globalen Beeinträchtigung der physiologischen Infektabwehr [106]. Bei Chemotherapien solider Tumoren stehen Störungen der unspezifischen und zellulären Abwehr im Vordergrund. Die Neutropenie entsteht relativ langsam, unterschreitet im peripheren Blut oft nicht 100 Zellen/ $\mu$ l und dauert zumeist kurz an (3 - 10 Tage). Es dominieren bakterielle Erreger [52]. In einer neueren Studie bei Patienten mit bakteriämischen Pneumonien erwiesen sich Pneumokokken und *Pseudomonas* spp. mit zusammen 70 % als die häufigsten Erreger [30]. Daneben muss mit Staphylokokken, Anaerobiern und Enterobakterien gerechnet werden [75].

Patienten mit hämatologischen und lymphatischen Neoplasien haben meist schon zu Beginn eine funktionelle Einschränkung einer oder mehrerer Zellreihen. Die zumeist sehr aggressive antineoplastische Chemotherapie führt zu ausgeprägten, lang anhaltenden Neutropenien. Deshalb sind in diesem Krankengut andere, sonst seltenere Erreger vorherrschend [52]. Unter den immunsupprimierten Patienten in einer hämatologisch-onkologischen Universitätsklinik betrug schon vor mehreren Jahren der Pneumonieanteil an den Infektionen ca. 50 % [23].

Nach einer Chemotherapie solider Tumoren wie dem Bronchialkarzinom besteht allerdings ein deutlich geringeres Infektionsrisiko, das in seiner Größe aber nur schwer abzuschätzen ist. Die vorliegenden Daten zur Häufigkeit von Infektionen unter Chemotherapie werden beispielsweise von der European Society of Biomodulation and Chemotherapy (ESBiC) als nicht ausreichend angesehen, so dass sie 1999 eine europäische Studie zu Infektionen bei Karzinompatienten ins Leben gerufen hat [122].

Eine internationale Arbeitsgruppe um Klastersky hatte in 2000 ein Score-System vorgestellt, um rechtzeitig Patienten zu erkennen, die nach einer chemotherapie-induzierten febrilen Neutropenie keine schweren Komplikationen entwickeln [128]. Dabei waren das Fehlen von schweren Tumorsymptomen, Gewichtsverlust, Hypotonie, COPD, Dehydratation, Alter unter 60 Jahre sowie die Histologie eines soliden Tumors mit einem geringeren Risiko von schweren Komplikationen oder Tod bei febriler Neutropenie assoziiert. Der Anteil von Bronchialkarzinomen in dieser mehr als 750 Patienten umfassenden Studie betrug 8 %.

Betrachtet man allein das Bronchialkarzinom, bietet es einige spezielle Aspekte wie die retrostenotische Pneumonie oder eine Infektion in einem nekrotisch zerfallenden Tumor [197]. Exakte Zahlen zur Inzidenz einer Pneumonie bei chemotherapiertem Lungenkarzinom sind aber nicht erhältlich. Lediglich in einer älteren Arbeit haben Perlin et al. an 121 Patienten mit Bronchialkarzinom verschiedener Histologie aus allen Tumorstadien bei 70 % der Erkrankten während des gesamten Krankheitsverlaufes eine pulmonale Infektion dokumentiert [183], wobei hier ein hoher Anteil von retrostenotischen Infektionen und Tumorzerfalls-Pneumonien unterstellt werden muss.

Dagegen lehrt die klinische Beobachtung, dass es nach Chemotherapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms eher selten zu „gewöhnlichen“ (nicht-tumornekrotischen, nicht-obstruktiven) Pneumonien kommt, trotz Suppression des Immunsystems und trotz der hohen Last an potentiell pathogenen Organismen, die täglich bis in die Alveolen hinein inhaliert werden. So gewinnt der Gedanke an einen gesteigerten lokalen Abwehrmechanismus an Bedeutung.

Eine andere mögliche pulmonale Schädigung betrifft das Lungengerüst. Der Schädigungsmechanismus ist überwiegend toxischer, seltener allergischer Natur. Häufig (jedoch nicht bei Cyclophosphamid) ist eine Beziehung zwischen kumulativer Dosis und dem Ausmaß der pulmonalen Störung zu erkennen. Zu den häufigsten Auslösern, die zu einer Alveolitis führen, gehören Bleomycin, Busulfan und Mitomycin C. Jedoch auch für Cyclophosphamid und sehr selten für Vinca-Alkaloide, die beide in der Behandlung des kleinzelligen Karzinoms angewandt werden, sind Alveolitis und Fibrose bekannt [1]. Patel hat den Schädigungsmechanismus als oxidative Degradierung des alveolären Lipidlayers durch Cyclophosphamid und seinen reaktiven Metaboliten beschrieben [179]. Ein intaktes antioxidatives System, wie es auch das Surfactantprotein-A (SP-A) im pulmonalen Surfactant-System repräsentiert, könnte möglicherweise die oxidativen Schäden begrenzen.

Neben diesem am häufigsten anzutreffenden diffusen toxischen Alveolarschaden vermag Cyclophosphamid auch eine Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie (BOOP) und eine unspezifische interstitielle Pneumonie zu induzieren [163]. Für Vincristin und Adriamycin sind als seltene pulmonale Nebenwirkungen ebenfalls unspezifische interstitielle Pneumonien dokumentiert [199].

Der sichere Nachweis auch leichtgradiger Alveolitiden und interstitieller Lungenschädigungen gelingt mit der bronchoalveolären Lavage (BAL), die in der Regel eine erhöhte Gesamtzellzahl mit Lymphozytose oder mit Neutrophilie aufweist [21,173,185].

## 1.4. Das Surfactantsystem

### 1.4.1. Anatomie und Physiologie des Alveolarsystems

Das Bronchialsystem endet nach etwa 16-18 dichotomen Verzweigungen in den 0,2 - 0,6 mm durchmessenden Alveolen. Ihre Gesamtheit umfasst eine Gasaustauschfläche von etwa 80 m<sup>2</sup> in der Expiration und 120 m<sup>2</sup> in der Inspiration. Sie sind ausgekleidet mit zweierlei Epithelzellen, den Pneumozyten Typ I und Typ II [166,245].

Die Pneumozyten Typ I oder Deckzellen überkleiden mit ihrem flachen, organellenarmen Zelleib etwa 95 % der Basalmenbran-Fläche und bilden damit den Gegenpart des auf der anderen Seite der Basalmenbran anliegenden Kapillarendothels des pulmonalarteriellen Gefäßsystems [166]. Erst in letzter Zeit wurde dem bis dahin als metabolisch inaktiv angesehenen Pneumozyten I eine wesentliche Rolle bei der alveolären Flüssigkeitshomöostase und bei der Regulation von Zellproliferation, Ionentransport und Peptidmetabolismus zugestanden [121,248].

Die verbleibenden 5 % der Basalmenbran wird von den Pneumozyten Typ II bedeckt, die trotz einem Durchmesser von 9 µm um ein mehrfaches kleiner sind als die Typ I-Zellen. Sie liegen einzeln und eingestreut im Verband der sie einfassenden Deckzellen und werden deshalb auch als Nischenzellen bezeichnet. Pneumozyten II stellen etwa 15 % aller Lungenparenchym-Zellen. Sie besitzen typischerweise auf ihrer Oberfläche Mikrovilli und im Zytoplasma zahlreiche aktive Organellen. Im rauen endoplasmatischen Retikulum werden nahezu alle Surfactant-Bestandteile neu synthetisiert oder reutilisiert, bevor sie im dichten Golgi-Apparat weiter transformiert werden. Die Lamellenkörper mit ihrem charakteristischen band- und zwiebelschalenartigen Aspekt dienen als Speicherorganellen für Phospholipide und Surfactantproteine, bis sie ihren Inhalt durch Verschmelzung mit der Zellmembran ausschleusen. Extrazellulär transformieren ihre Inhaltsstoffe rasch in tubuläres Myelin.

Neben der Surfactantsynthese und -sekretion ist der Pneumozyt II auch an zahlreichen anderen Prozessen beteiligt. Dazu gehören die Sekretion multipler Substanzen, Rezeptoren und Botenstoffe wie Lysozym, Kathepsin H, Antiproteasen, Convertase, apoptose-induzierende Membranrezeptoren, lysosomale Enzyme der Lamellenkörper. Der Pneumozyt II ist in die Reparatur geschädigter Deckzellen involviert und kann sich in einen Pneumozyten Typ I transformieren. Er interagiert mit Fibroblasten, Endothelzellen, Alveolarmakrophagen und Leukozyten. Mason und Williams bezeichneten den Pneumozyten II deshalb als den „defender of the alveolus“ [158], was Fehrenbach in seiner umfassenden Übersicht über den aktuellen Wissensstand zum Pneumozyten II wieder aufnahm [70].

### 1.4.2. Physikalische Grundlagen zur Oberflächenspannung

Auf den die Alveolen auskleidenden Pneumozyten befindet sich ein dünner Flüssigkeitsfilm, der Immunzellen, Botenstoffe, Serumproteine und Zellprodukte enthält. Auf dieser schmalen Flüssigkeitsschicht, die auch als Hypophase bezeichnet wird, breitet sich der Surfactant als ein- bis mehrschichtiger molekularer Lipidfilm (auch als „Monolayer“, „Bilayer“ oder „Multilayer“ benannt) aus. Er bildet die Grenzfläche zwischen der alveolären Luft und der Hypophase. In der neueren Nomenklatur findet sich für die beiden Schichten („Layer“ und Hypophase) auch der Begriff der „epithelial lining fluid“ (ELF).

Bei der Inspiration vergrößert sich die alveoläre Oberfläche. Die dicht liegenden Moleküle über der Hypophase werden auseinandergezogen und vertikal in der Flüssigkeit oder horizontal an die vergrößerte Oberfläche bewegt. Dabei muss gegen molekulare Kohäsionskräfte Arbeit geleistet werden, die für die an die Oberfläche gebrachten Moleküle größer ist als für die im Inneren verbliebenen Moleküle. Dementsprechend besitzen diese Grenzflächenmoleküle eine höhere potentielle Energie. Diese Energie wird als Grenzflächenenergie oder Oberflächenspannung (OFS) bezeichnet. Sie ist die Arbeit, die pro Flächeneinheit bei der Trennung zweier Phasen zur Vergrößerung einer Oberfläche aufgebracht werden muss [166].

Eine wesentliche physikalische Eigenschaft der OFS besagt, dass sie kleinstmögliche Flächen zu bilden versucht. In der Alveole bedeutet es, dass die ELF eine minimale alveoläre Oberfläche anstrebt, um den kleinstmöglichen potentiellen Energiezustand zu erreichen. Daraus resultiert eine Verkleinerung der Alveole und eine Erhöhung des intraluminalen Gasdrucks, der ohne Surfactant in Abhängigkeit vom Radius der Alveole unterschiedlich hoch wäre. Dafür hat Laplace das Gesetz formuliert:

$$P = \frac{2 \times OFS}{R}$$

woraus folgt:

$$OFS = \frac{P \times R}{2}$$

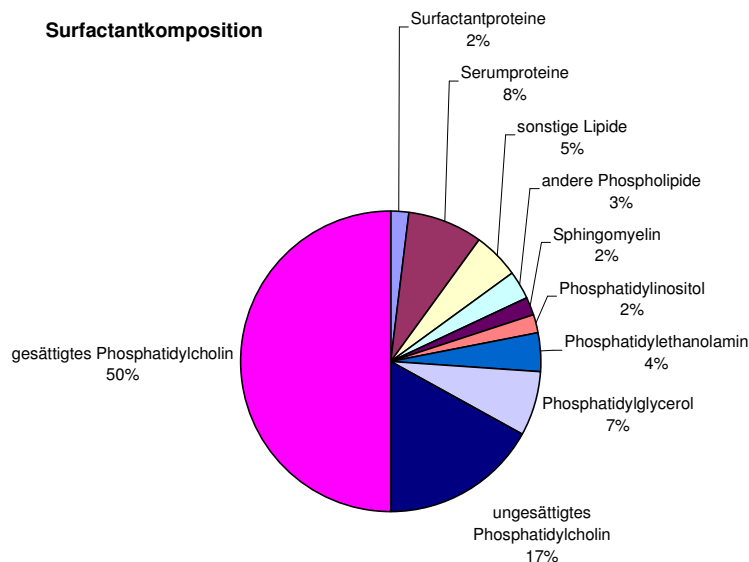
Das bedeutet: Der Gasdruck (P), auch Kollapsdruck der Alveolen bezeichnet, verhält sich proportional zur OFS und umgekehrt proportional zum Radius (R) der Alveole. Oder: Die OFS ist bei konstantem Druck direkt abhängig vom Radius.

Da Alveolen kein ausreichendes Stützgerüst besitzen, würden gemäß dem Laplace'schen Gesetz kleine Alveolen mit geringem Radius auf Grund ihrer hohen OFS während der fortlaufenden In- und Expiration zunehmend atelektatisch werden und ihre Luft in größere Alveolen mit geringerer OFS entleeren, die dadurch überbläht würden.

Der auf der Hypophase gelegene Surfactant ist in der Lage, die Grenzflächenenergie aufzunehmen und in die Phospholipidschicht zu verteilen. Dadurch wird die OFS endexpiratorisch derartig vermindert, dass in Alveolen jeglichen Durchmessers derselbe Kollapsdruck besteht und sich keine Atelektasen entwickeln. Die OFS wird während des gesamten Atemzyklus gesenkt, so dass eine Verminderung der Atemarbeit resultiert (s. a. 1.4.7.).

### 1.4.3. Zusammensetzung des Surfactant

Surfactant besteht aus einem Lipid-Protein-Gemisch, das die gesamte alveoläre Oberfläche auskleidet. Seine Zusammensetzung wird in Abbildung 1 aufgeschlüsselt.



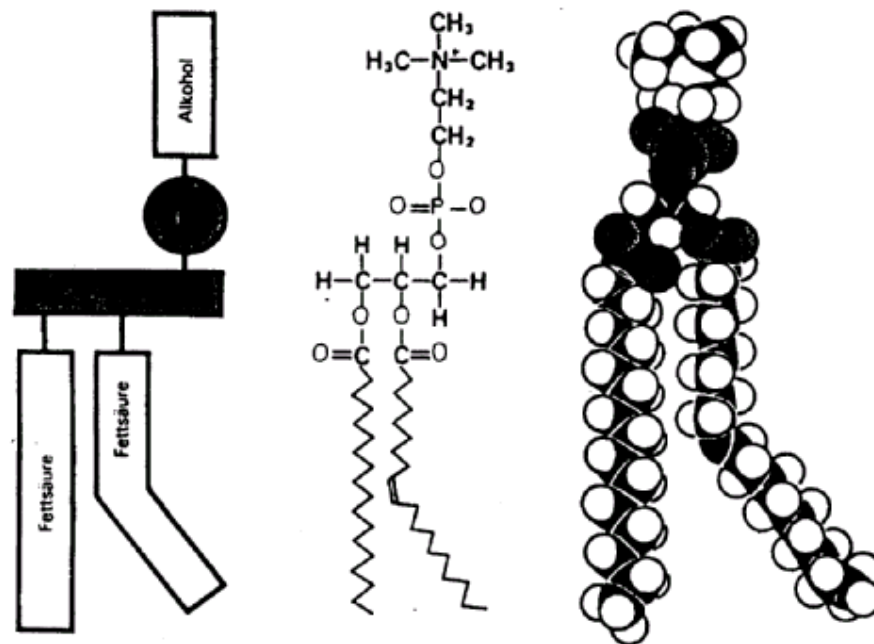
**Abbildung 1:** Zusammensetzung des Surfactant. Nach Hamm und Mitarbeiter [96].

Mittels Ultrazentrifugation kann der Surfactant in zwei Fraktionen aufgetrennt werden. Die sedimentierten großen (oder schweren) Aggregate („large aggregates“, LA) enthalten tubuläres Myelin, Lamellenkörper, multilamelläre Vesikel [155] sowie Surfactantproteine und repräsentieren damit die funktionell aktiven Surfactantanteile. Der Überstand mit den kleinen (oder leichten) Aggregaten („small aggregates“, SA) beinhaltet neben Zytokinen, Faktoren u. ä. die kleinen Vesikel, die nahezu keine Oberflächenaktivität besitzen. Beide Fraktionen entsprechen verschiedenen metabolischen Phasen. Die großen, aktiven Aggregate konvertieren in die inaktiven kleinen Aggregate, möglicherweise durch eine Carboxylesterase vermittelt, ohne dass molekulare Mechanismen oder Substrate bisher genau bekannt sind [202]. Diese biophysikalisch ungünstige Konversion wird beschleunigt durch Serumproteine oder Noxen [232].

#### **1.4.4. Zur Struktur der Surfactantlipide**

Lipide machen die Hauptkomponenten des Surfactant aus, von denen 90 % auf Phospholipide entfallen, die restlichen 10 % überwiegend auf Cholesterin. Abgesehen vom anders aufgebauten Sphingosin bestehen die Phospholipide in ihrem Kern aus Phosphorsäure und Glycerin, an deren einem Ende zwei unverzweigte Fettsäuren verestert sind. Am anderen Ende steht in einer Esterbindung der Alkoholrest Cholin, Ethanolamin, Glycerol, Inositol oder Serin (Abb. 2). Die Namensgebung der einzelnen Phospholipidklassen orientiert sich an diesen Alkoholgruppen mit

- Phosphatidylcholin (PC), etwa 80 % aller Phospholipide
- Phosphatidylglycerol (PG), etwa 10 % aller Phospholipide
- Phosphatidylethanolamin (PE)
- Phosphatidylinositol (PI)
- Phosphatidylserin (PS)



**Abb. 2:** Aufbau des Phospholipidmoleküls. Nach Tiriyaki [231].

Sind die beiden am Glycerin anhaftenden Fettsäureketten gesättigt, wird das Phospholipidmolekül als disaturiert bezeichnet, ansonsten als unaturiert. Bei der vorherrschenden Phospholipidklasse, dem PC, sind 60 % der Fettsäuren disaturiert. Die weitaus häufigste Fettsäurekette stellt die Palmitinsäure, die als disaturierter Fettsäurerest mit Phosphorsäure, Glycerin und Cholin das Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) bildet. DPPC macht die Hälfte des gesamten Surfactants aus und ist das bedeutendste Phospholipidmolekül für die Herabsetzung der Oberflächenspannung [12].

### 1.4.5. Rückblick in die Geschichte des Surfactant

Schon vor 75 Jahren hatte van Neergaard anhand seiner Berechnungen der Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze eine Substanz in den Alveolen postuliert, die ihrem endexpiratorischen Kollaps entgegenwirkt [241]. Seinen Forschungen war jedoch die angemessene Beachtung versagt geblieben. Erst zwischen 1955 und 1958 machten Pattle und Clements unabhängig voneinander die Entdeckung, dass sich in den Alveolen Substanzen befinden, die die Oberflächenspannung mindern. Pattles Entdeckung von sehr niedrigen Bläschen Spannungen im Schaum des Lungenödems ließ ihn einen „anti-pulmonary edema factor“ annehmen [180,181]. Clements bestimmte in Lungenextrakten die Oberflächen-

spannungen bei unterschiedlich großen alveolären Oberflächen und erstellte mit verschiedenen instillierten Substanzen Druck-Volumen-Kurven. Aus den Beobachtungen, dass erhöhte Oberflächenspannung Atelektasen fördert, schlossen Clement und seine Co-Autoren auf einen „anti-atelectasis factor“ [37,38]. Die gesuchte Substanz sollte laut Macklin aus Granula (wohl die Lamellenkörper) der Pneumozyten II stammen [153]. Klaus und Mitarbeiter [129] bewiesen, dass die Mitochondrienfraktion, durch deren Transformation [Schulz, 209] sich die Lamellenkörper ausbilden, die höchste Oberflächenaktivität aufwies. Entsprechend der neu entdeckten Funktion als „surface active agent“ wurde das Kunstwort „Surfactant“ kreiert.

Die experimentellen Daten wurden klinisch bedeutsam, indem Avery und Mead 1959 in Neugeborenen-Lungen mit frühkindlichem Atemnotsyndrom (IRDS) eine erhöhte Oberflächenspannung nachwiesen und einen Mangel an alveolärer Grenzflüssigkeit dafür verantwortlich machten [8]. Pattle und Thomas entdeckten 1961 mittels Infrarot-Absorptions-Spektrometer in der schaumigen Alveolarflüssigkeit das dem Ei-Lecithin ähnelnde Phosphatidylcholin, das sie als ursächlich für die Senkung der Oberflächenspannung ansahen [182]. Buckingham wies ebenfalls 1961 in den „Fibrillen“ (gemeint ist wohl das tubuläre Myelin) der Alveolarflüssigkeit Stickstoff, Protein und Phospholipide nach [26]. Interessant waren auch die Experimente von Klaus et al., die im selben Jahr aus dem getrockneten Alveolarschaum von Rinderlungen Puder extrahierten, das zu 50 - 70 % aus Lipiden bestand, davon fast 75 % aus Phospholipiden. Letztere konnten die Oberflächenspannung stärker senken als die gesamte Lipidmischung. Als Hauptbestandteil des Surfactant isolierten sie Phosphatidylcholin (PC) [129]. Dass neben PC auch Phosphatidylglycerol einen wesentlichen Bestandteil des Surfactant repräsentiert, indem es die Komprimierbarkeit je nach Größe der alveolären Oberfläche verändert, bemerkten Hallman und Gluck 1976 [94]. Den ersten Versuch eines Surfactant-Aerosols unternahmen Chu et al. 1967 mit Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), allerdings mit enttäuschendem Resultat [36].

Die Bildung der Surfactant-Komponenten Phospholipide, Proteine und Polysaccharide in den Pneumozyten Typ II hatten schon 1972 Chevalier und Collet mittels autoradiographischer Markierung festgestellt [34]. Den Nachweis, dass Surfactant intrazellulär in den Lamellenkörpern gespeichert wird, die sich extrazellulär zu tubulärem Myelin umbauen, erbrachte Williams 1977 mit Einsatz des Elektronenmikroskops [248].

Mehrere innovative Arbeitsgruppen hatten sich mit dem weiteren Verbleib des Surfactant beschäftigt. Geiger und Mitarbeiter wiesen die Reabsorption des DPPC in Alveolarepithelien

nach [80], Chandler et al. 1983 in die Pneumozyten Typ II [31]. Schon zuvor hatten King und Martin 1980 eine Wiederaufnahme in Alveolarmakrophagen beobachtet [126].

Baritussio und Mitarbeiter beschrieben 1981 anhand radioaktiv markierter Precursor-Substanzen, dass der intraalveoläre Surfactant-Turnover in einem Zeitraum von etwa 4 und 10 Stunden stattfand [11].

Seit den 80er Jahren waren die weiteren Forschungen immer vielfältiger geworden, z. B. durch Untersuchungen des Surfactant bei verschiedenen Lungenkrankheiten oder bei exogenen Einflüssen, insbesondere aber durch die Hypothese, dass Surfactant eine Rolle in der pulmonalen Abwehr und in der lokalen Immunmodulation einnimmt.

Die ersten Hinweise darauf hatten schon 1973 LaForce, Kelley und Huber gegeben. Sie beschrieben eine verstärkte Elimination von Staph. aureus in Anwesenheit von alveolärer Grenzflüssigkeit und stellten damit erstmals eine Immunfunktion des Surfactant in den Mittelpunkt [137]. Dass zwischen dem von King und Mitarbeitern im Jahr zuvor isolierten SP-A [127] und einer gesteigerten Bakterienelimination ein direkter Zusammenhang besteht, wurde jedoch erst in den 90er Jahren erkannt. Angestoßen von den Forschungsarbeiten von Tenner et al. 1989 an Makrophagen und Monozyten, die unter Zugabe von SP-A eine erhöhte Phagozytosebereitschaft aufwiesen [225], wurde in den weiteren Jahren bis heute eine intensive Forschungsarbeit zum Anteil des SP-A an der pulmonalen Abwehr betrieben. Kuan u. a. gaben 1992 der Hypothese weiteren Auftrieb, dass Surfactant auch der Infektabwehr dient, nachdem sie die Bindung und Aggregation von gramnegativen Bakterien durch Surfactantprotein-D demonstrieren konnten [134]. Heute besteht kein Zweifel mehr daran, dass Surfactant zusätzlich zu seiner originären Funktion als „surface active agent“ auch eine originäre Aufgabe in der primären pulmonalen Abwehr innehat.

#### **1.4.6. Bildung und Resorption der Surfactantlipide**

Primär werden die Bausteine des Surfactant über das Blutgefäßsystem zugeführt, im Golgi-Apparat und im endoplasmatischen Retikulum der Typ II-Pneumozyten synthetisiert und in den osmiophilen Lamellenkörpern in der schon endgültigen Surfactant-Komposition gespeichert. Nach deren Exozytose ins Alveolarlumen transformieren sich die Lamellen unter Mitwirkung von SP-A und Calciumionen in tubuläres Myelin, das als extrazelluläres Surfactant-Reservoir und Transportstruktur der Surfactantlipide von der Zelle zum Monolayer gilt [234,236,250]

Die kontinuierliche Erneuerung wird, neben der de novo-Bildung, nahezu ausschließlich ebenfalls von den Pneumozyten II geleistet, indem die Zellen den Surfactant oder seine

Abbauprodukte wieder aufnehmen, katabolisieren und reutilisieren. Neben diesem bedeutsamsten Recycling-Kreislauf gibt es verschiedene Wege der Clearance. So können Alveolarmakrophagen, Pneumozyten II oder andere Epithelzellen Surfactant phagozytieren und denaturieren [250]. Surfactant kann durch Phospholipasen abgebaut werden [235]. Mukoziliärer Transport oralwärts oder Lymphabfluss sind weitere Wege der Verkleinerung des Surfactantpools [80].

Der Turnover im Alveolarraum ist beträchtlich: er beträgt etwa 10 - 30 % der Surfactantmenge pro Stunde [253]. Für seinen Hauptbestandteil, das Dipalmitoylphosphatidylcholin beträgt der Turnover etwa 5 Stunden [11]. Dagegen erscheint die Gesamtmenge des Surfactant verhältnismäßig gering. Auf 1 m<sup>2</sup> Alveolaroberfläche kommen etwa nur 50 mm<sup>3</sup> des Oberflächen-Layers [166]. Der extrazelluläre Surfactant-Pool des Erwachsenen dürfte 10 - 15 mg/kg KG betragen [98].

Neben den Pneumozyten II können auch Epithelzellen des tiefen Bronchialsystems Surfactantkomponenten synthetisieren. Die Phospholipidzusammensetzung entspricht der des alveolären Milieus [20]. Dagegen produzieren Clarazellen der peripheren Bronchien Surfactant ohne Dipalmitoylphosphatidylcholin [12].

Über die humane Lunge hinaus ist Surfactant ein universell verbreitetes Lipid-Protein-Gemisch, das auch in den Lungen von Säugetieren wie Ratten, Kaninchen oder Meerschweinchen produziert wird. Bei den Tieren ist die Phospholipid-Zusammensetzung entsprechend den Erfordernissen im Vergleich zu humanem Surfactant modifiziert [190]. Sogar Nicht-Mammalia wie Vögel nutzen Surfactant zur Verringerung der Oberflächenspannung ihrer tubulären Atemwege. An ihre Bedürfnisse angepasst, ist ein hoher Anteil von oberflächenaktivem Dipalmitoylphosphatidylcholin nachzuweisen, dagegen kein SP-A [19].

#### **1.4.7. Organisation und Funktion von Monolayer und Multilayer**

Der Surfactant breitet sich mit einer Dicke von etwa 50 µm über der gesamten wässrigen Hypophase aus, auch bezeichnet als „Spreitung“. Die bipolaren Phospholipide tauchen mit ihrer hydrophilen Alkoholgruppe in die Hypophase ein. Die lipophile Fettsäurekette ragt zum Alveolarlumen. Dieser Aufbau ermöglicht es, die OFS der wässrigen Phase auf den Surfactant überzuleiten, der sie aufnimmt und als Seitdruck, „Spreitungsdruck“, weitergibt. Durch dieses geradezu geniale Prinzip gelingt es der Lunge, die OFS der Alveolen zu erniedrigen [166]. Bei Surfactantüberschuss nimmt auch er die energetisch günstigste Form an und organisiert sich zu kugeligen Vesikeln.

Der elektronenmikroskopische Nachweis der kontinuierlichen Doppelschicht aus Hypophase und Phospholipidlayer gelang zwei Arbeitsgruppen erst in den 90er Jahren [9,15]. Schürch und Mitarbeiter wiesen dabei nach, dass die vorhandene Phospholipidmenge für 2 - 5 Layer ausreicht [211]. Das garantiert auch unter extremen ventilatorischen Bedingungen einen intakten Alveolarfilm.

Auch unter den dynamischen Bedingungen der Atmung erweist sich der Surfactant als außergewöhnlich geeignet, schnell auf die atemmechanischen Vorgaben zu reagieren. Während der expiratorischen Reduktion der alveolären Oberfläche kommt es zu einer Überkompression des Surfactant. Die DPPC-Moleküle lagern sich dichter aneinander, so dass die OFS sinkt. Bei weiterer Kompression werden DPPC-Moleküle in die Tiefe gedrängt, so dass sich weitere Phospholipidschichten ausbilden, die wiederum eine weitere Senkung der OFS bewirken. Dieser Vorgang konnte sogar elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden [4]. Einer Atelektasenbildung entgegen wirkt die zusätzliche Eigenschaft des DPPC, unter Druck eine viskös-elastische Struktur auszubilden, die sich stabilisierend auf die Alveole auswirkt. Der Kollapsdruck kann in vivo bei einer Kompression um 15 - 20 % auf etwa 2 mN/m sinken [212]. Für die notwendige Fluidität sorgen dann die Phospholipide PG und PI [10] und die hydrophoben Surfactantproteine (s. a. Kapitel 1.4.9.).

Eine eingehende experimentelle, elektronenmikroskopisch gestützte Arbeit über die Multi-layer-Organisation des Surfactant unter Kompression hat kürzlich eine Arbeitsgruppe unter der Mitwirkung von van Golde und Haagsman veröffentlicht [56].

#### **1.4. 8. Aufgaben des Surfactantsystems**

Die Hauptaufgabe des Surfactantsystems besteht darin, die Oberflächenspannung in den terminalen Atemwegen zu senken. Neben dieser namensgebenden „klassischen“ Funktion erfüllt der Surfactant eine Vielzahl von Aufgaben, von denen im folgenden die wichtigsten aufgelistet sind.

---

### **Oberflächenaktive, „klassische“ Funktionen**

Verhinderung des Alveolenkollapses während der Expiration  
Unterstützung der inspiratorischen Alveolenexpansion  
Verringerung der Atemarbeit  
Stabilisierung der kleinen Atemwege, Verhinderung eines Air-trapping  
Verbesserung des mukoziliären Transportes  
Vorbeugung eines Lungenödems durch Balancierung der hydrostatischen Filtrationskräfte  
Aufnahme von inhalierten Mikropartikeln und Translokation in die Hypophase  
Aufrechterhaltung einer gleichbleibenden Gasaustauschfläche  
Verbesserung des Gasaustausches infolge Kompression der Hypophase (Spreitungsdruck)  
Schutz der Hypophase vor Austrocknung

### **Nicht biophysikalische und immunologische Funktionen**

Primäre Immunbarriere, Hemmung von Adhäsion und Invasion  
Antioxidative Wirkung zum Schutz gegen freie Radikale  
Aufnahme von inhalierten Mikropartikeln und Sedimentation in die Hypophase  
Opsonierung zur erleichterten Phagozytose  
Modulation von Chemotaxis, Phagozytose und „oxidative burst“ der Makrophagen  
Neutralisation von bakteriellen Toxinen  
Inhibition endotoxin-stimulierender Zytokine aus Makrophagen  
Neutralisation endogener Mediatoren wie freie Radikale und reaktive Spezies  
Hemmung der Proliferation, Zytotoxizität und Immunglobulinproduktion durch Phospholipide

---

**Tabelle 1:** Funktionen des Surfactantsystems [nach 76,85,166]

Insbesondere durch die vielfältigen Effekte der hydrophilen Surfactantproteine kann das Alveolarsystem rasch und fein abgestimmt reagieren - bevor Eindringlinge sich über mehrere Zellteilungszyklen ausbreiten können, bevor größere physikalisch-chemische Schäden durch kleine Partikel entstehen, bevor die langsamere adaptative Abwehr eingreifen kann. McCormack und Whitsett bezeichnen das als optimale Abwehrstrategie [159].

