1. Einleitung

1.1. Das pulmonale Surfactantsystem

1.1.1. Zusammensetzung pulmonalen Surfactants und Bedeutung der Surfactantbestandteile hinsichtlich Surfactantmetabolismus und -funktion

Surfactant (surface active agent) kleidet den Alveolarraum aller Säuger aus und dient, neben anderen, weiter unten beschriebenen Funktionen, in erster Linie der Reduktion der Oberflächenspannung an der Grenzfläche zwischen Lungengewebe und Luft; auf diese Weise verhindert Surfactant den Kollaps der Alveolen insbesondere in der Endexpiration und spielt so eine wichtige Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie der Atemmechanik [54, 281].

Surfactant stellt ein Gemisch aus Lipiden und Proteinen dar [93, 254, 281]. Durch die Untersuchung der extrazellulären Erscheinungsformen pulmonalen Surfactants, welche man mittels bronchoalveolärer Lavage gewinnt, erhält man Aufschluß über die genaue Zusammensetzung:

1.1.1.1. Lipide

Der Lipidanteil des Surfactant beträgt 85-90 %, davon 10-20 % Neutralfette (überwiegend Cholesterin, aber auch freie Fettsäuren und Triglyceride) und 80-90 % Phospholipide. Unter letzteren dominiert das Phosphatidylcholin. Typisch ist der hohe Anteil an Phosphatidylcholin mit zwei gesättigten Fettsäureresten, insbesondere an dipalmitoyliertem Phosphatidylcholin (DPPC). Insgesamt finden sich 70-80 % DPPC. In der Klasse der Phospholipide kommen weiterhin vor: Phosphatidylglycerol (ca. 8 % der Phospholipide), Phosphatidylethanolamin (ca. 5%), Phosphatidylinositol (ca. 3%), Phosphatidylserin (ca. 1,8%), Sphingomyelin (ca. 1,1%) und andere (ca. 5%) [12, 93, 254, 281]. Die Phospholipidzusammensetzung der verschiedenen intra- und extrazellulären Erscheinungsformen pulmonalen Surfactants und die Phospholipidzusammensetzung des Surfactants verschiedener Species sind sehr ähnlich [54, 135]. Die Surfactantphospholipide werden ausschließlich in den Typ-II-Alveozyten de novo oder über einen Deacylierungs-Reacylierungsweg synthetisiert [12, 93, 135, 281].

1.1.1.2. Proteine

Der Proteinanteil pulmonalen Surfactants beträgt ca. 10%, hiervon sind 50 % unspezifische Plasmaproteine und 50 % surfactantspezifische Apoproteine, welche als SP-A, SP-B und SP-C bezeichnet werden [54, 93, 108, 137, 218, 254, 281]. Für ein weiteres beschriebenes Protein, nämlich das SP-D, konnte die Surfactantspezifität noch nicht bewiesen werden [54, 137, 208, 218, 281].

1.1.1.2.1. SP-A

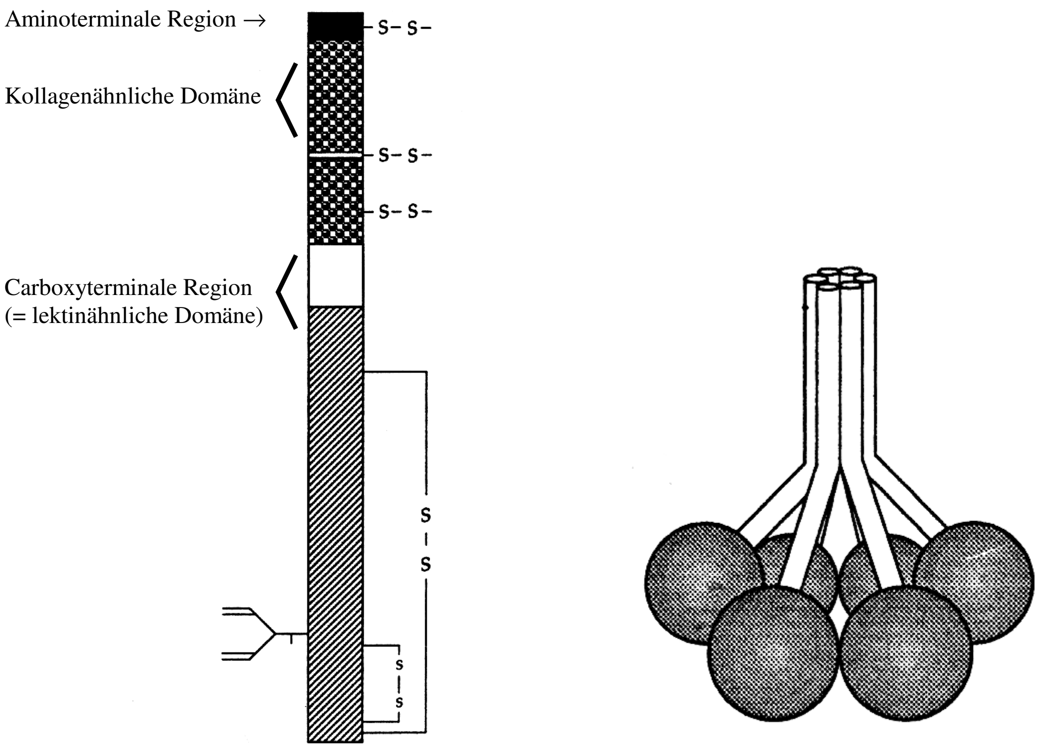
Struktur des SP-A:
SP-A, das größte Surfactantapoprotein, ist ein hydrophiles Glykoprotein, das ca. 3-4% der Surfactantmasse ausmacht, und in Typ-II-Alveozyten und Clarazellen gebildet wird [5, 54, 108, 137, 218, 302, 316]. Humanes SP-A wird von zwei verschiedenen Genen auf dem Chromosom 10 kodiert [54, 76, 108, 310]; das primäre Translationprodukt wird durch verschiedene posttranslationale Vorgänge wie proteolytische Spaltung, Acetylierung, Sulfonierung und Carboxylierung modifiziert, was auch das weite Spektrum bezüglich Molekulargewicht (molekulare Masse des Monomers: 26-38 kDa) und isoelektrischem Punkt (4,4-5,5) erklärt [17, 76, 108, 110, 212, 306].
Die Primärstruktur des SP-A, welche bei verschiedenen Spezies eine auffallende Sequenzhomologie aufweist, umfaßt drei Domänen: der aminoterminalen Region folgt eine kollagenähnliche und schließlich eine lektinähnliche Region (Abb. 1) [17, 54, 97, 98, 108, 110, 301]. Zunächst findet sich eine kurze, aminoterminale Region bestehend aus 7 Aminosäuren; Disulfidbindungen zwischen Cysteinresten an Position 6 sind vermutlich an der Oligomerbildung beteiligt [17, 54, 97, 98, 108, 110, 301]. Es folgt eine kollagenähnliche Domäne, die sich aus 23-24 Tripletts (Glycin-X-Y) zusammensetzt [17, 54, 97, 98, 108, 110, 301]. Diese Region liegt vermutlich als Triple-Helix vor, d.h. man nimmt an, daß sich drei Monomere mit ihren kollagenähnlichen Regionen zu Trimeren zusammenlagern. Sechs dieser Trimere lagern sich zu einem Oligomer, bestehend aus 18 Monomeren, zusammen; typisch ist

die blumenstraußartige Struktur, die durch einen Knick in der kollagenähnlichen Domäne zustandekommt (Abb. 1). Die Stiele des Blumenstraußes werden hierbei durch die aminoterminalen Regionen der Monomere gebildet, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind; die Knickbildung erfolgt im Bereich der kollagenähnlichen Domäne und die „Blüte“ wird jeweils durch die carboxyterminale Domäne gebildet, die eine globuläre Struktur aufweist und große Ähnlichkeit mit Lektinen besitzt (sog. C-Typ-Lektine; es handelt sich um Proteine, die aus einer carboxyterminalen, Kohlenhydrat-bindenden und aus einer aminoterminalen, kollagenähnlichen Domäne bestehen; zu den C-Typ-Lektinen gehört unter anderem auch C1q, die erste Komponente des Komplementsystems [65, 107, 301]) [17, 54, 97, 98, 108, 110, 301].

Abbildung 1

Struktur des hydrophilen Apoproteins SP-A

(Abbildung modifiziert nach [54])



SP-A Monomer

SP-A Oligomer
(bestehend aus 6 Trimeren)

Diese carboxyterminale Region, welche aus einem Verbindungsabschnitt und der eigentlichen Kohlenhydrat-bindenden Region besteht, bindet entsprechend Ca^{2+}-abhängig Kohlenhydrate [94, 107] und ist auch an der Bindung von Phospholipiden, v.a. DPPC, beteiligt [32, 156, 157, 161, 200, 232]. Im Bereich dieser Region finden sich Disulfidbrücken, die der Stabilisierung des Moleküls dienen [17, 54, 97, 98, 301], und eine Glykosilierung an Position 187, die, zusammen mit der KH-Bindungsstelle (SP-A-SP-A-Interaktionen), an der Lipidaggregation [95, 96, 157, 219, 314] und der Virusbindung und -neutralisation [16, 54, 286] durch SP-A entscheidend beteiligt zu sein scheint.

Funktionen des SP-A:

SP-A schreibt man entscheidenden Einfluß auf den Surfactantmetabolismus zu. Einige Studien konnten auch oberflächenaktive Eigenschaften des SP-A aufzeigen. Außerdem besitzt SP-A immunmodulierende Funktionen.

Einfluß des SP-A auf den Surfactantmetabolismus: SP-A ist, zusammen mit SP-B, erforderlich für die Bildung des sogenannten tubulären Myelins, der direkten Vorläuferstruktur des eigentlichen Surfactantoberflächenfilms an der Luft-Wasser Grenzschicht im Alveolarraum [219, 270, 314]. Hierbei scheinen die Eigenschaften des SP-A, Ca^{2+}-abhängig DPPC zu binden [32, 156, 157, 161, 232], Lipide zu aggregieren [95, 96, 157, 219, 314] und die Fusion von Lipidmembranen durch SP-B zu verstärken [219, 314], eine Rolle zu spielen. Wichtig in diesem Zusammenhang erscheint auch die Neigung des SP-A zur Selbstaggregation und SP-A-SP-A-Interaktionen [95, 96]. Im tubulären Myelin liegt SP-A an den Ecken der gitterförmigen Struktur [300]. Darüber hinaus bindet SP-A, vermutlich mit seiner carboxyterminalen Domäne, spezifisch an einen Rezeptor der Typ-II-Alveozyten und hemmt hier die Phospholipidsekretion [63, 159, 160, 226, 318, 321]. Außerdem beschleunigt SP-A die Aufnahme von Phospholipiden durch Typ II-Alveozyten und Alveolarmakrophagen [227, 277, 318, 324].

Einfluß des SP-A auf die oberflächenaktiven Eigenschaften pulmonalen Surfactants: Zahlreiche Studien konnten keine wesentliche Steigerung der Adsorptionsfähigkeit oder der Oberflächenaktivität unter oszillierenden Bedingungen durch das Surfactantapoprotein SP-A aufzeigen [218, 232]. Im Gegensatz dazu konnten in anderen in-vitro Untersuchungen eine gesteigerte Phospholipidadsorption (in einigen Studien an die Anwesenheit des hydrophoben Apoproteins SP-B gebunden) [42, 49, 111, 218, 224, 239, 293, 326], ein Steigerung der Oberflächenaktivität (Reduktion der Anzahl der Pulsationen, die bis zum Erreichen einer Oberflächenspannung von fast 0 mN/m nötig sind) [42, 111, 218, 224, 239, 293, 326] und eine Reduktion der Sensitivität gegenüber surfactantinhibitorischen Proteinen [48, 293] durch SP-A dargestellt werden.

Immunmodulierende Eigenschaften des SP-A: SP-A spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Abwehr inhalierter Keime [218]. SP-A bindet mit hoher Affinität über einen spezifischen Rezeptor an Alveolarmakrophagen und führt zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen [309]. Darüber hinaus fördert SP-A die Chemotaxis von Alveolarmakrophagen [322] und dient als Opsonin bei der Phagozytose verschiedener Erreger wie z.B. dem HSV [285] und Staphylokokkus aureus [183, 284]. Letzteres wird dadurch ermöglicht, daß SP-A sowohl an Alveolarmakrophagen, als auch an verschiedene Strukturen bestimmter Erreger, insbesondere an Endotoxine (= Lipopolysaccharide) gramnegativer Bakterien, bindet, wobei hier die COOH-terminale Domäne mit ihrer Eigenschaft Kohlenhydrate zu binden eine entscheidende Rolle spielt [54, 94, 107, 143, 275, 283, 284]. Außerdem reguliert SP-A die Cytokin- und Immunglobulinsekretion [154] und vermag Viren wie z.B. Influenza-A-Virus zu binden und zu neutralisieren, wobei für letztere Eigenschaft des SP-A die Glykosilierung an Position 187 der COOH-terminalen Domäne essentiell ist [16, 54, 286].

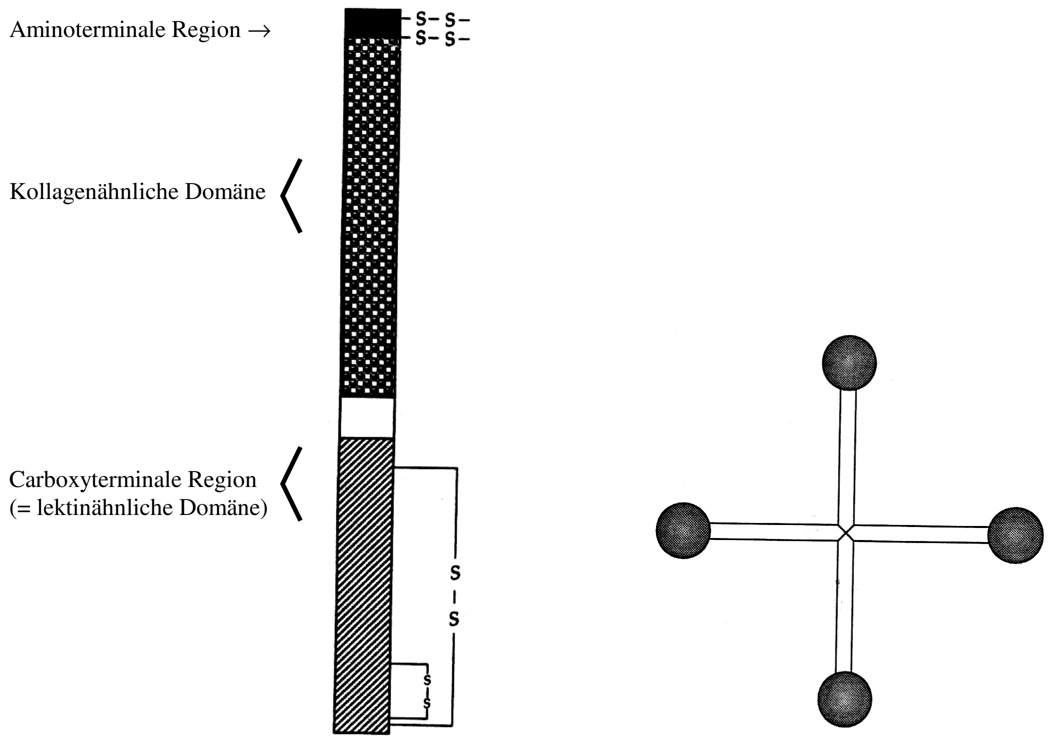
1.1.1.2.2. SP-D

Struktur des SP-D:

SP-D ist ein hydrophiles Glykoprotein, dessen Surfactantspezifität noch nicht eindeutig geklärt ist [54, 56, 92, 173, 208]. Weniger als 10% des SP-D liegen mit Surfactantlipiden assoziiert vor, außerdem wird SP-D-mRNA auch im Gastrointestinaltrakt gefunden und man konnte bis jetzt keinen Einfluß des SP-D auf Surfactantmetabolismus und auf die oberflächenaktiven Eigenschaften pulmonalen Surfactants nachweisen [54, 56, 92, 173, 208].