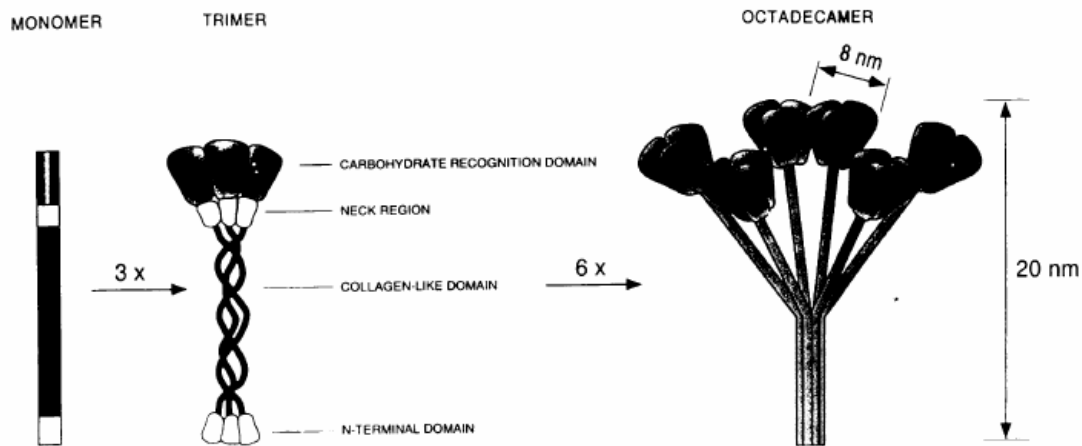
### 1.4.9. Die Surfactantproteine A, B, C und D

Proteine finden sich nur zu etwa 10 % im Surfactant. Vier Fünftel davon stellen Serumproteine wie Albumin oder Harnstoff, die die alveolo-kapilläre Membran passieren konnten. Lediglich 2 % des gesamten Surfactant bestehen aus den vier spezifischen Surfactantproteinen, die 1988 in der Reihenfolge ihrer Entdeckung als SP-A, SP-B und SP-C benannt wurden [189]. SP-D wurde erst ein Jahr nach Einführung dieser Nomenklatur entdeckt [184]. Die Proteine B und C haben Anteil an der Optimierung der Surfactantorganisation und -funktion [212]. SP-A und SP-D gehören als Kollektine zum natürlichen Abwehrsystem.

Proteine mit einem kollagenartigen und einem N-terminalen Anteil sowie einer kugelförmigen Kohlenhydrat-bindenden Domäne (CRD) werden zur Familie der Kollektine gerechnet. Mit ihrem freien C-terminalen Ende können sie an Molekülmuster zahlreicher Mikroorganismen binden und tragen wesentlich zur deren ersten, unspezifischen Abwehr („innate immunity“) bei. Surfactantprotein-D, Mannose-bindendes Lektin (MBL) sowie das in seiner Aufgabe noch unklare Leberkollektin-1 (CL-L1) stellen weitere humane Kollektine dar [92,101,251].

Surfactantprotein-A ist das am besten untersuchte Kollektin. Entsprechend seinem genetischen Code auf Chromosom 10 mit zwei Allelen und Splice-Varianten [74] wird es aus 248 Aminosäuren im endoplasmatischen Retikulum der Pneumozyten gebildet, in den Lamellenkörpern gespeichert und durch deren Verschmelzung mit der Zellwand ausgeschleust [100].

An die endständige kurze N-terminale Region schließt sich eine Kollagen-ähnliche längere Sequenz an, die über einen kurzen „Hals“ in das C-terminale Ende übergeht. Letzteres wird auf Grund seiner Kohlenhydrat-bindenden Region („carbohydrate recognition domain“) CRD-Domäne genannt. SP-A ist damit ähnlich strukturiert wie SP-D, jedoch mit 20 nm Länge um ein fünffaches kürzer. Drei Monomere legen sich zu einer um den Kollagen-Bereich gedrehten Tripelhelix, dem Trimer, zusammen. Sechs Trimere formieren, stabilisiert durch Disulfidbrücken am N-terminalen Ende, das ausdifferenzierte Oktadekamer-Molekül, dessen Aufbau an einen Tulpenstrauß erinnert (Abb. 3) [92].



**Abb. 3:** Die Struktur des SP-A-Moleküls [aus 92].

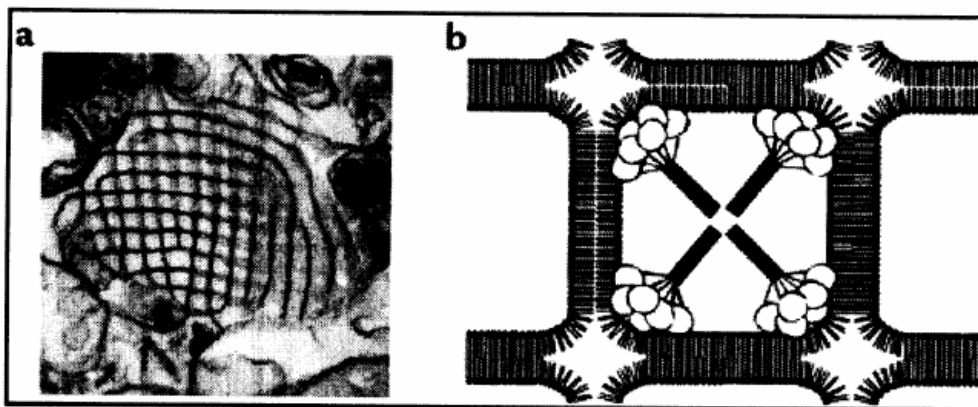
Als ein die Abwehr unterstützendes Molekül scheint SP-A auch in extrapulmonalen Organen des Menschen exprimiert zu werden, wie in Darm, Niere, Mittelohr, Brustdrüse [Übersicht in 92]. Sogar eine SP-A-Produktion in den mesothelialen und synovialen Höhlen wird angenommen [57].

Der Schwerpunkt der SP-A-Funktion liegt in seiner Unterstützung der unspezifischen Erstlinien-Abwehr im terminalen Bronchialsystem. Die CRD-Domäne bindet an Polysaccharide, Lipopolysaccharide (LPS), Membranproteine und Di-Mannose-Strukturen auf Zellwänden von gram-positiven und gram-negativen Bakterien. Pilze und Pneumocystis können über ihre Zellwand-Glykokonjugate erkannt werden. SP-A interagiert mit viralen Lektinen, Mannose-Oligosacchariden oder speziellen Glycoproteinsequenzen [49]. SP-A kann Mikroorganismen agglutinieren und aggregieren oder sich an Zellwandliganden anlagern und so als Opsonin wirken. SP-A wirkt chemotaktisch und stimuliert die Phagozytose, vorwiegend durch Aktivierung von Alveolarmakrophagen und Monozyten, aber auch auf neutrophile Granulozyten und deren „respiratory burst“. Kürzlich wurde sogar eine direkte toxische Wirkung auf Bakterien nachgewiesen [254]. Seit wenigen Jahren sind auch Beeinflussungen des adaptativen Immunsystems bekannt. Die Aktivität von Lymphozyten wird in der Regel gehemmt, ihre Effektoren (Entzündungsmediatoren, Immunglobuline) erfahren eine Absenkung. Auf die Liberation von Histamin und einiger Interleukine wirkt SP-A hemmend. In Abhängigkeit von verschiedenen Bedingungen kann es eine Entzündungs-

reaktion (vermittelt z. B. durch freie Radikale oder Zytokine) beschleunigen oder bremsen [nach 92,138,233].

Mittlerweile sind mehrere Kollektin-bindende Rezeptoren oder Proteine auf Zellmembranen bekannt. Alveolarmakrophagen und Pneumozyten II exprimieren als Bindungsstelle den SPR-210-Rezeptor. Monozyten können SP-A über ihren C1qR<sub>p</sub>-Rezeptor binden. Pneumozyten II besitzen auf ihrer Zellmembran mehrere Bindungsproteine für SP-A [Übersicht in 49]. Korpuskuläre Teilchen wie Pollen, Sporen oder inerte Mikropartikel schlagen auf dem Surfactant nieder, werden benetzt und in die Hypophase sedimentiert, wo sie phagozytiert werden [81]. Zuvor kann durch Bindung an SP-A eine Opsonierung erfolgen.

In den letzten 10 Jahren wurde eine kaum überschaubare Anzahl von Publikationen veröffentlicht, die sich mit der Interaktion von SP-A und pathogenen Organismen sowie seinen nicht-immunologischen Funktionen beschäftigten. Mehrere bedeutsame Arbeitsgruppen haben in aktuellen Reviews den derzeitigen Wissensstand zusammengefasst: Crouch und Wright 2001 [49], Haagsman 2002 [92], Hawgood und Poulain 2001 [101], Lawson and Reid 2000 [139], McCormack und Whitsett 2002 [159].



**Abb. 4:** Die Gitternetzstruktur des tubulären Myelin, elektronenmikroskopische Ansicht (a). Ausschnitt aus a, Modellansicht: Vier SP-A-Moleküle formieren sich in je einer Gitterecke von tubulärem Myelin mit ihren CRD-Domänen und verbinden sich im Zentrum mit ihren N-terminalen Enden [aus 159].

Zu den wichtigen nicht-immunologischen Aufgaben des SP-A gehört es, das tubuläre Myelin mit den sie enthaltenden Surfactantlipiden zu stabilisieren. Dazu lagert sich jeweils eine CRD-Domäne in jede Ecke eines Gitterquadrates; im Zentrum verbinden sich die vier N-terminalen Enden (Abb. 4) [159]. SP-A hat eine hohe Affinität zu DPPC und reguliert die Organisation

von Phospholipiden im Monolayer und dessen Flexibilität [213]. Die Phospholipid-Expression aus Pneumozyten Typ II wird durch SP-A gedrosselt, die Lipidaufnahme in Alveolarmakrophagen verstärkt [195,252]. SP-A blockiert die Phospholipase A2 [72], und schützt den Monolayer vor funktionellen Inhibitoren wie Serumproteinen [40]. Es hilft die biophysikalische Integrität zu bewahren, indem es die Konversion von aktiven großen Aggregaten in inaktive kleine Aggregate verlangsamt [239].

Die wichtigsten Aufgaben des SP-A werden in Tabelle 2 zusammengefasst.

<b>Nicht-immunologische Aufgaben</b>	<b>Immunologische Aufgaben</b>
Formierung des tubulären Myelins	Opsoninbildung
Surfactant-Sekretion und -Wiederaufnahme modulieren (Surfactanthomöostase)	Aggregation
Schutz vor Inhibitoren des Surfactant	Agglutination
Regulation und Ordnung des Phospholipid-einbaus in den Monolayer	Verbesserte Phagozytose durch Makrophagen
Erhaltung der Oberflächenaktivität	Aktivierung von Neutrophilen, respiratory burst
	T-Zell-Hemmung
	Entzündungsförderung oder -hemmung
	Chemotaxis für Neutrophile und Makrophagen
	Unterdrückung einer allergischen Reaktion

**Tabelle 2:** Die Rolle des SP-A im alveolären Surfactant.

Bisher ist zwar keine eigentliche Erkrankung bekannt, die auf einem hereditären SP-A-Mangel beruht [159]. An SP-A-defizienten Mäusen wurde aber eine erhöhte Sensitivität auf die Surfactantinaktivierung durch Plasmaproteine und eine raschere Konversion von den großen in kleine Aggregate belegt [101,118]. Zudem führt ein SP-A-Mangel zu Defiziten in der lektin-vermittelten Abwehr und zur Ausbildung einer stärkeren Entzündungsreaktion durch vermehrten Neutrophileneinstrom und Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies, die - unerwünscht - das Alveolarmilieu schädigen [92,159].

Surfactantprotein-B stellt ein kleines, hydrophobes Molekül aus 79 Aminosäuren dar. Die Precursor-Form wird in den Typ II-Pneumozyten produziert, auf dem Weg in die Lamellenkörper aktiviert und dort gespeichert [246]. Nach Exozytose in den Alveolarraum

wirkt es bei der Bildung des tubulären Myelins mit [191], beeinflusst durch seine positive Ionenladung die molekulare Anordnung der anionischen Phospholipidschichten [39] und beschleunigt die Bildung eines Surfactant-Multilayers durch Akzeleration des Eintauchvorgangs der Phospholipide in tiefere Schichten während der Verkleinerung der alveolären Oberfläche [46], was für die Funktion des Surfactant bei der Expiration essentielle Bedeutung hat. SP-B besitzt keine sekretorischen oder immunmodulatorischen Fähigkeiten. Aus einem schweren SP-B-Mangel resultiert jedoch innerhalb der ersten Lebensjahre der Tod an Lungenversagen [99]. Alveolarproteinosen werden mit Mutationen des SP-B-Gens in Zusammenhang gebracht [87].

Surfactantprotein-C als kleines, hydrophobes Molekül aus nur 35 Aminosäuren, wird ebenfalls als Precursor-Protein in den Pneumozyten II gebildet und zusammen mit SP-B und Phospholipiden über die Lamellenkörper als Vesikel aus den Zellen ausgeschleust. Im Alveolarraum im Überfluss vorhanden, liegt es in der Phospholipidschicht oder überspannt zwei Schichten [168]. Deshalb fördert es einerseits die Stabilität und die Ausbreitung der Surfactantlipide in der Alveole. Andererseits kann es durch Ruptur die Kontinuität der Phospholipidschicht unterbrechen und so deren Formation beeinflussen und die Verschieblichkeit der Lipidmoleküle erleichtern [113,114]. Weiterhin vermittelt es calcium- und druckabhängig den raschen Transfer von Phospholipiden zwischen Surfactantschicht und Vesikeln [124,175]. Möglicherweise schützt es vor Surfactantinaktivierung durch eingedrungene Serumproteine, indem es sie bindet [214]. Das Fehlen von SP-C führt zu interstitiellen Lungenerkrankungen und begünstigt möglicherweise die Emphysementstehung [246].

Surfactantprotein-D ist aus 355 Aminosäuren zusammengesetzt. Seine Funktion liegt nicht in der spannungsvermindernden Interaktion mit Phospholipiden, sondern in der pulmonalen Abwehr. Ähnlich dem SP-A und dem typischen Aufbau von Kollektinen folgend, besteht es aus 4 Sequenzen: einem kurzen N-terminalen Ende, einer Kollagen-ähnlichen Sequenz, einer kurzen „Halsregion“ und einem C-terminalen Ende, der „carbohydrate recognition domain“ (CRD) [46]. Wie beim SP-A lagern sich 3 Moleküle zum Trimer zusammen. 4 Trimere bilden ein Dodekamer, das im Gegensatz zum SP-A nicht blumenstraußähnlich, sondern wie ein Kreuz gelagert ist. Mit seinem C-terminalen Ende bindet es einerseits an bakterielle, virale und fungale Zellwandstrukturen wie Lipopolysaccharide (LPS), oder an Endotoxine und Glucoconjugate und führt so zur Aggregation und Agglutination zahlreicher

Mikroorganismen, zur Hemmung viraler Hämagglutination und zur Opsoninbildung. Andererseits interagiert es mit Alveolarmakrophagen und Pneumozyten Typ II und unterstützt somit die Phagozytose und den „respiratory burst“. Auch an Pollen und Stauballergene kann SP-D mit einem seiner Enden binden [Übersichten in 46,47,101]. Als Abwehr-Kollektin wurde SP-D auch in anderen humanen Geweben (z. B. cholangio-pankreatisches Gangsystem, Parotis) nachgewiesen [154]. Eine SP-D-Defizienz hat offenbar keine fatalen Folgen.

#### **1.4.10. Surfactantveränderungen bei verschiedenen Lungenerkrankungen**

Veränderungen der Surfactantkomponenten können schwerwiegende Beeinträchtigungen nach sich ziehen. Pathophysiologisch führt eine Dysfunktion der Phospholipide über eine verminderte Senkung der Oberflächenspannung zu Herabsetzung der Lungencompliance, zur Erhöhung der funktionellen Residualkapazität und zur Dystelektase oder Atelektase. Die Atemarbeit wird sich erhöhen. Der Gasaustausch zwischen Alveole und Kapillare wird gestört sein. Die verminderte antimikrobielle Aktivität und eine überschießende Entzündungsreaktion bei SP-A-Mangel ist in Tierversuchen belegt [159]. Die natürliche Elimination inerter Mikropartikel (z. B. durch Tabakrauch) ist bei geschädigtem Surfactant verzögert [78,165].

Bei bakteriellen und sog. atypischen Pneumonien sind SP-A- und Lipidgehalt erniedrigt und die OFS erhöht [90]. Ähnliche Veränderungen bestehen beim Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS). Bakterien, Viren, freigesetzte Toxine, aber auch von körpereigenen Entzündungszellen freigesetzte Phospholipasen und Proteasen ebenso wie Plasmaproteine und Hämoglobin [66] inaktivieren direkt oder indirekt das Surfactantsystem. In der Lunge von Asthmakranken ist die Surfactantfunktion gestört [108,109]. Frerking u. a. diskutierten kürzlich eine Beeinträchtigung des SP-A als Ausgangspunkt für die Entwicklung einer COPD [76]. Raucher weisen einen verminderten Phospholipidgehalt auf [110]. Bei idiopathischer Lungenfibrose sind u. a. die großen Aggregate vermindert, gleichermaßen bei Sarkoidose [89].

Zahlreiche andere Lungenkrankheiten wurden auf Konzentration und Funktion verschiedener Surfactant-Bestandteile untersucht. Übersichten dazu bieten Devendra und Spragg [55] oder Griese [85]. Eine ausführliche Übersicht über die zahlreichen Lungenerkrankungen, die mit einer Veränderung der Surfactantproteine assoziiert sind, gaben Hermans und Bernard in ihrer Publikation über epithelspezifische Proteine der Lunge [104].

## 1.5. Ziele dieser Arbeit

Durch die zytostatische Chemotherapie eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms erfährt das zelluläre Immunsystem eine erhebliche quantitative und qualitative Beeinträchtigung. Das eher seltene Ereignis einer nicht-poststenotischen Pneumonie bei chemotherapierten Patienten lässt vermuten, dass ein lokales pulmonales Abwehrsystem Immunfunktionen gegenüber inhalierten Krankheitserregern während der Phase der Knochenmarkdepression aufrecht erhält. Ein solches unspezifisches Abwehrsystem könnte durch das pulmonale Surfactant-System, insbesondere die Kollektine SP-A und SP-D repräsentiert werden. Inwieweit das lokale Surfactantsystem zum einen als primäre Immunbarriere, zum anderen in biophysikalischer Hinsicht in die Veränderungen während zytoreduktiver Therapie mit einbezogen ist, wurde bislang kaum charakterisiert.

In dieser Studie sollte bei Patienten mit Bronchialkarzinom geprüft werden, welchen Einfluss eine zytoreduktive Chemotherapie auf die Funktion und Zusammensetzung von Surfactant aus der bronchoalveolären Lavage aufweist. Weiterhin sollte untersucht werden, welchen differenziellen immunmodulatorischen Einfluss der aus der BAL isolierte Surfactant auf Entzündungszellen ausübt.

Da eine Rekrutierung von Patienten, die sowohl vor als auch nach einer Chemotherapie untersucht werden können, nicht möglich war, wurde in der vorliegenden Untersuchung zunächst in Form einer Pilotstudie bei unterschiedlichen Patienten Material gewonnen, um abzuschätzen, ob grundsätzliche Änderungen der Surfactant-Zusammensetzung und Funktion vorliegen. Dazu wurde bei Patienten mit Bronchialkarzinom entweder vor oder nach Chemotherapie eine Bronchoskopie mit BAL durchgeführt und aus der BAL Surfactant isoliert. Dieses Material wurde funktionell biophysikalisch charakterisiert, auf seine Phospholipidaggregat-Zusammensetzung überprüft, und der Gehalt an SP-A in der BAL bestimmt. Der isolierte Surfactant wurde zusätzlich in *in vitro*-Experimenten mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes auf seine Fähigkeiten charakterisiert, die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung und die mitogen-induzierte Zellproliferation zu modulieren. Sofern sich in der vorliegenden Pilotstudie grundsätzliche Unterschiede nachweisen lassen sollten, wären in einem zweiten Schritt die vermuteten chemotherapiebedingten Veränderungen in einem confirmatorischen Studiendesign an einer gepaarten Patientenstichprobe mit einer a priori berechneten Stichprobengröße zu verifizieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Patienten und Probanden

Die initiale Studienkonzeption hatte die Untersuchung identischer Patienten vor und nach Chemotherapie vorgesehen. Auf Grund der schwierigen Patientenrekrutierung mussten unterschiedliche Personen in die beiden Kollektive aufgenommen werden. Trotz der Teilnahme von vier Pneumologischen Zentren ließen sich, unter Beachtung der genannten Ausschlusskriterien, in dem vorbestimmten Zeitraum keine große Anzahl von Patienten gewinnen, die ein Studiendesign mit verbundener Stichprobe erlaubt hätte. In der Studie wurden deshalb entsprechend der Machbarkeit insgesamt 65 Patienten und Probanden untersucht, die sich auf 3 Kollektive verteilten.

Das erste Kollektiv umfasste 21 Patienten mit Bronchialkarzinom vor Einleitung einer Chemotherapie. Es handelte sich um 15 Männer und 6 Frauen. Das mittlere Alter betrug 59,5 Jahre innerhalb einer Altersspanne von 37 bis 77 Jahren. Die Patienten befanden sich zur Abklärung eines vermuteten Bronchialkarzinoms in stationärer Behandlung und waren bisher noch nicht tumorspezifisch behandelt worden. Die Tumordiagnose war im stationären Verlauf mittels Bronchoskopie bzw. einmal durch eine Feinnadelpunktion von Lebermetastasen zytologisch und/oder histologisch gesichert. Die Tumortypen verteilten sich auf 8 kleinzellige Karzinome und 13 nicht-kleinzellige Karzinome (8 Plattenepithel- und 5 Adenokarzinome). Die feingewebliche Diagnose passte zu den klinischen Befunden.

Die 16 Patienten des zweiten Kollektivs hatten einen Tag zuvor eine ACO-Chemotherapie erhalten. Die 10 Männer und 6 Frauen wiesen ein durchschnittliches Alter von 61,3 Jahren mit einer Altersspanne zwischen 47 und 80 Jahren auf. Ein Patient wurde nach dem 1. Zytostasekurs untersucht, 8 Patienten nach dem 2. Kurs, 4 nach dem 3. und 3 nach dem 4. Behandlungskurs (vgl. Tab. 1). Die Bronchoskopie erfolgte nach dem 3. oder 4. Behandlungskurs oder bei unzureichendem Ansprechen nach dem 1. oder 2. Kurs (s. a. Tab. 3). Der Zeitpunkt wurde vom behandelnden Pneumologen in der Klinik vorgegeben.

BAL nach Chemotherapie-Kurs	Anzahl der Patienten, n = 16
1	1
2	8
3	4
4	3

**Tabelle 3:** Zeitliche Stellung der BAL im Chemotherapie-Ablauf.

Unter den Patienten der beiden Kollektive befanden sich 17 Raucher und 17 Ex-Raucher. Bei 3 Patienten blieb der Raucherstatus unsicher. Wer bis zu 4 Wochen vor der Bronchoskopie inhalativ Tabak konsumiert hatte, wurde als Raucher eingestuft, ansonsten galt er als Ex-Raucher. In beiden Kollektiven gab es keinen lebenslangen Nichtraucher.

Eine generelle Aufteilung in die Subgruppen Raucher und Ex-Raucher wurde nicht vorgenommen, da die Kollektive klein waren. Die Rauchgewohnheiten in beiden Kollektiven glichen sich mit 9 Rauchern und 9 Ex-Rauchern vor Therapie und 8 Rauchern und 8 Ex-Rauchern nach Therapie.

Das Kontrollkollektiv stellten 28 gesunde Probanden (26 Männer, 2 Frauen, mittleres Alter  $25,5 \pm 0,6$  Jahre, Altersspanne 22 - 33 Jahre, Nichtraucher) dar, die sich im Rahmen anderer Studien einer Bronchoskopie unterzogen hatten.

	Eingeschlossene Proben	Patienten/ Probanden	Alter	Tumortyp
Vor Chemotherapie	21	m = 15 w = 6	59,5 $\pm 1,9$ Jahre	SCLC = 8 NSCLC = 13
Nach Chemotherapie	16	m = 10 w = 6	61,1 $\pm 2,4$ Jahre	SCLC = 16 NSCLC = 0
Kontrollen	28	m = 26 w = 2	25,5 $\pm 0,6$ Jahre	
Gesamt	65	m = 51 w = 14		

**Tabelle 4:** Demographie und Tumortypen.

Es bedeuten: m = männlich, w = weiblich, SCLC = Kleinzelliges Bronchialkarzinom, NSCLC = Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom. Beim Alter sind die Gruppenmittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.

Alter und Geschlechterverteilung zwischen Tumorpatienten und Kontrollpersonen unterschieden sich deutlich (vgl. Tab. 4). Die Probandengruppe war weder alters- noch geschlechtergematcht. Sie wurde nicht zu Vergleichen herangezogen, deren Parameter einem möglichen Alters- oder Geschlechtereinfluss unterliegen.

Die Studie beinhaltet Patienten aus dem Klinikum Hannover Heidehaus (Dr. W. Mall), aus der Abteilung Pneumologie an den beiden Standorten Klinikum Hannover Oststadt und Medizinische Hochschule Hannover (seinerzeit Prof. Dr. H. Fabel) und aus der Abteilung Kardiologie, Angiologie und Pneumologie der Universität Magdeburg (seinerzeit PD Dr. T. Welte, Leitung Prof. Dr. H. Klein).

Die Belastung der Patienten bestand ausschließlich darin, sich bei einer ohnehin notwendigen Bronchoskopie im Rahmen des Tumorstagings oder einer Verlaufsbeurteilung zusätzlich einer BAL zu unterziehen. Die Untersuchungsdauer verlängerte sich dadurch um etwa 5 Minuten. Bedeutsame periprozedurale Komplikationen traten nicht ein.

Die Studie war von der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover auf ihrer Sitzung am 29. 9. 1998 unter der Nr. 1864 genehmigt worden. Die Patienten hatten in die Studienteilnahme schriftlich eingewilligt.

Für die Patienten wurden Tumordaten, Raucherstatus, wesentliche Begleitkrankheiten, Medikation, Lungenfunktionsparameter (VC, ITGV, FRC, FEV 1), Blutgase (pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>) und an Laborwerten Leukozyten, Gesamtprotein, BKS, CRP erfasst (vgl. Tabelle 5 und 6).

Geschlecht	Alter	Diagnose	Recovery	BAL-Ort	Tumorstaging	Raucher	FEV 1	VC	FEV1%VC	ITGV
w	60	SC	50	Lin	lim	ja	2,29	2,85	80,4	2,75
m	60	Sqamous	30	ML	T2N3M0	ja	2,15	2,92	73,6	3,25
m	62	SC	39	Lin	ext	ja	2,53	3,38	74,9	3,75
m	47	SC	42	ML	ext	Ex	1,56	2,10	74,3	2,21
w	77	SC	42	ML	lim	Ex	1,06	1,48	71,6	2,17
w	57	SC	50	ML	ext	Ex	1,75	2,85	61,4	3,82
m	69	SC	47	Lin	ext	Ex	2,37	3,45	68,7	4,25
m	58	SC	52	Lin	ext	ja	3,50	4,01	87,3	5,07
w	49	SC	61	Lin	ext	Ex	2,27	3,45	65,8	3,37
w	57	SC	37	Lin	ext	ja	2,49	3,46	72,0	4,99
w	65	SC	33	Lin	ext	ja	1,65	2,44	67,6	2,95
m	49	SC	59	Lin	ext	Ex	3,89	5,38	72,3	4,84
m	75	SC	60	ML	ext	ja	1,47	2,35	62,6	4,24
m	80	SC	45	Lin	lim	ja	2,01	2,91	69,1	3,31
m	74	SC	44	ML	ext	ja	2,17	3,00	72,3	3,70
m	63	SC	35	Lin	lim	Ex	1,46	2,79	52,3	5,50
w	55	SC	28	ML	lim	ja	1,43	2,48	57,7	4,84
w	62	SC	49	ML	ext	Ex	2,00	3,42	58,5	3,55
m	74	SC	38	ML	ext	Ex	2,93	4,43	66,1	5,28
m	66	Sqamous	42	ML	T4N2M0	ja	1,78	3,20	55,6	3,51
m	68	Sqamous	30	ML	T2N0M0	Ex	1,88	2,72	69,1	3,93
w	56	Sqamous	20	Lin	T4N2M1	ja	2,42	3,80	63,7	4,46
m	46	Adeno	37	ML	T4N2M0	ja	2,47	3,35	73,7	3,77
m	37	Adeno	80	ML	T3N2M0	ja	4,54	5,56	81,7	5,17
m	65	SC	75	Lin	ext	ja	4,04	4,20	96,2	4,51
m	56	SC	41	ML	ext	Ex	2,33	2,76	84,4	n. d.
m	61	Sqamous	43	Lin	T4N2M1	Ex	2,15	3,94	54,6	4,70
m	54	SC	35	Lin	ext	Ex	2,34	4,36	53,7	3,72
m	63	Sqamous	50	Lin	T2N2M0	Ex	2,03	2,81	72,2	2,19
m	60	Adeno	59	ML	T2N0M1	Ex	3,00	3,90	76,9	n. d.
w	50	SC	70	Lin	lim	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
m	60	Sqamous	48	Lin	T2N1M1	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
m	58	Adeno	48	ML	T2N1M0	ja	3,30	4,20	78,6	4,95
m	58	Sqamous	38	Lin	T3N2M0	Ex	2,06	3,39	60,8	4,35
w	54	Adeno	55	ML	T2N2M1	Ex	2,68	3,38	79,3	2,73
w	61	SC	68	ML	lim	ja	2,05	2,75	74,5	n. d.
m	60	SC	60	Lin	ext	n. d.	2,90	3,50	82,9	n. d.

**Tabelle 5:** Basisdaten der Patienten.

*Geschlecht:* m = männlich, w = weiblich. *Alter:* in Jahren. *Diagnose:* SC = Kleinzelliges Bronchialkarzinom, Sqamous = Plattenepithel-Bronchialkarzinom, Adeno = Adeno-Bronchialkarzinom. *Recovery:* Rückgewinnungsmenge der BAL in ml, *BAL-Ort:* ML = Mittellappen, Lin = Lingula, *Staging:* gemäß TNM-Klassifikation für Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (letzte Revision 1997); lim = limited disease, ext = extensive disease für Kleinzellige Bronchialkarzinome. *Tabakraucher:* ja = aktuell Inhalationsraucher, Ex = Ex-Raucher. *FEV 1* = forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde (in Liter/sek). *VC* = inspiratorische Vitalkapazität (in Liter). *ITGV* = intrathorakales Gasvolumen oder funktionelle Residualkapazität (in Liter), n. d. = nicht durchgeführt.

Geschlecht	Alter	Recovery	FEV 1	VC	FEV 1 % VC	ITGV-FRC	VC % Soll	ITGV % Soll
m	23	94	4,98	5,42	92	3,72	86	104
m	23	84	5,72	6,31	91	3,81	111	114
m	27	86	4,87	5,55	88	4,03	101	120
m	26	88	4,82	5,97	81	3,90	115	122
m	23	76	5,41	6,65	81	3,18	113	94
m	24	80	5,77	7,76	74	5,21	118	141
m	25	66	4,62	5,49	84	3,78	102	116
m	24	76	6,05	8,05	75	4,90	122	132
m	24	84	5,41	6,52	83	3,97	105	111
m	24	72	4,65	5,41	86	4,28	103	134
m	25	80	3,78	4,52	84	1,73	93	57
m	22	73	4,36	5,24	83	2,52	92	76
m	29	70	4,62	5,80	80	4,11	109	124
m	24	80	3,83	4,32	89	3,42	81	106
m	27	82	4,51	5,02	89	3,72	86	107
m	24	83	5,70	6,65	86	4,51	111	130
m	24	72	5,64	7,56	75	5,27	119	144
m	25	88	5,83	7,85	74	5,73	120	154
m	22	76	4,63	5,46	85	2,64	95	79
w	33	76	3,37	4,13	81	n. d.	119	n. d.
m	32	82	4,14	5,13	82	n. d.	90	n. d.
m	23	88	4,93	6,08	81	n. d.	99	n. d.
m	27	72	4,89	6,49	75	n. d.	103	n. d.
m	23	88	4,78	5,40	88	n. d.	96	n. d.
m	25	58	5,17	6,26	83	n. d.	104	n. d.
m	24	76	4,63	5,80	80	n. d.	100	n. d.
m	28	84	4,02	4,83	83	n. d.	93	n. d.
w	33	77	3,51	4,77	74	n. d.	121	n. d.