Die monomere Form des SP-D besitzt ein Molekulargewicht von 43 kDa; sie besteht aus 355 Aminosäuren [54, 56, 92, 173, 208, 256]. SP-D weist eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit mit anderen C-Typ-Lektinen wie z.B. dem SP-A auf [54, 56, 65, 92, 107, 173, 208, 256]. Die Primärstruktur des SP-D umfaßt wie die des SP-A drei Domänen: eine kurze, aminoterminale Region, eine kollagenähnliche Domäne und eine carboxyterminale lektinähnliche Region. Die kollagenähnliche Domäne ist im Gegensatz zur entsprechenden Domäne des SP-A länger (59 Tripletts (Glycin-X-Y)) und weist keine Knickbildung auf (Abb. 2) [54, 56, 92, 173, 208, 256]. Die funktionelle Form besteht wahrscheinlich aus vier kreuzförmig angeordneten, über Disulfidbrücken gebundenen Trimeren (Abb. 2) [54, 56, 92, 173, 208].

Abbildung 2
Struktur des hydrophilen Apoproteins SP-D
(Abbildung modifiziert nach [54])



SP-D-Monomer

SP-D-Oligomer
(bestehend aus 4 Trimeren)

Funktionen des SP-D:

Einfluß des SP-D auf den Surfactantmetabolismus und die oberflächenaktiven Eigenschaften des Surfactant konnten bisher nicht nachgewiesen werden; die einzig bekannte Wechselwirkung zwischen SP-D und Phospholipiden ist die Eigenschaft des SP-D Phosphatidylinositol zu binden, deren Bedeutung aber noch unklar ist [54, 199, 200].

SP-D besitzt jedoch vermutlich wichtige Funktionen bei der lokalen Infektabwehr in der Lunge: SP-D bindet an Alveolarmakrophagen und fördert deren Produktion und Freisetzung von Sauerstoffradikalen [287]. Darüber hinaus vermittelt SP-D die Bindung verschiedener Bakterien, z.B. Pseudomonas aeruginosa oder Klebsiella pneumoniae, an Alveolarmakrophagen [54, 155, 170]. Weiterhin vermag SP-D Mikroorganismen zu agglutinieren, die dann vermutlich schneller durch die mukociliare Clearance beseitigt werden können [54, 155].

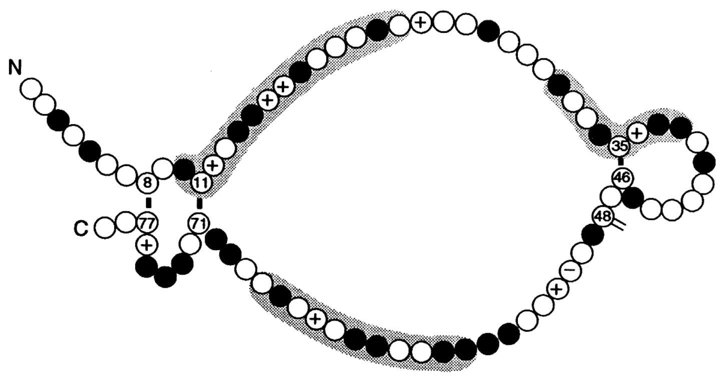
1.1.1.2.3. SP-B

Struktur des SP-B:

SP-B ist ein stark hydrophobes Protein, das zusammen mit SP-C ca. 2% der Surfactantmasse ausmacht und in Typ-II-Alveozyten und Clarazellen gebildet wird [108, 211, 218]. Das Gen für SP-B ist beim Menschen auf dem Chromosom 2 lokalisiert [108, 214]; das primäre Translationsprodukt mit einem Molekulargewicht von 42 kDa wird durch verschiedene posttranslationale Vorgänge wie z.B. proteolytische Abspaltung modifiziert [108, 111, 299]. Das native SP-B besitzt eine Molekularmasse von ca. 8 kDa. Das aktive Protein kommt im Alveolarraum als Monomer (10 %) und als Dimer (90%) vor [108, 136, 139]. Die monomere Form besteht aus 79 Aminosäuren mit einem hohen Anteil an Cystein (Abb. 3), wobei sich eine hohe Sequenzhomologie des SP-B zwischen verschiedenen Säugetierspezies findet [54, 59, 108, 111, 136, 139, 201]. Sechs dieser Cysteine dienen der Ausbildung von drei intramolekularen Disulfidbrücken, wodurch die typische Kringelstruktur und damit eine gewisse Strukturverwandtschaft zu den Serinproteasen (Plasminogen, tPa, Urokinase, Streptokinase, Prothrombin), Haptoglobin und Fibronectin zustande kommt, deren Bedeutung aber noch nicht eindeutig geklärt ist [136, 139]. Die siebte Cysteinaminosäure dient der Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbindung und damit der Ausbildung des SP-B-Dimers [136, 139]. Die Sekundärstruktur des SP-B ist hauptsächlich α-helical [289].

Abbildung 3

Struktur des hydrophoben Apoproteins SP-B
(Abbildung modifiziert nach [136])



Funktionen des SP-B:

SP-B schreibt man entscheidenden Einfluß auf den Surfactantmetabolismus und auf die oberflächenaktiven Eigenschaften pulmonalen Surfactants zu; immunmodulierende Eigenschaften des SP-B konnten dagegen bisher nicht nachgewiesen werden.

Einfluß des SP-B auf den Surfactantmetabolismus: SP-B spielt zusammen mit dem SP-A eine wichtige Rolle bei der Fusion von Lipidmembranen und der Ausbildung des tubulären Myelins [219, 270, 314]. Ob SP-B die Aufnahme von Phospholipiden durch Typ-II-Alveozyten steigern kann, wird kontrovers diskutiert [227, 318].

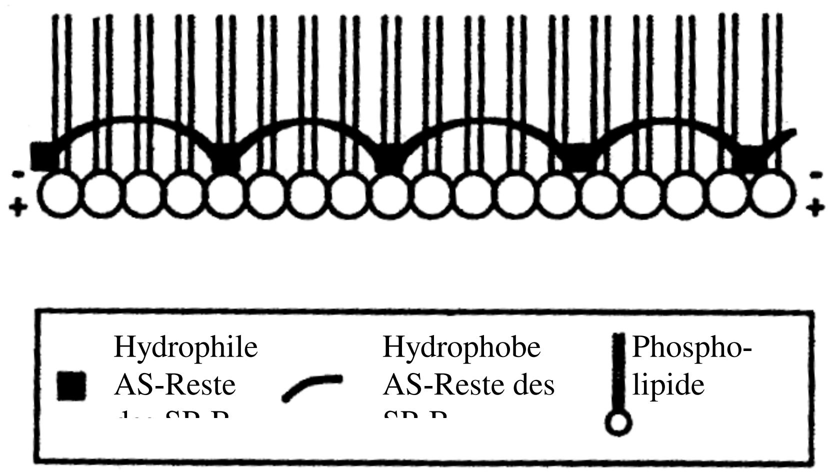
Einfluß des SP-B auf die oberflächenaktiven Eigenschaften pulmonalen Surfactants: SP-B beschleunigt die Phospholipidadsorption an eine Luft-Wasser-Interphase [45, 111, 152, 203, 311, 327]. Die minimalen Oberflächenspannungswerte erreichen bei surfactantähnlichen Phospholipidgemischen in Gegenwart des SP-B deutlich schneller niedrige und letztlich auch niedrigere Oberflächenspannungswerte (nämlich nahe 0 mN/m) als bei reinen Phospholipidgemischen [58, 218, 225, 312, 325, 326]. Hierbei nimmt man an, daß SP-B die Ordnung und Stabilität des PL-Films vor allem während Kompression fördert, wobei Interaktionen zwischen hydrophilen Aminosäureresten des SP-B und polaren Kopfgruppen der Phospholipide einerseits und zwischen hydrophoben Aminosäureresten des SP-B und den Fettsäureresten der Phospholipide andererseits eine entscheidende Rolle spielen dürften (Abb.

4) [6, 45, 91, 297]. Darüber hinaus schreibt man dem SP-B die Eigenschaft zu, der Beeinträchtigung der oberflächenaktiven Eigenschaften pulmonalen Surfactants durch Serumproteine entgegenzustehen [2, 244, 245, 249, 294].

Abbildung 4

Vorstellung über die Wechselwirkungen und die Anordnung des hydrophoben Apoproteins SP-B in einem PL-Monolayer

(Abbildung modifiziert nach [45])



Dargestellt sind die Wechselwirkungen zwischen hydrophilen Aminosäureresten des SP-B und polaren Kopfgruppen der Phospholipide einerseits und zwischen hydrophoben Aminosäureresten des SP-B und Fettsäureresten der Phospholipide andererseits.

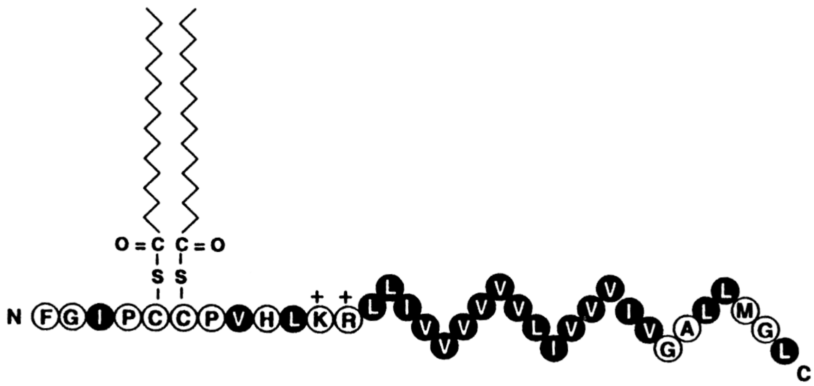
1.1.1.2.4. SP-C

Struktur des SP-C:

SP-C ist das am stärksten hydrophobe Apoprotein, das zusammen mit SP-B ca. 2% der Surfactantmasse ausmacht und ausschließlich in Typ-II-Alveozyten gebildet wird [15, 54, 108, 144, 211, 218]. Zwei Gene für SP-C sind beim Menschen auf dem Chromosom 8 lokalisiert [82]; das primäre Translationsprodukt mit einem Molekulargewicht von 21 kDa wird durch verschiedene posttranslationale Vorgänge wie z.B. proteolytische Abspaltung oder Palmitoylierung modifiziert [54, 60, 82, 108, 268]. Das aktive Protein kommt im Alveolarraum als Monomer und Dimer vor, deren eventuell unterschiedliche Funktion aber noch unklar ist [7, 52, 108]. Die monomere Form besitzt ein Molekulargewicht von 4-6 kDa und besteht aus 33-35 Aminosäuren (Abb. 5), wobei sich eine hohe Sequenzhomologie des SP-C zwischen verschiedenen Säugetierspezies findet [54, 60, 75, 106, 108, 268]. Der hydrophobe Charakter des SP-C kommt v.a. durch eine Dipalmitoylierung an zwei aminoterminalen Cysteinresten und durch eine aus 23 Aminosäuren bestehende carboxyterminale hydrophobe Region mit sechs aufeinanderfolgenden Valinresten zustande (Abb. 5) [54, 60, 75, 108, 268]. Diese hydrophobe Domäne des Moleküls bildet eine α-helicale Struktur, die sich in Phospholipidbilayern parallel zu den Fettsäureketten anordnet [54, 205, 290].

Abbildung 5

Struktur des hydrophoben Apoproteins SP-C
(Abbildung modifiziert nach [54])



F = Phenalalanin	G = Glycin	I = Isoleucin
P = Prolin	C = Cystein	V = Valin
H = Histiden	L = Leucin	K = Lysin
R = Arginin	M = Methionin	

Funktionen des SP-C:

SP-C schreibt man entscheidenden Einfluß auf die oberflächenaktiven Eigenschaften pulmonalen Surfactants zu; Einfluß auf den Surfactantmetabolismus oder immunmodulierende Eigenschaften konnte man dagegen bisher nicht eindeutig nachweisen.

Einfluß des SP-C auf die oberflächenaktiven Eigenschaften pulmonalen Surfactants: SP-C beschleunigt die Phospholipidadsorption an eine Luft-Wasser-Interphase [203, 205, 272, 326]. Die minimalen Oberflächenspannungswerte erreichen bei surfactantähnlichen Phospholipidgemischen in Gegenwart des SP-C deutlich schneller niedrige und letztlich auch niedrigere Oberflächenspannungswerte als bei reinen Phospholipidgemischen [58, 218, 225, 325, 326]. Einige Studien konnten keine wesentliche Unterschiede zwischen den hydrophoben Apoproteinen SP-B und SP-C hinsichtlich der Effizienz der Verbesserung der oberflächenaktiven Eigenschaften pulmonalen Surfactants feststellen [245]. In anderen Studien wiederum erwies sich SP-B als effektiver; Oberflächenspannungswerte nahe 0 mN/m fanden sich hier nur für Surfactantkompositionen, die das hydrophobe Apoprotein SP-B enthielten [58, 218, 325, 326]. Darüber hinaus schreibt man dem SP-C die Eigenschaft zu, der Beeinträchtigung der oberflächenaktiven Eigenschaften pulmonalen Surfactants durch Serumproteine entgegenzustehen, wobei sich SP-C in einigen Studien als weniger effektiv als SP-B erwies [2, 244, 245, 249, 294].