**Tabelle 6:** Basisdaten der Probanden.

*Geschlecht:* m = männlich, w = weiblich. *Alter:* in Jahren. *Recovery:* Rückgewinnungsmenge der BAL in ml, *BAL-Ort:* ML = Mittellappen, Lin = Lingula. *FEV 1* = forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde (in Liter/sek). *VC* = inspiratorische Vitalkapazität (in Liter). *ITGV* = intrathorakales Gasvolumen oder funktionelle Residualkapazität (in Liter), n. d. = nicht durchgeführt.

Als Ausschlusskriterien von der Studie galten

- Kontraindikationen gegen eine Chemotherapie oder eine Bronchoskopie (z. B. Karnofsky-Index < 50 %, stark eingeschränkte Lungenfunktion)
- beidseitiger Tumorbefall der Lunge
- aktuelle oder kürzlich abgelaufene Pneumonie der nicht tumortragenden Lunge
- blutige oder stark schleimige BAL
- nicht repräsentative BAL, erkennbar an einem Epithelzellen-Anteil von > 10 %
- BAL-Rückgewinnungsrate von weniger als 20 %
- mikrobiologische oder zytologische Hinweise (z. B. Neutrophilie > 11 %) auf eine Infektion in der BAL
- Hinweise auf eine durch Zytostatika induzierte Pneumonitis

## **2.2. Bronchoskopie**

### **2.2.1. Fiberbronchoskopie**

Die Bronchoskopie diente bei den Patienten vor Therapie der Diagnosestellung und Stadieneinteilung des Karzinoms. Im therapierten Kollektiv erfolgte sie am Tag nach der Chemotherapie.

Sie wurde mit Ausnahme von 3 Patienten (siehe Kap. 2.2.2.) als fiberoptische Spiegelung in Lokalanästhesie vorgenommen. Zum obligatorischen Monitoring gehörten die Ableitung eines 1-Kanal-EKG und der Herzfrequenz, die Messung der transkutanen Sauerstoffsättigung und die Anlage eines peripher-venösen Zugangs.

Nach Prämedikation mit 5 mg Hydrocodon und 0,5 mg Atropin subcutan etwa 30 Minuten vor der Untersuchung inhalierten die Patienten etwa 15 Minuten lang 1,5 mg Salbutamol in 0,9 %iger NaCl-Lösung über einen Inhalator. Zur Lokalanästhesie von Rachenschleimhaut und Kehlkopf wurde 4%ige Lidocain-Lösung aufgetragen. Die Anästhesie der unteren Atemwege erfolgte mit 2%iger Lidocain-Lösung. Die maximale Lidocaindosis überstieg nicht 6 mg/kg KG. Nur vereinzelt wurde die zusätzliche Gabe von bis zu 2,5 mg Midazolam notwendig. Während der Untersuchung wurde über eine Nasensonde 2 - 4 l Sauerstoff/min zugeführt.

Im Krankenhaus Heidehaus verliefen Inhalation und Lokalanästhesie modifiziert. Das Inhalationsgemisch beinhaltete neben 1,5 mg Salbutamol in 0,9 %iger NaCl-Lösung auch 2 ml einer 1%igen Oxybuprocain-Lösung. Nach einer Inhalationszeit von 20 - 30 Minuten wurden über eine Kehlkopfkanüle 2,5 ml einer 2%igen Lidocain-Lösung auf die Stimmbänder geträufelt, gefolgt von 2 - 4 Stößen (20 - 40 mg) eines Lidocain-Pumpsprays auf die Rachenschleimhaut. Bedarfsweise wurde die Lokalanästhesie nach Einführen des Bronchoskops komplettiert durch Beträufeln des Kehlkopfes und der Trachealschleimhaut unter Sicht mit bis zu 10 ml einer 1%igen Lidocain-Lösung. Die maximal applizierte Gesamtdosis errechnete sich auf 190 mg und blieb damit unter der von den Herstellern geforderten intravenösen Höchstdosis von 200 - 300 mg/Stunde [201] bzw. 4,5 mg/kg KG [7].

Alle Raucher wurden dazu angehalten, mindestens 12 Stunden vor der Bronchoskopie nicht zu rauchen.

### **2.2.2. Narkosebronchoskopie**

Die Bronchoskopie von 3 Patienten erfolgte in intravenöser Kurznarkose (Hypnotikum Methohexital, Muskelrelaxans Succinylcholin, Analgetikum Remifentanyl) mit dem starren Instrumentarium der Fa. Storz, Tuttlingen. Nach Abschluss der Probenentnahmen zur Tumordiagnostik schloss sich die BAL in der oben beschriebenen Technik an über ein in das starre Bronchoskopierohr eingeführtes flexibles Bronchoskop.

### **2.2.3. Gewinnung und primäre Verarbeitung der BAL**

Die Technik der BAL richtete sich nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie [54].

Zunächst erfolge die Inspektion des einsehbaren Bronchialsystems ggf. mit Entnahme der notwendigen Gewebs- und Sekretproben. Im Anschluss daran wurde der dem Tumor kontralaterale Lingula- oder Mittellappenbronchus auf Segment- oder Subsegmentebene zur BAL-Entnahme mit dem Bronchoskop okkludiert (wedge position). In den verschlossenen Bronchus wurden 20 ml einer körperwarmen 0,9 %igen NaCl-Lösung instilliert. Die rückgewonnene Portion wurde verworfen, um etwaige Verunreinigungen aus der bronchialen Vorlaufstrecke (Lidocain, bronchiale Zellen) zu minimieren.

Für die nun folgende BAL wurden 100 ml warme Kochsalzlösung in 5 Einzelfractionen á 20 ml eingespült, sogleich mit niedrigem Sog atraumatisch abgesaugt und gepoolt gesammelt. Durch Filterung über ein Mullnetz ließen sich eventuell noch vorhandene grobe Schleimflocken zurückhalten. Die gesiebte rückgewonnene Spülflüssigkeit (Recovery) wurde sofort auf Eis gelegt und gelangte ohne Unterbrechung der Kühlkette zur Primärzentrifugation ins Labor. Für jede Probe waren Zeitpunkt der BAL, Entnahmestort, Recovery und Ankunft im Labor protokolliert.

Die Primärzentrifugation der gekühlten BAL erfolgte innerhalb einer Stunde nach ihrer Entnahme aus dem Bronchialsystem. Das gepoolte Material wurde 10 Minuten lang mit 250 x g zentrifugiert, danach der zellfreie Überstand in Plastikröhrchen und Eppendorfcups portioniert und sofort bei -28° C für spätere Untersuchungen eingefroren.

Das Zellpellet wurde zur Ermittlung der Differenzialzytologie auf den Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet und mit einer May-Grünwald-Giemsa-Lösung gefärbt. Die mikroskopische Zellzählung und -differenzierung erfolgte als Doppelbestimmung manuell. Dazu wurden 200 Zellen differenziert. Die Gesamtzellzahl wurde in der Neubauer Zählkammer bestimmt.

## 2.3. Zytostatische Chemotherapie

Die Therapie mit Adriamycin, Cyclophosphamid und Vincristin gilt als etabliertes Protokoll zur Erstbehandlung des SCLC [226]. Es existieren verschiedene, in ihrer Dosis unterschiedliche Regimes [Übersicht in 208]. In der Studie kam folgendes Protokoll zu Anwendung:

Zytostatika: 60 mg/m<sup>2</sup> KOF Adriamycin (= Doxorubicin) i.v.

1000 mg/m<sup>2</sup> KOF Cyclophosphamid i.v.

1,5 mg/m<sup>2</sup> KOF Vincristin (= Oncovin) i.v.

Wiederholung Tag 28

Begleitmedikation: 50 - 100 mg Metoclopramid per infusionem

100 mg Prednisolon i.v.

Dimenhydrinat i.v. oder Supp.

bedarfsweise Ondansetron 4 – 8 mg i.v. oder oral

Modifikationen: Bei Anzeichen einer peripheren Polyneuropathie, wie sie das Vinca-alkaloid Vincristin hervorruft, wurde bei dem nächsten Chemotherapiekurs im Austausch das wirkähnliche Vinblastin in der Dosis 10 mg/m<sup>2</sup> KOF i.v. appliziert. Ein Patient erhielt wegen anhaltender Knochenmarkdepression einen auf 50 % dosisreduzierten Kurs. Der Zeitabstand von 4 Wochen bis zur nächsten Zytostatikagabe konnte sich um eine Woche verlängern wegen z. B. prolongierter Knochenmarkdepression.

## 2.4. Aufarbeitung der BAL

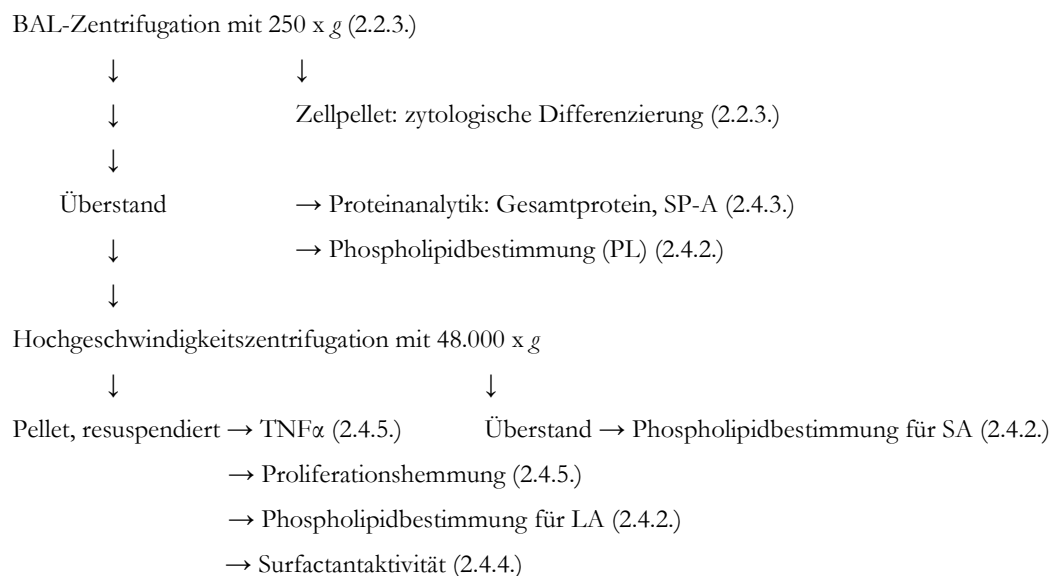
### 2.4.1. Übersicht über die Arbeitsschritte

Die auf Eis gekühlte BAL gelangte innerhalb einer Stunde nach Entnahme zur Weiterverarbeitung ins Labor. Die vorgesehenen Untersuchungen umfassten die

- **Zelluläre Diagnostik:** Zellzahlen und Differenzialzytologie
- **Surfactantanalytik:** Lipide (Gesamtphospholipide, kleine und große Aggregate)  
Proteine (Gesamtprotein, Surfactantprotein-A)  
Oberflächenspannung ( $\gamma_{\min}$ ,  $\gamma_{\max}$ ,  $\gamma_{\text{ads}}$ )
- **Immunmodulation:** TNF $\alpha$ -Sekretion aktivierter mononukleärer Blutzellen  
Proliferationshemmung aktivierter mononukleärer Blutzellen

Wegen der deutlich reduzierten Menge an Surfactant-Phospholipiden (s. Kap. 3.2.1.) konnte nicht jeder Patient komplett bezüglich aller vorgesehenen funktionellen und immunologischen Parameter analysiert werden.

Eine orientierende Übersicht (Abb. 5) soll vorab den Untersuchungsablauf verdeutlichen, bevor die weiteren Arbeitsschritte kurz erläutert werden. (Die in Klammern angegebenen Punkte beziehen sich auf den Methodik-Teil.)



**Abbildung 5:** Untersuchungsablauf der BAL. Übersicht.

## 2.4.2. Gewinnung der Surfactant-Fractionen, Lipidanalytik

Der zentrifugierten, zellfreien BAL wurden 2 x 500 µl als Proben für eine Doppelbestimmung der Phospholipide entnommen. Die übrige BAL-Flüssigkeit wurde bei 0° C mit 48000 x g für 60 Minuten lang zentrifugiert, um die Surfactantfraktionen aufzutrennen. Die „großen Aggregate“ (LA), die sich am Boden abgesetzt hatten, wurden resuspendiert und nach Berechnung der Wiederfindungsrate, Konzentrationskorrektur und Erfassung des Lipidverlustes der Phospholipidbestimmung (s. u.) zugeführt.

Aus dem Überstand wurden nach Ultrazentrifugation Doppelproben für die Bestimmung des Phospholipidgehaltes in den „kleinen Aggregaten“ (SA) entnommen.

Die Phospholipidmenge aus den drei Fraktionen (BAL-Überstand, SA-Überstand und LA-Pellet) wurden in einem photometrischen Verfahren in Anlehnung an Bartlett [13] bestimmt, indem nach einer Lipidextraktion und anschließendem thermischen und chemischen Herauslösen des Phosphates aus dem Phospholipidmolekül die Menge des enthaltenen Phosphates analysiert und auf die Konzentration des Phospholipids zurückgerechnet wurde. Das in jeder Probe schon primär enthaltene wasserlösliche anorganische Phosphat wurde zuvor, mittels Lipidextraktion nach Bligh und Dyer [22], durch eine Chloroform/Methanol-Mischung von den hydrophoben Phospholipiden getrennt. Eine eingehende Darstellung der aufwändigen Arbeitsschritte findet sich in der Dissertationsarbeit von Tiryaki [231].

### **2.4.3. Proteinanalytik**

Das Gesamtprotein in der zellfreien BAL wurde nach der von Lowry beschriebenen Methode bestimmt [150]. Dabei bildet sich nach Reaktion von Eiweißen mit einer alkalischen Kupferlösung und Reduktion mittels Folin-Reagens (Phosphormolybdänphosphorwolframsäure) durch aromatische Aminosäuren ein Farbstoff, dessen photometrische Messung die Quantifizierung des Proteingehaltes erlaubt.

Die Bestimmung des SP-A erfolgte mittels ELISA wie folgt: Nach Vorlegen einer Natrium(hydrogen)karbonat-Pufferlösung in die 96-Loch(Well)-Platte werden die einzelnen Wells mit dem monoklonalen Maus-SP-A-Antikörper (AK) beschichtet und die Platte über Nacht inkubiert. Auf die dreimalige Auswaschung mittels einer Tris-Pufferlösung folgt eine 30minütige Blockierung der noch nicht belegten Bindungskapazität mit einem irrelevanten Protein (Magermilch). Die Wells mit den an der Platte adsorbierten Maus-SP-A-AK werden dann mit je 100 µl Proben beschickt. Zur Vergleichsmessung wird eine Standardreihe mit 7 Verdünnungen zwischen 20 ng und 0,3125 ng SP-A in jeweils halbiertes Konzentration mitgeführt. Nach 2,5stündiger Inkubation und dreimaliger emulgator- und puffergetragener Auswaschung wird das polyklonale Kaninchen-SP-A als zweiter Antikörper einpipettiert, aus dem sich mit dem humanen SP-A Antigen-Antikörper-Komplexe bilden. Magermilch blockiert wiederum noch ungebundene Bindungsstellen. Nach Inkubation über Nacht werden ungebundene Kaninchen-Antikörper dreimalig mit einer Emulgator-Pufferlösung ausgewaschen. Der aufgetragene dritte Antikörper, ein peroxidase-gekoppelter Esel-Kaninchen-Antikörper, bindet an die vorhandenen AG-AK-Komplexe. Nach erneuter Inkubation über Nacht und dreimaligem

Waschen mit Emulgator-Pufferlösung wird eine Lösung aus Dinatriumphosphat, Phenylendiamin und Wasserstoffperoxid zugegeben, die durch Peroxidase umgesetzt wird. Nach 30 Minuten wird die Farbreaktion mit einer Stopplösung (Schwefelsäure) beendet. Die der SP-A-Konzentration proportionale Farbstoffkonzentration lässt sich bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 492$  nm im Photometer bestimmen. Die Quantifizierung erfolgt anhand der mitgeführten Standardlösung. Alle Messungen der Mikrotitrierplatte wurden doppelt evaluiert.

#### 2.4.4. Funktionelle Analytik

Mit dem von Enhorning 1977 entwickelten Pulsating Bubble Surfactometer (PBS) lassen sich Eigenschaften des Surfactant an sphärischen Oberflächen mit wechselndem Durchmesser bestimmen, analog zur alveolären Physiologie [65,67]. In einer temperierten, körperwarmen ( $37^\circ$  C) Probenkammer, die die zu untersuchende Probenflüssigkeit enthält, wird eine Luftblase mit einer mikroskopisch kontrollierten Größe von 0,40 mm gebildet. Die Größe der Luftblase wird automatisch durch Zufuhr und Ablassen von Luft in einem zyklischen Rhythmus zwischen einem minimalen Radius von 0,40 mm ( $\gamma_{\min}$ ) und einem maximalen Radius von 0,55 ( $\gamma_{\max}$ ) mm variiert, wobei die exakte Größe unter mikroskopischer Sicht kontrolliert und ggf. korrigiert wird. Über einen Druckabnehmer kann der Druck aufgezeichnet werden, der notwendig ist, um die Luftblase in ihrem minimalen und maximalen Radius offen zu halten. Daraus lässt sich nach dem Gesetz von Laplace ( $\Delta P = 2\gamma/r$ ) die Oberflächenspannung  $\gamma_{\min}$  bzw.  $\gamma_{\max}$  berechnen, die wiederum Rückschlüsse auf die Funktion des Surfactant zulässt.

Vor Beginn der Messungen an der pulsierenden Blase wird diese 10 Sekunden lang mit konstantem Radius stehen gelassen. In dieser statischen Phase lagern sich die Phospholipide an der Oberfläche der Luftblase an, werden dort gleichsam adsorbiert und bewirken eine Minderung der Oberflächenspannung, die - als  $\gamma_{\text{ads}}$  definiert - die Surfactantfunktion unter statischen Bedingungen beschreibt.

Als Probenflüssigkeit dienten die resuspendierten LA-Pellets, die die zu untersuchenden oberflächenaktiven Substanzen des Surfactant enthielten. Die PL-Konzentration in den Proben wurde auf 1 mg/ml eingestellt. Als Pulsationsrate der Blase wurden 20/min gewählt, um dem humanen Atemzyklus nahe zu kommen.

Die Auswertung erfolgte computergestützt mit Software des Fraunhofer Institutes für Toxikologie und Experimentelle Medizin und dem daraus weiterentwickelten Programm Bubble<sup>®</sup> (Schöck/Hohlfeld, MHH 1996).

### 2.4.5. Immunmodulation

In zwei experimentellen Ansätzen wurde geprüft, ob Surfactant der untersuchten Kollektive die Fähigkeit besitzt, die durch Lipopolysaccharide (LPS) induzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung von „peripheral blood monocyctic cells“ (PBMC) zu modulieren und die Proliferationsfähigkeit von PBMC in unterschiedlicher Weise herabzusetzen.

Die im folgenden kurz beschriebenen Methoden sind allgemein standardisiert.

Für die Untersuchung der TNF $\alpha$ -Freisetzung wurden die aus heparinisiertem Blut gesunder Probanden nach Dichtezentrifugation extrahierten mononukleären Zellen (PBMC) in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well (=  $2 \times 10^6$  Zellen/ml) zusammen mit 10 ng/well (200 ng/ml) Lipopolysaccharid (LPS) als Stimulanz zur Zytokinfreisetzung, 100  $\mu$ l isoliertem Surfactant (1 mg/ml) der jeweiligen Kollektive oder Kulturmedium (RPMI 1640-FCS-PenStrep.) als Negativkontrolle in eine Mikrotiterplatte gegeben. Nach 5stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37° C unter Zusatz von 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Mikrotiterplatte zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80° C gelagert.

Für die TNF $\alpha$ -Bestimmung mittels ELISA wurde die Mikrotiterplatte zunächst den Herstellerangaben entsprechend mit 100 $\mu$ l des 1:180 vorverdünnten Capture-Antikörpers über Nacht bei Raumtemperatur (RT) beschickt. Nach dreimaligem Waschen und Blocken freier Bindungsstellen mit 300  $\mu$ l Blockpuffer erfolgte nach erneutem Waschen die Zugabe der Analysenproben bzw. des Standards (je 100  $\mu$ l) für 2 h bei RT. Nach erneutem Waschen erfolgte dann die Zugabe des Detection-Antikörpers (100  $\mu$ l 1:180 verdünnt) für 2 h bei RT. Als nächstes wurden nach jeweils erneutem Waschen Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (100  $\mu$ l 1:200) für 20 min bei RT und die Substrat-Lösung für 20 min bei RT zugegeben und schließlich die Farbreaktion mit 50  $\mu$ l Stop-Lösung beendet. Die bei 450 nm im Photometer gemessene Farbintensität (mit Referenz bei 570 nm) zeigte durch Vergleich mit der mitgeführten Standardlösung die Konzentration des TNF $\alpha$  an. Die doppelt bestimmten und gemittelten Ergebnisse wurden durch einen Quotienten, der aus den Surfactant-behandelten PBMC und den Kontrollproben errechnet wurde, als „Stimulationsindex“ ausgedrückt.

Für die Untersuchung der Proliferationsfähigkeit wurden PBMC in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/well (=  $2 \times 10^6$  Zellen/ml) zusammen mit 5  $\mu$ g/ml Phythämagglutinin (PHA) als Stimulator des Zellwachstums, 100  $\mu$ l isoliertem Surfactant der jeweiligen

Kollektive oder Kulturmedium (RPMI 1640-FCS-PenStrep.) als Negativkontrolle in die Mikrotiterplatte eingesetzt. Nach 72stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37° C unter Zusatz von 5 % CO<sub>2</sub> wurden je Loch der Platte 10 µl <sup>3</sup>H-markiertes Thymidin (entsprechend 37 kBq/well) einpipettiert. Nach weiteren 4 Stunden wurden die Zellen durch Absaugen der Platte mittels eines Zell-Harvesters auf eine Filterplatte gewonnen. Nach Trocknung der Platte und Zugabe von jeweils 10 µl Szintillationsflüssigkeit wurde die Menge des in die PBMC eingebauten radioaktiven Thymidins in einem Cell sampler gemessen. Die doppelt bestimmten und gemittelten Ergebnisse wurden durch einen Quotienten aus den Surfactant-behandelten PBMC und den Positivkontrollen als „Stimulationsindex“ ausgedrückt.

## **2.5. Methodenkritische Anmerkungen**

Entsprechend der Machbarkeit wurden in dieser Arbeit Patienten vor und nach Chemotherapie als unverbundene Stichprobe untersucht und mit gesunden Normalprobanden verglichen.

Da keine großen systematischen Studien über das pulmonale Surfactantsystem bei gesunden Erwachsenen existieren, wurde im Einklang mit den Empfehlungen von Griese [85] Material von einem historischen Kontrollkollektiv aus dem eigenen Institut herangezogen, zumal damit auf nicht indizierte Bronchoskopien verzichtet werden konnte. Das Kontrollkollektiv unterschied sich aber in den Parametern Alter, Geschlecht und Raucherstatus erheblich von den Patienten. Unter der Prämisse gesunder Probanden durften jedoch nur Nichtraucher eingeschlossen werden [85].

Mögliche oder bekannte Einflüsse des Tabakkonsums auf die untersuchten Parameter werden in den jeweiligen Abschnitten des Kapitel 4 diskutiert, Einflüsse von Alter und Geschlecht in Kapitel 4.4.

Durch unvermeidbare Vorgaben (geringe Anzahl der Teilnehmer, unverbundenes Design der Patienten, Unterschiede zwischen Patienten- und Probandenkollektiv) wurde eine verminderte Aussagekraft der Studie in Kauf genommen.

## **2.6. Statistik**

Das in dieser Pilotstudie gewählte unverbundene Studiendesign war auf die extrem schwierige Patientenrekrutierung zurückzuführen. Wir haben deshalb die initial angestrebte Studienkonzeption einer verbundenen Patientenstichprobe verlassen müssen und uns entschieden, entsprechend der Machbarkeit Material für die Analytik zu sammeln,

um zu untersuchen, ob sich bei Vergleich unverbundener Patientengruppen überhaupt Unterschiede entdecken lassen. Wegen der Umstellung auf eine Studienkonzeption entsprechend der Machbarkeit wurde keine a priori Berechnung der Stichprobengrößen aufgeführt. In dieser Pilotstudie sollte zunächst abgeschätzt werden, ob überhaupt Veränderungen der Zusammensetzung und Funktion des Surfactant-Systems auftreten. Die deskriptive Statistik wurde mit dem Programm GraphPad PRISM<sup>®</sup> der Firma GraphPad Software, Inc., Version 3.00, erstellt. Zusätzlich kam zur Erarbeitung von Tabellen und Grafiken die Software Microsoft<sup>®</sup> Excel 97 und Microsoft<sup>®</sup> Word 2000 zur Verwendung. Die Ergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwertes ( $\pm$  SEM) dargestellt. In der Annahme nicht-normalverteilter Daten wurde der nicht-parametrische U-Test von Mann und Whitney angewandt. Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  angenommen. Bei signifikanten Gruppenunterschieden ist der exakte p-Wert angegeben.

## 2.7. Aufstellung der verwendeten Materialien und Medikamente

### Bronchoskopie

Atropin-Sufat Braun 0,5 mg, Braun, Melsungen  
Dicodid Injektionslösung, Abbott, Wiesbaden  
Dormicum 1 ml Injektionslösung, Roche, Grenzach-Wyhlen  
Xylocain Viscös 2 %, AstraZeneca, Wedel  
Xylocain Pumospray, AstraZeneca, Wedel  
Novesine Lösung 1 %, Wander, Nürnberg  
Sultanol Fertiginhalat, GlaxoSmithCline, München  
Medikamentenvernebler Nr. 3033678, Intersurgical, Wokingham  
Monitoring für Pulsoxymeter und EKG-Ableitung, Dräger, Lübeck  
Intravenöse Verweilkanülen, Braun, Melsungen  
NaCl-Lösung 0,9 %, Eigenherstellung der Krankenhausapotheke  
2-, 5-, 10- und 20ml-PP+PET-Spritzen, Becton Dickinson, USA  
verschiedene Sterican-Kanülen, Braun, Melsungen  
10 ml-PP-Sammelröhrchen mit Stopfen, Sarstedt, Numbrecht  
Verschließbare PP-Sammelgefäße 30 ml, Sarstedt, Numbrecht, Nr. 60.543.001  
Fiberbronchoskope P 20 und P 30, Olympus Optical, Hamburg  
Starres Instrumentarium für die Bronchoskopie, Storz, Tuttlingen

### Primärzentrifugation, Ultrazentrifugation

Zentrifuge Biofuge B, Heräus Septech  
Parafilm M, American Can Company  
Microtubes 1,5 ml, Nr. 72.690.500, Röhrchen mit Stopfen Nr. 55.539, Sarstedt, Numbrecht  
Glasmesszylinder, Schott DURAN, Mainz

### Ultrazentrifugation

Glasmesszylinder, Schott DURAN, Mainz  
Magnetrührer MA 2071 und Magnetrührfische, Hecht-Assistent, Sondheim  
Ultraschallbad Bandelin Sonorex RK 510 H, Bandelin electronic, Berlin  
Zentrifugenröhrchen PP, Nr. 342082, Beckman, Palo Alto  
Laborwaage Sartorius 1602 MP, Sartorius, Göttingen  
Ultrazentrifuge J1-21 mit Rotor JA 20-1, Beckman, Palo Alto  
Variable Kolbenhubpipette (200-100µl), Eppendorf, Hamburg  
Glasröhrchen mit Schraubverschluss und Teflondichtung, Pyrex, England

### Resuspendierung und PL-Messungen

Ringer-Lactat-Lösung, Fresenius, Bad Homburg  
variable Finnpipetten (1-40 µl, 40-200µl, 200-1000µl), Labsystems, Frankfurt  
Kapillarspitzen 200 µl, Biozym Diagnostik, Hessisch-Oldendorf  
Vortex, Typ REAX IR, Nr. 54113, Heidolph, Schwabach  
Ultraschallbad Bandelin Sonorex RK 510 H, Bandelin electronic, Berlin  
Analysenwaage BP 221S Sartorius, Göttingen  
Gläserne HPLC-Fläschchen, Nr. 27230, Neolab, Heidelberg  
Mikroeinsätze (G40, Nr. 300410) und Federn (S50, Nr. 300408), CS Gaschromatographie Service, Langerwehe

## Lipidextraktion

Methanol Chromasolv, Nr. 34860, Riedel de Haen, Seelze  
Chloroform Chromasolv, Nr. 34854, Riedel de Haen, Seelze  
Isotonische NaCl-Lösung 0,9 %, Braun, Melsungen  
Glasröhrchen (16 x 100 mm) mit Schraubverschluss und Teflondichtung, Pyrex, England  
Multipipette 4981 und passende Combitips (5, und 10 ml), Eppendorf, Hamburg  
Glasröhrchen mit Schraubverschluss und Teflondichtung, Pyrex, England  
Vortex, Typ REAX IR, Nr. 54113, Heidolph, Schwabach  
Ultrazentrifuge J2-21 und Rotor JA20-1, Beckman, Palo Alto, USA  
Glas-Pasteurpipetten mit Pipettierhilfe, Nr E-1097, Neolab, Heidelberg

## Phosphatbestimmung

Kaliumhydrogenphosphat p.a., Nr. 1.04873.0250, Merck, Darmstadt  
Perchlorsäure 70% p.a., Nr. 1.00519.1000, Merck, Darmstadt  
Perhydrol 30% p.a., Nr. 1.07209.0250, Merck, Darmstadt  
Aqua dest. aus der Millipore-Anlage des Institutes  
Schwefelsäure 95-97% p.a., Nr. 1.00731.1000, Merck, Darmstadt  
Ascorbinsäure p.a., Nr. 1.00127.1000, Merck, Darmstadt  
Laborreiniger Extran MA 03, phosphatfrei, Nr. 1.07550.2000, Merck, Darmstadt  
Weithalsrundflaschen aus Glas mit Schliffstopfen, Schott DURAN, Mainz  
Glasmesszylinder 50 ml, 100 ml, 250 ml, Schott, DURAN, Mainz  
Trockenschrank, Typ I, Heraeus, Osterode  
Fiolax-Reagenzgläser, DIN 12395, 16 x 160 mm, Schott, Mainz  
variable Finnpietten, Labsystems, Frankfurt  
Multipipette plus 4981 Eppendorf, Hamburg, Nr. 612B7465, Merck, Darmstadt  
dazu passende Combitips (5 und 10 ml), Eppendorf, Hamburg  
Vortex, Reamix 2789, Hecht-Assistent, Sondheim  
Thermoblock 2036/DA Liebisch, Bielefeld  
Techne DB-3D Dri-Block, Cambridge  
Wasserbad GFL Typ 1002, Nr. 1048989d, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel  
Spektralphotometer LKB Ultrospec K 4053, Biochrom, Cambridge  
Einmalküvetten halbmicro, Nr. 1201, Müller ratiolab, Dreieich

## Pulsating Bubble Surfactometer

Pulsating Bubble Surfactometer, Fasszange und Probenkammer C 280 10083, Lot/2894, Electronetics Corp, Amherst  
Glasflasche, 2,0 l, Schott, DURAN, Mainz  
Wasser, Chromasolv-Qualität, Nr. 120592, Riedel de Haen, Seelze  
Magnetrührer mit Heizplatte, IKA Combimag, Typ RCT, Janke & Kunkel, Staufen  
Wasserbad GFL Typ 1002, Nr. 1048989d, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel  
JK MS1 Minishaker IKA, Dynatec, Denkendorf  
Ultraschallbad Bandelin Sonorex Typ RK 52, Bandelin electronic, Berlin  
Pasteur-Plast-Pipette 150 mm, 3 ml, Eppendorf, Hamburg  
variable Finnpietten (1-40 µl, 40-200 µl), Labsystems, Frankfurt  
Kapillarspitzen 200 µl, Biozym Diagnostik, Hessisch-Oldendorf  
MethanolG Chromasolv, Nr. 34860, Riedel de Haen, Seelze

## Gesamtprotein

Albumin aus Rinderserum (Nr. 11920), Serva, Heidelberg  
Natrium-Azid, Nr. 6688, Merck, Darmstadt  
Natriumhydroxid p. a., Nr. 6495, Merck, Darmstadt  
Natriumkarbonat, Nr. 6392, Merck, Darmstadt  
Kalium-Natrium-Tetrahydrat, Nr. 8087, Merck, Darmstadt  
Kupfersulfat, Nr. 2790, Merck, Darmstadt  
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, Nr. 9001, Merck, Darmstadt  
Aqua dest. aus der Millipore-Anlage des Institutes  
Zentrifugenanalyser Cobas Fara II, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen  
Analysenwaage 1602 MP, Sartorius, Göttingen  
Photometer MR 700, Heidolph, Schwabach