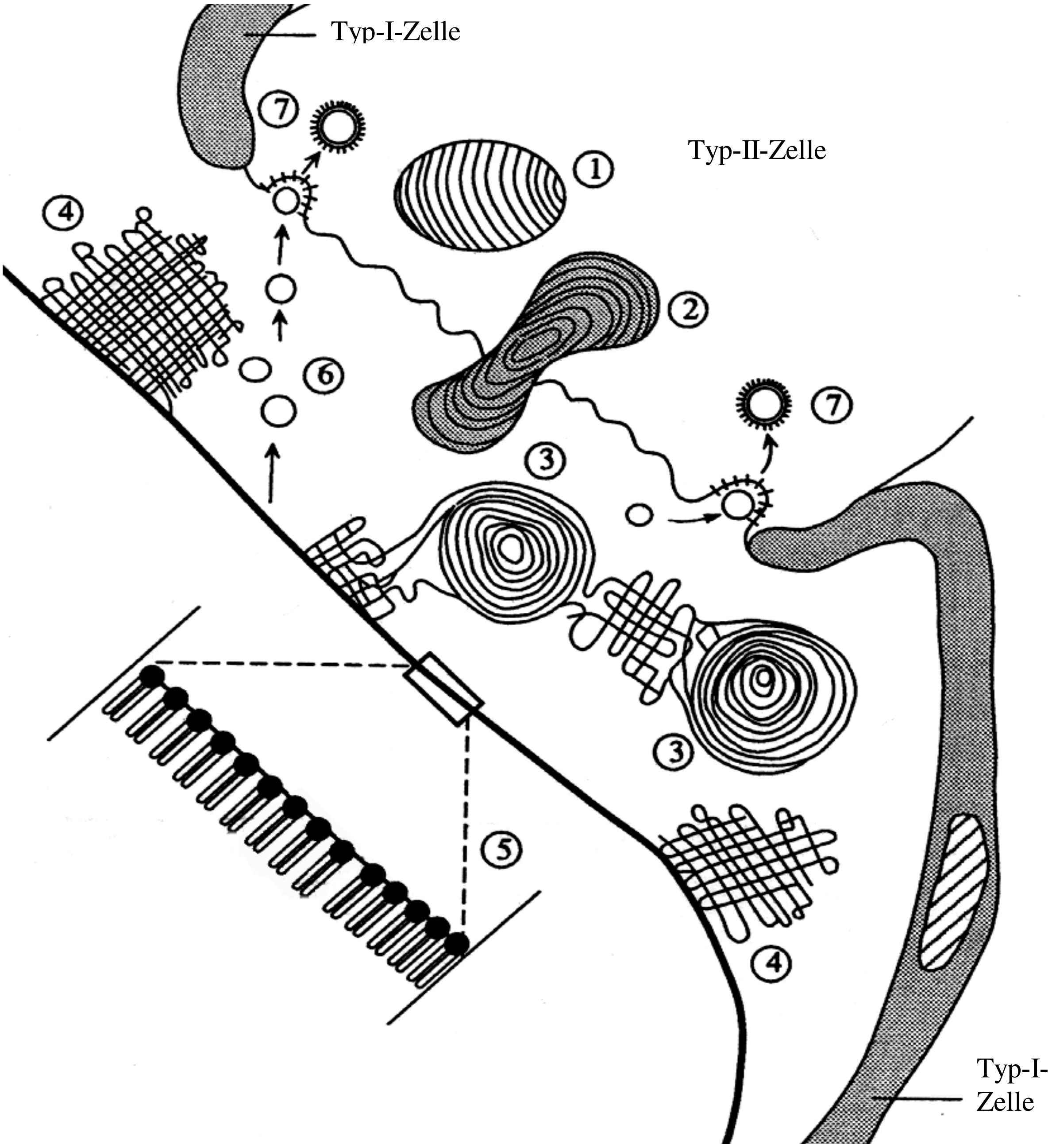
1.1.2. Surfactantmetabolismus

Die einzelnen Surfactantkomponenten werden im endoplasmatischen Retikulum der Typ-II-Alveozyten, z.T. auch in Clarazellen und Trachealepithelzellen gebildet [5, 12, 54, 93, 144, 211, 302, 316, 317]. Die Einzelkomponenten werden anschließend via Golgi-Apparat mittels kleiner Vesikel zu den sogenannten lamellar bodies transportiert, welche die intrazellulären Speicherformen des Surfactant darstellen und in welchen die Vereinigung der einzelnen Surfactantkomponenten stattfindet Die Phospholipide liegen in den Lamellarkörperchen in Form dicht gepackter, konzentrischer Membranen vor [54, 93, 317]. Während die Phospholipidkomposition und der relative Phospholipidgehalt der Lamellarkörperchen weitgehend den extrazellulären Erscheinungsformen pulmonalen Surfactants entprechen, liegen SP-B und SP-C in den Lamellarkörperchen in höheren Konzentrationen vor als SP-A [10, 54, 93, 204].

Nach Exozytose der Lamellarkörperchen wird das sezernierte Surfactantmaterial im Alveolarraum in der alveolären Hypophase in das sogenannte tubuläre Myelin transformiert, eine gitterförmige Struktur aus sich regelmäßig kreuzenden Doppelmembranen, für deren Bildung die Anwesenheit der Apoproteine SP-A und SP-B, nicht dagegen die des SP-C notwendig ist. SP-A befindet sich vermutlich in den Ecken dieser Kreuzungen. Das tubuläre Myelin stellt die direkte Vorläuferstruktur des eigentlichen Surfactantoberflächenfilms an der Luft-Wasser-Grenzschicht im Alveolarraum dar [95, 96, 219, 270, 300, 314]. In diesem Surfactantoberflächenfilm richten sich die Phospholipide entsprechend ihrem amphiphilen Charakter mit ihren hydrophoben Fettsäureresten zur Gasphase und mit ihren hydrophilen Kopfgruppen zur wässrigen Hypophase hin aus [146]. Zwischen dem tubulären Myelin und dem Surfactantoberflächenfilm an der Luft-Wasser-Grenzschicht findet ein ständiger Austausch von Surfactantkomponenten statt (Abb. 6) [54, 93, 317]. Surfactant kann nach der Dichte in ultraschwere, schwere und leichte Fraktionen unterteilt werden, wobei nur die ultraschweren und schweren Fraktionen volle biophysikalische Aktivität in vitro und in vivo aufweisen. Während des alveolären Respirationszyklus findet vermutlich ein Übergang der ultraschweren Fraktionen in schwere und später leichte Fraktionen statt [86, 87, 115, 129].

Abbildung 6

Schematische Darstellung des Surfactantmetabolismus
(Abbildung modifiziert nach [54])



Die einzelnen Surfactantkomponenten werden im endoplasmatischen Retikulum vor allem der Typ-II-Alveozyten gebildet. Die Vereinigung der Surfactantkomponenten und die intrazelluläre Speicherung erfolgen in den sog. Lamellarkörperchen (1). Nach Exozytose der Lamellarkörperchen (2) wird das sezernierte Surfactantmaterial im Alveolarraum in das sogenannte tubuläre Myelin (4) transformiert (3). Aus dem tubulären Myelin bildet sich der Surfactantoberflächenfilm an der Luft-Wasser-Grenzschicht (5). Ein großer Teil des Surfactant wird wieder in die Typ-II-Alveozyten aufgenommen und reutilisiert (6 +7).

Der Abbau des in den Alveolarraum sezernierten Surfactant geschieht über drei Wege: 60-80% des sezernierten Surfactant werden wieder in die Typ-II-Alveozyten aufgenommen und dort reutilisiert, indem die Surfactantkomponenten wieder in die Lamellarkörperchen aufgenommen und anschließend erneut sezerniert werden. Dieser Weg wird heute für alle Surfactantbestandteile angenommen [11, 13, 14, 27, 93, 131, 132, 227, 229, 317, 324]. Die Wiederaufnahme des Surfactant durch Typ-II-Alveozyten wird wesentlich durch SP-A gefördert [227, 277, 318]. 10-20 % des sezernierten Surfactant werden durch Alveolarmakrophagen abgebaut [54, 93, 229, 317, 318]. Schließlich werden weniger als 10 % des sezernierten Surfactant entlang der Atemwege (durch mukoziliare Clearance nach oral), oder ins Blut und in das Lymphsystem abtransportiert, oder durch Transport der Abbauprodukte in andere Organe wie Leber und Niere aus der Lunge entfernt [209, 229, 318].

Surfactantsekretion und -clearance werden durch viele Faktoren beeinflußt [33, 179, 317, 318]. Zahlreiche Studien konnten aufzeigen, daß eine kontinuierliche, flache Atmung zu Hypoxämie, Atelektasenbildung und reduzierter Compliance führt; demgegenüber führen gelegentlich eingestreute tiefe Atemzüge oder eine gesteigerte Ventilation, vor allem durch Steigerung der Atemvolumina, zu einer gesteigerten Surfactantsekretion. Die respirationsvermittelte Dehnung der Typ-II-Alveozyten gilt als wichtigster physiologischer Stimulus der Surfactantsekretion [33, 179, 180, 191, 318]. Weitere Untersuchungen (z.B. Zellkulturstudien) zeigten, daß weiterhin folgende Substanzen zu einer Steigerung der Surfactantsekretion beitragen können: Substanzen, die zu einer gesteigerten cAMP-Bildung in Zellen führen wie z.B. ß-adrenerge Agentien wie Katecholamine [28, 318], cAMP-Analoga [28, 318], Methylxanthine und Choleratoxin [318], weiterhin purinerge Substanzen wie Adenosine und ATP (über cAMP, über einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} oder über eine Aktivierung der Proteinkinase C) [318], Leukotriene (vermutlich vermittelt durch Arachidonsäuremetaboliten) [318], Histamine [318], Antihistamine [318], Vasopressin [318], cholinerge Substanzen [28, 318] und Glucocorticoide [317, 318]. Wesentlicher Inhibitor der Surfactantsekretion ist v.a. SP-A, aber auch z.B. Substanz P [63, 159, 160, 226, 318, 321]. Dem SP-A schreibt man weiterhin entscheidenden Einfluß auf die Surfactantclearance durch Förderung der Surfactantaufnahme durch Typ-II-Alveozyten und Alveolarmakrophage zu; SP-A ist jedoch ohne Einfluß auf die Surfactantaufnahme durch Lungenfibroblasten [227, 277, 318,]. Ob auch die hydrophoben Apoproteine SP-B und SP-C die Surfactantclearance durch Förderung der Phospholipidaufnahme durch Typ-II-Alveozyten beeinflußen können, wird kontrovers diskutiert [13, 227, 318].

Welche Faktoren die Surfactantsynthese, -sekretion und -clearance und somit die Größe des alveolären Surfactantpools in vivo regulieren und ob z. B. eine Feedback-Regulation vorliegt, ist gegenwärtig noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen [318].

1.1.3. Funktionen pulmonalen Surfactants

1.1.3.1. Biophysikalische Funktionen pulmonalen Surfactants und Einfluß auf die Lungenfunktion, den Gasaustausch und den alveolären Flüssigkeitshaushalt

Eine wesentliche Funktion des Surfactant besteht in der Senkung der alveolären Oberflächenspannung, damit der durch die Oberflächenspannung (OSP) mit ihrer Tendenz zur Oberflächenverkleinerung erzeugte intraalveoläre Druck (Kollapsdruck der Alveolen P) entsprechend dem Laplace`schen Gesetz (P= 2 x OSP/r) nicht zum Alveolarkollaps führt. Dies ist vor allem bei sehr kleinem Krümmungsradius der Alveolen, d.h. also in der endexpiratorischen Situation, wichtig. Dazu bildet der pulmonale Surfactant einen Monolayer an der Luft-Wasser-Interphase im Alveolarraum [54, 281].

Allgemein vermögen Phospholipide in wäßrigen Lösungen durch Adsorption an die Luft-Wasser-Grenzfläche die Oberflächenspannung deutlich zu reduzieren (Equilibriumoberflächenspannungswert für Wasser: ca. 70 mN/m; Equilibriumoberflächenspannungswert für eine mit PC gesättigte Interphase: ca. 25 mN/m) [218]. Laterale Kompression eines solchen mit PC gesättigten Films führt zu einer weiteren Reduktion der Oberflächenspannung; für einen dicht gepackten Oberflächenfilm aus gesättigten PC-Molekülen, v.a. DPPC, wurde eine Senkung der Oberflächenspannung bis annähernd 0 mN/m beobachtet [218].

In-vitro-Versuche, z.B. mittels Pulsating Bubble Surfactometer, haben gezeigt, daß nur natürliche Surfactantpräparate oder organische Extrakte dieser natürlichen Surfactantpräparate volle biophysikalische Aktivität aufweisen, d.h. eine rasche Adsorption (meist innerhalb einer Sekunde) mit einem Equilibriumoberflächenspannungswert von etwa 25 mN/m und eine minimale Oberflächenspannung von nahe 0 mN/m meist nach wenigen Oszillationen zeigen, im Gegensatz zu synthetischen apoproteinfreien Phospholipidmixturen mit DPPC als Hauptbestandteil (nur sehr langsame Adsorption, Adsorptionswerte zwischen 40 und 50 mN/m, keine minimale Oberflächenspannung nahe 0 mN/m nach Oszillation) [45, 58, 111, 152, 196, 203, 218, 225, 272, 312, 325, 326, 327]. Rekonstitutionsversuche von PL-Gemischen mit den einzelnen Surfactantapoproteinen zeigten deren große Bedeutung für die biophysikalischen Eigenschaften des Surfactant [45, 58, 111, 152, 196, 203, 218, 225, 272, 312, 325, 326, 327]: Zugabe des hydrophoben Apoproteins SP-B zu verschiedenen PL-Gemischen führte zu einer beschleunigten PL-Adsorption und deutlich niedrigeren

Equilibriumoberflächenspannungswerten als bei reinen PL-Gemischen [45, 111, 152, 203, 311, 327]. Nach Oszillation des Films kam es zu einem weiteren Abfall der Oberflächenspannung auf Werte nahe 0 mN/m [58, 218, 225, 312, 325, 326]. Zahlreiche Untersuchungen zeigten eine ähnliche Effizienz des anderen hydrophoben Apoproteins, nämlich des SP-C, hinsichtlich der Verbesserung der biophysikalischen Eigenschaften [245]. Andere Studien dagegen fanden eine deutlich beschleunigte PL-Adsorption und niedrige Equilibriumoberflächenspannungswerte nach Zugabe des SP-C zu verschiedenen PL-Gemischen, jedoch keine Oberflächenspannungswerte nahe 0 mN/m nach Oszillation des Films [58, 218, 325, 326]. Auch hinsichtlich der Bedeutung des hydrophilen Apoproteins SP-A für die oberflächenaktiven Eigenschaften pulmonalen Surfactants gibt es unterschiedliche Untersuchungsergebnisse: Einige Studien zeigten eine beschleunigte PL-Adsorption und ein schnelleres Erreichen der Oberflächenspannungswerte nahe 0 mN/m durch Zugabe des SP-A zu verschiedenen PL-Gemischen (in einigen Studien an die gleichzeitige Anwesenheit des SP-B gebunden) [42, 49, 111, 218, 224, 239, 293, 326], zahlreiche andere Untersuchungen konnten keine Verbesserung, z.T. sogar eine Verschlechterung der oberflächenaktiven Eigenschaften nach Zugabe des SP-A zu verschiedenen PL-Gemischen nachweisen [218, 232]. Darüber hinaus schreibt man den hydrophoben Apoproteinen SP-B und SP-C die Eigenschaft zu, der Beeinträchtigung der oberflächenaktiven Eigenschaften pulmonalen Surfactants durch Serumproteine entgegenzuwirken [2, 244, 245, 249, 294]; in einigen Studien konnte dies auch für das SP-A nachgewiesen werden [48, 293].

Die Bedeutung der Surfactantapoproteine für die biophysikalischen Eigenschaften pulmonalen Surfactants zeigt sich auch in vivo: die Applikation eines natürlichen organischen Surfactantextraktes führt sowohl beim IRDS [51, 67, 71, 99, 133, 134, 162, 171, 184, 213, 253, 262], im Tiermodell nach induzierter Lungenschädigung [3, 19, 69, 99, 121, 165, 167, 230, 231, 266, 267, 279, 280, 329] wie auch in den seltenen Fällen, in denen eine Surfactantgabe beim ARDS erfolgte [83, 105, 113, 140, 163, 164, 228, 241, 246, 263, 264, 303, 307, 308, 313], zu einer akuten Verbesserung des Gasaustausches und der Lungenfunktion. Darüber hinaus bewirkt die Zugabe eines SP-B-Antikörpers zu einer natürlichen Surfactantpräparation eine Abschwächung der Wirksamkeit dieses Surfactants im Tiermodell [152]. Außerdem erweisen sich Kinder mit kongenitaler alveolärer Proteinose aufgrund einer SP-B-Defizienz (homozygot) und SP-B knockout Mäuse bei homozygotem Defekt des SP-B-Gens als nicht lebensfähig [44, 54, 194, 311]. Tierexperimentelle Untersuchungen ergaben dagegen noch keine eindeutigen Aussagen hinsichtlich der

Bedeutung des SP-A für die biophysikalische Aktivität pulmonalen Surfactants in vivo. So wurde über eine höhere Effektivität von natürlichen, SP-A enthaltenden Surfactantpräparationen im Vergleich zu organischen Surfactantextrakten (ohne SP-A) berichtet [218, 323]. Andere Studien konnten dagegen keine Unterschiede zwischen natürlichen, SP-A enthaltenden Surfactantpräparationen und organischen Surfactantextrakten (ohne SP-A) aufzeigen [185, 218, 323]. Weiterhin scheint die Zugabe eines SP-A-Antikörpers, im Gegensatz zu der eines SP-B-Antikörpers (s.o.), keinen Einfluß auf die Wirksamkeit einer natürlichen Surfactantpräparation in vivo zu haben. Schließlich erwiesen sich SP-A knockout Mäuse im Gegensatz zu SP-B knockout Mäusen als lebensfähig [130, 152].

Das Vorhandensein eines intakten pulmonalen Surfactantsystems ist Voraussetzung für eine ungestörte Lungenfunktion, einen physiologischen Gasaustausch und einen normalen alveolären Flüssigkeitshaushalt. Beeinträchtigungen des pulmonalen Surfactant mit fehlender oder verminderter Reduktion der Oberflächenspannung, z.B im Rahmen des ARDS, betrachtet man als einen wesentlichen Pathomechanismus der Entstehung einer respiratorischen Insuffizienz. In diesem Zusammenhang zu erwähnen sind insbesondere eine Reduktion der Compliance, die Ausbildung eines Lungenödems, alveoläre Instabilität mit Atelektasenbildung, eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Widerstandes und schwere Gasaustauschstörungen, die durch Ventilations-Perfusions-Verteilungsstörungen und ausgeprägten intrapulmonalen Shuntfluß gekennzeichnet sind [19, 21, 26, 51, 99, 121, 140, 145, 162, 165, 167, 184, 192, 210, 228, 231, 246, 253, 266, 267, 279, 280, 329] (genaueres siehe Kap. 1.3.2.1. ARDS).

1.1.3.2. Beteiligung pulmonalen Surfactants bei der Abwehr inhalierter Noxen

Hierbei spielen vermutlich vor allem die hydrophilen Apoproteine SP-A und SP-D eine wichtige Rolle. Ihnen schreibt man in diesem Zusammenhang zahlreiche Eigenschaften zu, u.a.: Bindung an Alveolarmakrophagen und Förderung der Freisetzung von Sauerstoffradikalen [287, 309], Förderung der Chemotaxis von Alveolarmakrophagen [322], Förderung der Phagozytose verschiedener Erreger durch Alveolarmakrophagen [54, 94, 143, 155, 170, 183, 275, 283, 284, 285], Regulation der Cytokin-und Immunglobulinsekretion

[154], Virusbindung und -neutralisation [16, 286] und Aggregation von Mikroorganismen [155].

Den hydrophoben Apoproteinen SP-B und SP-C konnte bisher kein Einfluß auf die Abwehr inhalierter Noxen nachgewiesen werden.

Weitere immunmodulierende Eigenschaften, wie zum Beispiel eine Hemmung der Chemotaxis, der Chemiluminiszenz, der Cytokinsekretion, der TNF-Sekretion und der Phagozytose durch Alveolarmakrophagen, werden möglicherweise durch Phospholipide hervorgerufen, welche auf diese Weise vermutlich zur Suppression inflammatorischer Prozesse in der Lunge beitragen können [1, 4, 112, 261, 276, 315].

1.2. Die Hämostase im alveolären Kompartiment

1.2.1. Aufbau des Fibrinogenmoleküls, Fibrinpolymerisation und Fibrin(ogen)olyse

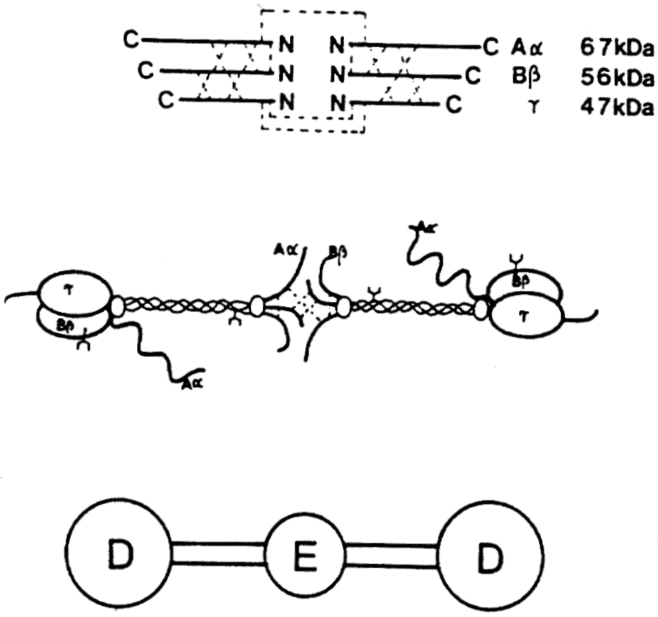
1.2.1.1. Aufbau des Fibrinogenmoleküls

Fibrinogen ist ein Glykoprotein, das sich aus zwei Monomeren zusammensetzt, die jeweils aus drei Polypeptidketten , Aα (610 Aminosäuren, 67 kDa), Bß (461 Aminosäuren, 56 kDa) und γ (411 Aminosäuren, 47 kDa), bestehen (Abb. 7) [61, 64, 77, 176]. Das Fibrinogenmolekül wird durch insgesamt 29 Disulfidbrücken stabilisiert, hat ein Molekulargewicht von ca. 340 kDa und eine stabförmige Struktur mit den Maßen 7 x 45 nm [61, 64, 77, 176]. Aminoterminal sind die beiden Monomere über drei Disulfidbrücken miteinander verbunden und bilden hier die zentrale Domäne, welche dem plasmininduzierten Fragment E entspricht. Hier befinden sich auch die Fibrinopeptide A und B, deren Abspaltung durch Thrombin die Fibrinpolymerisation einleitet (Abb. 7) [61, 64, 77, 176]. Von der zentralen Domäne ausgehend bilden die drei Polypeptidketten spiralige Stränge, die die zentrale Domäne mit jeweils einer distalen Domäne verbinden, die aus den carboxyterminalen Abschnitten der drei Polypeptidketten besteht und die dem plasmininduzierten Fragment D entspricht. So entsteht die typische trinoduläre Struktur (Abb. 7) [61, 64, 77, 176].

Im Bereich der distalen Domäne sind die carboxyterminalen Abschnitte der γ-Kette wichtig für Interaktionen mit Thrombozyten [150], für die Fibrinpolymerisation [43, 291] und die Quervernetzung durch Faktor XIII [41]. Im Bereich der carboxyterminalen Abschnitte der Aα-Kette finden sich Abschnitte, die mit Thrombozyten interagieren [177], und proteasesensitive Bereiche [149]. Proteasesensitive Strukturen finden sich auch im Bereich der spiraligen Stränge. Das Fibrinogenmolekül besitzt außerdem vier Kohlenhydratreste, deren Bedeutung noch nicht vollständig geklärt ist [81], und drei hoch- und 10 niedrigaffine Ca^{2+}-Bindungsstellen, wobei dem Kalzium eine wichtige Rolle bei der Polymerisation von Fibrinmonomeren zukommt [193, 291].

Abbildung 7

Aufbau des Fibrinogenmoleküls
(Abbildung modifiziert nach [61])



Das Fibrinogenmolekül setzt sich aus zwei Monomeren zusammen, die jeweils aus drei Polypeptidketten (Aα, Bß, γ) bestehen.
Typisch ist die trinoduläre Struktur.
E = plasmininduziertes Fragment E (zentrale Domäne)
D = plasmininduziertes Fragment D (distale Domäne)

1.2.1.2. Fibrinpolymerisation

Die Ausbildung eines stabilen Fibringerüstes aus Fibrinogen vollzieht sich in drei Schritten:

1. *Bildung von Fibrinmonomeren durch Abspaltung der Fibrinopeptide A und B*

Initial kommt es unter Einwirkung von Thrombin zur Abspaltung kleiner Peptide, der sogenannten Fibrinopeptide A und B, von den aminoterminalen Abschnitten der Aα- bzw. Bß -Kette im Bereich der zentralen Domäne und damit zur Freilegung von Bindungsstellen, die für die Fibrinpolymerisation essentiell sind. Die Abspaltung des Fibrinopeptides A geschieht dabei deutlich schneller als die des Fibrinopeptides B [29, 43, 64, 74, 102, 166, 188, 202, 252, 291].

2. *Polymerisation der Fibrinmonomere*

Zwischen den durch die Abspaltung der Fibrinopeptide A und B freigesetzten Bindungsstellen im Bereich der zentralen Domäne eines Fibrinogenmoleküls und korrespondierenden Abschnitten im Bereich der distalen Domäne eines anderen Fibrinogenmoleküls kommt es zur Ausbildung non-kovalenter Bindungen [29, 43, 64, 74, 102, 166, 188, 202, 252, 291]. Infolge der schnelleren Abspaltung des Fibrinopeptides A entsteht zunächst präferentiell eine Linearvernetzung des Fibrins mit Ausbildung langer, zweisträngiger, sich überlappender Fibrillen [29, 43, 64, 74, 102, 166, 188, 202, 291]. Im weiteren Verlauf kommt es durch Abspaltung des Fibrinopeptides B auch zur Lateralvernetzung mit Ausbildung dickerer Fibrinfasern [64, 74, 102, 166, 188, 202, 252]. Die dreidimensionale Fibrinmatrix entsteht durch Ausbildung bestimmter Verzweigungspunkte, an denen drei oder vier Fibrinmoleküle beteiligt sind [64, 102, 188, 202].

3. *Quervernetzung der Fibrinmatrix*

Zum Schluß kommt es unter Einwirkung des Faktors XIII und Ca^{2+} zur sogenannten Quervernetzung der Fibrinmatrix mit Ausbildung kovalenter Bindungen, wobei in diesem Zusammenhang zum Beispiel kovalente Bindungen zwischen den γ-Ketten zweier Fibrinmoleküle (sogenannte γ-Dimere), aber auch zwischen γ-Ketten dreier oder vierer Fibrinmoleküle (γ-Trimere bzw. γ-Tetramere) zu erwähnen sind. Kovalente Bindungen entstehen weiterhin auch zwischen α-Ketten und zwischen α- und γ-Ketten [40, 41, 64, 102, 188, 189, 202, 215].

1.2.1.3. Fibrin(ogen)olyse

Wichtigste Aufgabe der Serinprotease Plasmin, die durch Aktivierung des Plasminogens mit Hilfe verschiedener Plasminogenaktivatoren entsteht, ist die proteolytische Spaltung von Fibrin und Fibrinogen [64, 73, 80, 114, 148]. Initial kommt es, sowohl bei Fibrinogen als auch bei nichtquervernetztem Fibrin, durch Abspaltung des carboxyterminalen Endes der Aα-Ketten zur Ausbildung des Fragmentes X (FsX: MG ca. 250 kDa), welches anschließend in die Fragmente D (FsD: MG ca. 90 kDa) und Y (FsY: MG 155 kDa) gespalten wird. Letzteres wird weiter in die Fragmente D und E (FsE: MG 50 kDa) gespalten. Die Fragmente D und E sind die Endprodukte der Fibrin(ogen)olyse [64, 73, 80, 148]. Das Fibrinogenmolekül verliert mit zunehmendem Spaltungsgrad seine Fähigkeit zur Polymerisation. Die Spaltprodukte lagern sich dabei an die entsprechenden komplementären Bindungsstellen an und hemmen so die Polymerisation von Fibrin [64, 80, 114, 148].

Die proteolytische Spaltung von quervernetztem Fibrin führt zu größeren Intermediärprodukten und neben den Fragmenten D und E zu sogenannten D-Dimer-Fragmenten als Endprodukte. Bei letzteren handelt es sich um zwei durch kovalente Bindung zwischen γ-Ketten verbundene D-Fragmente; diese γ-γ-Bindungen können durch Plasmin nicht gespalten werden [41, 78, 80, 148].

1.2.2. Physiologie des alveolären Gerinnungssystems

Die Aktivierung der Gerinnung im alveolären Kompartiment erfolgt überwiegend über den extrinsischen Weg, wobei sowohl alveoläre Epithelzellen als auch Alveolarmakrophagen Thromboplastin (tissue factor) oder Thromboplastin-Faktor-VII-Komplexe sezernieren mit nachfolgender Aktivierung des Faktors X [34, 35, 38, 88, 104, 122, 123, 124, 126, 174, 190, 246, 258]. Für die profibrinolytische Aktivität spielen vor allem Plasminogenaktivatoren vom Urokinasetyp, aber auch t-Pa, eine entscheidende Rolle, welche durch Alveolarmakrophagen und Epithelzellen sezerniert werden und sich, ebenso wie Plasminogen, in der bronchoalveolären Lavage lungengesunder Menschen nachweisen lassen [24, 37, 38, 39, 126, 178, 246, 258].

In der bronchoalveolären Lavage lungengesunder Menschen findet sich eine relativ niedrige prokoagulatorische Aktivität verbunden mit einem hohen Maß an fibrinolytischer Aktivität, so daß unter normalen Umständen eine extravaskuläre Fibrinablagerung in der Lunge nicht beobachtet wird [24, 38, 126, 128, 246]. Außerdem finden sich im alveolären Kompartiment normaler Lungen keine oder nur geringe Mengen an Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, α_2-Antiplasmin, Faktor X, Prothrombin und Fibrinogen. Faktor VII, Faktor V, tissue-factor, Urokinase und Plasminogen sind dagegen vorhanden [38, 126].