## SP-A

ELISA-Mikrotitrierplatten U-Form, Nr. 650061, Greiner, Flacht  
Mehrkanalpipette, Eppendorf, Hamburg  
Multipipette plus 4981, Eppendorf, Hamburg, Nr. 612B7565, Merck, Darmstadt,  
pH-Meter C 6820, Schott, Hofheim  
Microplate Reader, Dynatech, Denkendorf  
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan p.a., Nr. 1.083.820.500, Merck, Darmstadt  
NaCl p.a. Nr 6404, Merck, Darmstadt  
KCl p.a., Nr. 4936, Merck, Darmstadt  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> p.a., Nr. 6580, Merck, Darmstadt  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> p.a., Nr. 4873, Merck, Darmstadt  
Tween 20, P-1379, Sigma, Deisenhofen  
Aqua dest. aus der Millipore-Anlage des Institutes  
NaHCO<sub>3</sub> p.a., Nr. 1.063.290.500, Merck, Darmstadt  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> p.a., Nr. 1.069.320.500, Merck, Darmstadt  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> p.a., Nr. 6580, Merck, Darmstadt  
Perhydrol 30%, Nr. 1.072.090.250, Merck, Darmstadt  
Phenylendiamin Nr. P9020, Sigma, Deisenhofen  
Schwefelsäure 95-97 % p.a., Nr. 1.00731.1000, Merck, Darmstadt  
Mouse anti human SP-A, MAB 3280, Chemikon, Harrow  
Rabbit anti human SP-A, AB 3420, Chemikon, Harrow  
Esel anti Kaninchen peroxidase-markiert, 711-035,152, Dianova, Hamburg  
SP-A human recombinant, Clone 01-010, Altana Pharma, Konstanz

## Isolation von PBMC

Laborfuge GL, Heraeus Sepatech, Osterode  
Werkbank, HeraSafe, Heraeus, Hanau  
Sterile 50ml-Röhrchen, Falcon, Becton Dickinson, San Jose  
Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm), Millipore, Eschborn  
Kulturmedium RPMI 1640, Cambrex, Verviers  
Ficoll-Paque <sup>TM</sup>Plus Nr. 17-1440-03, Amersham Biosciences,

## Stimulationsversuche

Ready Safe Szintillationsflüssigkeit, Beckman, Palo Alto

Wallac Szintillationszähler 1409, Beckman, Palo Alto

Laborfuge GL, Heraeus Sepatech, Osterode

Multipipette mit passenden Combitips, Eppendorf, Hamburg

Mehrkanalpipette mit Pipettenspitzen, Eppendorf, Hamburg

96-Loch-Mikrotiterplatten, MaxiSorp Surface, Nunc-IMMUNO PLATE, Brand Products, Roskilde

<sup>3</sup>H-markiertes Thymidin (370kBq/ml), TRK 61, Amersham Buchler, Braunschweig

PHA Stammlösung, Boehringer, Mannheim

Brutschrank, Heraeus, Berlin

Cell sampler, Canberra Packard, Dreieich

Harvester, Canberra Packard, Dreieich

LPS (L2630), Sigma, Deisenhofen

## TNF $\alpha$ -ELISA

DuoSet ELISA human TNF- $\alpha$ , Nr. DY 210, R&D Systems, Minneapolis

Carbonatpuffer: 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,5, Fa. Merck, Darmstadt

Waschpuffer: 0,05% Tween 20, Sigma, Deisenhofen, in PBS (Fertiglösung)

Blockpuffer: 1% BSA, Sigma, Deisenhofen, 5% Sucrose (Fa. Merck, Darmstadt) in PBS mit NaN<sub>3</sub>

Reagent-Diluent: 1% BSA, Sigma, Deisenhofen, in PBS, pH 7,2 - 7,4

Substrate-Lösung: Color-Reagent A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) + Color-Reagent B (Tetramethylbenzidine) (1:2), R&D Systems, Wiesbaden

Stop-Lösung: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 95-97%, verdünnt, Nr. 1.00731.1000, Merck, Darmstadt

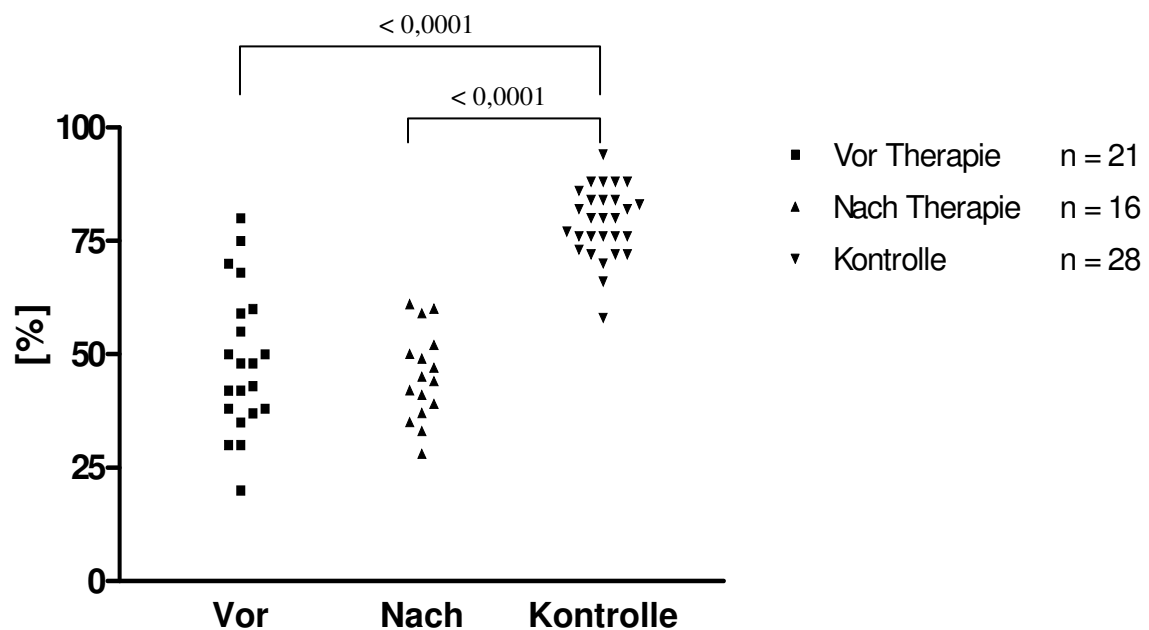
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Allgemeine BAL-Daten

##### 3.1.1. Recovery

Die Rückgewinnungsrate (Recovery) der instillierten Spülflüssigkeit betrug bei Patienten vor Chemotherapie im Mittel  $48,5 \pm 3,4$  ml, bei den Patienten nach Chemotherapie  $45,1 \pm 2,4$  ml. Zwischen beiden Kollektiven bestand kein Unterschied ( $p = 0,41$ ).

Die Recovery der gesunden Probanden lag bei  $78,9 \pm 1,5$  ml. Zwischen den beiden Patientenkollektiven und den gesunden Probanden war der Unterschied in der Rückgewinnung hochsignifikant (jeweils  $p < 0,0001$ ) (vgl. Abb. 6).



**Abbildung 6:** Rückgewinnungsrate der BAL von Patienten vor und einen Tag nach zytostatischer Chemotherapie, verglichen mit Gesunden. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Klammern bezeichnen das Signifikanzniveau.

##### 3.1.2. Zellzahl und Differenzialzytologie

Gesamtzellzahl, Zellzahl in Bezug auf die rückgewonnene BAL-Menge und mikroskopische Zelldifferenzierung sind in den folgenden Tabellen 3 und 4 dargestellt.

	Gesamt- zellzahl [ x 10 <sup>6</sup> ]	Zellen / $\mu$ l
<b>Vor Therapie</b> n = 21	6,66 $\pm$ 1,75 #	112,9 $\pm$ 23,5 *
<b>Nach Therapie</b> n = 16	7,85 $\pm$ 1,16	175,4 $\pm$ 23,8 #
<b>Kontrolle</b> n = 28	9,11 $\pm$ 0,92	115,0 $\pm$ 11,7

**Tabelle 3:** Gesamtzellzahl und Zellzahl/ $\mu$ l in der BAL von Patienten vor und einen Tag nach zytostatischer Chemotherapie, verglichen mit Gesunden. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

\* p < 0,05 für Vergleich zwischen Patienten.

# p < 0,05 für Vergleich mit Kontrolle.

Die Zellzahlen aller Kollektive wiesen die bekannt hohe Schwankungsbreite auf [39,51]. Sie lag bei den Patienten vor Therapie zwischen 0,3 und 32,60 x 10<sup>6</sup> (8 – 435/ $\mu$ l), nach Therapie zwischen 0,2 und 20,2 x 10<sup>6</sup> (57 – 388/ $\mu$ l). Im Kontrollkollektiv fand sich eine ähnlich breite Spanne von 3,0 bis 25,5 x 10<sup>6</sup> Zellen (56 – 311/ $\mu$ l).

Die Gesamtzellzahlen zwischen Patienten und Kontrollprobanden sind auf Grund der niedrigen Recovery beider Patientenkollektive nicht miteinander vergleichbar. Wird als Bezugsparameter die rückgewonnene Spülflüssigkeit gewählt, ergibt sich eine signifikante Erhöhung der Zellzahlen nach Chemotherapie, die sowohl für den Vergleich zu vor Therapie als auch zu den Probanden eine Signifikanz von < 0,05 erreichte (vgl. Tab. 3).

Sowohl bei den Patienten als auch bei den Probanden lagen die prozentualen Zellzahlen innerhalb der großen Schwankungsbreite der Norm von Gesunden, wie sie z. B. bei Ettensohn u. a. und bei der DGP hinterlegt sind [53,68]. Ein Patient vor Therapie wies bei einer niedrigen Gesamtzellzahl mit 24 % Lymphozyten und dementsprechender Verminderung der Makrophagen eine abweichende Zusammensetzung auf. Alle übrigen Parameter einschließlich seiner klinischen Daten zeigten keine auffälligen Abweichungen, so dass er in die Studie eingeschlossen blieb.

	Makrophagen			Lymphozyten			Neutrophile Granulozyten			Eosinophile Granulozyten			Epithelien		
	[ x 10 <sup>6</sup> ]	[ 10 <sup>6</sup> / µl ]	[ % ]	[ x 10 <sup>6</sup> ]	[ 10 <sup>6</sup> / µl ]	[ % ]	[ x 10 <sup>6</sup> ]	[ 10 <sup>6</sup> / µl ]	[ % ]	[ x 10 <sup>6</sup> ]	[ 10 <sup>6</sup> / µl ]	[ % ]	[ x 10 <sup>6</sup> ]	[ 10 <sup>6</sup> / µl ]	[ % ]
<b>vor Therapie</b> n = 19	7,003 ± 1,82	117,2 ± 23,9	94,6 ± 2,0	0,213 ± 0,10 #	3,310 ± 1,4 #	3,4 ± 1,4 #	0,082 ± 0,04	1,668 ± 0,82 *	1,8 ± 0,7	0,013 ± 0,01	0,270 ± 0,15	0,2 ± 0,1	0	0	0
<b>nach Therapie</b> n = 16	7,399 ± 1,08	165,3 ± 21,9 #	94,9 ± 1,1	0,314 ± 0,14 #	6,943 ± 3,3 #	2,9 ± 1,1 #	0,093 ± 0,02	2,221 ± 0,52	1,6 ± 0,6	0,015 ± 0,01	0,290 ± 0,24	0,1 ± 0,1	0,029 ± 0,03	0,731 ± 0,7	0,4 ± 0,4
<b>Kontrolle</b> n = 28	8,596 ± 0,90	108,4 ± 11,4	94,4 ± 0,6	0,333 ± 0,04	4,125 ± 0,49	4,1 ± 0,5	0,109 ± 0,03	1,380 ± 0,39	1,01 ± 0,3	0,043 ± 0,03	0,575 ± 0,43	0,2 ± 0,1	0,045 ± 0,025	0,520 ± 0,3	0,5 ± 0,3

**Tabelle 4:** Differenzialzytologie der BAL von Patienten vor und einen Tag nach zytostatischer Chemotherapie, verglichen mit Gesunden. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM.

\* p < 0,05 für Vergleich zwischen Patientenkollektiven.

# p < 0,05 für Vergleich mit Kontrolle.

Die Anzahl der Makrophagen/ $\mu$ l rückgewonnene BAL wies zwischen den Patienten nach Therapie und den Kontrollen einen signifikanten Unterschied auf (vgl. Tab. 4). Sonst bestanden bei den Makrophagen sowohl in den Zellzahlen als auch in der prozentualen Verteilung keine Unterschiede zwischen den Kollektiven.

Vergleiche zwischen den Lymphozyten der Kontrollprobanden und der Patienten erreichten für die Gesamtzellzahl und die prozentuale Verteilung statistische Signifikanz zwischen Kontrollprobanden und den beiden Patientengruppen, nicht jedoch für die Patienten untereinander. Bei der Lymphozytenzahl/ $\mu$ l rückgewonnene BAL war ein Unterschied nur für die Patienten vor Therapie gegenüber den Probanden nachzuweisen. Wegen der numerisch geringen Differenzen auf dem Niveau von 3 - 4 % aller Zellen sind die Unterschiede für die Aussage in dieser Studie zu vernachlässigen.

Die neutrophilen Granulozyten/ $\mu$ l rückgewonnene BAL wiesen eine Differenz zwischen den Patientenkollektiven auf. Sonst unterschieden sich die Kollektive nicht.

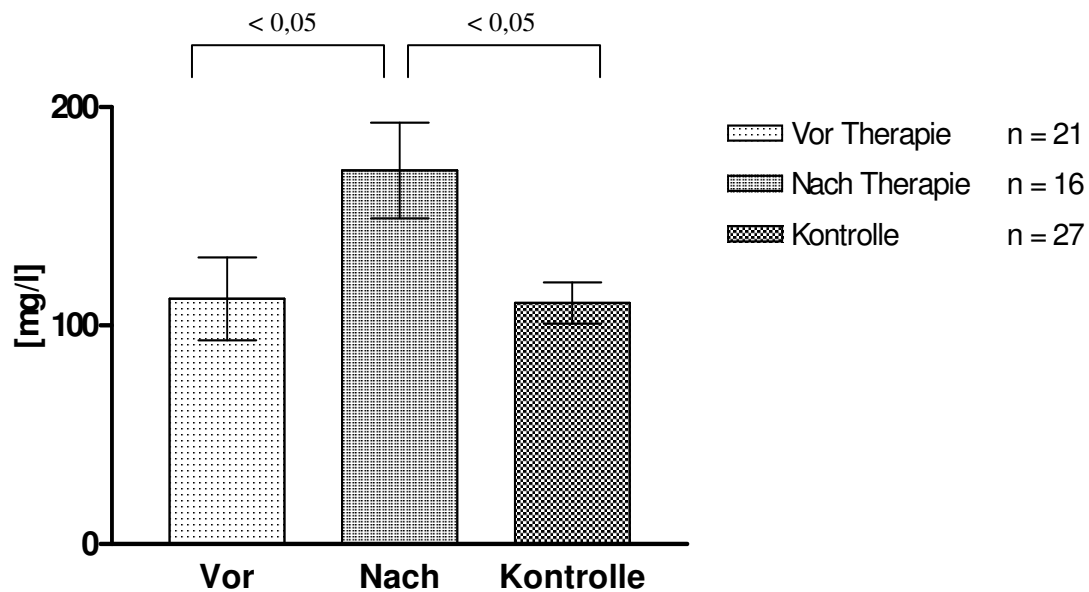
Auch die eosinophilen Granulozyten unterschieden sich im jeweiligen Vergleich der drei Kollektive nicht.

In keiner BAL fand sich eine nennenswerte Anzahl von epithelialen Zellen, so dass das Material als repräsentativ anzusehen war. Basophile Granulozyten, Plasmazellen und Mastzellen fehlten erwartungsgemäß [43,205].

### **3.1.3. Gesamtprotein**

Das Gesamtprotein umfasste in allen drei Gruppen eine weite Spanne. Es betrug vor Therapie zwischen 49 und 404,8 mg/l, im Mittel  $112,3 \pm 19,0$  mg/l, nach Therapie zwischen 49 und 381,7 mg/l, im Mittel  $171,0 \pm 21,9$  mg/l. Bei den Probanden war die Spanne schmaler; bei Werten von 49,2 bis 240,0 mg/l betrug das Mittel  $110,4 \pm 9,4$  mg/l (Abb. 7).

Der Proteingehalt der untherapierten Patienten und der Probanden unterschied sich statistisch nicht. Allerdings ergab sich eine Signifikanz für den Vergleich des Kollektives nach Therapie gegenüber vor Therapie ( $p = 0,011$ ) und gegenüber der Kontrollgruppe ( $p = 0,022$ ).



**Abbildung 7:** Der Gehalt an Gesamtprotein in der BAL von Patienten vor und einen Tag nach zytostatischer Chemotherapie, verglichen mit Gesunden (Kontrolle). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Klammern bezeichnen das Signifikanzniveau.

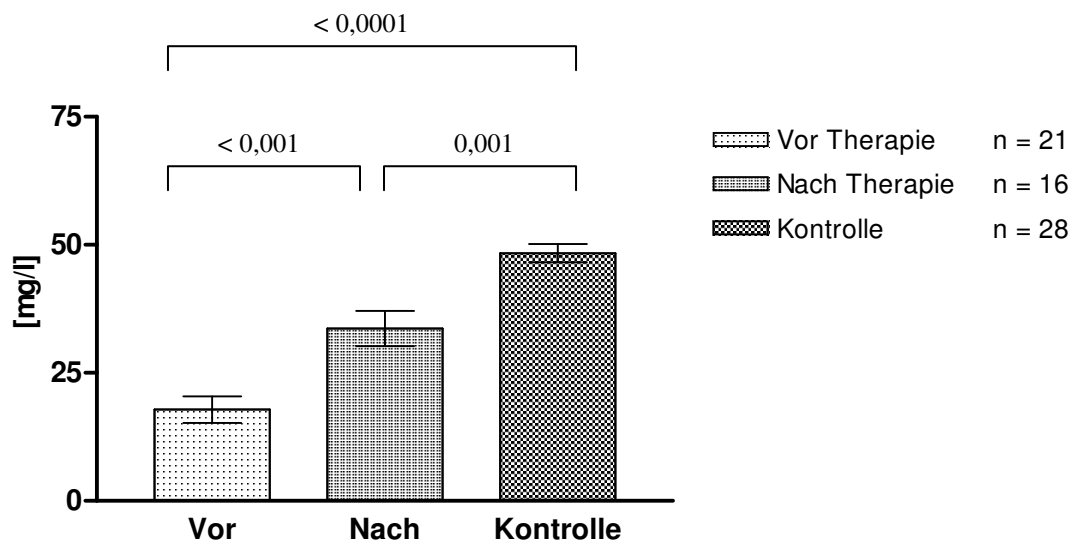
## 3.2. Surfactantzusammensetzung

### 3.2.1. Gesamt-Phospholipide

Die native, zellfreie BAL enthielt in jedem der drei Kollektive eine unterschiedliche mittlere Konzentration an Phospholipiden (PL) (Abb. 8). Die Patienten vor Chemotherapie wiesen im Durchschnitt  $17,82 \pm 2,6$  mg/l (Spanne von 6,15 bis 59,29 mg/l) auf. Nach Chemotherapie stieg die mittlere PL-Konzentration auf  $33,64 \pm 3,4$  mg/ml an, die Spannweite (3,95 und 60,06 mg/l) lag weiter auseinander. Bei den Probanden betrug der Mittelwert  $48,37 \pm 1,8$  mg/ml, die Spanne 28,7 bis 68,4 mg/l.

Die PL-Konzentrationen der beiden Patientenkollektive wichen hochsignifikant voneinander ab ( $p = 0,0003$ ). Ebenso hochsignifikant vermindert waren die Messwerte beider Patientenkollektive im jeweiligen Vergleich mit den Probanden.

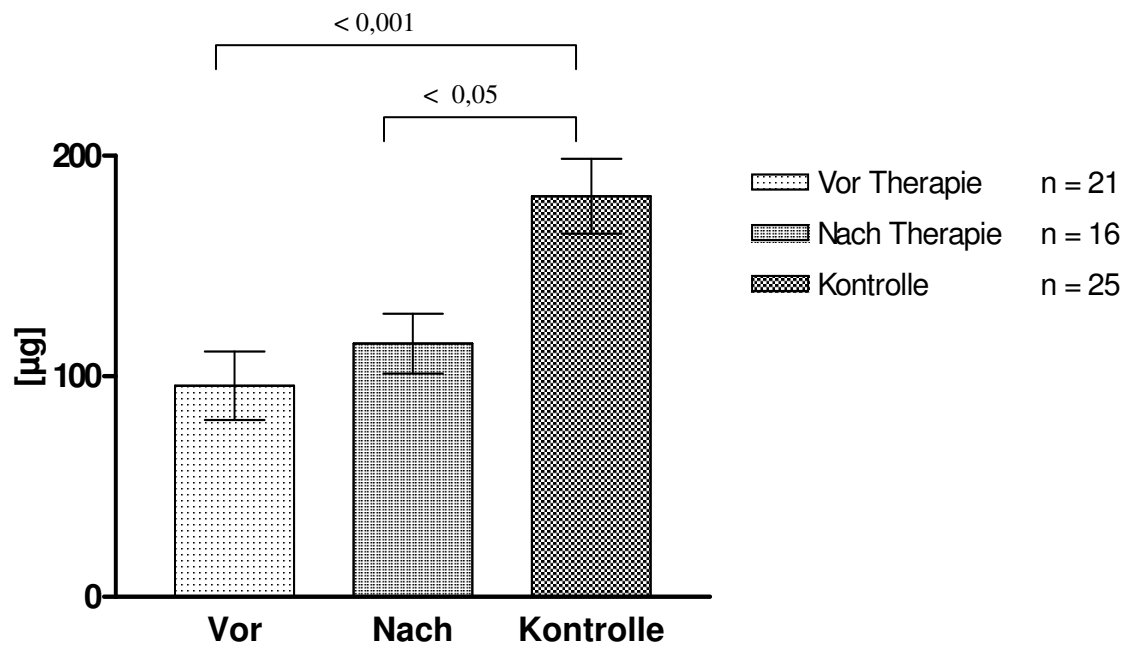
Aufgrund der deutlich reduzierten Gesamtmenge an Phospholipiden stand nicht für jeden Patienten eine ausreichende Menge an Surfactant für die funktionellen und immunologischen Experimente zur Verfügung, so dass deren Fallzahl kleiner ausfiel.



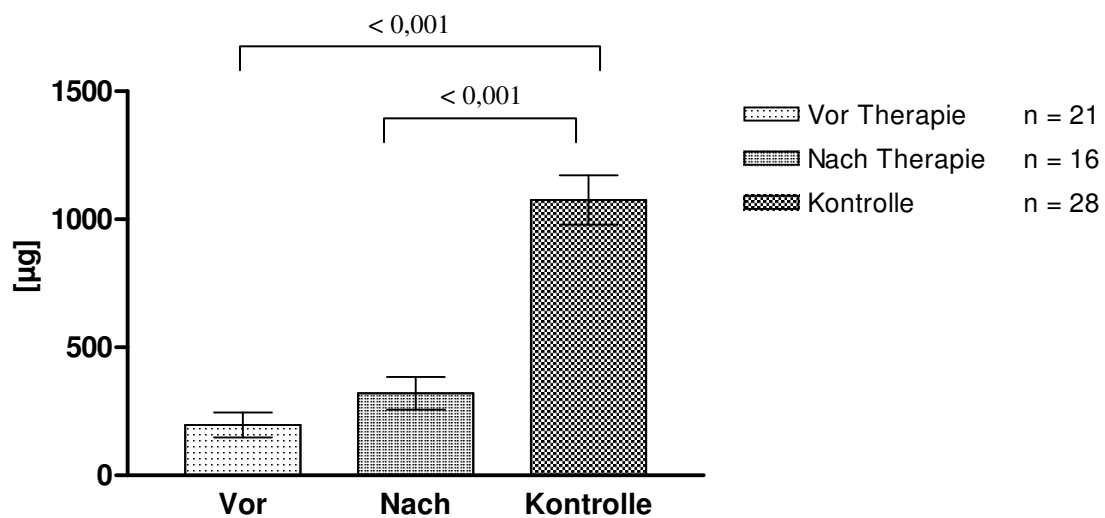
**Abbildung 8:** Der Gehalt an Gesamtlipolipiden (PL) in der BAL von Patienten vor und einen Tag nach zytostatischer Chemotherapie, verglichen mit Gesunden (Kontrolle). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Klammern bezeichnen das Signifikanzniveau.

### 3.2.2. SA und LA

Der ultrazentrifugierte Überstand der BAL der Patienten vor Chemotherapie enthielt im Mittel  $95,7 \pm 15,5 \mu\text{g}$  „kleine Aggregate“ (SA) innerhalb einer weiten Spanne von  $37,0$  bis  $281,2 \mu\text{g}$ . Der Mittelwert unterschied sich nicht ( $p = 0,12$ ) von den Patienten nach Chemotherapie, der sich mit  $114,9 \pm 13,6 \mu\text{g}$  (Spanne zwischen  $40,1$  und  $239,8 \mu\text{g}$ ) errechnete. Beide Kollektive unterschieden sich jedoch von den Kontrollprobanden ( $p = 0,0009$  bzw.  $p = 0,0092$ ), deren mittlerer SA-Wert bei  $181,7 \pm 17,0 \mu\text{g}$  in einer sehr weiten Spanne von  $13,8$  bis  $316,6 \mu\text{g}$  lag (Abb. 9).



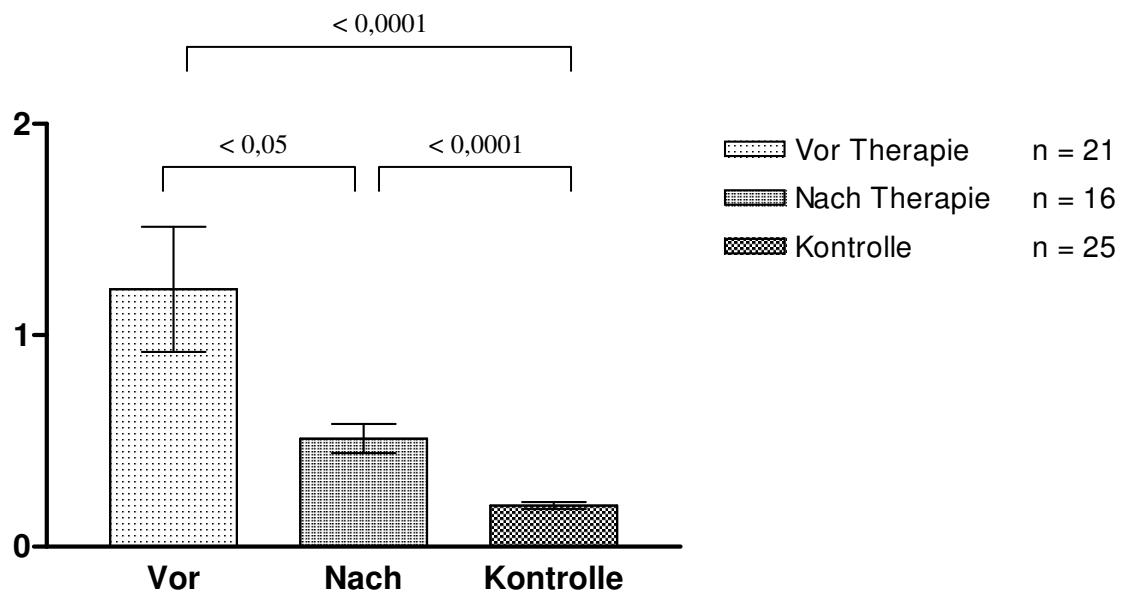
**Abbildung 9:** Der Gehalt an „kleinen Aggregaten“ in der BAL von Patienten vor und einen Tag nach zytostatischer Chemotherapie, verglichen mit Gesunden (Kontrolle). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Die Klammern bezeichnen das Signifikanzniveau.



**Abbildung 10:** Der Gehalt an „großen Aggregaten“ in der BAL von Patienten vor und einen Tag nach zytostatischer Chemotherapie, verglichen mit Gesunden (Kontrolle). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Die Klammern bezeichnen das Signifikanzniveau.

Ähnliche Resultate fanden sich bei den „großen Aggregaten“ (LA) aus dem ultrazentrifugierten Pellet der BAL (Abb. 10). Es bestand knapp keine Signifikanz ( $p = 0,055$ ) bei den Gruppenmittelwerten zwischen den Patientenkollektiven (vor Therapie  $188,8 \pm 808,5 \mu\text{g}$ ). Beide Patientenkollektive wiesen dagegen eine hochsignifikante Abweichung ( $p < 0,0001$ ) in der Gegenüberstellung mit den Probanden auf. Deren Mittelwert betrug  $1076 \pm 96,4 \mu\text{g}$  mit Maximalwerten von 429,38 und 2598,4  $\mu\text{g}$ .

Für die Beurteilung der PL-Funktion wurde das Verhältnis der kleinen inaktiven Surfactantaggregate zu den aktiven „großen Aggregaten“ als Quotient betrachtet (SA/LA). Mit einer errechneten Größe von  $1,22 \pm 0,3$  (Spanne 0,04 bis 5,69) für die Patienten vor Therapie und  $0,51 \pm 0,07$  (Spanne 0,12 bis 0,96) nach Chemotherapie erreichte der Unterschied eine Signifikanz von  $p = 0,04$ . Die gesunden Probanden wiesen im Mittel einen SA/LA-Quotienten von  $0,19 \pm 0,02$  zwischen den Maximalwerten 0,03 und 0,40 auf. Damit war für die Probanden ein hochsignifikanter p-Wert  $< 0,0001$  gegenüber den beiden Patientenkollektiven gegeben (Abb. 11).



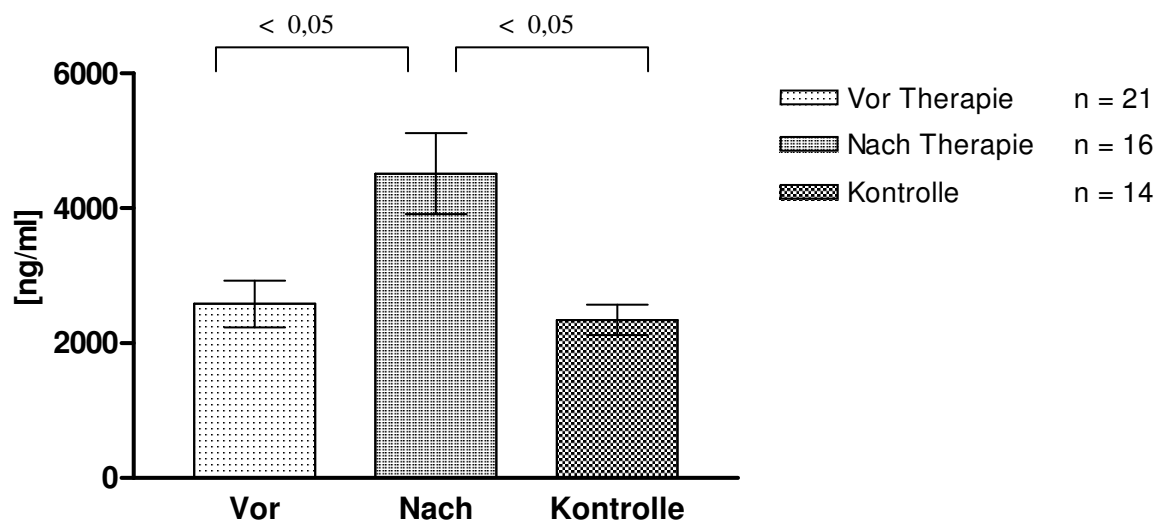
**Abbildung 11:** Der Quotient von „kleinen Aggregaten“ und „großen Aggregaten“ in der BAL von Patienten vor und einen Tag nach zytostatischer Chemotherapie, verglichen mit Gesunden (Kontrolle). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Die Klammern bezeichnen das Signifikanzniveau.

### 3.2.3. SP-A

Interessanterweise lagen die Mittelwerte des Surfactantprotein A bei den Patienten nach Chemotherapie bedeutend höher als bei den Patienten vor Therapie ( $p = 0,0096$ ). Sie betragen  $2580 \pm 350$  ng/ml vs.  $4513 \pm 600$  ng/ml (Abb. 12). Dabei umfasste die jeweilige Spanne 408 bis 6809 bzw. 1091 bis 9515 ng/ml.

Auch wenn man allein die Subgruppe der kleinzelligen Karzinome ohne die NSCLC miteinander vergleicht, ändert sich das Signifikanzniveau mit  $p = 0,002$  nur unbedeutend (nicht graphisch dargestellt).

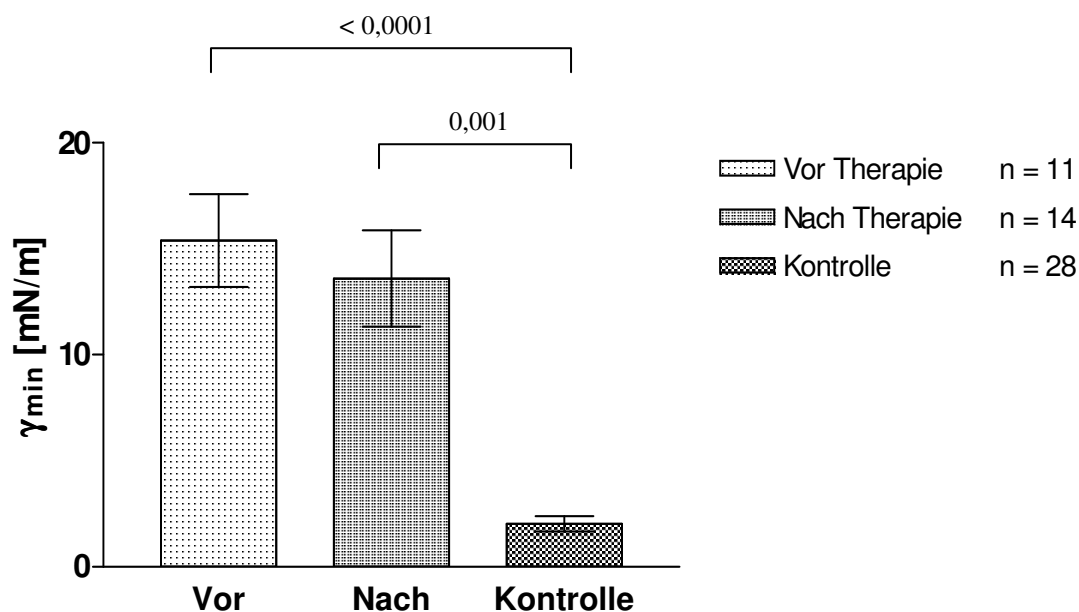
Die Messwerte der Kontrollgruppe betragen im Mittel  $2344 \pm 228$  ng/ml. Sie entsprachen in ihrer Höhe den Patientenwerten vor Therapie und unterschieden sich mit  $p = 0,0083$  von den Patienten nach Therapie.



**Abbildung 12:** Der Gehalt von Surfactantprotein-A in der BAL von Patienten vor und einen Tag nach zytostatischer Chemotherapie, verglichen mit gesunden Probanden (Kontrolle). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Klammern bezeichnen das Signifikanzniveau.

### 3.3. Surfactantfunktion

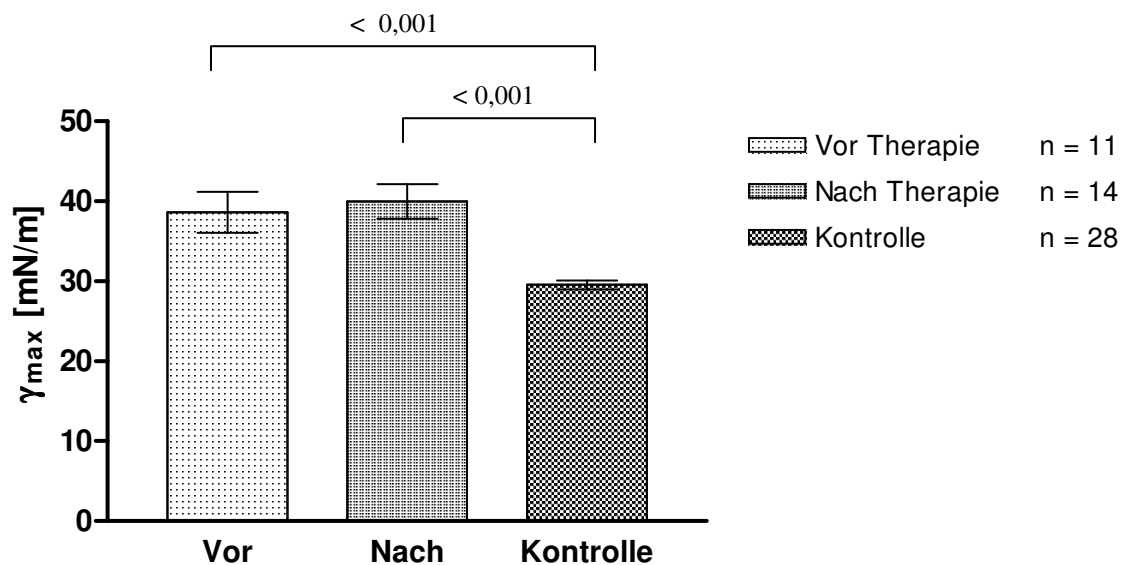
Eine wesentliche Aufgabe des Surfactant liegt in der Reduktion der alveolären Oberflächenspannung (OFS). Durch Messung der OFS an unterschiedlich gekrümmten Bläschen kann seine Funktionsfähigkeit eingeschätzt werden. Mit dem PBS existiert eine etablierte Messmethode, die annähernd physiologische Bedingungen simuliert. Für die Untersuchung der Surfactantfunktion standen allerdings weniger Patienten zur Verfügung.



**Abbildung 13:** Die Oberflächenspannung einer 0,40 mm großen Luftblase in der „große Aggregat-Fraktion“ aus der ultrazentrifugierten BAL von Patienten vor und einen Tag nach zytostatischer Chemotherapie und von gesunden Probanden (Kontrolle). Die Messung erfolgte im PBS nach einer 5minütigen Pulsationsfrequenz von 20/min. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Klammern bezeichnen das Signifikanzniveau.

In der Messung von  $\gamma_{\min}$  war die Oberflächenspannung in beiden Patientengruppen deutlich erhöht, aber mit  $p = 0,60$  nicht unterschiedlich. Der Gruppenmittelwert betrug für die Patienten vor Therapie  $15,39 \pm 2,19$  mN/m mit minimalen und maximalen Werten von 0,92 und 25,22 mN/m. Nach der Chemotherapie lag der Mittelwert bei  $13,60 \pm 2,27$  mN/m in einem Bereich zwischen 0,82 und 23,21 mN/m. Die Probanden wiesen mit  $2,02 \pm 0,37$  mN/m (enge Streubreite von 0,0 bis 7,9) eine normale Oberflächenspannung auf. Sie unterschied sich von den Patienten vor Therapie mit  $p < 0,0001$  und von den Patienten nach Therapie mit  $p < 0,0019$  (Abb. 13).

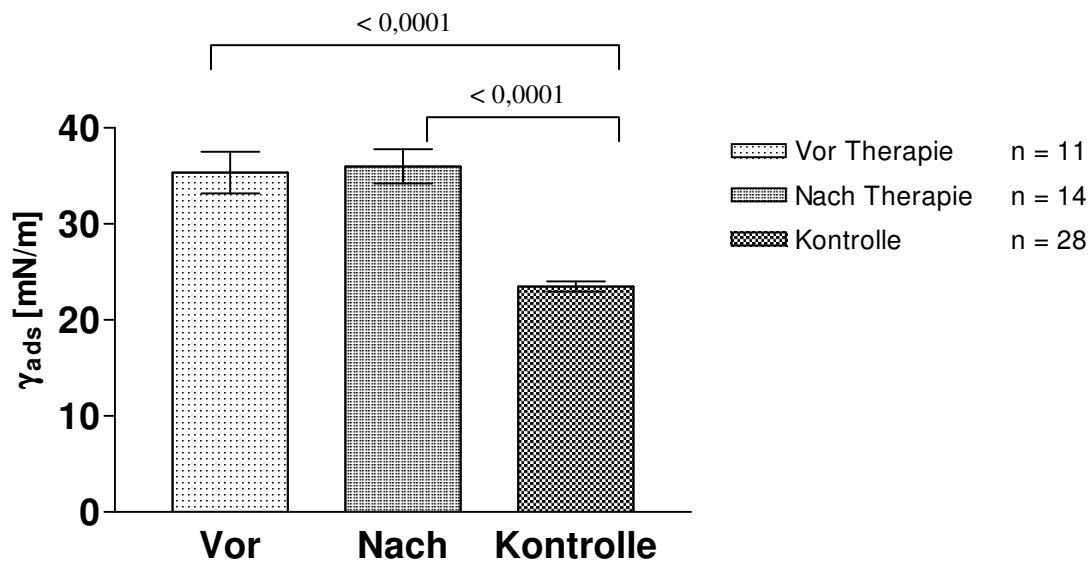
Bei der Ermittlung von  $\gamma_{\max}$  ließ sich, wie auch schon bei  $\gamma_{\min}$ , zwischen den Patientenkollektiven keine signifikante Differenz der Mittelwerte ableiten ( $p = 0,72$ ). Bei den Patienten vor Therapie betrug das arithmetische Mittel  $38,62 \pm 2,58$  mN/m (Streubreite zwischen 25,49 und 53,52 mN/m), bei den Patienten nach Therapie  $39,98 \pm 2,17$  (Streubreite 27,88 bis 51,69 mN/m). Die OFS beider Patientenkollektive lag dagegen hochsignifikant (jeweils  $p < 0,001$ ) über der OFS der gesunden Probanden, deren Mittelwert  $29,22 \pm 0,56$  mN/m (Spanne zwischen 15,99 und 31,83 mN/m) betrug (vgl. Abb. 14).



**Abbildung 14:** Die Oberflächenspannung einer 0,55 mm großen Luftblase in der „große Aggregat-Fraktion“ aus der ultrazentrifugierten BAL von Patienten vor und einen Tag nach zytostatischer Chemotherapie und von gesunden Probanden (Kontrolle). Die Messung erfolgte im PBS nach einer 5minütigen Pulsationsfrequenz von 20/min. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Klammern bezeichnen das Signifikanzniveau.

$\gamma_{\text{ads}}$  bezeichnet die OFS in einer Luftblase, die nach deren Bildung 10 Sekunden lang ohne induzierte Druck- oder Volumenänderung in der Trägerflüssigkeit der Probenkammer ruhte. In diesem Zeitraum adsorbierten Phospholipide an die Grenzschicht der Luftblase. Wiederum unterschieden sich die Mittelwerte der Patientenkollektive untereinander nicht signifikant ( $p = 0,68$ ). Im einzelnen betragen im Kollektiv vor Chemotherapie das arithmetische Mittel  $35,35 \pm 2,17$  mN/m, minimaler Wert 23,35 maximaler Wert 47,85. Nach Chemotherapie ließen sich  $35,99 \pm 1,79$  mN/m im Mittel, minimal 27,88, maximal 51,68 mN/m ermitteln (vgl. Abb. 15).

Die Probanden wiesen nach 10 Sekunden eine mittlere OFS von 23,48 mN/m auf bei einer Spannbreite zwischen 20,25 und 43,20 mN/m auf. Für den Mittelwert errechneten sich hochsignifikante Abweichungen zu beiden Patientengruppen von  $p < 0,0001$ .



**Abbildung 15:** Die Oberflächenspannung einer Luftblase nach 10 Sekunden statischer Adsorption in der „große Aggregat-Fraktion“ aus der ultrazentrifugierten BAL von Patienten vor und einen Tag nach zytostatischer Chemotherapie und von gesunden Probanden (Kontrolle). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Klammern bezeichnen das Signifikanzniveau.

### 3.4. Immunmodulation

Mit dem ersten Testansatz wurde der Frage nachgegangen, welchen Einfluss Surfactant von Tumorpatienten auf die LPS-induzierte Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  aus mononukleären Zellen hat, die aus dem Blut gesunder Spender gewonnen waren (peripheral blood mononuclear cells, PBMC). Dazu wurde ein Stimulationsindex aus der exprimierten Zytokinmenge der surfactant-inkubierten PBMC und der in lediglich einem neutralen Medium inkubierten PBMC errechnet.

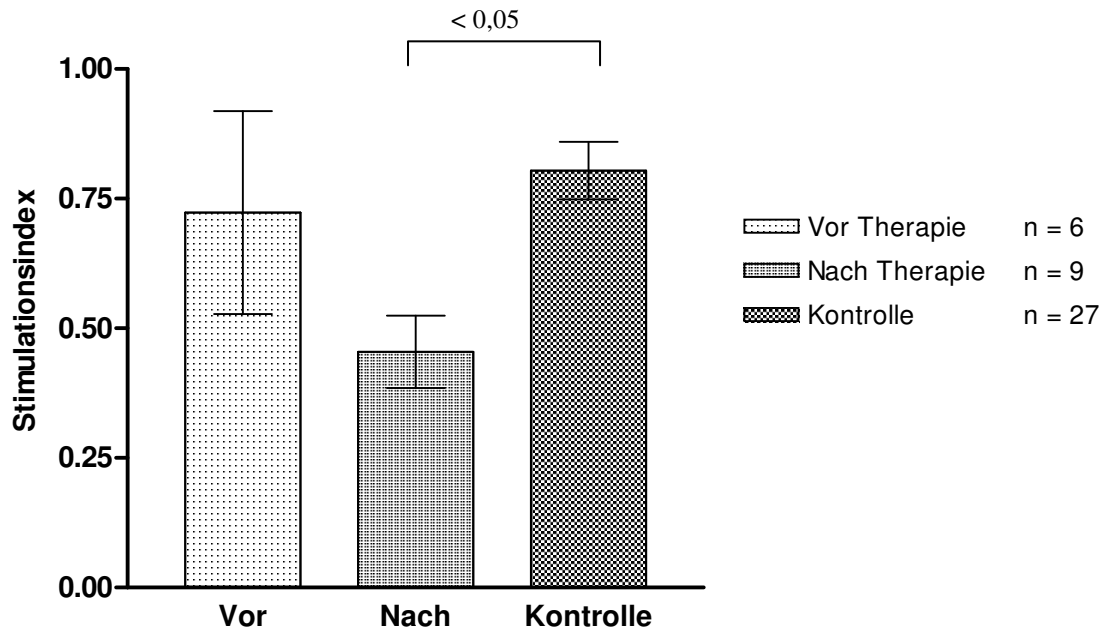
Das kleine Kollektiv von 6 Patienten vor Therapie wies einen breit gestreuten Stimulationsindex zwischen 0,34 und 1,64 mit einem Mittelwert von  $0,723 \pm 0,20$  auf. Eine deutlich geringere Streuung zeigte die etwas größere Gruppe von 9 Patienten nach Chemotherapie mit einem Index zwischen 0,17 und 0,80 bei einem Mittelwert von  $0,454 \pm 0,07$ . Die gesunden Probanden lagen im arithmetischen Mittel bei  $0,804 \pm 0,06$  innerhalb einer Spanne zwischen 0,36 und 1,63 (vgl. Abb. 16).

Die Betrachtung der Untergruppe der nativen NSCLC wies keinen Trend zu höheren  $\text{TNF}\alpha$ -Werten auf als für die SCLC, wie es eine frühere Arbeit an LPS-stimulierten Leukozyten gezeigt hatte (ohne Abb.) [51].

Die LPS-induzierte Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  erbrachte keinen Unterschied im Vergleich der beiden Patientenkollektive ( $p = 0,27$ ) und der Patienten vor Therapie mit dem

Kontrollkollektiv ( $p = 0,21$ ). Dagegen führte der aufbereitete Surfactant von Patienten nach Chemotherapie gegenüber den Probanden zu einer deutlichen Hemmung der TNF $\alpha$ -Freisetzung ( $p = 0,003$ ).

Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen allerdings die geringen Patientenzahlen und die teilweise breite Streuung beachtet werden.

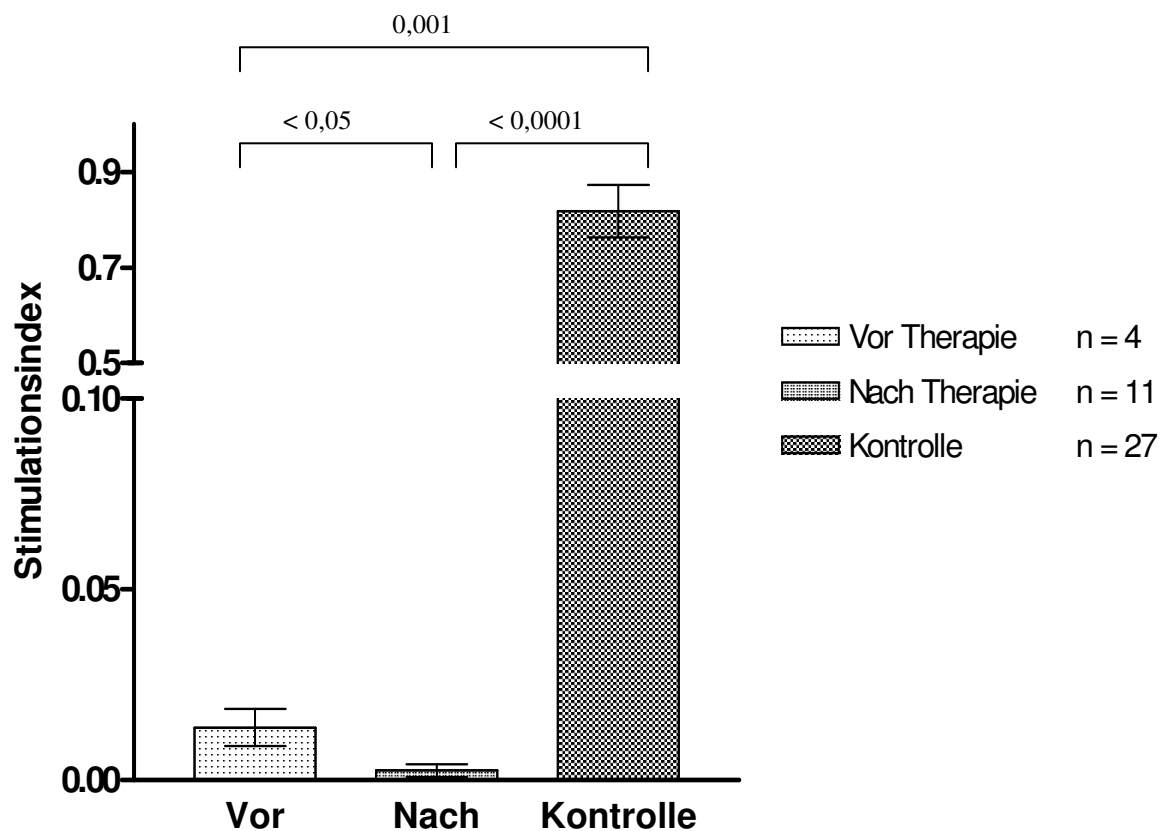


**Abbildung 16:** Freisetzung von TNF $\alpha$  aus PBMC (peripheral blood mononuclear cells) des peripheren Blutes von gesunden Spendern unter dem Einfluss von isoliertem Surfactant von Patienten mit Bronchialkarzinom vor und nach Chemotherapie und von gesunden Probanden (Kontrolle). Dargestellt ist der Gruppenmittelwert  $\pm$  SEM des jeweiligen Stimmulationsindex (Verhältnis von Surfactant-behandelten und Medium-behandelten PBMC). Die Klammern bezeichnen das Signifikanzniveau.

In einem zweiten Ansatz wurde untersucht, ob der aus den 3 Kollektiven isolierte Surfactant eine proliferationshemmende Wirkung auf die durch PHA (Phythämagglutinin) induzierte Proliferation von PBMC aufweist. Dazu wurde ein Stimmulationsindex aus dem Quotienten der Mitoserate der mit Surfactant und der mit neutralem Medium inkubierten PBMC errechnet.

Die Patienten vor und nach Chemotherapie unterschieden sich im Stimmulationsindex untereinander signifikant ( $p = 0,0158$ ). Die Fallzahl der erstgenannten Gruppe beträgt zwar nur  $n = 4$ , jedoch lagen die Werte bei einer Streuung von nur 0,005 eng um den Mittelwert von 0,0138 beieinander. Die 11 Patienten nach Therapie boten einen durchschnittlichen Stimmulationsindex von  $0,0248 \pm 0,0017$ . Der Minimalindex betrug 0,0001, der maximale Indexwert 0,0196 (vgl. Abb. 17).

Im Vergleich mit den Kontrollprobanden bestand für beide Kollektive eine hochsignifikante Hemmung der Proliferation:  $p = 0,0016$  bzw.  $p < 0,0001$ . Die Probanden wiesen im Mittel einen Index von  $0,8186 \pm 0,055$  bei einer Spanne zwischen 0,1000 und 1,2874 auf.



**Abbildung 17:** Phythämagglutinin(PHA)-induzierte Proliferation von PBMC (peripheral blood mononuclear cells) des peripheren Blutes von gesunden Spendern unter dem Einfluss von isoliertem Surfactant von Patienten mit Bronchialkarzinom vor und nach Chemotherapie und von gesunden Probanden (Kontrolle). Dargestellt ist der Gruppenmittelwert  $\pm$  SEM des jeweiligen Stimmulationsindex (= Quotient von Surfactant-behandelten und Medium-behandelten PBMC). Die Klammern bezeichnen das Signifikanzniveau.

## 4. Diskussion

### 4.1. Vorbemerkungen

In dieser Arbeit wurden Wirkungen einer definierten zytostatischen Polychemotherapie auf die zelluläre und lokale Abwehr im Alveolarraum und auf Zusammensetzung, Funktion und Immunmodulation des Surfactant untersucht. Zwei Patientenkollektive mit einem gesicherten Bronchialkarzinom, rekrutiert aus vier pneumologischen Zentren, wurden vor und nach Applikation der Chemotherapie mit gesunden Probanden verglichen. Das Konzept der vorliegenden Untersuchung basiert auf der klinischen Beobachtung, dass sich nach zytoreduktiven Chemotherapien verhältnismäßig wenige Infektionen im Bronchialsystem ereignen. Möglicherweise existiert ein lokales azelluläres Abwehrsystem wie das pulmonale Sufactantsystem, welches im Rahmen der zytoreduktiven Therapie eine protektive Abwehrfunktion aufweist.

Die BAL vor Chemotherapie erfolgte im Rahmen der tumordiagnostischen Bronchoskopie. Um lokale Einflüsse durch den Tumor selbst auszuschließen wie Einwirkungen auf die Aktivität der Alveolarmakrophagen [115], auf die Proteinzusammensetzung [174], auf die Zytologie [59] oder auf die Höhe des SP-A durch SP-A-Expression aus Adenokarzinomen [146], wurde in der tumorfreien Lungenhälfte lavagiert.

Die BAL nach Chemotherapie fand grundsätzlich am Folgetag eines Chemotherapie-Kurses statt. An diesem Zeitpunkt weit vor der erwarteten Knochenmarkdepression konnte eine möglichst geringe Infektionsgefährdung der Patienten durch die Bronchoskopie selbst gewährleistet werden.

Die Chemotherapie nach dem ACO-Protokoll eignet sich gut zu Untersuchungen, die einen direkten Einfluss der Chemotherapie evaluieren wollen. Sie wird, anders als andere Regimes, an nur einem Tag in einem engen Zeitrahmen appliziert, vergleichbar mit einer Bolusgabe. Die Medikamentenspiegel sind nicht abhängig von der intestinalen Resorption.

### 4.2. Recovery

Die Rückgewinnungsrate der BAL-Flüssigkeit (Recovery) bei den gesunden Probanden lag mit fast 79 % über den von verschiedenen Arbeitsgruppen angegebenen durchschnittlichen Rückgewinnungsraten (Ettensohn u. a.: 63 %, [68], Deutsche Gesellschaft für Pneumologie: 50 - 60 % [53], Costabel: etwa 75 % in Mittellappen und Lingula [45]).

Die Rückgewinnung in den beiden Patientenkollektiven betrug 48 % und 45 %. Diese Differenz war nicht signifikant. Die im Vergleich zu den Probanden hochsignifikant niedrigere Recovery (jeweils  $p < 0,0001$ ) lässt sich durch pulmonale Begleiterkrankungen erklären. So litten die überwiegende Anzahl der Patienten an Erkrankungen wie Emphysem, chronisch-obstruktiver Bronchitis oder chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung und wiesen pathologische Lungenfunktionswerte auf (vgl. Kap 2.1. Tab. 5). Bronchiale Obstruktion und Lungenüberblähung vermindern die Rückgewinnungsrate [194], so dass sie unter 30 % betragen kann [45]. Alle Patienten waren Raucher oder Ex-Raucher und wiesen ein höheres Lebensalter auf. Bei Rauchern und bei älteren Menschen haben einige Arbeitsgruppen ebenfalls eine Verringerung der Recovery ausgewiesen [33,194,229], andere hingegen fanden die Rückgewinnung nicht vermindert [111,206].

Trotz dieser patientenbedingten Einschränkungen wurde das empfohlene Mindestvolumen von 25 ml Recovery [43] nur bei einem Patienten mit einer Rückgewinnung von 20 ml unterschritten.

### 4.3. Zytologie

Die Gesamtzellzahlen wiesen in unseren Kollektiven eine hohe Variabilität auf. Die beiden höchsten Zellzahlen der lungengesunden, nichtrauchenden Probanden lagen mit 311 bzw.  $300/\mu\text{l}$  ( $25,2$  bzw.  $21,0 \times 10^6$ ) sogar oberhalb der in der Literatur beschriebenen Werte. Die höchsten Patientenwerte mit 435 bzw.  $388/\mu\text{l}$  ( $20,2$  bzw.  $32,6 \times 10^6$ ) waren Rauchern zuzuordnen. Die niedrigste Zellzahl vor Chemotherapie lag bei  $8/\mu\text{l}$  bzw.  $0,3 \times 10^6$ .

In der Differenzialzytologie wiesen die Patienten vor Therapiebeginn (ältere Patienten, Raucher oder Ex-Raucher) gegenüber den Probanden (geringeres Alter, Nichtraucher) eine signifikant höhere absolute und anteilige Zahl von Lymphozyten auf, während sich Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten dagegen nicht unterschieden.

Derartige Schwankungsbreiten in der Gesamtzellzahl sind nicht ungewöhnlich. Bei Ettensohn und Mitarbeitern betrug die Zellzahl bei 78 gesunden Probanden  $0,7 - 23 \times 10^6$  bzw.  $4 - 267/\mu\text{l}$  [68]. In Querschnittuntersuchungen der gleichen Autoren mit bis zu 5 BAL je Proband wies die intraindividuelle Zellzahl eine beträchtliche Variabilität bis zum Faktor 4 auf [69]. Costabel nannte für gesunde Nichtraucher einen Normwert bis  $13 \times 10^6$ . Bei sonst gesunden Rauchern kann die Gesamtzellzahl bis zum 4fachen höher liegen als bei Nichtrauchern. Als Ursache gibt er eine erhöhte Anzahl von Alveolarmakrophagen an [43].

Es besteht eine eindeutige positive Korrelation zwischen Recovery und Gesamtzellzahl [68]. Wegen der niedrigeren Rückgewinnungsraten in den Patientenkollektiven muss deshalb dem

Parameter „Zellzahl/ $\mu$ l zurückgewonnener BAL“ mehr Bedeutung beigemessen werden als der absoluten Zellzahl. Hierin unterschieden sich die Patienten vor Therapie nicht von den Probanden.

Der Einfluss des Rauchens auf die Differenzialzytologie wird nicht einheitlich beurteilt. Neben den absolut erhöhten Makrophagen entsprechen bei Costabel der prozentuale Anteil von Neutrophilen, Eosinophilen und Lymphozyten denen der Nichtraucher [43]. Andere Untersucher berichteten bei Rauchern von einer normalen [204] oder sogar verminderten [59] Anzahl an Alveolarmakrophagen oder von einem Anstieg der Lymphozyten-, Neutrophilen- und Eosinophilenzahl [43,156].

In zwei kleinen Studien waren bei alten Menschen eine erhöhte Neutrophilenzahl bzw. eine erhöhte Gesamtzellzahl beschrieben worden [125,229]. Bei Ratten hatte eine Arbeitsgruppe um Pabst nach Lipopeptid-Stimulation unterschiedliche Leukozytenzahlen in Abhängigkeit vom Lebensalter der Tiere nachgewiesen [151]. Dagegen haben laut Pokieser et al. die Parameter Alter und Geschlecht keinen Einfluss auf die Verteilung der Zellen in der humanen BAL [188]. Auch Etensohn u. a. fanden in einem größeren Kollektiv keine Abhängigkeit der Differenzialzytologie von Lebensalter, Geschlecht, Körperlänge oder Rasse [68]. Deshalb wurde in dieser Arbeit den Unterschieden zwischen Patienten und Probanden insbesondere bei Alter und Geschlecht keine Bedeutung beigemessen.

Ob Lidocain einen Einfluss auf die Zellpopulationen besitzt, haben Baser et al. untersucht. Die direkte Zugabe von 216 - 342 mg Lidocain zu 100 ml rückgewonnener BAL und eine Lidocain-Expositionszeit von über 25 Minuten führten zu einem geringen Anstieg der Gesamtzellzahl und einem zeitabhängigen Verlust der in vitro-Lebensfähigkeit von Monozyten. In vivo bestand allerdings kein eindeutiger Unterschied [14]. Anhand dieser Daten bleibt ein Lidocain-Einfluss für die hier untersuchten Patienten und Probanden bei einer verwendeten Dosis von maximal 190 mg unbedeutend, zumal die erste aspirierte Portion der Lavage, in der sich noch Beimengungen des Lokalanästhetikums befunden hätten, verworfen wurde.

Bezogen auf die rückgewonnene BAL-Menge waren bei Patienten einen Tag nach Chemotherapie eine signifikant höhere Anzahl von Zellen im Alveolarraum nachzuweisen als bei Patienten vor Therapiebeginn. Die höhere Zellzahl beruhte fast ausschließlich auf einer Zunahme der Makrophagen. Die Anzahl der Lymphozyten und Neutrophilen war ebenfalls größer, ihr relativer Anteil aber niedriger. Die Differenz von 117 gegenüber 165/ $\mu$ l bei den Makrophagen war, wohl wegen der breiten Streuung der Messwerte, nur knapp nicht

signifikant. Eine ähnliche Zellkonstellation mit mildem Anstieg der Gesamtzellzahl und der Makrophagen beschreiben Arai und Shirai nach COP-BLAM-Therapien (Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison, Bleomycin, Adriamycin, Procarbazin) von B-Zell-Lymphomen [5].

Für die Neutrophilen ließ sich die Differenz von 1,7 gegenüber 2,2/ $\mu$ l zwar statistisch absichern. Sie ist jedoch in dieser Größe als unbedeutend zu werten, zumal ihr prozentualer Anteil sogar sank.

Die Makrophagen stellten jeweils einen Anteil von mehr als 94 % der alveolären Zellen und unterschieden sich in ihrem Anteil bei den drei Kollektiven nicht. Deshalb kommt für die höhere Zellzahl nach der Therapie keine chemotherapie-induzierte Alveolitis in Betracht. Die manifeste alveoläre Schädigung durch Zytostatika ist durch eine lymphozytäre oder eine gemischte lymphozytär-neutrophile Alveolitis charakterisiert [1], selbst bei klinisch asymptomatischen Patienten [21]. Beide Patientenkollektive beinhalteten eine nahezu identische Anzahl von Rauchern und Ex-Rauchern, so dass auch der Raucherstatus keine Erklärung für die höhere Zellzahl bietet.

Wie später noch ausgeführt, fand sich nach der Chemotherapie ein erhöhtes Gesamtprotein. Eine mögliche Ursache für die höhere Zellzahl könnte deshalb in einer gestörten kapillären Barriere mit Zell- und Eiweißestrom liegen. In Kap. 4.5. wird auf die mögliche Schädigung der alveolo-kapillären Grenzschicht näher eingegangen.

Die bisherigen Erkenntnisse zu Veränderungen der Alveolarzytologie beruhen auf broncho-alveolären Lavagen wenige Wochen nach den Chemotherapiekursen, die sowohl von stabilen als auch ansteigenden und abfallenden Zellzahlen berichteten. 3 Wochen nach dem 2. Kurs einer Chemotherapie mit ACO und Etoposid bei 17 SCLC (davon 12 gematcht) beschrieben Hosker und Koautoren einen Abfall der Gesamtzellzahl bei unveränderter Differenzial-Verteilung [116]. Zum gleichen Resultat gelangten Rossi und Mitarbeiter nach MACC-Chemotherapien (Melphalan, Methotrexat, Cyclophosphamid, Doxorubicin) in 8 gepaarten Patienten mit Bronchialkarzinom [200]. Capelli et al. hatten Ergebnisse zu 6 Patienten mit Bronchialkarzinom publiziert, deren Zellzahl und zelluläre Zusammensetzung einen Monat nach Abschluss einer Chemotherapie ohne signifikante Veränderung zu 31 anderen Patienten vor Therapie geblieben waren [29]. Eine Studie zeitnah nach Chemotherapie stammt von Cooper und Mitarbeitern. Sie konnten in der BAL von Rattenlungen aufzeigen, dass schon 16 Stunden nach intraperitonealer Injektion von Cyclophosphamid unreife Makrophagen in den Alveolarraum einströmten und sich der prozentuale Anteil der Lymphozyten verminderte [42]. Dagegen demonstrierten Santosousso u. a. ebenfalls an Ratten nach s.c.-Applikation von

Cyclophosphamid ab Tag 4 eine Verminderung der Alveolarmakrophagen in der BAL, die sich nach weiteren Zytostatikagaben verstärkte [203].