1.3. Veränderungen des alveolären Surfactant- und Gerinnungssystems bei pneumologischen Erkrankungen

1.3.1. Pathophysiologie des alveolären Gerinnungssystems

Wie oben erwähnt, wird bei lungengesunden Menschen eine extravaskuläre Fibrinablagerung in der Lunge nicht beobachtet [24, 38, 126, 128, 246]. Im Gegensatz dazu ist die extravaskuläre Fibrinablagerung ein wichtiges Merkmal zahlreicher inflammatorischer Lungenerkrankungen, z.B. beim ARDS, aber auch bei Pneumonitis, bei Sarcoidose und bei idiopathischer pulmonaler Fibrose [20, 34, 88, 104, 123, 128, 174, 190, 246, 298], und läßt sich auch in Tiermodellen mit induzierter Lungenschädigung nachweisen [122, 124, 127]. Diesem extravaskulären Fibrin mißt man eine wichtige Bedeutung bei in der Akutphase der respiratorischen Insuffizienz, z.B. durch Surfactantbeeinträchtigung [20, 84, 101, 242, 243, 244, 246, 248, 250, 274] und durch Potenzierung der akuten inflammatorischen Reaktion (durch Beeinflussung der Chemotaxis, der Gefäßpermeabilität und der Immunmodulation durch Fibrinspaltprodukte) [126, 128, 251, 269], aber auch in der Reparationsphase akuter Lungenschädigungen. Hierbei nimmt man an, daß Fibrin als Matrix für die Anlagerung und Proliferation von Fibroblasten dient mit anschließender Kollagensynthese und Fibrosierung [8, 20, 30, 85, 122, 123, 124, 125, 126, 128, 169, 190, 240, 241, 246, 328]. Im Zusammenhang mit der extravaskulären Fibrinablagerung spielen eine erhöhte kapillar-endotheliale und alveolär-epitheliale Permeabilität mit Übertritt von Plasmaproteinen (z.B. Fibrinogen) in das Interstitium und in den Alveolarraum und eine gesteigerte koagulatorische mit einer reduzierten fibrinolytischen Aktivität im alveolären Kompartiment eine entscheidende ursächliche Rolle [20, 34, 88, 104, 122, 123, 124, 126, 127, 128, 174, 190, 240, 241, 246, 250, 298]. Letzterer Aspekt wurde in zahlreichen Studien untersucht: In der bronchoalveolären Lavage von Patienten mit o.g. Erkrankungen findet sich eine signifikant erhöhte, durch Thromboplastin und Faktor VII vermittelte, prokoagulatorische Aktivität [123, 126, 127, 128, 190, 246, 250]. Die gesteigerte prokoagulatorische Aktivität wird gehemmt durch Antikörper gegen Tissue-Faktor und Faktor VII, durch Concanavalin A, einem Inhibitor des Tissue-Faktors, und durch DFP, einem Inhibitor des Faktors VII. Dies unterstreicht die Bedeutung von Faktor VII und Tissue-Faktor (und damit des extrinsischen Weges) für die gesteigerte prokoagulatorische Aktivität in der bronchoalveolären Lavage dieser Patienten

[123, 128]. Die Erhöhung der prokoagulatorischen Aktivität ist besonders ausgeprägt bei Patienten mit schweren pulmonalen Funktionsstörungen und korreliert signifikant mit dem alveolären Proteinleakage und Surfactantveränderungen [250]. Andererseits findet sich in der BAL oben genannter Patienten eine reduzierte fibrinolytische Aktivität. Anhand der bronchoalveolären Lavagen von ARDS-Patienten ließ sich zeigen, daß diese reduzierte fibrinolytische Aktivität nicht bedingt ist durch eine reduzierte Plasminogen- oder Urokinasekonzentration [20, 126, 127, 128], sondern einerseits durch eine gesteigerte Antiplasminaktivität [20, 126, 127, 128] mit Nachweis gesteigerter Konzentrationen von α_2 -Antiplasmin, α_1-Antitrypsin und α_2- Makroglobulin in der BAL [20, 126, 127, 128] und andererseits durch eine reduzierte Urokinaseaktivität [20, 126, 127, 128, 190], bedingt durch eine gesteigerte Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Aktivität (Bildung von Urokinase-Urokinaseinhibitor-Komplexen [20, 292]) mit Nachweis erhöhter Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Konzentrationen und z.T. auch erhöhter Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-2-Konzentrationen in der BAL [20, 126, 127, 128]. All diese Komponenten, die unter diesen pathophysiologischen Bedingungen in gesteigerter Menge oder überhaupt erst im alveolären Kompartiment auftreten und letztlich für das gestörte Gleichgewicht zwischen koagulatorischer und fibrinolytischer Aktivität verantwortlich sind, entstehen vermutlich, wie oben erwähnt, durch Extravasation in den Alveolarraum, möglicherweise aber auch durch lokale Bildung z.B. in geschädigten Epithelzellen, Fibroblasten oder Alveolarmakrophagen [20, 123, 190].

1.3.2. Veränderungen des Surfactantsystems bei pneumologischen Krankheitsbildern

1.3.2.1. ARDS

Unter dem akuten Lungenversagen (acute respiratory distress syndrome, ARDS) versteht man eine „akute Funktionsstörung der Gasaustauschstrecke der Lunge (Kapillare-Interstitium-Alveole), welche nach unterschiedlichen Auslösern bei vorbestehend Lungengesunden ohne spezielle Prädisposition auftreten kann“ [240]. Eine Studie aus dem Jahre 1972 nennt eine Zahl von 150000 Erkrankungen in den USA pro Jahr mit einer Inzidenz von 75/100000. Neuere Studien beziffern die Inzidenz auf etwa 1,5-3,5 [241, 295]. Diese divergierenden Angaben sind zum Teil auf die bis dato unterschiedlichen Kriterien, die zur Definition des ARDS herangezogen wurden, zurückzuführen. Erst im Jahre 1994 wurden im Rahmen einer Amerikanisch-Europäischen Konsensus-Konferenz zum Thema ARDS vier Kriterien festgelegt, an Hand derer dieses Syndrom nun diagnostiziert werden sollte. Diese Kriterien umfassen den Schweregrad der Gasaustauschstörung, den Tatbestand des akuten Beginns und der beidseitigen Betroffenheit der Lunge durch Infiltrate und die Abwesenheit einer kardiogenen Ursache der Ödembildung. Wenn die Gasaustauschstörungen einen bestimmten Schweregrad nicht erreichen (p_aO_2/F_iO_2 zwischen 300 und 200 mm Hg), wird der Begriff ALI (acute lung injury) vorgeschlagen (Tabelle 1) [18].
In der Pathogenese des ARDS unterscheidet man direkte Lungenparenchymaffektionen durch Effektoren, die über den Alveolarraum Zugang zum Lungenparenchym gewinnen, und indirekte Lungenparenchymaffektionen durch pulmonal-vaskulär eingeschwemmte Effektoren. Zur ersteren Gruppe gehören z.B. die Aspiration von Mageninhalt, die Aspiration von Süßwasser oder Salzwasser (Beinahe-Ertrinken), parapneumonisches ARDS als Folge einer sich diffus ausbreitenden pulmonalen Infektion, die Lungenkontusion, die Inhalation toxischer Gase (NO_2, Ozon, Rauchgas) oder die Intoxikation mit Paraquat. Zur letzteren Gruppe gehören alle Zustände, die zu einer pulmonal-vaskulären Einschwemmung von Produkten aktivierter Kaskadensysteme, aktivierter inflammatorisch-kompetenter Zellen und bakterieller Toxine führen. Hierzu zählen die Sepsis, das Polytrauma, die Verbrennung, aber auch die Pankreatitis oder die Massentransfusion [169, 240, 241, 246]. Im Verlauf der pathogenetischen Sequenz führen die primär alveolär oder pulmonal-vaskulär in das Lungenparenchym gelangten Effektoren zu einer sich perpetuierenden inflammatorischen

Reaktion der Gasaustauschstrecke der Lunge, d.h. des mikrovaskulären, interstitiellen und alveolären Kompartiments.

Tabelle 1 Kriterien des „acute lung injury“ (ALI) und des „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) laut Konsensus-Konferenz [18]

	Timing	Oxygenation	Röntgenthorax	Pulmonalarterieller Druck
ALI-Kriterien	Akuter Beginn	$p_aO_2/F_iO_2<300$ mm Hg (Peep nicht berücksichtigt)	Bilaterale Infiltrate	< 18 mm Hg, wenn gemessen oder kein klinischer Hinweis auf linksventrikuläre Funktionsstörung
ARDS-Kriterien	Akuter Beginn	$p_aO_2/F_iO_2<200$ mm Hg (Peep nicht berücksichtigt)	Bilaterale Infiltrate	< 18 mm Hg, wenn gemessen oder kein klinischer Hinweis auf linksventrikuläre Funktionsstörung

Dieses entzündliche Geschehen ist durch eine exsudative Frühphase und eine proliferativ-fibrosierende Spätphase gekennzeichnet. An dieser inflammatorischen Reaktion der pulmonalen Endstrecke sind eine Vielzahl humoraler Mediatorsysteme und inflammatorisch-kompetenter Zellen beteiligt, deren möglicherweise unterschiedliche Bedeutung hinsichtlich verschiedener klinischer Verläufe des ARDS jedoch gegenwärtig noch unklar ist [169, 240, 241, 246]. Es resultieren folgende, für das ARDS typische, pathophysiologische und klinische Veränderungen [169, 240, 241, 246]:

- Anstieg der kapillar-endothelialen und der alveolär-epithelialen Permeabilität mit einer Exsudation plasmaproteinreicher Flüssigkeit in das Interstitium und später in den Alveolarraum (plasma leakage), d.h. Ausbildung eines interstitiellen bzw. alveolären Lungenödems. Zu der Ödembildung dürfte auch die in Folge der Surfactantbeeinträchtigung auftretende Zunahme der alveolären Oberflächenspannung mit Atelektasenbildung und Abnahme des interstitiellen, perivaskulären Druckes und daraus resultierender Flüssigkeitsverschiebung aus dem pulmonalen Gefäßbett in das Interstitium und den Alveolarraum beitragen (entsprechend dem Starling`schen Gesetz) [26, 72, 145, 192, 240, 241, 246].

- Erhöhung des pulmonalarteriellen Widerstandes infolge einer gesteigerten Freisetzung vasoaktiver Mediatoren (z.B. Thromboxan A_2) und der überschießenden, hypoxischen Vasokonstriktion mit einer konsekutiven inhomogenen Verteilung der pulmonalen Perfusion [169, 240, 241, 246].

- Alveoläre Instabilität mit Atelektasenbildung und konsekutiver inhomogener Verteilung der Ventilation [169, 240, 241, 246].

- Schwere Gasaustauschstörungen, die durch Ventilations-Perfusions-Verteilungsstörungen und ausgeprägten intrapulmonalen Shuntfluß gekennzeichnet sind [169, 240, 241, 246].

- Abnahme der Dehnbarkeit der Lunge (Compliance) [169, 240, 241, 246].

Im weiteren Verlauf des ARDS können sekundäre, aggravierende Komplikationen auftreten, die zur Perpetuierung des inflammatorischen Geschehens beitragen. Hierzu gehört zum Beispiel das Auftreten sekundärer, nosokomialer Pneumonien. Die Inzidenz nosokomialer Pneumonien bei ARDS-Patienten wird z.T. mit mehr als 70 % angegeben, und die Letalität des ARDS steigt bei Auftreten einer sekundären Pneumonie signifikant an. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei die Beeinträchtigung der Host-Defense-Mechanismen im alveolären Kompartiment unter den Bedingungen des ARDS. Hierzu zählen unter anderem die Beeinträchtigung des Flimmerepithels mit beeinträchtigter mukoziliarer Clearance wie auch der proteolytische Abbau der als unspezifische Opsonine des Alveolarraums geltenden Surfactantapoproteine SP-A und SP-D. Es resultiert eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber nosokomialen Entzündungen. Darüber hinaus kommt es insbesondere bei beatmeten Patienten zu einer vermehrten mikrobiellen Beladung der Lunge, die durch Mikroaspiration und durch retrograde Keimaszension aus dem Gastrointestinaltrakt hervorgerufen wird [169, 240, 241, 246]. Weitere sekundäre, aggravierende Komplikationen können auch durch therapeutische Interventionen zur Verbesserung des Gasaustausches hervorgerufen werden. So muß angenommen werden, daß „durch erhöhte Beatmungsdrücke sekundär inflammatorisch-proliferative Prozesse unterhalten oder sogar induziert werden können“ [169, 240, 241, 246]. Weitere Komplikationen betreffen systemische Auswirkungen des ARDS. Diese umfassen die Folgen einer arteriellen Hypoxämie und die Ausbildung einer Sepsis mit Multiorganversagen, ausgehend von einer sekundären, nosokomialen Pneumonie oder als Ursache des ARDS [169, 240, 241, 246].

Das ARDS weist mit 50-90 % eine erschreckend hohe Mortalität auf [241]. Die Prognose des ARDS ist stadienabhängig. Die akute, exsudative Phase des ARDS kann prinzipiell folgenlos, d.h. ohne persistierende Einschränkung der Lungenfunktion, ausheilen. Oft kommt es jedoch, möglicherweise getriggert durch persistierende Fibrinablagerungen in atelektatischen Lungenbezirken, aber auch durch aufgepropfte, nosokomiale Infektionen, zur Fibroblastenaktivierung mit resultierender irreversibler Lungenfibrose mit narbigem Umbau („honey combing“). Mit Erreichen dieses Stadiums verschlechtert sich die Prognose erheblich, selbst im Falle des Überlebens bleiben die fibrotischen Veränderungen mit einer entsprechenden Einschränkung der Lungenfunktion bestehen [8, 20, 30, 85, 122, 123, 124, 125, 126, 128, 169, 190, 240, 241, 246, 328].

Welche Rolle spielt nun eine Beeinträchtigung des pulmonalen Surfactantsystems im Rahmen des ARDS? Frühe postmortem-Untersuchungen von Lungen von ARDS-Patienten lieferten Hinweise auf eine schwere Beeinträchtigung der Surfactantfunktion bei ARDS-Patienten [210, 246] und in mehreren klinischen Untersuchungen konnte bislang eine erniedrigte biophysikalische Aktivität des pulmonalen Surfactant in bronchoalveolären Lavagen von ARDS-Patienten dargestellt werden [84, 101, 217, 246]. Die oben skizzierten klinischen und pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen des ARDS sind vermutlich zumindest entscheidend mitbedingt durch eine Beeinträchtigung des pulmonalen Surfactant [246]. Folgerichtig konnte eine Verbesserung des Gasaustausches und der Compliance in Tiermodellen mit ARDS-ähnlichen Lungenveränderungen [3, 19, 69, 99, 121, 165, 167, 230, 231, 266, 267, 279, 280, 329] und bei ARDS-Patienten [83, 105, 113, 140, 163, 164, 169, 195, 228, 241, 246, 263, 264, 307, 303, 308, 313] nach Surfactantapplikation beobachtet werden. Zu der Beeinträchtigung der pulmonalen Surfactantaktivität beim ARDS dürften folgende Faktoren beitragen:

- Quantitative Veränderungen einzelner Surfactantkomponenten z.B. durch Störung der Surfactantsynthese, des Surfactantmetabolismus und der Surfactantsekretion durch direkte Schädigung der Typ-II-Alveozyten [246]. Auch der Übertritt von Plasmaphospholipiden in den Alveolarraum im Rahmen der erhöhten endothelialen und epithelialen Permeabilität und die Ansammlung von Membranphospholipiden geschädigter Zellen tragen vermutlich zu den Veränderungen des Phospholipidprofils bei [246]. Entsprechend findet man in Lavagen von ARDS-Patienten allenfalls eine leichte Reduktion des Gesamtphospholipidgehaltes, aber einen deutlichen Abfall des relativen Gehaltes der biophysikalisch wichtigen Phospholipide Dipalmitoylphosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol, eine Zunahme des relativen Gehaltes an Phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin und eine Erniedrigung der Konzentration der Surfactantapoproteine SP-A und SP-B [84, 101, 169, 217, 246].

- Inaktivierung pulmonalen Surfactants durch inflammatorische Mediatoren [46, 47, 118, 169, 216, 236, 246, 247]. In diesem Zusammenhang sind die erhöhten phospholipolytischen und proteolytischen Aktivitäten zu nennen, die einen Abbau einzelner Surfactantkomponenten bewirken. Außerdem ist ein negativer Einfluß dieser Mediatoren (z.B. TNFα) auf die Expression der Surfactantapoproteine festzustellen.