#### **4.4. Einflüsse von Geschlecht, Alter und Narkosebronchoskopie**

Für SP-A im Serum wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen gefunden [173a]. Über SP-A in der BAL sind keine vergleichenden Untersuchungen zu einem Geschlechterunterschied veröffentlicht. Deshalb kann im Einklang mit den Daten der Literatur davon ausgegangen werden, dass die Überzahl an männlichen Probanden und Patienten die Ergebnisse dieser Studie nicht beeinflusst hat.

Bezüglich des SP-A fanden Lesur und Mitarbeiter an Probanden einer weiten Altersspanne keinen Einfluss des Lebensalters auf den SP-A-Gehalt in der BAL [141], ebenso Betsuyaku et al. [20a]. Die letztere Arbeitsgruppe beschrieb zudem ein niedrigeres SP-A bei Rauchern mit einem gesicherten Emphysem in mittlerem und höherem Alter gegenüber jüngeren Rauchern und Nichtrauchern. In dieser Arbeit dagegen liegen die SP-A-Werte beider Patientengruppen nicht unter denen der Probanden. Alle Patienten dieser Studie weisen ein mittleres und höheres Alter auf, so dass der bei Betsuyaku et al. aufgezeigte Unterschied für die Altersgruppen für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit nur eine untergeordnete Rolle spielen dürfte.

In der postnatal reifenden Lunge und bei bis zu 8jährigen Kindern sind Unterschiede im Gehalt von Surfactantproteinen und in der Konzentration und der biologischen Wirksamkeit von PL gegenüber Erwachsenen beschrieben [19a,119a,191a]. Dagegen gibt es für gesunde Erwachsene zu einer Abhängigkeit der PL oder der Surfactantfunktion von Alter oder Geschlecht keine Untersuchungen. Ihnen kommt auch in der Übersichtsliteratur keine Bedeutung zu. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Unterschiede in Alter und Geschlecht zwischen den Kollektiven der Probanden und der Patienten in dieser Arbeit unberücksichtigt bleiben können.

Von den drei Patienten, die in dieser Studie eine Allgemeinnarkose erhalten hatten, wiesen zwei mit 30 ml und 42 ml eine etwas niedrigere BAL-Ausbeute im Vergleich zum Gruppenmittelwert von 48 ml auf. Die Zahl der Neutrophilen und der Gesamtzellen bewegte sich innerhalb der gewohnten Schwankungsbreite.

Die wenigen Daten über einen Vergleich von Allgemeinnarkose gegenüber Lokalanästhesie ergeben kein einheitliches Bild. Kuylenstierna u. a. [136] beschrieben in der BAL von 9 Patienten in Allgemeinnarkose die Zelldifferenzierung und das Albumin/Serumalbumin-Verhältnis als nicht different von 16 gesunden Probanden in lokaler Anästhesie. Gesamtzellzahl und Recovery waren jedoch erniedrigt. Die Arbeitsgruppe um de Blasio [53] bestätigte eine geringere BAL-Recovery in Allgemeinnarkose, bestimmte jedoch höhere Neutrophilenzahlen. Einen höheren Neutrophilenanteil sowie eine erhöhte Gesamtzellzahl fanden Eliraz et al. [64] in der BAL von 26 lungengesunden Patienten eine Stunde nach Beatmungsbeginn verglichen mit dem Zeitpunkt direkt nach der Intubation.

#### **4.5. Gesamtprotein**

Klech gab den Gehalt bei Normalpersonen bei ungefähr 70 mg/l an [130]. Andere Autoren nannten, in Abhängigkeit von der Untersuchungsmethode, höhere Werte um 90 mg/l [85,156,210]. Der mittlere Proteingehalt der BAL vor Chemotherapie war mit dem der Probanden nahezu identisch und lag mit etwa 112 mg/l gering über dem Bereich der oben genannten Studien. Die weiten Spannen der Messwerte sind nicht ungewöhnlich. Auffällig war dagegen die Höhe des mittleren Proteingehaltes von 171 mg/l nach der Chemotherapie im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Dieser Befund könnte als Schädigung der alveolo-kapillären Grenze gewertet werden. Einen Proteinanstieg von 150 auf 290 mg/l fand auch die Arbeitsgruppe um Capelli und Vellutti einen Monat nach Abschluß der Chemotherapie von 6 Bronchialkarzinomen und bezeichnete zytotoxische Schäden der alveolo-kapillären Barriere als wahrscheinliche Ursache [29]. Auch Cooper und Koautoren berichteten von einem Albuminanstieg nach niedrig dosierter intraperitonealer Gabe von Cyclophosphamid bei Ratten und werteten das Ergebnis als Ausdruck einer Lungenschädigung [42].

Dagegen waren Hosker u. Mitarbeiter zu anderen Resultaten gelangt. Bei Patienten mit einem Bronchialkarzinom war der Gehalt an Protein vor dem 3. ACO-Kurs unverändert zum Ausgangswert geblieben [116]. Auch Bhalla u. a. fanden bei 9 Patienten nach 4 Kursen einer CAF-Induktionstherapie (Cyclophosphamid, Adriamycin, 5-FU) keinen Proteinanstieg im Vergleich zu Gesunden [21].

Eine Schädigung der alveolo-kapillären Grenzschicht durch Rauchen hatten Arbeitsgruppen um Mancini und Schmekel verneint [156,206].

Möglicherweise reflektiert die Proteinzunahme nur eine akute, kurzfristige Reaktion der alveolo-kapillären Membran oder eine Pneumozytendysfunktion auf die toxische Chemotherapie. Diesbezüglich besteht zukünftig noch Klärungsbedarf.

#### 4.6. SP-A

Das interessanteste Ergebnis im Sinne der aufgestellten Hypothese war eine Erhöhung des Surfactantprotein-A bei den Patienten nach Chemotherapie. Während sich die Werte vor Therapie nicht von denen der Probanden unterschieden, lag die Konzentration des Kollektins einen Tag nach der zytostatischen Therapie signifikant höher ( $p = 0,0096$ ).

Untersuchungen zum Gehalt von Surfactantprotein-A in der BAL von Tumorpatienten sind rar. Lediglich eine Arbeitsgruppe um Halme hatte das SP-A bei 16 Patienten mit SCLC, die zuvor einen lokalen Progress nach Chemotherapie aufwiesen, vor Einleitung der Tumorbestrahlung bestimmt. Dabei waren hohe SP-A-Spiegel mit einem hohen Ausmaß an Schäden nach der folgenden Strahlentherapie behaftet, so dass die Autoren die Rolle des SP-A als Prädiktionswert für die Entwicklung von strahleninduzierten Lungenschäden diskutierten [95]. Griese und Mitarbeiter berichteten über 24 Kinder mit unterschiedlichen Tumoren, deren SP-A-Gehalt in der BAL auf das 4fache erhöht war. Allerdings waren die Kinder immunsupprimiert, hatten Lungenverschattungen und Fieber [86]. Darüber hinaus kann lediglich auf zwei tierexperimentelle Studien verwiesen werden, in denen Chemotherapeutika zur Fibroseinduktion benutzt wurden. Nach intratrachealer Bleomycininstillation veränderten sich an Tag 4, 21 und 28 nur die Phospholipide, nicht die Konzentrationen von Surfactantprotein-A [112]. SP-A und Bleomycin steigerten synergistisch die Freisetzung proentzündlicher Zytokine aus Makrophagen-Zelllinien [117]. Diese Ergebnisse sind allerdings für Vergleiche nur bedingt geeignet, weil es sich um experimentelle Modelle im Zusammenhang mit der Induktion einer Lungenfibrose handelte.

Beide Patienten-Kollektive waren bezüglich Alter, Geschlecht und Raucherstatus miteinander vergleichbar, so dass der Unterschied nicht auf diese Merkmale zurückzuführen sein dürfte. Die Gruppen waren mit 21 bzw. 16 Patienten zwar nur klein. Nahezu alle in dieser Arbeit zitierten Studien wiesen aber ähnliche oder niedrigere Teilnehmerzahlen auf. Es bleibt jedoch ungeklärt, ob und inwieweit das Ergebnis durch das Studiendesign beeinflusst war, was für die Konzeption künftiger Studien beachtet werden muss.

Im Einklang mit den Ergebnissen von Hamm et al. sowie Lesur et al. [97,141] wichen die SP-A-Werte der Raucher und Ex-Raucher vor Therapie nicht ab von denen der nicht-rauchenden Probanden. Sie waren nicht erniedrigt, wie es von anderen Arbeitsgruppen für Raucher berichtet worden war [16,20a,111,215a]. Auf eine weitergehende vergleichende Bewertung der SP-A-Konzentration der Probanden mit den Patienten über die aufgezeigte

Plausibilität der Messwerte hinaus wird wegen fehlender gematchter Gruppen bei den Parametern Rauchen, Alter und Geschlecht verzichtet.

Es ist denkbar, dass eine Erhöhung des SP-A-Gehaltes nach Chemotherapie einen erhöhten Schutz vor pulmonalen Infektionen durch verstärkte Opsonierung, Neutralisierung von Bakterien sowie Aggregatbildung und Antigen-Präsentation, sogar durch eine antikörperartige Funktion, bieten könnte.

Zahlreiche Mikroorganismen, die eine Pneumonie auslösen, werden durch SP-A in ihrer Aktivität beeinflusst. So wurde *Mycoplasma pneumoniae* über die Affinität von SP-A zu deren Lipidliganden gehemmt [35]. SP-A stimuliert die Phagozytose von *Streptococcus pneumoniae* durch Alveolarmakrophagen. [230]. Das Respiratory syncytial virus verlor durch Bindung an SP-A seine Infektiosität, SP-A verbesserte seine Phagozytose durch Alveolarmakrophagen [82,142]. Es neutralisierte das Influenza A-Virus durch Bindung des CRD an Virusprotein [18]. Für *Staphylococcus aureus* wirkte es als Opsonin [157], ebenso für Herpes simplex Typ I [238]. Auch für *Haemophilus influenzae* Typ I agierte SP-A als Opsonin und förderte dessen Aggregation [162]. Es bewirkte durch Bindung an bakterielle LPS eine raschere Elimination von *E. coli* [220]. Erstmals wurde auch über eine direkte antibakterielle Aktivität, ähnlich Antikörpern, gegen *E. coli* berichtet [254].

SP-A-defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte Empfänglichkeit für Infektionen mit B-Streptokokken [144], *Pneumocystis carinii* [145] und *Pseudomonas aeruginosa* [143]. SP-A band an *Pseudomonas aeruginosa* und *Cryptococcus neoformans*, allerdings ohne Opsonineffekt [27,242]. Alveolarmakrophagen in transplantierten Lungen wurden durch Zugabe von SP-A zur Phagozytose und Produktion von Stickstoffradikalen stimuliert, so dass sie *Klebsiella pneumoniae* verstärkt eliminierten [105]. Eine Übersicht über die Interaktionen des SP-A mit pathogenen Organismen geben van Golde [234] und Crouch und Wright [49].

Neben direkten Wirkungen auf Erreger entfaltet SP-A zahlreiche zelluläre Effekte im Wirt. Es bewirkte die Bildung toxischer Sauerstoffradikale aus Makrophagen („respiratory burst“), um eine Phagozytose einleiten [234]. Es inhibierte direkt die Proliferation von CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten [24]. Die Expression proinflammatorischer Zytokine wie INF $\gamma$  oder Interleukin-2 aus Lymphozyten wurde durch SP-A gehemmt, unter bestimmten Bedingungen jedoch auch gesteigert [134, Review in 48,249]. Die Freisetzung von NO aus Makrophagen wurde, je nach deren Vorstimulation, gesteigert oder gehemmt [219]. Gegenteilige Effekte

übte es auch auf TNF $\alpha$  aus, dessen Liberation durch SP-A unterdrückt wurde [161,198], aber auch heraufreguliert werden konnte [132,133]. Haagsman und Wright et al. hielten die jeweilige Wirkung für abhängig von Faktoren wie Art und Aktivierungsstatus der Effektorzellen, Art und Menge des Pathogens oder aktueller Struktur des Surfactantproteins [92,251].

Zu den sowohl proinflammatorischen als auch antiinflammatorischen Immunantworten des SP-A wird gegenwärtig die Meinung vertreten, dass SP-A als „first line-defense“ die lokale Abwehr über das Makophagen-Monozytensystem heraufregulieren soll. Wenn sich jedoch schon eine Entzündung im Alveolarraum ausgebildet hat, hemmt SP-A die proentzündlichen Zytokine und somit einen Granulozyten- und Lymphozyteneinstrom, um die empfindliche Balance im Alveolarsystem nicht durch exzessive und destruierende Entzündungsreaktionen zu schädigen [92,233,251]. Die gegenseitige Beeinflussung von Signalstoffen und SP-A sowie der Ablauf der Aktivierungskaskaden sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Bezüglich der Entzündungsmodulation erzielte SP-A noch auf weitere humane Abwehrsysteme Effekte, die von Interesse sind. In Untersuchungen von Watford u. a. schien es die C1q-vermittelte Komplementaktivierung zu behindern und damit die Initiation einer Entzündungskaskade zu erschweren [243]. Es verstärkte die Aufnahme apoptotischer Granulozyten in Alveolarmakrophagen und trug damit zur Auflösung einer Entzündung bei [193]. Mit Pneumozyten II interagiert es über einen Oberflächenrezeptor und beeinflusste so direkt die Surfactant-Expression [32,222]. Darüber hinaus setzte SP-A über seinen auf Pneumozyten exprimierten Rezeptor SPAR eine Signalkaskade in Gang, die letztlich Typ II-Pneumozyten vor Apoptose schützte. Das könnte nach Meinung von White und Strayer die bekannte hohe Widerstandsfähigkeit gegen Verletzungen und die gute Re-Epithelialisierung geschädigter Alveolen erklären [245]. In diesem Zusammenhang sind auch die Beobachtungen der Arbeitsgruppe um McCormack bedeutsam, die bei einer SP-A-Überexpression eine verminderte Anfälligkeit des Surfactant gegenüber Inaktivierung durch Proteine feststellte [63].

Unsere Befunde eines erhöhten SP-A-Gehaltes direkt nach der zytostatischen Behandlung von Bronchialkarzinomen unterstützen die Hypothese einer Heraufregulation eines lokalen Abwehrsystems. Die Elimination pathogener Organismen und apoptotischer Zellen könnte beschleunigt werden. Suppression der Zytokinausschüttung, verminderte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, Hemmung der Komplementkaskade und Lymphozytensuppression könnten

unerwünschte überschießende Entzündungsreaktionen vermindern. Gerade auch ein möglicher Schutz von Pneumozyten II durch SP-A kann im Rahmen der zytostatischen Chemotherapie bedeutsam sein. Ob sich der Anstieg des SP-A auf einen engen Zeitraum direkt nach der Chemotherapie beschränkt oder länger andauert, bedarf weiterer Untersuchungen. Halme u. a. hatten bei einigen ihrer chemotherapeutisch und z. T. mit INF $\gamma$  behandelten Karzinompatienten wenige Monate später ein erhöhtes SP-A gefunden [95].

Völlig unklar bleibt derzeit, über welchen Mechanismus die mutmaßliche Heraufregulation des SP-A nach der zytostatischen Chemotherapie erreicht wurde.

Es könnte sich um eine kompensatorische Sekretion aus noch intakten Pneumozyten handeln. Denkbar wäre auch eine vermehrte SP-A-Liberation aus destruierten Pneumozyten. Möglicherweise verlangsamen defiziente Pneumozyten den Prozess der SP-A-Degradierung bzw. der SP-A-Wiederaufnahme. Ob Funktionseinbußen durch strukturelle Veränderungen der Pneumozyten II eine Rolle spielen, könnte elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Dass bei unspezifischen akuten Lungenschäden die SP-A-Konzentration ansteigt, hatte schon Crouch aufgezeigt [47]. Glucocorticoide erhöhen die Expression aller Surfactantproteine [87]. Deshalb ist es denkbar, dass die Erhöhung von SP-A im Kollektiv nach der zytostatischen Therapie mit beeinflusst wurde durch die Begleitmedikation, die für jeden Patienten einmalig 100 mg Prednisolon am Tag vor der Zytostase umfasste. In diesem Fall würde das sonst immunsuppressive Steroid einen günstigen Effekt auf die lokale Abwehr ausüben.

Von weiterer Bedeutung für das Verständnis von alveolärer Abwehr und Infektion wären Kenntnisse über Kollektine und Zytokine im Nadir einer Knochenmarkdepression 7 - 10 Tage nach Chemotherapie. Das erhöhte Infektionsrisiko dürfte der Durchführbarkeit einer Bronchoskopie zu wissenschaftlichen Zwecken während der zytostatischen Behandlung jedoch enge Grenzen setzen.

#### **4.7. Phospholipide und Surfactantfunktion**

Die originäre Funktion der Phospholipide (PL) besteht in der Reduktion der Oberflächenspannung (OFS) im terminalen Bronchialsystem. Hierzu ist neben einer ausreichenden Menge an PL das Verhältnis von oberflächenaktiven „großen Aggregate“ (LA) zu wenig aktiven „kleinen Aggregaten“ (LA) von entscheidender Bedeutung.

Während die Probanden die erwarteten normalen Werte aufwiesen, zeigten sich bei den Tumorpatienten schwerwiegende Störungen. Die Menge an PL war in beiden Kollektiven signifikant unter den Wert Gesunder erniedrigt [85]. Der Phospholipid-Abfall ging besonders zu Lasten der aktiven „großen Aggregate“. Bei Vergleich mit den Probanden waren die LA nicht nur in ihrer Menge hochsignifikant vermindert. Zusätzlich bestand ein gestörtes Verhältnis von SA und LA zu Ungunsten der oberflächenaktiven Formen, was für eine vermehrte metabolische Konversion der LA zu den SA spricht. Überraschend betrafen die Veränderungen beide Patientenkollektive. Ebenso überraschend wiesen die Patienten vor Therapie durchweg die ungünstigsten Werte für sämtliche Lipid-Parameter auf, was sich für die PL und für SA/LA sogar in signifikanten Differenzen gegenüber dem therapierten Kollektiv niederschlug. Die Gegenüberstellung der LA blieb nur knapp unterhalb des Signifikanzniveaus.

Eine inflammatorisch bedingte Konversion der Surfactantaggregate mit konsekutiver Surfactantdysfunktion, wie sie für eine Reihe von Lungenerkrankungen mit einhergehender Entzündungsreaktion beschrieben wurde, ist nicht anzunehmen [Übersichten bei 85 und 90]. So fanden sich bezüglich der zellulären BAL-Zusammensetzung keine Hinweise für eine Entzündung. Als weitere mögliche Ursache kommt Rauchen in Betracht, denn Tabakrauchpartikel schädigen die Surfactantfunktion direkt [107] und bewirken zudem eine stark verlangsamte alveoläre Clearance [165]. Wenigstens 34 der 37 Patienten hatten Tabakkonsum angegeben (9/9 Raucher/Ex-Raucher in einem, 8/8 im anderen Kollektiv). Ein Einfluss des Rauchens auf die Unterschiede in den Lipidparametern beider Patientengruppen ist deshalb nicht anzunehmen. Die Surfactantergebnisse früherer Studien sind nicht einheitlich. Bei Rauchern wurden die Phospholipide teils als gering erhöht [110], als erniedrigt [71,149,152], aber auch als in etwa unverändert im Vergleich zu Nichtrauchern gefunden [111,156,223], es bestand jedoch zumeist eine eingeschränkte Oberflächenaktivität [98,110,223]. Von den Phospholipid-Subgruppen zeigten einige Untersuchungen das Phosphatidylcholin unverändert [156], andere erniedrigt [223], wobei eine erhöhte Oberflächenspannung gemessen wurde [206].

Die Lipidergebnisse passen gut zu der hier ebenfalls gezeigten Surfactantdysfunktion der Patienten. Sowohl bei minimaler als auch bei maximaler Ausdehnung der Luftblase im PBS erwies sich die OFS bei den Tumorpatienten gegenüber den Probanden als hochsignifikant erhöht. Eine besonders auffällige Diskrepanz boten die Messwerte der Luftblase bei kleinem Durchmesser. Während sie sich bei den Probanden um 2 mN/m bewegten, betrug die OFS bei

den Patienten etwa das 7fache. Bei maximalem Durchmesser machte die Differenz etwa 25 % aus.

Aufgrund des Verlustes an Oberflächenaktivität muss für die untersuchten Tumorpatienten insbesondere endexpiratorisch, aber auch endinspiratorisch, eine erhöhte Kollapsneigung der Alveolen und eine erhöhte Atemarbeit angenommen werden. Die Funktionseinschränkung betraf ebenso die Adsorption der Lipide bei einer 10 Sekunden lang still stehenden Luftblase, so dass auch bei annähernd statischer Ventilation in Atemmittellage mit einer verstärkten Kollapsneigung der Alveolen gerechnet werden muss. Im Gegensatz zum Lipidstatus unterschied sich die Surfactantfunktion beider Patientenkollektive nicht.

Die bisher publizierten Phospholipiddaten bei Bronchialkarzinom gehen lediglich auf PL-Subgruppen ein. Nach zytostatischer Chemotherapie mit MACC hatten Rossi et al. bei 8 gepaarten Patienten nach Therapie eines Bronchialkarzinoms erniedrigte Werte für Phosphatidylcholin (PC) und erhöhte Werte für Phosphatidylglycerol (PG) gemessen. Vor der Zytostasegabe hatten beide Lipide den Normwerten von Kontrollpersonen entsprochen [200]. Dagegen erwies sich das Phosphatidylcholin bei 22 Rauchern mit Plattenepithel-Bronchialkarzinom in der Untersuchung von Arias-Diaz und Mitarbeitern als erniedrigt im Vergleich zu 8 Rauchern ohne Karzinom [6]. Eine Chemotherapie dieser Patienten war nicht erfolgt. Darüber hinaus waren Phospholipide einschließlich ihrer funktionellen Subgruppen und deren Einflüsse auf die Oberflächenspannung beim karzinomerkrankten Menschen bisher nicht systematisch untersucht worden. Die wenigen tierexperimentellen Studien beschäftigten sich ausschließlich mit der tracheobronchialen Applikation von Bleomycin zur Fibroseinduktion [112,140,148,176]. Sie sind aufgrund des starken lokalen Entzündungsreizes nicht geeignet für Vergleiche mit i.v.-Zytostatika zur Tumorthherapie.

Ein erhöhter Gehalt an Proteinen, wie er in den Proben nach Therapie gemessen wurde, ist in der Lage, die Konversion von LA in SA zu beschleunigen [232] und die Surfactantfunktion zu behindern [215]. Wahrscheinlich spielt die Proteininhibition hier aber nur eine untergeordnete Rolle, denn im Kollektiv vor Therapie, in dem die schwersten Surfactant-Beeinträchtigungen für PL, LA und SA/LA detektiert worden waren, entsprach das Protein den Normwerten der Probanden.

Bei der COPD wurden die PL als stark erniedrigt [152], jedoch auch als normal [93] ermittelt. Der PL-Spiegel kann durch aktivierte Phospholipasen sinken, die aus Entzündungszellen

stammen [2]. Beim Emphysem kommt es zum Anstieg von Elastasen, die Surfactant-Komponenten denaturieren können [187]. Infolge einer Reduktion von Pneumozyten II wird weniger Surfactant synthetisiert und sezerniert [177]. COPD und Emphysem wurden bei den Tumorpatienten gehäuft angetroffen (vgl. Kap. 2.1, Tab. 5), so dass diese Mechanismen einen Einfluss haben könnten.

Auf eine andere denkbare Ursache für erniedrigte PL, die angesichts der häufigen Malnutrition von Tumorpatienten Bedeutung erlangen könnte, machten Guthmann und Mitarbeiter in einer tierexperimentellen Arbeit aufmerksam. Sie wiesen an Ratten mit Vitamin E-Mangel auf die Unterdrückung der PL-Synthese und seines wichtigsten Anteils, dem Phosphatidylcholin hin [91]. Mögliche nutritive Einflüsse auf die Zusammensetzung der humanen BAL sind bisher noch nicht publiziert.

Daneben muss auch ein möglicher methodenbedingter Einfluss auf die differente Komposition und Funktion der Phospholipide in den Kollektiven, in denen sich unterschiedliche Patienten gegenüberstanden, diskutiert werden, der aber in seiner Bedeutung und seinem Ausmaß schwierig abzugrenzen ist, zumal die Parameter Alter, Geschlecht, Tabakkonsum und Begleiterkrankungen beider Gruppen vergleichbar waren. Erst bei identischen Patienten vor und nach Chemotherapie könnten die Unterschiede eindeutig der Therapie zugeschrieben werden. Es muss zukünftigen Studien vorbehalten bleiben, mit einem verbundenen Design und einer größeren Teilnehmerzahl die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren.

Selbst unter Einbeziehung dieser einschränkenden methodischen Aspekte sprechen die dargestellten Ergebnisse einer gestörten Surfactantfunktion und -aggregation für eine Veränderung der extrazellulären PL-Morphologie und -Zusammensetzung bei den Tumorträgern. Möglicherweise kommt es durch das Karzinom zu einer Störung der PL-Synthese oder zu einer Störung der extrazellulären Anordnung der PL, über deren Ablauf noch keine Erkenntnisse vorliegen. Komplizierend kommt hinzu, dass die extrazelluläre Morphologie der Surfactant-Aggregate zu tubulärem Myelin durch SP-A mit gesteuert wird [239], so dass Veränderungen des Surfactantprotein-A, wie es in einem der Kollektive nachgewiesen wurde, ebenfalls einen Einfluss auf die Struktur und Funktion des Surfactant haben kann.

Nachdem andere Ursachen für die Dysbalance der Phospholipide und die eingeschränkte biophysikalische Aktivität keine überzeugende Erklärung bieten, müssen humorale oder

immunvermittelte Einflüsse des malignen Tumors diskutiert werden. Beispielsweise sind gerade für Bronchialkarzinome eine Fülle von Paraneoplasien bekannt [46]. Alveolarmakrophagen zeigten in der gesunden Lungenhälfte von Trägern eines Bronchialkarzinoms eine veränderte Aktivität. Hosker und Mitarbeiter demonstrierten vor Chemotherapie mittels Chemilumineszenz eine erhöhte Phagozytose-Aktivität [115], nach Chemotherapie eine Verminderung [116]. McDonald und Atkins nahmen sogar einen generalisierten Immundefekt bei Trägern von Bronchialkarzinomen an, nachdem mit  $\text{INF}\gamma$  stimulierte Alveolarmakrophagen in beiden Lungenhälften eine verminderte Zytostaseaktivität im Vergleich zu Kontrollpersonen aufgewiesen hatten [160].

Als Hinweis für einen Einfluss von Tumorprodukten auf den Surfactant könnte gewertet werden, dass mit der Reduktion der Tumorzellmenge infolge der ACO-Kurse sich ein hochsignifikanter Anstieg der Phospholipide von 17,8 mg/dl auf nahezu die doppelte Menge und ein gleichsinniger Anstieg der oberflächenaktiven „großen Aggregate“ von im Mittel 197  $\mu\text{g}$  auf 321  $\mu\text{g}$  nachweisen ließ. Dementsprechend ließ sich eine signifikante Verbesserung der Surfactantkonversion evaluieren, dargestellt am geringeren SA/LA-Quotienten. In zeitlichem Zusammenhang mit der zytostatischen Behandlung veränderten sich essentielle Bestandteile der alveolären Grenzschicht zu einer verbesserten Surfactanthomöostase hin. Das lässt die Hypothese eines parakrinen oder immunvermittelten Einflusses des Bronchialkarzinoms auf die Menge und die Zusammensetzung der Phospholipide im Surfactant zu.

#### **4.8. Immunmodulation durch Surfactant**

$\text{TNF}\alpha$  gehört mit anderen Interleukinen zu den proinflammatorischen Zytokinen. Nach Freisetzung aus Alveolarmakrophagen und Pneumozyten II aktiviert es ortsständige Entzündungszellen und regt sie zur Bildung von toxischen Sauerstoffradikalen und zytolytischen Faktoren an. Es löst eine entzündungsfördernde Zytokinkaskade aus, reguliert Apoptose, fördert chemotaktisch die Migration von Granulozyten und Monozyten und steigert nicht zuletzt Gewebsdestruktion und Fibrogenese [123,138,217].

Um der Frage nachzugehen, welche immunologischen Wirkungen Surfactant von Tumorpatienten haben kann, wurde exemplarisch die LPS-induzierte Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und das Proliferationsverhalten von PBMC nach Inkubation mit Surfactant von Patienten und von gesunden Probanden untersucht.

Die Bestimmung der LPS-induzierten  $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung aus PBMC ergab keine signifikante Differenz zwischen den beiden Patientengruppen. Wegen der breiten Streuung und der

geringeren Anzahl eignete sich das untherapierte Patientenkollektiv jedoch nur eingeschränkt zur statistischen Auswertung. Dagegen bewirkte das Surfactant-Material der chemotherapierten Patienten im Vergleich mit den Probanden eine signifikante Hemmung der Zytokinproduktion.

Bei Kremlev u. a. waren es die Surfactantlipide, die eine Suppression der TNF $\alpha$ -Produktion aus SP-A-stimulierten isolierten Monozytenreihen bewirkt hatten [133]. Die dosisabhängige Hemmung der TNF $\alpha$ -Liberation aus Rattenmakrophagen durch Rindersurfactant beschrieben Talati und Mitarbeiter [224]. Demgegenüber wies in dieser Studie die TNF- $\alpha$ -Freisetzung keinen Zusammenhang mit der Höhe der Gesamt-PL auf. Vielmehr wurden im Kollektiv der Probanden sowohl die höchste PL-Konzentration als auch die höchsten TNF- $\alpha$ -Werte gemessen. Möglicherweise befanden sich noch Spuren von Zytostatika in der BAL, so dass die niedrigere Stimulationsfähigkeit nach Chemotherapie auch auf die tags zuvor erfolgte Zytostase zurückzuführen sein könnte. Um das Phänomen zu klären, wäre eine Bestimmung der Medikamentenspiegel in der BAL nötig. Für dieses Kompartiment existieren noch keine Untersuchungen zu Wirkstoffspiegeln. Im Plasma erreicht Vincristinsulfat einen triphasischen Wirkspiegel, dessen terminale Halbwertszeit (HWZ) 19 - 156 Stunden umfasst [88]. Die erst in der Leber aktivierten wirksamen Metaboliten von Cyclophosphamid haben eine kurze mittlere HWZ von 7 Stunden, sind aber im Plasma bis 72 Stunden nachweisbar [17]. Adriamycin wird rasch u. a. in der Lunge angereichert. Im Plasma besitzt es eine biphasische HWZ von 3 und 30 - 50 Stunden [186]. Alle drei Chemotherapeutika kommen deshalb für biologische Wirkungen auf zelluläre Funktionen einen Tag nach Therapie in Frage.

Gegen einen nennenswerten Medikamenteneinfluss sprechen die Ergebnisse von Santosuosso und Mitarbeitern. Sie hatten demonstriert, dass mit INF $\gamma$  und LPS stimulierte Lungengewebs-Makrophagen von Ratten, die nach repetitiver s.c.-Gabe von Cyclophosphamid (Tage 0, 3, 5, 7, 9) am Tag 10 entnommen waren, ihre Fähigkeit behalten hatten, normale TNF $\alpha$ -Mengen freizusetzen [203].

Die PHA-induzierte Proliferation von PBMC wurde durch den Patienten-Surfactant beider Tumorkollektive nahezu vollständig unterdrückt. Der schmale Streubereich der Messwerte weist den Ergebnissen trotz der nur geringen Patientenzahlen (n = 4, n = 11) doch eine Bedeutung zu.

Santosuosso et al. hatten vergleichbare Untersuchungen an Ratten-Makrophagen publiziert [203]. In einem aufwändigen Studiendesign (Cyclophosphamid-Gaben s. c. an den Tagen 0, 3, 5, 7, 9, BAL an den Tagen 4, 10, 14, Isolation von Alveolarmakrophagen, Messung der mit

GM-CSF stimulierten oder unstimulierten Proliferation mittels Beta-Counter) fanden sie eine signifikante Abnahme der Proliferation an den Tagen 4 und 10 im Vergleich zu den Kontrolltieren. An Tag 14 zeigten die stimulierten und unstimulierten Makrophagen im Vergleich mit den Kontrollen wieder eine normale, in der Tendenz sogar gesteigerte Proliferationsfähigkeit. Die Autoren konstatierten, dass die Cyclophosphamid-Wirkung sich auf den Zeitraum der Therapie beschränkt und schon wenige Tage nach Abschluß der Zytostase eine vollständige Erholung der Makrophagen nachzuweisen ist.

Während die nahezu maximale Hemmung der Proliferation durch Surfactant nach Therapie auf die am Tag zuvor stattgefundenene antineoplastische Behandlung zurückführbar wäre, z. B. durch noch enthaltene Zytostatikaspuren, überrascht in dieser Studie die ebenfalls starke Wachstumshemmung des Surfactant vor Zytostase und bleibt in ihrer Ursache völlig unklar. Zu untersuchen wären nicht nur immunsuppressive Einflüsse durch Medikamente wie topische oder systemische Corticosteroide, sondern auch besonders eine etwaige humorale Hemmung der Proliferation durch das Bronchialkarzinom selbst. Neben Wirkspiegel-Bestimmungen der Zytostatika und anderer applizierter Medikamente im isolierten Surfactant müssten die Daten durch größere Fallzahlen an miteinander verbundenen Patienten vor und nach Therapie sowie durch zusätzliche Experimente bezüglich eines Tumoreinflusses per se abgesichert werden.

#### **4.9. Resümee**

Zusammenfassend lässt sich - unter Beachtung der durch das Studiendesign gegebenen Begrenzungen - ein Einfluss der Chemotherapie auf den Surfactant vermuten. Nach der antineoplastischen Therapie mit ACO liegt das SP-A signifikant höher, was einen verbesserten Schutz vor alveolären Infektionen bedeuten kann. Die verminderte Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins TNF $\alpha$  zeigt immunologische Einflüsse von Surfactant nach Chemotherapie an. Das erhöhte Gesamtprotein könnte auf eine Alteration der alveolo-kapillären Grenze hinweisen.

Die Phospholipid-Zusammensetzung ist nicht nur bei den Patienten nach Chemotherapie erheblich gestört. Die untherapierten Karzinompatienten weisen eine noch stärkere Verminderung der Gesamtphospholipide und der oberflächenaktiven „großen Aggregate“ auf. Die biophysikalische Minderfunktion des Surfactant kann auf diese Phospholipidergebnisse zurückgeführt werden. Der Surfactant beider Patientengruppen bewirkt eine Hemmung der Proliferationsfähigkeit monozytärer Zellen. Möglicherweise beruhen einige dieser Veränderungen auf einem parakrinen oder immunologischen Tumoreinfluss.

Die wesentlichen Resultate dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Nach einer zytostatischen Chemotherapie mit ACO finden sich bei Patienten mit Bronchialkarzinom höhere SP-A-Spiegel in der BAL als bei Patienten mit Bronchialkarzinom vor Chemotherapie, was für eine verbesserte lokale Abwehrleistung sprechen kann.
- Bei Patienten mit Bronchialkarzinom ist die Phospholipidzusammensetzung des Surfactant besonders ungünstig beeinflusst, da es - über einen bisher unbekanntem Weg - zu einer Reduzierung der Phospholipide und zu einer vermehrten Konversion oberflächenaktiver LA mit einer konsekutiven biophysikalischen Surfactant-Dysfunktion kommt.
- Bei Patienten mit Bronchialkarzinom sind nach zytostatischer Therapie die Phospholipide und die biologisch aktiven LA höher als bei Patienten vor einer Chemotherapie, allerdings nicht in einem Maße, die die gestörte Surfactant-Funktion verbessert.
- Aus der BAL isolierter Surfactant von Patienten mit Bronchialkarzinom bewirkt, möglicherweise auf noch unbekanntem humoralen Weg, eine Proliferationshemmung von mononukleären Zellen.

Diese Resultate können aber durch die kleinen Fallzahlen, nicht identische Patienten beider Tumorkollektive und die in Basisdaten abweichenden Probanden möglicherweise mit auf die Studienbedingungen zurückzuführen sein und nicht eindeutig nur der zytostatischen Chemotherapie zugeschrieben werden. Deshalb zeigt diese Arbeit Perspektiven auf, die in zukünftigen Studien unter Korrektur der genannten methodischen Begrenzungen erhärtet werden müssten.

## 5. Zusammenfassung

Eine zytostatische Chemotherapie reduziert die zelluläre Abwehr, so dass das Risiko für die Ausbildung einer lebensbedrohlichen Allgemeininfektion steigt.

Mit den Kollektinen des pulmonalen Surfactantsystems SP-A und SP-D besitzt die Lunge ein zusätzliches lokales Abwehrsystem, über dessen Reaktion im Rahmen einer Chemotherapie bisher wenig bekannt ist. Auch die Funktion der Surfactantlipide während einer Chemotherapie ist bisher kaum untersucht. Aus diesem Grund haben wir bei Patienten mit einem Bronchialkarzinom evaluiert, ob es vor und nach einer Chemotherapie zu Veränderungen im Surfactantsystem und zu einer Immunmodulation durch Surfactant kommt.

Hierzu wurden 16 Patienten mit einem kleinzelligen Bronchialkarzinom einen Tag nach zytostatischer Therapie mit Adriamycin, Cyclophosphamid und Vincristin einer Bronchoskopie mit bronchoalveolären Lavage unterzogen. Sie wurden in einem unverbundenen Design verglichen mit 21 Patienten, die an einem bisher untherapierten Bronchialkarzinom erkrankt waren. Als Normkollektiv dienten 28 gesunde Probanden. Nach Auszählung der zellulären Bestandteile wurde aus der BAL Surfactant isoliert, funktionell und biochemisch charakterisiert und auf seine immunmodulatorische Potenz hin geprüft.

Trotz reduzierter Recovery in den Patientenkollektiven fand sich in der BAL von Patienten nach Chemotherapie eine erhöhte Zellzahl, vorwiegend durch Alveolarmakrophagen. Zusätzlich fand sich ein erhöhtes Gesamtprotein, was auf eine gestörte Permeabilität der alveolo-kapillären Grenze hindeuten könnte. Unter dem Einfluss der Chemotherapie kam es zu einer Erhöhung des SP-A, so dass eine Steigerung der alveolären first-line-defense gegen Mikroorganismen postuliert werden kann.

In der Lipid- und Funktionsanalytik wiesen beide Patientenkollektive eine geringere Menge an Phospholipiden, großen Aggregaten (LA) und kleinen Aggregaten (SA) auf. Der erhöhte SA/LA-Quotient spricht für eine vermehrte metabolische Konversion von den oberflächenaktiven LA zu den inaktiven SA. Am ungünstigsten waren die Veränderungen vor Therapie ausgeprägt. Übereinstimmend dazu wurde eine schwere Störung der biophysikalischen Surfactantfunktion beider Tumorkollektive ermittelt.

Isolierter Surfactant der chemotherapierten Patienten war in der Lage, sowohl die TNF $\alpha$ -Freisetzung aus mononukleären Blutzellen als auch deren Proliferation zu hemmen, möglicherweise infolge Restmengen von Zytostatika in der Alveolarflüssigkeit. Besonders stark wurde die Zellproliferation durch den Surfactant der untherapierten Patienten supprimiert, so dass möglicherweise im isolierten Surfactant auch humorale Faktoren eine Rolle für die

Proliferationshemmung spielen. Möglicherweise könnten sogar durch das Bronchialkarzinom selbst Surfactantlipide, Surfactantfunktion und zelluläre Funktionen im alveolären Kompartiment verändert werden.

Auf Grund der Zusammensetzung der Kollektive lässt sich aber nicht zweifelsfrei beantworten, ob die Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen eindeutig der Chemotherapie zuzuschreiben sind. Es hat sich zwar die Annahme erhärtet, dass eine zytostatische Chemotherapie Einfluss nehmen kann auf das lokale pulmonale Abwehrsystem der Kollektive, auf die Phospholipidzusammensetzung und die biophysikalische Funktion von Surfactant sowie auf die konsekutive Fähigkeit des Surfactant, zelluläre Immunfunktionen zu modulieren. Die weitere Forschungsarbeit auf diesem Gebiet wird aber die hier präsentierten perspektivischen Ergebnisse mit einem entsprechend geänderten Studiendesign verifizieren müssen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Abid SH, Malhotra V, Perry MC.** Radiation-induced and chemotherapy-induced pulmonary injury. *Curr Opin Oncol* 2001;13:242-248.
2. **Ackerman SJ, Kwatia MA, Doyle CB, Enhorning G.** Hydrolysis of surfactant phospholipids catalyzed by phospholipase A<sub>2</sub> and eosinophil lysophospholipases causes surfactant dysfunction. *Chest* 2003;123(3Suppl):355S.
3. **Adjei AA.** Management of small cell lung cancer. *Curr Opin Pulm Med* 2000;6(4):384-90.
4. **Amrein M, von Nahmen A, Sieber M.** A scanning force- and fluorescence light microscopy study of the structure and function of an model pulmonary surfactant. *Eur Biophys J* 1997;26(5):349-357.
5. **Arai N, Shirai T.** Evaluation of bronchoalveolar lavage fluid in patients with B-cell-lymphoma before and after COP-BLAM-therapy. *Rinsho Ketsueki* 1993;34:705-711.
6. **Arias-Diaz J, Vara E, Torres-Melero, Garcia C, Baki W, Ramirez-Armengol JA, Balibrea JL.** Nitrite/nitrate and cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients. *Cancer* 1994;74(5):1546-1551.
7. **Astra USA Inc.** Xylocaine (lidocaine HCl Injection USP). Package insert Feb 1995.
8. **Avery ME, Mead J.** Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membran disease. *Am J Dis Child* 1959;97:517-523.
9. **Bachofen H, Schürch S, Michel RP, Weibel ER.** Experimental hydrostatic pulmonary edema in rabbit lungs. Morphology [see comments]. *Am Rev Respir Dis* 1993;147(4):989-996.
10. **Bangham AD, Morley CJ, Phillips MC.** The physical properties of an effective lung surfactant. *Biochim Biophys Acta* 1979;297:217-227.
11. **Baritussio AG, Magoon MW, Goerke J, Clements JA.** Precursor product relationship between rabbit type II cell lamellar bodies and alveolar surface-active material. Surfactant turnover time. *Biochim Biophys Acta* 1984;666:382-393.
12. **Barrow RE, Hills BA.** Surface tension induced by dipalmitoyl lecithin in vitro under physiological conditions. *J Physiol* 1979;297:217-227.
13. **Bartlett GR.** Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959;234:466-468.
14. **Baser Y, deShazo RD, Barkman HW Jr, Nordberg J.** Lidocaine effects on immunocompetent cells. Implications for studies of cells obtained by bronchoalveolar lavage. *Chest* 1982;82(3):323-328.
15. **Bastacky J, Lee CY, Goerke J, Koushafar H, Yager D, Kenaga L, Speed TP, Chen Y, Clements JA.** Alveolar lining layer is thin and continuous: low-temperature scanning electron microscopy of rat lung. *J Appl Physiol* 1995;79(5):1615-1628.
16. **Baughman RP, Whitsett JA.** The effect of cigarette smoking on surfactant apoprotein. *Clin Res* 1988;36A503.
17. **Baxter Oncology GmbH.** Fachinformation zu Endoxan<sup>®</sup>, Frankfurt/M., Deutschland, Januar 2002.

18. **Benne CA, Kraaijeveld CA, van Strijp JA, Brouwer E, Harmsen M, Verhoef J, van Golde LM, van Iwaarden JF.** Interactions of surfactant protein A with influenza A viruses: binding and neutralization. *J Infect Dis* 1995;171(2):335-341.
19. **Bernhard W, Gebert A, Vieten G, Rau GA, Hohlfeld JM, Postle AD, Freihorst J.** Pulmonary surfactant in birds: coping with surface tension in a tubular lung. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281(1):R327-R337.
- 19a. **Bernhard W, Hoffmann S, Dombrowski H, Rau GA, Kamlage A, Kappler M, Haitzma JJ, Freihorst J, von der Hardt H, Poets CF.** Phosphatidylcholine molecular species in lung surfactant: composition in relation to respiratory rate and lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25(6):725-31.
20. **Bernhard W, Haagsman HP, Tschernig T, Poets CF, Postle AD, van Eijk, ME, von der Hardt H.** Conductive airway surfactant: surface-tension function, biochemical composition, and possible alveolar origin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:41-50.
- 20a. **Betsuyaku T, Kuroki Y, Nagai K, Nashuara Y, Nishimura M.** Effects of ageing and smoking on SP-A and SP-D levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir J* 2004; 24(6):964-70.
21. **Bhalla KS, Wilczynski SW, Abushama AM, Petros WP, McDonald CS, Loftis JS, Chao NJ, Vredenburg JJ, Folz RJ.** Pulmonary toxicity of induction chemotherapy prior to standard or high-dose chemotherapy with autologous hematopoietic support. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(1):17-25.
22. **Bligh EG, Dyer WJ.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-917.
23. **Böhme A, Hoelzer D.** Pneumonien nach Zytostatikagabe. *Pneumologie* 1994;48(2):121-125.
24. **Borron PJ, Mostaghel EA, Doyle C, Walsh ES, McHeyzer-Williams MG, Wright JR.** Pulmonary surfactant proteins A and D directly suppress CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> cell function: evidence for two shared mechanisms. *J Immunol* 2002;169(10):5844-5850.
25. **Brennan P, Bray I.** Recent trends and the future direction for lung cancer mortality in Europe. *Br J Cancer* 2002;87(1):43-48.
26. **Buckingham S.** Studies on the identification of an antiatelectasis factor in normal sheep lungs. *Am J Child Dis* 1961;102:521-522.
27. **Bufler P, Schmidt B, Schikor D, Bauernfeind A, Crouch EC, Griese M.** Surfactant protein A and D differently regulate the immune response to nonmucoïd *Pseudomonas aeruginosa* and its lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28(2):249-256.
28. **Burke WM, Roberts CM, Bryant DH, Cairns D, Yeates M, Morgan GW, Martin BJ, Blake H, Penny R, Zaunders JJ, et al.** Smoking-induced changes in epithelial lining fluid volume, cell density and protein. *Eur Respir J* 1992;5[7]:780-784.
29. **Capelli O, Rovatti E, Gilioli F, Garuti GC, Lega M, De Maria D, Covi M, Capitolo S, Fontana A, Pellegrino M, Vellutti G.** BAL-modifications after antitubercular and immunomodulant therapy in lung cancer. *Respiration* 1992;59(suppl.1):50-52.
30. **Carratala J, Roson B, Fernandez-Sevilla A, Alcaide F, Gudiol F.** Bacteremic pneumonia in neutropenic patients with cancer: causes, empirical antibiotic therapy, and outcome. *Arch Intern Med* 1998;158(8):868-872.

31. **Chandler A, Claypool WD Jr, Strauss JF, Fisher AB.** Uptake of liposomal phosphatidylcholine by granular pneumocytes in primary culture. *Am J Physiol* 1983;245:C397-404.
32. **Chen Q, Fisher AB, Strayer DS, Bates SR.** Mechanism for secretagogue-induced surfactant protein A binding to lung epithelial cells. *Am J Physiol* 1998;275(1Pt1):L38-46.
33. **Cherniack RM.** Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. *Am Rev Resp Dis* 1990;141:499-506.
34. **Chevalier G, Collet AJ.** In vivo incorporation of choline-<sup>3</sup>H, leucine-<sup>3</sup>H and galactose-<sup>3</sup>H in alveolar type II pneumocytes in relation to surfactant synthesis. A quantitative radioautographic study in mouse by electron microscopy. *Anat Rec* 1972;174:289-310.
35. **Chiba H, Pattanajitvilai S, Mitsuzawa H, Kuroki Y, Evans A, Voelker DR.** Pulmonary surfactant proteins A and D recognize lipid ligands on Mycoplasma pneumoniae and markedly augment the innate immune response to the organism. *Chest* 2003;123(3Suppl):426S.
36. **Chu J, Clements JA, Cotton EK, Klaus MH, Sweet AY, Tollex WH, Bradley WL, Brandorff LC.** Neonatal pulmonal ischemia. Part I: clinical and physiologic studies. *Pediatrics* 1967;40:709-782.
37. **Clements JA.** Surface tension of lung extracts. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957;95:170-172.
38. **Clements JA, Brown ES, Johnson RP.** Pulmonary surface tension and the mucous lining of the lungs: some theoretical considerations. *J Appl Physiol* 1958;12:262-268.
39. **Cochrane CG, Revak SD.** Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships. *Science* 1991;254:566-568.
40. **Cockshutt AM, Weitz J, Possmayer F.** Pulmonary surfactant protein A enhances the surface activity of lipid extract surfactant and reverses inhibition by blood proteins in vitro. *Biochemistry* 1990;29:8424-8429.
41. **Coonrod JD.** Role of surfactant free fatty acids in antimicrobial defenses. *Eur J Respir Dis* 1987;71:209-214.
42. **Cooper JA Jr, Merrill WW, Reynolds HY.** Cyclophosphamide modulation of bronchoalveolar cellular populations and macrophage oxidative metabolism. Possible mechanisms of pulmonary pharmacotoxicity. *Am Rev Respir Dis* 1986;134(1):108-114.
43. **Costabel U.** Atlas der bronchoalveolären Lavage. Thieme Verlag Stuttgart New York 1994.
44. **Costabel U.** Methode und Technik der bronchoalveolären Lavage. *Prax Klin Pneumol* 1988;41:218-221.
45. **Costabel U.** Technik und Methodik der bronchoalveolären Lavage bei interstitiellen Lungenkrankheiten. *Schweiz Med Wschr* 1986;116:1238-1244.
46. **Creuwels LA, van Golde LM, Haagsman HP.** The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* 1997;175(1):1-39.
47. **Crouch EC.** Collectins and pulmonary host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:177-201.

48. **Crouch E, Hartshorn K, Ofek I.** Collectins and pulmonary innate immunity. *Immunol Rev* 2000;173:52-65.
49. **Crouch E, Wright, JR.** Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol* 2001;63:521-554.
50. **Culpitt SV, Rogers DF, Shah,P, De Matos C, Russell RE, Donnelly LE, Barnes PJ.** Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(1):24-31.
51. **Czembrzynska-Nowak M, Bienkowska M, Szklarz E.** Exogenous interleukin 2 regulates interleukin 6 and nitric oxide but not interferon gamma and tumor necrosis factor alpha production in bronchoalveolar leukocytes from patients with small cell lung cancer. *Arch Immunol Ther Exp* 1998;46(6):367-374.
52. **Dalhoff K (federführend), Ewig S, Höffken G, Maass M, Niedermeyer J, Ratjen F, Welte T, Wilkens H.** Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Prävention von Pneumonien bei erworbenem Immundefizit. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie. *Pneumologie* 2002;56(12):807-831.
53. **de Blasio F, Daughton DM, Thompson AB, Robbins RA, Spurzem JR, Sisson JH, Von Essen SG, Romberger DJ, Rubinstein I, Floreani AA, et al.** General vs local anesthesia. Effect on bronchoalveolar lavage findings. *Chest* 1993;104(4):1032-1037.
54. **Deutsche Gesellschaft für Pneumologie.** Empfehlungen zur diagnostischen bronchoalveolären Lavage. *Pneumologie* 1994;Sonderheft1(5):311-323.
55. **Devendra G, Spragg RG.** Lung surfactant in subacute pulmonary disease. *Respir Res* 2002;3(1):19-23.
56. **Diemel RV, Snel MM, Waring AJ, Walther FJ, van Golde LMG, Putz G, Haagsman HP, Batenburg JJ.** Multilayer formation upon compression of surfactant monolayers on protein concentration as well as lipid composition. *J Biol Chem* 2002;277(24):21179-21188.
57. **Dobbie JW, Tasiaux N, Meijers P, Anderson J, Bodart C, Hind C, Bourguet C, Perret J.** Lamellar bodies in synoviocytes, mesothelium and specific epithelia as possible site of auto-antigen in rheumatoid disease. *Br J Rheumatol* 1994;33:508-519.
58. **Dobbs LG.** Pulmonary surfactant. *Ann Rev Med* 1989;40:431-446.
59. **Dogmalla-Kulawik J, Guzman J, Costabel U.** Immune cells in bronchoalveolar lavage in peripheral lung cancer – analysis of 104 cases. *Respiration* 2003;70(1):43-48.
60. **Domby WR, Whitcomb ME.** The effects of corticosteroid administration on the bronchoalveolar cells obtained from guinea pigs by lung lavage. *Am Rev Respir Dis* 1978;117(5):893-896.
61. **Dorscheid DR, Low E, Conforti A, Shifrin S, Sperling AI, White SR.** Corticosteroid-induced apoptosis in mouse airway epithelium: effect in normal airways and after allergen-induced airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(2):360-366.
62. **Eberhardt W, Stamatis G, Stuschke M, Wilke H, Muller MR, Kolks S, Flasshove M, Schutte J, Stahl M, Schlenger L, Budach V, Greschuchna D, Stuben G, Teschler H, Sack H, Seeber S.** Prognostically orientated multimodality treatment including surgery for

- selected patients of small-cell lung cancer patients stages IB to IIIB: long-term results of a phase II trial. *Br J Cancer* 1999;81:1206-1212.
63. **Elhalwagi BM, Zhang M, Ikegami M, Iwamoto HS, Morris RE, Miller ML, Dienger K, McCormack FX.** Normal surfactant pool sizes and inhibition-resistant surfactant from mice that overexpress surfactant protein A. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:380-387.
64. **Eliraz A, Ezri T, Guttman R, Wishnitzer R, Soroker D.** Inflammatory cells in bronchial lavage fluid after general anesthesia and artificial respiration. *Harefuah* 1990;118(3):139-41.
65. **Enhörning G.** Pulmonary surfactant function studied with the pulsating bubble surfactometer (PBS) and the capillary surfactometer (CS). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001;129(1):221-226.
66. **Enhörning G.** Surfactant replacement in health and human lung disease: state of the art [editorial]. *Am Rev Respir Dis* 1989;140(2):281-283.
67. **Enhörning G.** Pulsation bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. *J Appl Physiol* 1977;43:198-203.
68. **Ettensohn DB, Jankowski MJ, Redondo AA, Duncan PG.** Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject. II. Safety and results of repeated BAL, and use in the assessment of intrasubject variability. *Chest* 1988;94(2):281-85.
69. **Ettensohn DB, Jankowski MJ, Duncan PG, Lalor PA.** Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject. I. Technical aspects and intersubject variability. *Chest* 1988;94(2):275-80.
70. **Fehrenbach H.** Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res* 2001;2(1):33-46.
71. **Finley TN, Ladman AJ.** Low yield of pulmonary surfactant in cigarette smokers. *N Engl J Med* 1972;285:223-227.
72. **Fisher AB, Dodia C, Chander A.** Inhibition of calcium independent phospholipase A2 by surfactant protein A. *Am J Physiol* 1994;267:L335-341.
73. **Fisseler-Eckhoff A, Müller KM.** Tumorheterogenität in plattenepithelialen und kleinzelligen Bronchialkarzinomen. *Pneumologie* 1998,Sonderheft1(3):39.
74. **Floros J, Hoover RR.** Genetics of the hydrophilic surfactant proteins A and D. *Biochim Biophys Acta* 1998;1408(1-2):312-322.
75. **Flückinger U, Trampuz A.** Pneumonie beim immunkompromittierten Wirt. *Therap Umsch* 2001;58(19):614-619.
76. **Frerking I, Gunther A, Seeger W, Pison U.** Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options. *Intensive Care Med* 2001;27(11):1699-1717.
77. **Fuhrman C, Parrot A, Wislez M, Prigent H, Boussaud V, Bernaudin J-F, Mayaud C, Cadranel J.** Spectrum of CD4 to CD8 T-cell ratios in lymphocytic alveolitis associated with methotrexate-induced pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(7):1186-1191.
78. **Gehr P, Im Hof V, Geiser M, Schürch S.** Der mukoziliäre Apparat der Lunge - die Rolle des Surfactant. *Schweiz Med Wochenschr* 2000;130:691-698.

79. **Gehr P, Green FHY, Geiser M, Im Hof V, Lee MM, Schürch S.** Airway surfactant, a primary defense barrier: mechanical and immunological aspects. *J Aerosol Med* 1996;9:163-181.
80. **Geiger K, Gallagher ML, Hedley-Whyte J.** Cellular distribution and clearance of aerolized dipalmitoyl lecithin. *J Appl Physiol* 1975;39(5):759-766.
81. **Geiser M, Schürch S, Gehr P.** Influence of surface chemistry and topography of particles on their immersion into the lung's surface-lining layer. *J Appl Physiol* 2003;94:1793-1801.
82. **Ghildyal R, Hartley C, Varrasso A, Meanger J., Voelker DR, Anders EM, Mills J.** Surfactant protein A binds to the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and neutralizes virion infectivity. *J Infect Dis* 1999;180:2009-2013.
83. **Ghio AJ, Fracica PJ, Young SL, Piantadosi CA.** Synthetic surfactant scavenges oxidants and protects against hyperoxic lung injury. *J Appl Physiol* 1994;77:1217-1223.
84. **Gligorov J, Couteau C, Debourdeau P, Antione M, Pene F, Milleron B.** Small cell lung carcinoma. *Bull Cancer* 1999;10 Suppl.3:5-16.
85. **Griese M.** Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* 1999;13(6):1455-1476.
86. **Griese M, Neumann M, von Bredow T, Ratjen F.** Surfactant in children with malignancies, immunosuppression, fever, and pulmonary infiltrates. *Eur Respir J* 2002;50(5):1284-1291.
87. **Griese, M, Tredano M, Nicolai T, Bahuau M.** Molekulare Grundlagen und Klinik der pulmonalen Alveolarproteinosen. *Dtsch Arztebl* 2002;99(15):A1013-1023.
88. **Gry-Pharma GmbH.** Fachinformation zu Vincristinsulfat-GRY® 1/-2/-5, Kirchzarten, Juni 2002.
89. **Günther A, Schmidt R, Nix F, Yabut-Perez M, Guth C, Rosseau S, Siebert C, Grimminger F, Morr H, Vercovsky HG, Seeger W.** Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Eur Respir J* 1999;14:565-573.
90. **Günther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, Temmesfeld B, Walmrath D, Morr H, Seeger W.** Changes in pulmonary surfactant during bacterial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:176-184.
91. **Guthmann F, Kollack I, Schachtrup C, Schlame M, Spener F, Rüstow B.** Vitamin E deficiency reduces surfactant lipid biosynthesis in alveolar type II cells. *Free Radical Biol and Med* 2003;34(6):663-673.
92. **Haagsman HP.** Structural and functional aspects of the collectin SP-A. *Immunobiol* 2002;205:476-489.
93. **Hallman M, Spragg R, Harrell JH, Moser KM, Gluck L.** Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. Study of bronchoalveolar lavage phospholipides, surface activity phospholipase activity, and plasma myo-inositol. *J Clin Invest* 1982;70:673-683.
94. **Hallman M, Gluck L.** Phosphatidylglycerol in lung surfactant. III. Possible modifier of surfactant function. *J Lipid Res* 1976;17:257-262.

95. **Halme M, Hallman M, Ruotsalainen T, Piilonen A, Taskinen E, Pekonen M, Maasilta P, Mattson K.** Tumor response and radiation-induced lung injury in patients with recurrent small cell lung cancer treated with radiotherapy and concomitant interferon- $\alpha$ . *Lung cancer* 1999;23[1]:39-52.
96. **Hamm H, Kroegel C, Hohlfeld J.** Surfactant: a review of its functions and relevance in adult respiratory disorders. *Respir Med* 1996;90(5):251-270.
97. **Hamm H, Lührs J, Guzman J, Costabel U, Fabel H, Bartsch W.** Elevated surfactant protein A in bronchoalveolar lavage fluids from sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis patients. *Chest* 1994;106:1766-1770.
98. **Hamm H, Fabel H, Bartsch W.** The surfactant system of the adult lung: physiology and clinical perspectives. *Clin Investig* 1992;70(8):637-657.
99. **Hamvas A, Nogee LM, deMello DE, Cole FS.** Pathophysiology and treatment of protein-B deficiency. *Biol Neonate* 1995;67(Suppl.1):18-31.
100. **Hawgood S.** Pulmonary surfactant apoproteins: a review of protein and genomic structure. *Am J Physiol* 1989;257:L13-22.
101. **Hawgood S, Poulain FR.** The pulmonary collectins and surfactant metabolism. *Annu Rev Physiol* 2001;63:495-519.
102. **Hermanek P, Henson DE, Hutter RVP, Sobin LH.** TNM Supplement 1993. A commentary on uniform use. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo 1993.
103. **Hermanek P, Scheibe O, Spiessl B, Wagner G.** (Hrsg.) International Union Against Cancer (UICC): *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*. 4. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1987:73-78.
104. **Hermans C, Bernard A.** Lung epithelium-specific proteins. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(2):646-678.
105. **Hickman-Davis JM, O'Reilly P, Davis IC, Peti-Peterdi J, Davis G, Young KR, Devlin RB, Matalon S.** Killing of *Klebsiella pneumoniae* by human alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L944-L956.
106. **Hiddemann W, Maschmeyer G, Runde V, Einsele H.** Prophylaxe, Diagnostik und Therapie von Infektionen bei Patienten mit malignen Erkrankungen. *Internist* 1996;37:1212-1224.
107. **Higenbottam T.** Tobacco smoking and the pulmonary surfactant system. *Tokai J Exp Clin Med* 1985;10(4):465-470.
108. **Hohlfeld J.** The role of surfactant in asthma. *Respir Res* 2001;3(1):4.
109. **Hohlfeld JM, Ahlf K, Enhorning G, Balke K, Erpenbeck VJ, Petschallies J, Hoymann HG, Fabel H, Krug N.** Dysfunction of pulmonary surfactant in asthmatics after segmental allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1803-1809.
110. **Hohlfeld J, Fabel H, Hamm H.** The role of pulmonary surfactant in obstructive airway disease. *Eur Respir J* 1997;10:482-491.
111. **Honda Y, Takahashi H, Kuroki Y, Akino T, Abe S.** Decreased contents of surfactant proteins A and D in BAL fluids of healthy smokers. *Chest* 1996;109:1006-1009.

112. **Horiuchi T, Mason RJ, Kuroki Y, Cherniack RM.** Surface and tissue forces, surfactant protein A, and the phospholipid components of pulmonary surfactant in bleomycin-induced fibrosis in the rat. *Am Rev Respir Dis* 1990;151(4Pt1):1006-1013.
113. **Horowitz AD, Baatz JE, Whitsett JA.** Lipid effects on aggregation of pulmonary surfactant protein SP-C studied in fluorescence energy transfer. *Biochemistry* 1993;32:9513-9523.
114. **Horwitz AD, Elledge B, Whitsett JA, Baatz JE.** Effects of lung surfactant proteolipid SP-C on the organization of model membrane lipids: a fluorescence study. *Biochim Biophys Acta* 1992;1107:44-54.
115. **Hosker HS, Corris PA.** Alveolar macrophage and blood monocyte function in lung cancer. *Cancer Detect Prev* 1991;15(2):103-106.
116. **Hosker HSR, Mc Ardle P, Corris PA.** Alveolar macrophage function before and during treatment with cytotoxic chemotherapy in patients with small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 1991;27(12):1711.
117. **Huang W, Wang G, Phelps DS, Al-Mondhiry H, Floros J.** Combined SP-A-bleomycin effect on cytokines by THP-1 cells: impact of surfactant lipids on this effect. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L94-102.
118. **Ikegami M, Korfhagen TR, Whitsett JA, Bruno MD, Wert SE.** Characteristics of surfactant from SP-A-deficient mice. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1998;275:L247-254.
119. **Jemal A, Taylor M, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ.** Cancer Statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003;53:5-26.
- 119a. **Jobe AH, Ikegami M.** Biology of surfactant. *Clin Perinatal* 2001;28(3):655-69.
120. **Johnson BE.** Management of small cell lung cancer. *Clin Chest Med* 2002;23(1):225-239.
121. **Johnson MD, Widdicombe JH, Allen L, Barbry P, Dobbs LG.** Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1699-1971.
122. **Karthaus M, Buchheidt D, Hiddemann W, Donnelly JP, Krcmery V, Schiel X, Wilhelm M, Helmerking M.** European surveillance of infections in cancer patients - ESIC. *Chemotherapy* 1999;45:237-241.
123. **Keane MP, Strieter RM.** The importance of balanced pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease. *Respir Res* 2002;3:5.
124. **Keough KMW, Pérez-Gil J, Nag K.** Adsorption and monolayer formation of some pulmonary surfactant components visualized by epifluorescence microscopy. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:95(abstr).
125. **Kikawada M, Oyama T, Ogawa K, Arai H, Iwamoto T, Takasaki M.** The characterization of bronchoalveolar lavage fluid in very elderly patients with cerebrovascular disease. *J Gerontol* 2001;56:M771-774.
126. **King RJ, Martin H.** Intracellular metabolism of the apoproteins of pulmonary surfactant in rat lung. *J Appl Physiol* 1980;48:812-820.