- Surfactantinhibition durch Plasmaproteine. Im Rahmen des ARDS kommt es zu einem Anstieg der kapillar-endothelialen und der alveolär-epithelialen Permeabilität mit einer Exsudation plasmaproteinreicher Flüssigkeit in das Interstitium und später in den Alveolarraum (plasma leakage). In der BAL von ARDS-Patienten läßt sich ein entsprechend erhöhter Proteingehalt nachweisen. Zu diesen Proteinen gehören Albumin, Hämoglobin, v.a. aber auch Fibrinogen, welches im Verlauf akuter und chronischer inflammatorischer Erkrankungen in Fibrin umgewandelt wird. Das morphologische Korrelat dieser gesteigerten alveolären Fibrinbildung stellen die hyalinen Membranen dar. Zugrunde liegt hier ein Anstieg der prokoagulatorischen Aktivität im Alveolarraum, verbunden mit einer Erniedrigung der antifibrinolytischen Aktivität [20, 34, 88, 122, 123, 124, 126, 127, 128, 169, 174, 190, 240, 241, 246, 250, 298].

Zahlreiche in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen zeigten die surfactantinhibitorischen Eigenschaften diverser Plasmaproteine auf [48, 79, 116, 117, 151, 198, 242, 243, 244, 245, 246, 248, 249, 274, 294]. Fibrinogen besitzt in vitro ausgeprägte surfactantinhibitorische Eigenschaften. Als stärkster Inhibitor pulmonalen Surfactants erwies sich jedoch Fibrin, in das die hydrophoben Surfactantbestandteile in großem Umfang inkorporiert werden und die somit der Oberflächenspannungsregulation entzogen werden. Die inhibitorische Kapazität von Fibrinpolymeren übersteigt hierbei die des nativen Fibrinogen um ca. zwei Zehnerpotenzen [242, 243, 248]. Die Inkorporation des pulmonalen Surfactant in Fibrin stellt somit den bedeutendsten Mechanismus der Proteininhibition des Surfactant dar. Weitere in-vitro-Untersuchungen zeigten die unterschiedliche Sensitivität verschiedener Surfactantlösungen gegenüber den surfactantinhibitorischen Eigenschaften diverser Plasmaproteine auf. Hierbei scheinen die Unterschiede in der Lipid- und/oder Apoproteinzusammensetzung eine Rolle zu spielen, gerade letzterer Aspekt hat vermutlich entscheidende Bedeutung. So konnte gezeigt werden, daß die Zugabe der hydrophoben Apoproteine, insbesondere von SP-B, zu einem synthetischen Phospholipidgemisch (PLM) dessen Resistenz gegenüber Fibrinogen deutlich erhöhte [245]. In Übereinstimmung hiermit weisen klinisch eingesetzte organische Surfactantextrakte mit niedrigem SP-B-Gehalt (Curosurf und Survanta) eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber Fibrinogen auf als solche Surfactantpräparate mit einem hohen Anteil an SP-B (CLSE und Alveofact) [244]. Diese Untersuchungen unterstreichen die Vermutung, daß die hydrophoben Surfactantapoproteine die Eigenschaft haben, der Beeinträchtigung der oberflächenaktiven Eigenschaften des Surfactant durch Serumproteine entgegenzuwirken [2, 244, 245, 249, 294]; in Ergänzung wird diese Eigenschaft in einigen Studien auch dem hydrophilen Apoprotein SP-A zugeschrieben [48, 293].

Die enge Interaktion zwischen pulmonalem Surfactant und Fibrin/Fibrinogen beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Beeinträchtigung der oberflächenaktiven Eigenschaften des Surfactant durch diese Proteine. Umgekehrt konnten neuere in-vitro-Studien zeigen, daß pulmonaler Surfactant Einfluß sowohl auf die Fibrinogenolyse als auch auf die Fibrinolyse nimmt [89, 90]. In diesen Untersuchungen fand sich eine deutliche Hemmung der plasmininduzierten Fibrinogenolyse durch ein apoproteinfreies Phospholipidgemisch [89]. Diese Hemmung der plasmininduzierten Fibrinogenolyse wurde durch Zugabe der hydrophoben Surfactantapoproteine SP-B und SP-C zu dem

Phospholipidgemisch noch deutlich verstärkt, während die Zugabe des hydrophilen Apoproteins SP-A zu dem Phospholipidgemisch nur zu einer sehr moderaten Zunahme der Fibrinogenolyseinhibition führte [89]. Die Surfactantapoproteine alleine hatten keinen wesentlichen Einfluß auf die plasmininduzierte Fibrinogenolyse [89]. Ähnlich wie ein synthetisches Phospholipidgemisch zeigte auch der bovine Surfactantextrakt CLSE eine dosisabhängige Hemmung der plasmininduzierten Fibrinogenolyse [89]. Weitere Untersuchungen machten deutlich, daß verschiedene Surfactantlösungen nicht nur die Fibrinogenolyse, sondern auch, falls inkorporiert in ein Fibringerinnsel, die Fibrinolyse konzentrationsabhängig inhibieren [90, 274].

1.3.2.2. Andere pneumologische Erkrankungen

Störungen des pulmonalen Surfactant spielen auch bei anderen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Beim Atemnotsyndrom des Kindes (IRDS) stellt der Surfactantmangel, bedingt durch die ungenügende Produktion infolge der fetalen Lungenunreife, die Ursache der respiratorischen Insuffizienz dar. Im fortgeschrittenen Stadium trägt auch ein Protein-leakage in den Alveolarraum mit nachfolgender Inhibition von pulmonalem Surfactant zu der respiratorischen Insuffizienz bei. Das Atemnotsyndrom des Neugeborenen ist eine wichtige Ursache neonataler Mortalität und Morbidität und stellt bei Frühgeborenen die häufigste Todesursache dar. Studien aus Schweden geben eine Inzidenz von 0,3 % für alle Neugeborenen und von 14 % für Neugeborene mit einem Gestationsalter < 33 Wochen an. Die Letalität konnte durch Einführung der Surfactantherapie etwa halbiert werden und beträgt gegenwärtig ca. 25 % [51, 54, 67, 71, 133, 134, 162, 171, 184, 213, 253, 262, 281].

Die alveoläre Proteinose des Erwachsenen ist eine chronische Lungenerkrankung unbekannter Ätiologie mit Ablagerung von PAS-positivem Material in der Alveolarlichtung, den Alveolarmakrophagen und den terminalen Bronchiolen. Auffallend ist besonders der hohe Gehalt an Phospholipiden, SP-B, SP-C, SP-A und SP-D in Lavagen von Patienten mit alveolärer Proteinose. Interessanterweise konnte jüngst das Krankheitsbild der alveolären Proteinose bei GM-CSF knockout Mäusen beobachtet werden und folgerichtig durch exclusive Expression in Typ-II-Zellen oder inhalative Applikation von GM-CSF beseitigt werden [54, 55, 119, 222].

Der sogenannten kongenitalen alveolären Proteinose liegt eine Mutation des SP-B-Gens mit resultierendem absolutem SP-B-Mangel zugrunde. Bis heute wurden sechs verschiedene Mutationen des Gens identifiziert. Nur der homozygote Zustand führt zu Entwicklung des Krankheitsbildes. Der SP-B-Mangel ist assoziiert mit einer inkompletten posttranslationalen Spaltung des SP-C und Störungen des Surfactantmetabolismus mit reduziertem Gehalt an Lamellarkörperchen und tubulärem Myelin und einem abnormen Phospholipidprofil. Der erste Fall wurde 1993 beschrieben. Alle bis heute erkrankten Kinder wurden termingerecht geboren und entwickelten in der frühen Neonatalperiode eine schwere, therapierefraktäre respiratorische Insuffizienz mit 100%iger Letalität [54, 194, 311]. In Analogie hierzu erweisen sich homozygote SP-B knockout Mäuse als nicht lebensfähig [44].

Veränderungen des pulmonalen Surfactantsystems sind weiterhin auch bei schweren Formen der Pneumonie und der idiopathischen pulmonalen Fibrose beobachtet worden [54].

1.4. Fragestellung

Vor dem Hintergrund der oben angeführten Aspekte hinsichtlich der engen Interaktion zwischen pulmonalem Surfactant und polymerisierendem Fibrin wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, welchen Einfluß die Surfactantapoproteine SP-A, SP-B und SP-C auf die Inkorporationsrate des Surfactant in Fibrin und, damit verbunden, auf die Fibrinolyse ausüben. Folgende Fragen wurden im Detail untersucht:

- Inwieweit unterscheiden sich Fibringerinnsel nach Inkorporation verschiedener, in ihrer Zusammensetzung unterschiedlicher Surfactantlösungen in ihrer Sensitivität gegenüber der plasmininduzierten Fibrinolyse ?

- Welche Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang den Surfactantapoproteinen zu, d.h. auf welche Weise wird der Einfluß der Surfactantphospholipide auf die plasmininduzierte Fibrinolyse durch die Surfactantapoproteine moduliert ?

- Läßt sich die unterschiedliche Modulation der durch Phospholipide hervorgerufenen Fibrinolyseinhibition durch die Surfactantapoproteine dadurch erklären, daß die Surfactantapoproteine zu einem veränderten Einbau der Phospholipide in ein Fibringerinnsel führen ?

- Haben Surfactantapoproteine per se einen Einfluß auf die Fibrinbildung oder die plasmininduzierte Fibrinolyse ?

- Kommt es neben einer eventuell durch Surfactantapoproteine veränderten Phospholipideinbaurate auch zu einer unterschiedlichen Inkorporation der Surfactantapoproteine in ein Fibringerinnsel selber ?

2. Materialien, Geräte und Methoden

2.1. Materialien und Geräte

Materialien:	AB-Komplex (enthält Avidin und mehrfach-biotinylierte Meerrettich-Peroxidase)	Dako, Hamburg
	ABTS (2,2`-Azino-Di-[3-Ethyl-Benzthiazolinsulfonat(6)]	Boehringer, Mannheim
	Acrylamid	Serva, Heidelberg
	Alveofact (Kälberlungensurfactantextrakt)	Thomae, Biberach
	Ammoniumheptamolybdat	Merck, Darmstadt
	Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
	Anti-Maus-Antikörper (Schaf)	Amersham-Buchler, Braunschweig
	Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
	BCA-Proteinassay	Pierce, via Bender und Hohlbein, München
	Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
	Bradford-Reagenz, bestehend aus:	
	Chloroethanol	Aldrich, Steinheim
	Ethanol	Merck, Darmstadt
	Phosphorsäure 85 %	Merck, Darmstadt
	Serva Blue G 250	Serva, Heidelberg
	1-Butanol	Merck, Darmstadt
	Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
	Chloroform	Merck, Darmstadt
	Diisopropylether	Merck, Darmstadt
	Dipalmitoylphosphatidyl (N-Methyl-^{3}H)-Cholin (Aktivität: 84,1 mCi/mg)	Amersham-Buchler, Braunschweig

Dithiothreitol	Merck, Darmstadt
Dipalmitoylphosphatidylcholin	Sigma, München
EDTA-Dinatriumsalz	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
gereinigtes Humanfibrinogen (25 mg/ml)	Behringwerke, Marburg
^{125}J-markiertes humanes Fibrinogen (200 µCi/mg Fibrinogen)	Amersham-Buchler, Braunschweig
Glycerol 85 %	Mainland, Frankfurt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Mannose	Pierce, München
Mercaptoethanol	Sigma, München
Methanol	Baker, Groß-Gerau
monoklonaler Antikörper gegen humanes SP-A (PE 10; Maus)	T. Akino, Department of Biochemistry, Sapporo, Japan
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
n-Octyl-ß-D-Glucopyranosid	Sigma, München
Phosphatidylglycerol	Sigma, München
humanes Plasmin (10 U/ml)	Boehringer, Mannheim
1-Propanol	Merck, Darmstadt
rekombinantes humanes SP-A	Byk Gulden, Konstanz
Rinderserumalbumin BSA	Paesel & Lorei, Frankfurt
Salzsäure 37 %	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
Sephadex 60	Sigma, Deisenhofen
Serva Blue G 250	Serva, Heidelberg
SP-B-Antikörper (8A5E, monoklonaler	

Ak (Maus) gegen porcines SP-B)	Y. Suzuki Department of Biochemistry, Sapporo, Japan
TEMED	Sigma, Deisenhofen
bovines Thrombin (30 IU/ ml)	Behringwerke, Marburg
Toluol	Merck, Darmstadt
Tricin	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt
(Chemikalien in p.a.-Qualität)	

Lösungen und Puffer:

Acrylamid-Lsg A
(49,5 % Gesamtacrylamid, davon 3 % Bisacrylamid
= 48 g Acrylamid + 1,5 g Bisacrylamid ad 100 ml H_2O)
Acrylamid-Lsg B
(49,5 % Gesamtacrylamid, davon 6 % Bisacrylamid
= 46,5 g Acrylamid + 3 g Bisacrylamid ad 100 ml H_2O)
Äquilibrierungspuffer
(5mM Tris/Cl pH 7,4 + 1 mM $CaCl_2$ + 0,02% Natriumazid)
Anodenpuffer
(0,2 M Tris in H_2O)
APS
(10 % Ammoniumperoxodisulfat in H_2O)
Elutionspuffer
(5 mM Tris/Cl pH 7,4 + 2 mM EDTA-Dinatriumsalz + 0,02%Natriumazid)
Entfärbelösung
(10 % Eisessig in H_2O)
Extraktionspuffer
(5 mM Tris + 6mM n-Octyl-ß-D-Glucopyranosid, pH 7,8)

Färbelösung
(10 % Eisessig + 0,025 % Serva Blue G in H_2O)
Fixierlösung
(50 % Methanol + 10 % Eisessig in H_2O)
Gelpuffer
(3 M Tris/Cl pH 8,45 + 0,3 % SDS in H_2O)
Kathodenpuffer
(0,1 M Tris + 0,1 M Tricin + 0,1 % SDS in H_2O)
LH-60-Puffer
(47,5 % CH_3OH, 47,5 % $CHCl_3$, 5% 10^{-1} N HCl)
PBS-Puffer
(N_2HPO_4 2,9 g/l, NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, KH_2PO_4 0,2g/l in H_2O)
Probenpuffer
(4 % SDS + 12 % Glycerol + 50 mM Tris + 0,1 % Serva Blue G in H_2O)
Probenpuffer, denaturierend
(Probenpuffer + 2 % Mercaptoethanol in H_2O)
Substratlösung
(20 mg ABTS, 10 µl 30 % H_2O_2, 30 ml Substratpuffer)
Substratpuffer
(60 mM Natriumacetat-Trihydrat,
50 mM Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat pH 4,2)
Überschichtungslösung
(1 M Tris + 0,1 % SDS + 0,33 M HCl in H_2O)

Geräte:	ß-counter	Canberra Packard
	γ-counter	Canberra Packard
	Elektrophoreseapparatur	von Keutz, Reiskirchen
	ELISA-Photometer 400 V. 1.1.	SLT, Crailsheim
	Dialyseschlauch Cellulose (Cut off 12 kDa)	Sigma, Deisenhofen
	Flachbettschreiber	Rohde und Schwarz, Köln
	Fraktionssammler RediFrac	Pharmacia, Freiburg
	Laborwaage AJ 100	Mettler, Gießen
	Laborzentrifuge Rotanta / RP	Hettich, Tuttlingen

Mikrotiterplatten (Maxisorp, Polysorp)	Nunc, Wiesbaden
Nylonfilter	Nytal, 150 µm Porengröße, Thal SSG Co., Schweiz
Pipetten und Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Janke und Kunkel, Staufen
Speedvac Univapo 150 H	Uniequip, Martinsried
Spektralphotometer Uvicon UV 860	Kontron, München
Tischzentrifuge Mikroliter	Hettich, Tuttlingen
Ultrazentrifuge Omega II 70	Heraeus, Hanau
UV-Detektor Kratos SF 773	BAI, Bensheim
UV-Durchflußphotometer	BAI, Bensheim
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Sorvall RC 5C	Du Pont, Bad Homburg

2.2. Methoden

2.2.1. SP-A-Aufbereitung

2.2.1.1. Reinigung und Isolierung des SP-A mittels Affinitätschromatographie

Zur Reinigung und Isolierung des hydrophilen Apoproteins SP-A wurde die von Kuroki et al. beschriebene Mannose-Affinitätschromatographie durchgeführt, wobei man sich die Eigenschaft des SP-A zu nutze macht, Ca^{2+}-abhängig an Kohlenhydrate zu binden [94, 107, 156, 160].
Verwendet wurden bronchoalveoläre Lavagen vom Kaninchen. Die Lavageflüssigkeit wurde zunächst zur Entfernung von zellulärem Material bei 300 x g zentrifugiert. Nach 48000 x g -Zentrifugation (60 min, 1°C) zur Anreicherung der Surfactantbestandteile wurde das pelletierte Material in 0,9 % iger NaCl-Lösung resuspendiert und auf eine Phospholipidkonzentration von 10 mg/ml eingestellt.
Die Extraktion des hydrophilen Apoproteins SP-A erfolgte wie von Iwaarden et al. beschrieben mittels n-Octyl-ß-D-Glucopyranosid [288]. Dieses Verfahren wurde gewählt, weil bei der Lipidextraktion nach Bligh + Dyer die Gefahr der Denaturierung des SP-A durch Chloroform besteht und weil jüngste Studien die Vermutung nahelegen, daß auch die Butanolextraktion zum Verlust einiger funktioneller Eigenschaften des SP-A führt [54, 257, 288].
Nach Behandlung der resuspendierten Pellets mit einem Potter-Homogenisator wurden ca. 2ml der Lösung (ca. 20 mg Phospholipide) mit 200 ml Extraktionspuffer (5mM Tris, 6mM n-Octyl-ß-D-Glucopyranosid, pH 7,8) versetzt und anschließend unter gleichzeitigem Mischen mit einem Magnetrührer für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert [288]. Zur Delipidierung und Proteinentfernung wurde anschließend eine Ultrazentrifugation (100000 x g, 60 min) durchgeführt [288]. Der resultierende Überstand wurde mit $CaCl_2$ (Endkonzentration 1mM) versetzt und anschließend für die Mannose-Affinitätschromatographie verwandt. Bei maximalem Säulenfluß (5ml/min) wurde die Mannosesäule (Durchmesser 5 cm, Höhe 3 cm, Kapazität 1mg SP-A/ml Gel) zunächst für mehrere Stunden mit Elutionspuffer (5mM Tris/Cl pH 7,4 + 2mM EDTA-Dinatriumsalz + 0,02 % Natriumazid) und anschließend 60 min mit Äquilibrierungspuffer (5mM Tris/Cl pH 7,4 + 1mM $CaCl_2$ + 0,02% Natriumazid) gespült. Nach Reduktion der Flußrate auf 2-3 ml/min wurde die Probe auf die Säule aufgetragen und anschließend so lange mit

Äquilibrierungspuffer gespült, bis das Photometersignal (=279 nm) stabil war. Anschließend wurde mit Elutionspuffer gespült und das Eluat in Fraktionen von 300 Tropfen gesammelt. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Durchflußphotometer, die Signale wurden mit einem Flachbettschreiber aufgezeichnet. Die Peakfraktionen wurden anschließend gepoolt und gegen 150 mM NaCl dialysiert.

2.2.1.2. Beurteilung der Reinheit des isolierten SP-A mittels SDS-Page

Der Beurteilung der Reinheit des isolierten SP-A diente die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben mittels diskontinuierlicher Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) entsprechend der Methode nach Schägger und Jagow [238]. Verwandt wurden Trenngele mit 10% Polyacrylamid. Die Proteine werden hierbei, nach Denaturierung mit SDS (Sodiumdodecylsulfat), entsprechend ihrer Molekülgröße unter Einwirkung eines elektrischen Feldes in einer Polyacrylamidmatrix aufgetrennt und anschließend angefärbt.

Tabelle 2: Lösungen für die SDS-Page

Lösungen	**Komponenten**
Acrylamid-Lsg A	49,5 % Gesamtacrylamid, davon 3 % Bisacrylamid = 48 g Acrylamid + 1,5 g Bisacrylamid ad 100 ml H_2O
Acrylamid-Lsg B	49,5 % Gesamtacrylamid, davon 6 % Bisacrylamid = 46,5 g Acrylamid + 3 g Bisacrylamid ad 100 ml H_2O
Gelpuffer	3 M Tris/Cl pH 8,45 + 0,3 % SDS in H_2O
Probenpuffer	4 % SDS + 12 % Glycerol + 50 mM Tris + 0,1 % Serva Blue G in H_2O
Probenpuffer, denaturierend	Probenpuffer + 2 % Mercaptoethanol in H_2O
APS	10 % Ammoniumperoxodisulfat in H_2O
Überschichtungslösung	1 M Tris + 0,1 % SDS + 0,33 M HCl in H_2O
Anodenpuffer	0,2 M Tris in H_2O
Kathodenpuffer	0,1 M Tris + 0,1 M Tricin + 0,1 % SDS in H_2O
Fixierlösung	50 % Methanol + 10 % Eisessig in H_2O
Färbelösung	10 % Eisessig + 0,025 % Serva Blue G in H_2O
Entfärbelösung	10 % Eisessig in H_2O

Tabelle 3: Pipettierschema für ein 10 bzw. 16,5 %iges SDS-Page-Gel nach Schägger und Jagow

Lösungen	**Sammelgel**	**Zwischengel**	**Trenngel (10%)**	**Trenngel (16,5%)**
Acrylamid-Lsg A (µl)	800	2020		
Acrylamid-Lsg B (µl)			4240	7000
Gelpuffer (µl)	2480	3330	7000	7000
TEMED (µl)	16	6	14	14
Glycerol (85%) (µl)			2240	2240
H_2O (µl)	6600	4590	7400	4640
APS (µl)	240	90	240	240

Zunächst wurden die Elektrophoreseplatten mit Methanol entfettet, mit Spacern (1,5 mm) versehen und mit Isolierband abgedichtet. Nach Einfüllen der 10%igen Trenn- und der Zwischengellösung und dem Benetzen des oberen Gelrandes mit einigen ml Überschichtungslösung erfolgte die Polymerisation bei Zimmertemperatur in etwa 45 min. Nach Absaugen der Überschichtungslösung wurde das Sammelgel aufgetragen und der Probenkamm eingesetzt. Nach 60 min wurde der Probenkamm entfernt und der Marker und die SP-A-Proben, welche vorher in flüssigem Stickstoff gefroren, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend nach Auflösung in 20-40 µl Probenpuffer + 2% Mercaptoethanol 15 min bei 95 °C inkubiert wurden, in die Kammtaschen pipettiert. Anschließend wurden die Kammtaschen mit Sammelgel überschichtet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte anfangs bei einer Spannung von 30 V und nach Eindringen der Proben in das Sammelgel für weitere 3 h bei 130 Volt. Anschließend wurde das Gel 30 min mit Fixierlösung, dann 90 min mit Färbelösung und über Nacht mit Entfärbelösung behandelt.

Die Reinheit des isolierten SP-A wurde als >95% ermittelt.

2.2.1.3. Quantifizierung des isolierten Kaninchen-SP-A mittels der Proteinbestimmung nach Lowry

Der Quantifizierung des SP-A vom Kaninchen diente die Proteinbestimmung nach Lowry [172]. Grundlage ist die Biuretreaktion: im alkalischen Milieu wird Cu^{2+} durch das Protein zu Cu^{1+} reduziert, welches als farbiger Komplex gebunden wird. Verwendet wurde hierbei Bicinchoninsäure (BCA); zwei Moleküle BCA reagieren mit einem Cu^{1+}-Ion zu einem violetten Chelatkomplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm [259].
Die Durchführung erfolgte mittels eines kommerziellen Kits (Pierce) [260]: Die Proben und Standards (Rinderserumalbumin in Konzentrationsbereichen von 2 µg/ml bis 1,5 mg/ml) wurden in einem Volumen von 50 µl auf Polystyrol-Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) aufgetragen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl BCA-Reagenz (Lösung aus Natriumcarbonat, -bicarbonat und -tartrat und BCA-Detektionsreagenz in 0,2 N NaOH + 0,08 % Cu_2SO_4). Nach 30 min Inkubation bei 37°C erfolgte die photometrische und computergestützte Auswertung bei 550 nm.

2.2.1.4. Quantifizierung des humanen SP-A mittels ELISA

Die Quantifizierung des humanen SP-A erfolgte mittels eines kompetitiven ELISAs, d.h. eines ELISAs, der auf einer Konkurrenz zwischen dem an der Mikrotiterplatte gekoppelten Antigen (rekombinantes humanes SP-A) und dem Probenantigen um die Bindung an den zugegebenen monoklonalen Maus-Antikörper gegen humanes SP-A beruht. Je größer der SP-A-Gehalt der Probe, desto weniger SP-A-Antikörper kann auf der Mikrotiterplatte binden und anschließend nachgewiesen werden.
Verwendet wurden Polystyrol-Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc, Wiesbaden), die zunächst über Nacht mit Antigen (humanes rekombinantes SP-A, Byk Gulden, Konstanz, 100 ng/ml in PBS; 200 µl/well) bei 4°C beschichtet wurden. Überschüssige Bindungsstellen wurden mittels 1%iger Rinderserumalbuminlösung (BSA) in PBS pH 7,4 60 min geblockt.
Es folgte die Vorbereitung der Proben vor Auftrag auf die Platte:
Standard: 250µl monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes SP-A PE 10 [158]
(1: 15000 in 1% BSA/PBS)
+ 25µl Standard (humanes rekombinantes SP-A in verschiedenen

Verdünnungsstufen)

+ 200µl PBS pH 7,4

+ 25µl 20% Triton X-100

Proben: 250µl monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes SP-A PE 10 [158]

(1: 15000 in 1% BSA/PBS)

+ 100µl Probe

+ 125µl PBS pH 7,4

+ 25µl 20% Triton X-100

Anschließend wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

Nach Vorinkubation (60 min, 37 °C) wurden die Proben und Standards auf die Mikrotiterplatten pipettiert (200µl/well) und 90 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS/0,5% Tween gewaschen und daraufhin 200µl einer 1:1000-Verdünnung von biotinyliertem Anti-Maus-Antikörper vom Schaf (in PBS / 1 % BSA) hinzugefügt und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem Antikörper wurde dann dreimal mit PBS/0,5% Tween gewaschen und daraufhin 200µl des in PBS/1% BSA verdünnten sogenannten AB-Komplexes für 60 min auf der Platte inkubiert. Der AB-Komplex enthält mehrfach-biotinylierte Meerrettich-Peroxidase und Avidin, welches nach Komplexbildung mit dem biotinylierten Antikörper und dem Enzym der Verstärkung der Empfindlichkeit des Testes dient. Der SP-A-Nachweis erfolgte dann durch spektralphotometrische Auswertung bei 405 oder 450 nm, nachdem das zugefügte farblose Substrat 2,2`-Azino-Di-(3-Ethyl-Benzthiazolinsulfonat(6)) (ABTS) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (200µl der Substratlösung bestehend aus 20 mg ABTS, 10 µl 30% H_2O_2 und 30 ml Substratpuffer (60 mM Natriumacetat-Trihydrat, 50 mM Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat pH 4,2)) durch die Peroxidase zu einem farbigen Substrat umgesetzt wurde.

2.2.1.5 Beurteilung der Funktionsfähigkeit des isolierten SP-A mittels eines Phospholipidaggregationsassays

Grundlage dieses Tests ist die schon oben erwähnte Eigenschaft des SP-A, Lipide zu aggregieren [95, 96, 157, 219, 314]. Dies macht man sich bei dem Nachweis der Funktionsfähigkeit des isolierten SP-A zu nutze: das isolierte SP-A aggregiert in Gegenwart

von Ca^{2+} ein synthetisches Phospholipidgemisch (PLX = DPPC:PG 7:3 wt/wt), was durch Zunahme der Absorption photometrisch nachgewiesen wird [96].
Konkret wurde hierfür das isolierte SP-A (10-50 µg) lyophilisiert, anschließend in 875 µl Puffer (Elutionspuffer der Mannosesäule) resuspendiert und dann mit 100 µl der PLX-Stammlösung (1mg/ml in Elutionspuffer der Mannosesäule) versetzt. Es folgte die Messung der Absorption bei 400 nm vor Ca^{2+}-Zugabe (baseline) und nach Zugabe von jeweils 25 µl einer Ca^{2+}-Stocklösung (200 mM $CaCl_2$ x 2 H_2O) nach 2, 4 und 6 Minuten [96].

2.2.2. SP-B- und SP-C-Aufbereitung

2.2.2.1. Reinigung und Isolierung der hydrophoben Apoproteine SP-C und SP-B mittels Sephadex-LH-60-Säulenchromatographie

Zur Reinigung und Isolierung der hydrophoben Apoproteine SP-B und SP-C wurde die Gelfiltrationschromatographie mit Sephadex LH-60 durchgeführt [111, 304]. Verwendet wurden bronchoalveoläre Lavagen vom Kaninchen. Die Lavageflüssigkeit wurde zunächst zur Entfernung von zellulärem Material bei 300 x g zentrifugiert. Nach 48000 x g -Zentrifugation (60 min, 1°C) zur Anreicherung der Surfactantbestandteile wurde das pelletierte Material unter Ultraschallbehandlung (25 kHz, 50 W, 30 sec) in 0,9 % iger NaCl-Lösung resuspendiert und auf eine Phospholipidkonzentration von ca. 2-4 mg/ml eingestellt. Pro Säulenlauf wurde die Menge, die ca. 100 mg Phospholipiden entspricht, verwendet.
Zunächst wurden die hydrophoben Bestandteile des Surfactant mittels einer Extraktion nach Bligh und Dyer isoliert [22]. Es handelt sich hierbei um ein zweiphasiges Extraktionsverfahren mit Chloroform und Methanol. Die Extraktion erfolgte in Zentrifugenröhrchen oder Schütteltrichtern. 0,8 Volumenanteile der resuspendierten Pellets wurden mit zwei Teilen Methanol und einem Teil Chloroform versetzt. Die resultierende einphasige Lösung wurde innerhalb von 30 min mehrmals geschüttelt. Anschließend erfolgte die Phasentrennung durch Zugabe von einem Teil Chloroform und einem Teil 0,9%iger NaCl. Die Chloroformphase mit den hydrophoben Surfactantbestandteilen wurde dann unter

Stickstoff getrocknet, in 3-4 ml LH-60-Puffer (47,5 % Ch_3OH, 47,5% $CHCl_3$, 5% 10^{-1} N HCl) resuspendiert und anschließend für die Sephadex-LH-60-Säulenchromatographie verwandt.
Die LH-60-Säule (Durchmesser 1,5 cm, Höhe 100 cm) wurde zunächst mit dem o.g. LH-60-Puffer für mehrere Tage bei 4°C äquilibriert. Nach Auftragen der Probe auf die Säule erfolgte die Gelfiltrationschromatographie bei einem hydrostatischen Druck von 20 cm H_2O und einem Säulenfluß von ca. 0,2 ml/min über 20 Stunden. Die Fraktionen wurden mit einem Fraktionssammler aufgefangen und deren optische Dichte bei 279 nm mit einem Durchflußphotometer gemessen. Die Fraktionen der drei Peaks (SP-B-Dimer, SP-B-Monomer und SP-C) wurden anschließend jeweils gepoolt.