127. **King RJ, Clements JA.** Surface active materials from dog lung: II. Composition and physiological correlations. *Am. J. Physiol.* 1972;223:715-726.
128. **Klastersky J, Paesmans M, Rubenstein EB, Boyer M, Elting L, Reld R, Gallagher J, Herrstedt J, Rapoport B, Rolston K, Talcott J.** The multinational association for supportive care in cancer risk index: a multinational scoring system for identifying low-risk febrile neutropenic cancer patients. *Clin Oncology* 2000;18(16):3038-3051.
129. **Klaus MH, Clements JA, Havel RJ.** Composition of surface-active material isolated from beef lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 1961;47:1858-1859.
130. **Klech H, Pohl W. (Eds.)** Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL): Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Resp J* 1989;2:561-585.
131. **Konietzko N, Fabel H.** *Weißbuch Lunge 2000.* Zur Lage und Zukunft der Pneumologie in Deutschland. Thieme Verlag Stuttgart 2000.
132. **Koptides M, Umstead TM, Floros J, Phelps DS.** Surfactant protein A activates NF-kappa B in the THP-1 monocytic cell line. *Am J Physiol* 1997;273:L382-388.
133. **Kremlev SG, Umstead TM, Phelps DS.** Surfactant protein A regulates cytokine production in the monocytic cell line TPH-1. *Am J Physiol* 1997;272:1996-L1004.
134. **Kuan SF, Rust K, Crouch E.** Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides: surfactant protein D is an *Escherichia coli*-binding protein in bronchoalveolar lavage. *J Clin Invest* 1992;90:97-106.
135. **Kuroki Y, Shiratori M, Ogasawara Y, Tsuzuki A, Akino T.** Characterization of pulmonary surfactant protein D: its copurification with lipids. *Biochim Biophys Acta* 1991;1086:185-190.
136. **Kuylenstierna R, Hernbrand R, Eklund A.** Comparison of bronchoalveolar lavage fluid recovered during bronchoscopy with local or general anesthesia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1988;114(4):443-5.
137. **LaForce FM, Kelley WJ, Huber GL.** Inactivation of staphylococci by alveolar macrophages with preliminary observation on the importance of alveolar lining material. *Am Rev Respir Dis* 1973;108:783-790.
138. **Lasky JA, Brody AR.** Interstitial fibrosis and growth factors. *Environ Health Perspect* 2000;108(Suppl 4):751-762.
139. **Lawson PR, Reid KBM.** The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity. *Immunol Rev* 2000;173:66-78.
140. **Ledwozyw A, Rucinski T, Synowiec R.** The influence of endotracheal bleomycin administration on phospholipid composition of rat lung surfactant. *Arch Vet Pol* 1992;32(1-2):41-48.
141. **Lesur OA, Bernard M, Begin RO.** Clara cell protein (CC-16) and surfactant-associated protein A (SP-A) in asbestos-exposed workers. *Chest* 1996;109:467-474.
142. **LeVine AM, Gwozdz J, Stark J, Bruno M, Whitsett JA, Korfhagen TR.** Surfactant protein-A enhances respiratory syncytial virus clearance in vivo. *J Clin Invest* 1999;103:1015-1021.

143. **LeVine AM, Kurak KE, Bruno MD, Stark JM, Whitsett JA, Korfhagen TR.** Surfactant protein-A deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:700-708.
144. **LeVine AM, Bruno MD, Huelsman KM, Ross GF, Whitsett JA, Korfhagen TR.** Surfactant protein-A deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J Immunol* 1997;158:4336-4340.
145. **Linke MJ.** Immunosuppressed surfactant protein-A deficient mice have increased susceptibility to *Pneumocystis carinii* infection. *J Infect Dis* 2001;183:943-952.
146. **Linnoila RI, Mulshine JL, Steinberg SM, Gazdar AF.** Expression of surfactant-associated protein in non-small-cell lung cancer: a discrimination between biologic subsets. *J Nat Cancer Inst* 1992;Monograph(13):61-66.
147. **Liu MC, Proud D, Lichtenstein LM, Hubbard WC, Bochner BS, Stealey BA, Breslin L, Xiao H, Freidhoff LR, Schroeder JT, Schleimer RP.** Effects of prednisone on the cellular responses of cytokines and mediators after segmental allergen challenge of asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(1):29-38.
148. **Low RB, Adler KB, Woodcock-Mitchell J, Giancola MS, Vacek PM.** Bronchoalveolar lavage lipids during development of bleomycin-induced fibrosis in rats. Relationship to altered epithelial cell morphology. *Am Rev Respir Dis* 1988;138(3):709-713.
149. **Low RB, Davis GS, Giancola MS.** Biochemical analyses of bronchoalveolar lavage fluids of healthy human volunteer smokers and nonsmokers. *Am Rev Respir Dis* 1978;118:863-875.
150. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RK.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
151. **Lührmann A, Wenske B, Tschernig T, Pabst R.** Einfluss des Lebensalters auf den Einstrom von Leukozyten in Lungenkompartimente nach lokaler Stimulation. *Pneumologie* 2003;57(1):42,V18.
152. **Lusuardi M, Capelli A, Carli S, Tacconi MT, Salmona M, Donner CF.** Role of surfactant in chronic obstructive pulmonary disease: therapeutic implications. *Respiration* 1992;59:28-32.
153. **Macklin CC.** The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumocytes. *Lancet* 1954;1:1099-1104.
154. **Madsen J, Kliem A, Tornoe I, Skjodt K, Koch C, Holmskov U.** Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues. *J Immunol* 2000;164(11):5866-70.
155. **Magoon MW, Wrigt JR, Baritussio A, Williams MC, Goerke J, Benson BJ, Hamilton RL, Clements JA.** Subfractionation of lung surfactant. Implications for metabolism and surface activity. *Biochim Biophys Acta* 1983;750:18-31.
156. **Mancini NM, Bene MC, Gerard H, Chabot F, Faure G, Polu JM, Lesur O.** Early effects of short-time cigarette smoking on the human lung: a study of bronchoalveolar lavage fluids. *Lung* 1993;171(5):277-291.
157. **Manz-Keinke H, Plattner H, Schlepper-Schäfer J.** Lung surfactant protein A (SP-A) enhances serum-independent phagocytosis of bacteria by alveolar macrophages. *Eur J Cell Biol* 1992;75:95-100.

158. **Mason RJ, Williams MC.** Type II alveolar cell: defender of the alveolus. *Am Rev Respir Dis* 1977;115:81-91.
159. **McCormack FX, Whitsett JA.** The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest* 2002;109(6):707-712.
160. **McDonald CF, Atkins RC.** Defensive cytostatic activity of pulmonary alveolar macrophages in primary lung cancer. *Chest* 1990;98(4):881-885.
161. **McIntosh JC, Mervin-Blake S, Conner E, Wright JR.** Surfactant protein A protects growing cells and reduces TNF-Alpha activity from LPS-stimulated macrophages. *Am J Physiol* 1996;15:L310-L319.
162. **McNeeley TB, Coonrod JD.** Aggregation and opsonization of type A but not type B Haemophilus influenzae by surfactant protein A. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:114-122.
163. **Meyers JL.** Pathology of drug-induced lung disease. In: Katzenstein AA, Askin FB, eds. Katzenstein and Askin's surgical pathology of non-neoplastic lung disease. Saunders, Philadelphia, 3<sup>rd</sup> ed. 1997;4:81-111.
164. **Mikuniya T, Nagai S, Tsutsumi T, Morita K, Mio K, Satake N, Izumi T.** Proinflammatory or regulatory cytokines released from BALF macrophages of healthy smokers. *Respiration* 1999;66[5]:419-426.
165. **Möller W, Kohlhäufel M, Häußinger K, Heyder J.** Pneumologische Diagnostik mit Modellaerosolen. *Pneumologie* 2002;56(8):503-510.
166. **Morgenroth K.** Das Surfactantsystem der Lunge. De Gruyter Berlin New York 1986.
167. **Morr H, Bergfeld S.** Occurrence and significance of paraneoplastic syndromes in bronchial cancer. *Pneumologie* 1991;45(7):557-564.
168. **Morrow MR, Taneva S, Simatos GA, Allwood LA, Keough KMW.** <sup>2</sup>H NMR studies of the effect of pulmonary surfactant SP-C on the 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine headgroup: a model for transbilayer peptides in surfactant and biological membranes. *Biochemistry* 1993;32:11338-11344.
169. **Mountain CF.** Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 1997;111(6):1710-1717.
170. **Müller-Quernheim J.** Bronchoalveoläre Lavage. In: Labor und Diagnose, Thomas U (Hrsg). Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg 1992 S.1764ff.
171. **Neurohr C, Leuchte H, Villena H, Behr J.** Regulation der Interleukin-8-Freisetzung durch Cyclosporin A, FK 506, Mycophenolat Mofetil und Prednisolon in primär isolierten humanen Bronchialepithelzellen in Air-Liquid-Interface-Kultur. *Pneumologie* 2003;S1:40,P251.
172. **Niell HB.** Extensive stage small cell lung cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2001;2(1):71-76.
173. **Niitsu N.** Evaluation of pulmonary function and bronchoalveolar lavage fluid in elderly non-Hodgkin's lymphoma before and after COP-BLAM III therapy. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 1994;31(9):705-710.
- 173a. **Nomori H, Horio H, Fuyuno G, Kobayashi R, Morinaga S, Suemasu K.** Serum surfactant protein A levels in healthy individuals are increased in smokers. *Lung* 1998;176(6):355-61.

174. **Olsen GN, Gangemi JD.** Bronchoalveolar lavage and the immunology of primary lung cancer. *Chest* 1987;87(5):677-683.
175. **Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Haagsman HP, van Golde LMG, Demel RA.** Interaction of lipid insertion into monomolecular layers by lung surfactant proteins SP-B and SP-C. *Biochemistry* 1991;30:8276-8281.
176. **Osanai K, Takahashi K, Sato S, Iwabuchi K, Ohtake K, Sata M, Yasui S.** Changes of lung surfactant and pressure-volume curve in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Appl Physiol* 1991;70(3):1300-1308.
177. **Otto-Verberne CJM, Ten Have-Oproek AAW, Willems LNA, Franken C, Kramps JA, Dijkmann JH.** Lack of type II cell and emphysema in human lungs. *Eur Respir J* 1991;4:316-323.
178. **Pasini F, Pelosi G, De Manzoni G, Rosti G.** High dosis chemotherapy in small cell lung cancer. *Tumori* 2002;88(3):179-186.
179. **Patel JM.** Metabolism and pulmonary toxicity of cyclophosphamide. *Pharmac Ther* 1990;47:137-146.
180. **Pattle RE.** Properties, function, and origin of the alveolar lining layer. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1958;148(931):217-240.
181. **Pattle RE.** Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature* 1955;175:1125-1126.
182. **Pattle RE, Thomas LC.** Lipoprotein composition of the film lining the lung. *Nature* 1961;189:844.
183. **Perlin E, Bang KM, Shah A, Hursey PD, Whittingham WL, Hyshmi K, Campbell L, Kassim OO.** The impact of pulmonary infections on the survival of lung cancer patients. *Cancer* 1990;66(3):593-596.
184. **Persson A, Chang D, Rust K, Moxley M, Longmore W, Crouch E.** Purification and biochemical characterization of CP4 (SP-D), a collagenous surfactant-associated protein. *Biochemistry* 1989;28:6361-6367.
185. **Petermann W, Zurborn K, Barth J.** Die BAL bei Zytostatika-induzierten Lungenveränderungen. *Pneumologie* 1990;44,Sonderheft1:578-579.
186. **Pharmachemie B.V.** Fachinformation zu medac Adriamedac<sup>®</sup>, Haarlem, Niederlande, August 2001.
187. **Pison U, Tam EK, Caughey GH, Hawgood S.** Proteolytic inactivation of dog lung surfactant-associated proteins by neutrophil elastase. *Biochim Biophys Acta* 1989;992:251-257.
188. **Pokieser L, Bernhardt K, Kreuzer A, Schalleschak J.** Klinische Zytologie der Lunge und Pleura. Handbuch und Farbatlas. Springer Wien New York 2001, S.71.
189. **Possmayer F.** A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis* 1988;138(4):990-998.
190. **Postle AD, Heeley EL, Wilton DC.** A comparison of the molecular species composition of mammalian lung surfactant phospholipids. *Comp Biochem Physiol* 2001;129(1):65-73.

191. **Poulain FR, Allen L, Williams MC, Hamilton RL, Hagwood S.** Effects of surfactant apolipoproteins on liposome structure: implications for tubular myelin formation. *Am J Physiol* 1992;262:L730-L739.
- 191a. **Ratjen F, Rehn B, Costabel U, Bruch J.** Age-dependency of surfactant phospholipids and surfactant protein A in bronchoalveolar lavage fluid of children without bronchopulmonary disease. *Eur Respir J* 1996;9(2):328-33.
192. **Registerstelle des EKN (Hrsg).** Krebs in Niedersachsen. Bericht über die Erprobungsphase des EKN mit den Daten von 1996 – 1999. Im Auftrag des Niedersächsischen Ministeriums für Soziales, Frauen, Familie und Gesundheit 2003.
193. **Reida MF, Wright, JR.** Surfactant protein A enhances apoptotic cell uptake and TGF-beta1 release by inflammatory alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285(4):L854-861.
194. **Reynolds H, Newball H.** Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J Lab Clin Med* 1974;84(4):559-573.
195. **Rice WR, Ross GF, Singleton FM, Dingle S, Whitsett JA.** Surfactant-associated protein inhibits phospholipid secretion from type II cells. *J Appl Physiol* 1987;63:692-698.
196. **Rogli VL, Vollmer RT, Greenberg SD, McGavran MH, Spjut HJ, Yesner R.** Lung cancer heterogeneity: a blinded and randomized study of 100 consecutive cases. *Hum Pathol* 1985;16(6):569-579.
197. **Rolston KVI.** The spectrum of pulmonary infections in cancer patients. *Curr Opin Oncol* 2001;13:218-223.
198. **Rosseau S, Hammerl P, Maus U, Gunther A, Seeger W, Grimminger F, Lohmeyer J.** Surfactant protein a downregulates cytokine production evoked by *Candida albicans* in human alveolar macrophages and monocytes. *J Immunol* 1999;163:4495-4502.
199. **Rossi SE, Erasmus JJ, McAdams HP, Sporn TA, Goodman PC.** Pulmonary drug toxicity : radiologic and pathologic manifestations. *Radiographics* 2000;20:1245-1259.
200. **Rossi, GA, Balbi, B, Benatti U, Morelli A, Sacco O, Vassallo F, Ravazzoni C.** Changes in pulmonary surfactant composition following MACC chemotherapy for lung carcinoma. *Eur J Resp Dis* 1987;71(5):400-409.
201. **Roxane Laboratories Inc.** Lidocaine hydrochloride topical solution. Package insert Oct 1996.
202. **Ruppert C, Bagheri A, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Seeger W, Günther A.** Identifizierung und Charakterisierung möglicher Surfactant Protein (SP-)B-Spaltprodukte. *Pneumologie* 2003;57(Suppl.1):S.82(Abstr).
203. **Santosousso M, Divangahi M, Zganiacz A, Xing Z.** Reduced tissue macrophage population in the lung by anticancer agent cyclophosphamide: restoration by local granulocyte macrophage-colony-stimulating factor gene transfer. *Immunobiol* 2002;99[4]:1246-1252.
204. **Schildge J.** Der Einfluss des Inhalationsrauchens auf die Klinik und die bronchoalveoläre Lavage bei Sarkoidose. *Pneumologie* 2003;57(10):585-590.
205. **Schildge J, Klar B, Hardung-Backes M.** Die Mastzelle in der bronchoalveolären Lavage bei interstitiellen Lungenerkrankungen. *Pneumologie* 2003;57:202-207.

206. **Schmekel B, Bos JAH, Khan AR, Wohlfart B, Lachmann B, Wollmer P.** Integrity of the alveolar-capillary barrier and alveolar surfactant system in smokers. *Thorax* 1992;47:603-608.
207. **Schmidt R, Meier U, Yabut-Perez M, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W, Günther A.** Alteration of fatty acid profiles in different pulmonary surfactant phospholipides in acute respiratory distress syndrome and severe pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:95-100.
208. **Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K.** Kompendium Internistische Onkologie. Springer Berlin 1999.
209. **Schulz, H.** Die mikroskopische Anatomie und Pathologie der Lunge. Springer Berlin 1959.
210. **Schumacher U, Mausolf A, Barth J, Welsche U, Petermann W.** Recovery of proteins from the broncho-alveolar lavage fluid proposal for a standardisation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30(1):11-14.
211. **Schürch S, Schürch D, Curstedt T, Robertson B.** Surface activity of lipid extract surfactant in relation to film area compression and collapse. *J Appl Physiol* 1994;77(2):974-986.
212. **Schürch S, Bachofen H, Goerke J, Green F.** Surface properties of rat pulmonary surfactant studied with a captive bubble method: adsorption, hysteresis, stability. *Biochim Biophys Acta* 1992;1103:127-136.
213. **Schürch S, Possmayer F, Cheng S, Cockshutt AM.** Pulmonary SP-A enhances adsorption and appears to induce surface sorting of lipid extract surfactant. *Am J Physiol* 1992;263:L210-218.
214. **Seeger W, Günther A, Thede C.** Differential sensitivity to fibrinogen inhibition of SP-C vs SP-B-based surfactants. *Am J Physiol* 1992;261:L286-291.
215. **Seeger W, Stohr G, Wolf HRD, Neuhof H.** Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer. *J Appl Physiol* 1985;58:326-338.
- 215a. **Shijubo N, Honda Y, Itoh Y, Yamaguchi T, Kuroki Y, Akino T, Kawai T, Abe S.** BAL surfactant protein A and Clara cell 10-kDa protein levels in healthy subjects. *Lung* 1998;176(4):257-65.
216. **Spira A, Ettinger DS.** Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med* 2004;350(4):379-392.
217. **Sporn MB, Roberts AB.** Peptide growth factors and their receptors. Springer New York, 1991.
218. **Stahel RA, Ginsberg R, Havemann K, Hirsch FR, Ihde DC, Jassem J, Karrer K, Maurer LH, Osterlind K, van Houtte P.** Staging and prognostic factors in small cell lung cancer: a consensus report. *Lung Cancer* 1989;5:119-126.
219. **Stamme C, Walsh E, Wright JR.** Surfactant protein A differentially regulates IFN- $\gamma$  and LPS-induced nitrite production by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23(6):772-779.
220. **Stamme C, Wright JR.** Surfactant protein A enhances the binding and deacylation of E. coli LPS by alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1999;276:L540-L547.
221. **Statistisches Bundesamt.** Zweigstelle Bonn, Gesundheitsstatistiken 2004.

222. **Strayer DS, Pinder R, Chander A.** Receptor-mediated regulation of pulmonary surfactant secretion. *Exp Cell Res* 1996;226(1):90-97.
223. **Subramaniam S, Bummer P, Gairola CG.** Biochemical and biophysical characterization of pulmonary surfactant in rats exposed chronically to cigarette smoke. *Fundam Appl Toxicol* 1995;27(1):63-69.
224. **Talati AJ, Crouse DT, English BK, Newman C, Harrison L, Meals E.** Immunomodulation by exogenous surfactant: effect on TNF $\alpha$ -secretion and luminol-enhanced chemiluminescence activity by murine macrophages stimulated with group B streptococci. *Microbes Infect* 2001;3(4):267-273.
225. **Tenner, A. J., S. L. Robinson, J. Borchelt, and J. R. Wright.** Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 1989;264:13923-13928.
226. **Thomas M (federführend), Baumann M, Deppermann M, Freitag L, Gatzemeier U, Huber R, Passlick B, Serke M, Ukena D.** Empfehlungen zur Therapie des Bronchialkarzinoms. *Pneumologie* 2002;56(2):113-131.
227. **Thomas M (federführend), Gatzemeier U, Goerg R, Matthiessen W, Morr H, Schönfeld N, Ukena D, Stamatis G.** Empfehlungen zur Diagnostik des Bronchialkarzinoms. *Pneumologie* 2000;54(8):361-371.
228. **Thomas JS, Lamb D, Ashcroft T, Corrin B, Edwards CW, Gibbs AR, Kenyon WE, Stephens RJ, Whimster WF.** How reliable is the diagnosis of lung cancer using small biopsy specimens? Reports of a UKCCCR Lung Cancer Working Party. *Thorax* 1993;48(11):1135-1139.
229. **Thompson AB, Scholer SG, Daughton DM, Potter JF, Rennard SI.** Altered epithelial lining fluid parameters in old normal individuals. *J Gerontol* 1992;47(5):M171-176.
230. **Tino MJ, Wright JR.** Surfactant protein A stimulates phagocytosis of specific lipids on lymphocyte proliferation in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1996;267:L357-364.
231. **Tiryaki E.** Surfactant in humaner bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit nach Lungentransplantation: Zusammensetzung und Funktion. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Hochschule Hannover, 2000.
232. **Ueda T, Ikegami M, Jobe A.** Surfactant subtypes. In vitro conversion, in vivo function, and effects of serum protein. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149(5):1254-1259.
233. **Vaandrager AB, van Golde LMG.** Lung surfactant proteins A and D in innate immune defense. *Biol Neonate* 2000;77(suppl 1):9-13.
234. **Van Golde LM.** Potential role of surfactant proteins A and D in innate lung defense against pathogens. *Biol Neonate* 1995;76(Suppl1):2-17.
235. **van Golde LMG.** Metabolism of phospholipids in the lung. *Am Rev Respir Dis* 1976;114(5):977-1000.
236. **Van Golde LMG, Batenburg JJ, Robertson B.** The pulmonary surfactant system: Biochemical aspects and functional significance. *Physiol Rev* 1988;68:374-455.

237. **Van Iwaarden JF, van Strijp JAG, Ebskamp MJM, Welmers B, Verhoef J, van Golde LMG.** Surfactant protein A is an opsonin in the phagocytosis of herpes simplex virus type 1 by rat alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1991;61:L204-209.
238. **Veldhuizen EJA, Haagsman HP.** Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochim Biophys Acta* 2000;1467(2):255-270.
239. **Veldhuizen RAW, Yao L, Hearn SA, Possmayer F, Lewis JF.** Surfactant-associated Protein A is important for maintaining surfactant large-aggregate forms during surface-area cycling. *Biochem J* 1996;313:835-840.
240. **Vergnon JM, Boucheron S, Riffat J, Guy C, Blanc P, Emmonot A.** Intestinal pneumopathies caused by busulfan. Histologic, developmental and bronchoalveolar lavage analysis of 3 cases. *Rev Med Interne* 1988;9(4):377-383.
241. **von Neergard K.** Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Z Gesamt Exp Med* 1929;66:373-394.
242. **Walenkamp AM, Verheul AF, Scharringa J, Hoepelmann IM.** Pulmonary surfactant protein A binds to *Cryptococcus neoformans* without promoting phagocytosis. *Eur J Clin Invest* 1999;29(1):83-92.
243. **Watford WT, Wright JR, Hester CG, Yiang H, Frank MM.** Surfactant protein A regulates complement activation. *J Immunol* 2001;167(11):6593-6600.
244. **Weibel ER.** Design and Structure of the Human Lung. in: Fishman AP: Pulmonary Diseases and Disorders. McGraw-Hill Book Company, New York, St. Louis, San Francisco 1980.
245. **White MK, Strayer DS.** Survival signaling in type II pneumocytes activated by surfactant protein-A. *Exp Cell Res* 2002;280(2):270-279.
246. **Whitsett JA, Weaver TE.** Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med* 2002;347(26):2141-2148.
247. **Williams MC.** Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. *Annu Rev Physiol* 2003;65:669-695.
248. **Williams MC.** Conversion of lamellar body membranes into tubular myelin in alveoli of fetal rat lungs. *J Cell Biol* 1977;72:260-277.
249. **Wright JR.** Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiological Reviews* 1997;77:931-962.
250. **Wright JR.** Clearance and recycling of pulmonary surfactant. *Am J Physiol* 1990;259:L1-L12.
251. **Wright JR, Borron P, Brinker KB, Folz RJ.** Surfactant protein A. Regulation of innate and adaptive immun response in lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24(5):513-517.
252. **Wright JP, Youmans DC.** Degradation of surfactant lipids and surfactant protein A by alveolar macrophages in vitro. *Am J Physiol* 1995;268:772-780.
253. **Wright JR, Clements JA.** Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:426-444.

- 
254. **Wu H, Kuzmenko A, Wan S, Schaffer L, Weiss A, Fisher JH, Kim KS, McCormack FX.** Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest* 2003;111(10):1589-1602.
255. **Zelen M.** Keynote address on biostatistics and data retrieval. *Cancer Chemother Rep* 1973; 3/4:31-35.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

<b>ACO</b>	zytostatische Medikamente Adriamycin, Cyclophosphamid, Vincristin
<b>AG</b>	Antigen
<b>AK</b>	Antikörper
<b>BAL</b>	bronchoalveoläre Lavage
<b>BKS</b>	Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit
$\gamma_{ads}$	Oberflächenspannung nach 10 Sekunden statischer Adsorption
$\gamma_{max}$	Mittelwert der während dynamischer Messung bei maximalem Blasenradius ermittelten OFS
$\gamma_{min}$	Mittelwert der während dynamischer Messung bei minimalem Blasenradius ermittelten OFS
<b>CAF</b>	siehe FAC
<b>COP-BLAM</b>	zytostatische Medikamente Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison, Bleomycin, Adriamycin, Procarbazin
<b>COPD</b>	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
<b>CRD</b>	carbohydrate recognition domain, C-terminales Ende von Surfactant-Proteinen
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>DPPC</b>	Dipalmitoylphosphatidylcholin
<b>DGP</b>	Deutsche Gesellschaft für Pneumologie
<b>ELF</b>	epithelial lining fluid
<b>FAC</b>	zytostatische Medikamente 5-Fluouracil, Adriamycin, Cyclophosphamid
<b>FEV 1</b>	forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
<b>FRC</b>	funktionelle Residualkapazität
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten- und Makrophagenstimulierender Faktor
<b>HWZ</b>	Halbwertszeit
<b>ITGV</b>	intrathorakales Gasvolumen
<b>i.v.</b>	intravenös
<b>INF<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>kBq</b>	Kilobequerel
<b>KOF</b>	Körperoberfläche
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>LA</b>	„large aggregates“, große Surfactantaggregate
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MACC</b>	zytostatische Medikamente Methotrexat, Melphalan, Cyclophosphamid, Doxorubicin
<b>MBP</b>	mannose binding protein
<b>MHH</b>	Medizinische Hochschule Hannover
<b>mN/m</b>	Millinewton pro Meter
<b>NSCLC</b>	non small cell lung cancer, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
<b>OFS</b>	Oberflächenspannung
<b>p</b>	Probabilität, Irrtumswahrscheinlichkeit
<b>p O<sub>2</sub></b>	Sauerstoffpartialdruck
<b>p CO<sub>2</sub></b>	Kohlendioxidpartialdruck
<b>PBMC</b>	peripher blood mononuclear cells
<b>PBS</b>	Pulsating Bubble Surfactometer
<b>PC</b>	Phosphatidylcholin
<b>PE</b>	Phosphatidylethanolamin
<b>PET</b>	Polyethylen
<b>PG</b>	Phosphatidylglycerol
<b>PHA</b>	Phythämagglutinin
<b>PI</b>	Phosphatidylinositol
<b>PL</b>	Phospholipide
<b>PP</b>	Polypropylen
<b>PS</b>	Phosphatidylserin
<b>SA</b>	„small aggregates“, kleine Surfactantaggregate
<b>SA/LA</b>	Quotient aus „small aggregates“ und „large aggregates“
<b>s.c.</b>	subcutan
<b>SCLC</b>	small cell lung cancer, kleinzelliges Bronchialkarzinom
<b>SEM</b>	Standardfehler des Mittelwertes
<b>SP-A, -B, -C, -D</b>	Surfactantprotein-A, -B, -C, -D
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor alpha
<b>VC</b>	inspiratorische Vitalkapazität

## 8. Danksagung

Am Ende der Arbeit möchte ich allen danken, die zum Gelingen des Projektes „Dissertation“ beigetragen haben.

In erster Linie sind zu nennen:

Prof. Dr. med. Helmut Fabel für die Überlassung des Themas.

Ganz besonders mein Betreuer Prof. Dr. med. Jens Michael Hohlfeld für alle gewährte Unterstützung, die Geduld und die immer angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ohne die Gelegenheit, Patienten in den Kliniken von Dr. med. Werner Mall (Heidehaus Hannover) und Prof. Dr. med. H. Klein und Prof. Dr. med. Tobias Welte (seinerzeit Universität Magdeburg) bronchoskopisch zu untersuchen, hätte die Arbeit nicht ausgeführt werden können.

Dr. med. Veit J. Erpenbeck verdanke ich viele gute Tipps zum Umgang mit der Software Prism<sup>®</sup>.

Die MTA Marion Schael und Claudia Kelle in der Medizinischen Hochschule und im Fraunhofer Institut haben wertvolle Vorarbeit in Zytologie und Analytik geleistet.

Nicht zuletzt haben Krankenschwestern und Assistenzpersonal in allen beteiligten Häusern gute Gedanken und helfende Hände beigesteuert und so mit zum Gelingen beigetragen.

## 9. LEBENSLAUF

---

### Persönliche Daten

Dieter Specht  
25. 10. 1959 in Hehlen/Krs. Holzminden geboren  
verheiratet, 2 Kinder

---

### Schulbildung und Studium

1969 - 78 Schiller-Gymnasium in Hameln, Abitur  
1978 - 84 Studium an der Medizinischen Hochschule Hannover  
Praktisches Jahr in Leer/Ostfriesland  
1984 Approbation

---

### Berufstätigkeit als Arzt

19.1.84 - 30.6.87 Pathologisches Institut des Nordstadt-Krankenhauses Hannover,  
Chefarzt Prof. Ostertag.  
1.7.87 - 31.3.91 Klinik für Pneumologie im Städtischen Krankenhaus Heidehaus,  
Hannover, Chefarzt Dr. Mall.  
1.4.91 - 31.3.93 Rotationsstelle in die Medizinische Klinik des Nordstadt-Krankenhauses  
Hannover, Chefarzt Dr. Busse. Schwerpunkte: Intensivmedizin,  
Abdomensonographie, Echokardiographie.  
1.4.93 - 30.9.2000 Klinik für Pneumologie, Heidehaus, Chefarzt Dr. Mall.  
Eigenständige Arbeit in allen Funktionsbereichen der Pneumologie  
1.10.2000 - 30.4.2004 Rotation ins Vinzenzkrankenhaus Hannover, Innere Abteilung,  
Chefärzte PD Dr. Hepp/Dr. Meister. Hauptarbeitsfelder: konservative  
Kardiologie, Abdomen-, Echo- und Gefäßsonographie, Geriatrische  
Medizin, Intensivstation, Gastroenterologie.  

---

seit 1.5.2004 Oberarzt in der Abteilung Lungen- und Bronchialheilkunde der  
Karl-Hansen-Klinik, Bad Lippspringe, Chefarzt Prof. Dr. R. Meister

---

### Berufliche Weiterbildung

1989 Fachkunde "Rettungsmedizin"  
1990 "Fachkunde im Strahlenschutz" für Thoraxorgane  
1993 Facharzt für Lungen- und Bronchialheilkunde  
1994 Zusatzbezeichnung "Allergologie"  
1999 Zusatzbezeichnung "Umweltmedizin"  
2003 Facharzt für Innere Medizin  
2003 Qualifikation als Transfusionsbeauftragter

## 10. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die in der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertationsschrift mit dem Titel

**Der Einfluss einer zytostatischen Chemotherapie auf Funktion und Zusammensetzung des pulmonalen Surfactantsystems bei Patienten mit Bronchialkarzinom**

in der Abteilung Pneumologie des Zentrums Innere Medizin der Medizinischen Hochschule Hannover und dem Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin unter der Betreuung von **Prof. Dr. med. J. M. Hohlfeld** ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hannover, 15. 6. 2005

---

Dieter Specht