2.2.2.2. Beurteilung der Reinheit der isolierten hydrophoben Apoproteine SP-B und SP-C mittels SDS-Page

Der Beurteilung der Reinheit der isolierten hydrophoben Surfactantapoproteine SP-B und SP-C diente die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben mittels diskontinuierlicher Tricin-SDS-Polyacralamidgelelektrophorese (SDS-Page) entsprechend der Methode nach Schägger und Jagow [238]. Verwandt wurden Trenngele mit 16,5 % Polyacrylamid, die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Die konkrete Durchführung ist unter 2.2.1.2. beschrieben.
Die Reinheit beider Apoproteine wurde als > 95 % ermittelt.

2.2.2.3. Quantifizierung der isolierten hydrophoben Apoproteine SP-B und SP-C mittels Bradford-Proteinbestimmung

Die Quantifizierung der Peakfraktionen der LH-60-Chromatographie erfolgte mittels der Bradford-Proteinbestimmung [25]. Sie beruht auf den Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und dem Farbstoff Serva blue.
Zur Durchführung wurden definierte Volumina der zu untersuchenden gepoolten Peakfraktionen des Säulenlaufs und Proteinstandards (1, 2, 5, 10 und 20 µg Rinderserumalbumin) zunächst durch Vakuumzentrifugation getrocknet und anschließend in 50 µl Chloroethanol aufgenommen. Nach Zugabe von 800 µl H_2O und 800 µl

Bradfordreagenz (0,01 % Serva blue G 250, 4,75 % Ethanol, 8,5 % Phosphorsäure in H_2O) erfolgte nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur die photometrische Auswertung bei 595 nm. Die erhaltenen Werte wurden wegen der reduzierten Anfärbbarkeit der Apoproteine SP-B und SP-C im Vergleich zu dem als Standard verwendeten Albumin durch den mit rekombinant hergestelltem SP-C ermittelten Korrekturfaktor von 0,66 dividiert [237].

2.2.2.4. Quantifizierung des SP-B mittels ELISA

Zur Quantifizierung des hydophoben Apoproteins SP-B mittels eines Festphasenadsorptions-ELISAs wird die Hydrophobizität des SP-B zur direkten Bindung an die Platte genutzt [153].
Die zu untersuchenden Proben wurden zunächst in 1-Propanol/PBS (Volumenverhältnis 50:50) aufgenommen; die SP-B-Standards (humanes isoliertes SP-B-Dimer) wurden ebenfalls in 1-Propanol/PBS (Volumenverhältnis 50:50) seriell in Konzentrationen von 40 ng/well bis 312,5 pg/well verdünnt. Die Proben und Standards wurden in einem Volumen von 100 µl/well auf Polysorp Mikrotiterplatten überführt, welche anschließend bei 37°C 6 h bis zur Trocknung im Trockenschrank inkubiert wurden. Nach Wiederaufnahme der Proben in 100µl Trifluorethanol (zur homogeneren Verteilung und damit gleichmäßigeren Bindung des SP-B an die Platte) und erneuter Trocknung (37°C, 6h) erfolgten zwei Waschschritte mit jeweils 200 µl Diisopropylether/1-Butanol 3:2 (v/v) zur Entfernung der Phospholipide. Das folgende ELISA-System erfolgte in Anlehnung an Reinke et al. [223]. Nach dreimaligem Waschen mit 200 µl PBS/0,5 % Tween 20 und dem Blocken überschüssiger Bindungsstellen mit PBS/1% Rinderserumalbumin (Inkubation über 2h) erfolgte nach erneutem dreimaligem Waschen mit 200µl PBS/0,5 % Tween 20 die 12stündige Inkubation mit 200µl (2µg/ml in PBS/1% BSA) des SP-B-Antikörpers (8 A5E, monoklonaler Antikörper von der Maus gegen porcines SP-B) [271]. Die nachfolgenden Schritte (Inkubation mit biotinyliertem Anti-Maus-Antikörper, Inkubation mit AB-Komplex, Zugabe des Substrates ABTS und spektralphotometrische Auswertung) erfolgten wie beim SP-A-Elisa beschrieben.

2.2.3. Ermittlung des Phospholipidgehaltes verschiedener Surfactantlösungen mittels colorimetrischer Phosphatbestimmung

Die Grundlage der Ermittlung des Gesamtphospholipidgehaltes verschiedener Surfactantlösungen ist die colorimetrische Phosphatbestimmung [234]. Mit den zu untersuchenden Proben wurde zunächst eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer durchgeführt (s.o.) [22]. Die Chloroformphase wurde anschließend zur colorimetrischen Phosphatbestimmung verwandt. Dazu wurden die Proben (getrocknet oder in organischem Medium) und die Standards (Kaliumdihydrogenphosphat mit 0,2-5 µg Phosphor, entsprechend 4,7- 120 µg Phospholipid) zunächst mit 200 µl 70 %iger $HClO_4$ versetzt und anschließend zur Freisetzung der Phosphatgruppe 60 min bei 200°C in einem Thermoblock inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml 4,6 mM Ammoniumheptamolybdat erfolgte die Reduktion zum Farbkomplex durch Zugabe von 20 µl 650 mM Ascorbinsäure (45 min Inkubation bei 60°C) mit anschließender spektralphotometrischer Auswertung bei 698 nm.

2.2.4. Präparation verschiedener synthetischer und natürlicher Surfactantlösungen

2.2.4.1. Alveofact

Bei Alveofact handelt es sich um einem kommerziell erhältlichen, organischen Extrakt aus Lavagematerial von Kälberlungen, d.h. es enthält die Surfactantphospholipide mit den hydrophoben Apoproteinen SP-C und SP-B, jedoch nicht das hydrophile Apoprotein SP-A. Das als Lyophilisat vorliegende Alveofact wurde zunächst in 150 mM NaCl/3 mM Ca^{2+} resuspendiert und dann kurz geschallt (50 W, 25 kHz, 1 min). Nach Bestimmung des Gesamtphospholipidgehaltes mittels colorimetrischer Phosphatbestimmung erfolgte die Einstellung der Konzentration auf 50mg/ml.

2.2.4.2. Synthetisches Phospholipidgemisch PLX

Zur Herstellung einer synthetischen Phospholipidmixtur (=PLX), welche aus den Surfactantphospholipiden DPPC und PG (7:3 (wt/wt)) besteht, wurden die als Lyophilisat vorliegenden Einzelkomponenten zunächst abgewogen und anschließend in Chloroform/Methanol (2:1 v/v) resuspendiert. Nach Trocknung mittels Vakuumzentrifugation erfolgte die Resuspension in wäßrigem Medium (150 mM NaCl/3 mM Ca^{2+}) durch einminütiges Schallen (50 W, 25 kHz). Nach Bestimmung des Gesamtphospholipidgehaltes mittels colorimetrischer Phosphatbestimmung erfolgte die Einstellung der Konzentration auf 50mg/ml.

2.2.4.3. Rekonstitution der synthetischen Phospholipidmixtur PLX mit den Surfactantapoproteinen

Die Rekonstitution der synthetischen Phospholipidmixtur PLX mit den hydrophoben Surfactantapoproteinen erfolgte durch Zugabe von 0,1-2 Gewichtsprozent (vgl. zum PL) des in organischem Medium (Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) vorliegenden SP-B und/oder SP-C zu der im selben Medium vorliegenden PLX-Stammlösung (50mg/ml). Es folgte die Trocknung mittels Vakuumzentrifugation und die anschließende Resuspension in 150 mM NaCl/3 mM Ca^{2+}.

Die Rekonstitution der synthetischen Phospholipidmixtur PLX mit dem hydrophilen Surfactantapoprotein SP-A erfolgte durch Zugabe von 0,1-2 Gewichtsprozent (vgl. zum PL) des in wäßrigem Medium vorliegenden Proteins zu der in 150 mM NaCl/3 mM Ca^{2+} resuspendierten synthetischen Phospholipidmixtur PLX (50mg/ml).

2.2.4.4. „Large surfactant aggregates“ (LSA) vom Kaninchen

Bei den „large surfactant aggregates“ handelt es sich um die oberflächenaktive Präkurserfraktion des alveolären Surfactantmonolayers.

Die Gewinnung der nativen „large surfactant aggregates“ (enthalten Surfactantlipide und alle Surfactantapoproteine) erfolgte durch Zentrifugation von bronchoalveolären Lavagen vom

Kaninchen bei 300 x g (10 min; 4°C; Zell-Depletion) und dann bei 48000 x g (1h; 4°C). Das pelletierte Material wurde dann in wäßrigem Medium (150 mM NaCl/3 mM Ca^{2+}) resuspendiert und nach Ermittlung des Phospholipidgehaltes mittels colorimetrischer Phosphatbestimmung auf eine Phospholipidkonzentration von 50 mg/ml eingestellt (LSA-Stammlösung).

Zur Gewinnung der organischen Phase der „large surfactant aggregates“ (enthält Surfactantlipide und die hydrophoben Apoproteine SP-B und SP-C, jedoch kein SP-A) wurde ein Teil der LSA-Stammlösung einer Bligh und Dyer-Extraktion zugeführt [22]. Anschließend wurde die Chloroformphase mittels Vakuumzentrifugation getrocknet, in wäßrigem Medium (150 mM NaCl/3 mM Ca^{2+}) resuspendiert und nach Ermittlung des Phospholipidgehaltes mittels colorimetrischer Phosphatbestimmung auf eine Phospholipidkonzentration von 50 mg/ml eingestellt.

Zur Gewinnung der wäßrigen Phase der large surfactant aggregates (enthält nur das hydrophile Surfactantapoprotein SP-A, jedoch keine Surfactantlipide und kein SP-B oder SP-C) wurde ein Teil der LSA-Stammlösung einer Butanolextraktion [257] unterzogen und das getrocknete Sediment resuspendiert und in den gleichen Volumina wie die LSA-Stammlösung in einem Versuch eingesetzt.

2.2.5. Probenvorbereitung

2.2.5.1. Fibrin Plate Assay

Zur Charakterisierung des Einflusses verschiedener Surfactantlösungen auf die plasmininduzierte Fibrinolyse wurde der Fibrin Plate Assay eingesetzt [90, 278]. Dabei wurden auf Mikrotiterplatten mittels Thrombin radioaktiv-markierte ^{125}J-Fibringerinnsel hergestellt, in welche verschiedene Surfactantlösungen unterschiedlicher Konzentration inkorporiert waren. Alle Versuche wurden in Gegenwart von 150 mM NaCl / 3 mM Ca^{2+} durchgeführt. Nach zweistündiger Inkubation mit Plasmin zur Einleitung der Fibrinolyse wurden die Überstände aus den Mikrotiterplatten abpipettiert und die sich im Überstand befindende freigesetzte Radioaktivität als Ausdruck der entstandenen Menge an

Fibrinspaltprodukten in einem γ-counter gemessen und anschließend um die Basisfreisetzung (freigesetzte Aktivität in Gegenwart von 150 mM NaCl/3 mM Ca^{2+}) korrigiert. So konnte die plasmininduzierte Fibrinolyse quantitativ dargestellt und der Einfluß verschiedener, in das Fibringerinnsel inkorporierter Surfactantkomponenten auf die Fibrinolysekinetik untersucht werden.

Zur konkreten Versuchsdurchführung wurden jeweils 30 µl einer wäßrigen Lösung aus Fibrinogen (Konzentration 5mg/ml), ^{125}J-radioaktiv-markiertem Fibrinogen und verschiedenen Surfactantpräparationen unterschiedlicher Konzentration (0-30 mg/ml) (Konzentrationsangaben jeweils bezogen auf 30 µl) mittels Multipipetten auf Mikrotiterplatten aufgebracht. Die Clotbildung erfolgte durch Zugabe von jeweils 20 µl Thrombin (Konzentration 0,01 U/ml). Anschließend wurden die Platten für 90 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Platten zur Konsolidierung der Clots auf der Platte bei 1485 x g für 10 min zentrifugiert. Es folgte die Zugabe von jeweils 200 µl Plasmin (Konzentration 1U/ml) bzw. 200 µl 150 mM NaCl/3 mM Ca^{2+} zur Ermittlung der Basis-freisetzung. Das Gesamtvolumen betrug somit 250 µl/well. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 120 min wurden jeweils 150 µl des Überstandes abpipettiert und die Aktivität in einem γ-counter gemessen. Die in jedem Versuchsansatz mit Plasmin freigesetzte Menge an Radioaktivität wurde um die in Gegenwart von 150 mM NaCl/3 mM Ca^{2+} freigesetzte Aktivität des gleichen Ansatzes (Basisfreisetzung) korrigiert und auf die Ausgangsaktivität bezogen. Die Basisfreisetzung betrug stets weniger als 10 % der Gesamtradioaktivität und ist Ausdruck freier, nicht Protein gebundener Aktivität des Ausgangsmaterials bzw. durch die Thrombinwirkung freigesetzter, ebenfalls J^{125}-markierter Fibrinopeptide.

Folgende konkrete Fragestellungen wurden untersucht:

1. *Einfluß des Kälberlungensurfactantextraktes Alveofact auf die plasmininduzierte Fibrinolyse im Vergleich zu einem apoproteinfreien synthetischen Phospholipidgemisch (PLX)*

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden steigende Mengen des Alveofact bzw. des PLX (0-30 mg/ml) vor der Clotbildung dem radioaktiv-markierten Fibrinogen hinzugefügt.

2. *Einfluß von „large surfactant aggregates“ vom Kaninchen (nativ, organische Phase, wäßrige Phase) auf die plasmininduzierte Fibrinolyse*

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden steigende Mengen der wie oben beschrieben gewonnenen nativen „large surfactant aggregates“ vor der Clotbildung in einem Konzentrationsbereich von 0-20 mg/ml Phospholipid dem radioaktiv-markierten Fibrinogen hinzugefügt. Alternativ wurde eine korrespondierende Menge der organischen oder wäßrigen Phase nach organischer Extraktion eingesetzt.

3. *Modulation der durch ein synthetisches apoproteinfreies Phospholipidgemisch (PLX) hervorgerufenen Hemmung der Fibrinolyse durch die Surfactantapoproteine*

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden jeweils 20 mg/ml PLX, welche wie oben beschrieben mit steigenden Mengen der einzelnen Surfactantapoproteine versetzt wurden (0,1%-2% wt/wt Apoprotein bezogen auf die Gesamtphospholipide = 0,02-0,4 mg/ml Apoprotein), vor der Clotbildung dem radioaktiv-markierten Fibrinogen hinzugefügt.

4. *Einfluß der isolierten Surfactantapoproteine auf die plasmininduzierte Fibrinolyse*

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die einzelnen Surfactantapoproteine ohne Phospholipide (in einer Konzentration von 0,2 mg/ml) vor der Clotbildung dem radioaktiv-markierten Fibrinogen hinzugefügt.

2.2.5.2. Filterversuche

Mittels der unten beschriebenen Filterversuche [242] wurden folgende drei Aspekte untersucht:

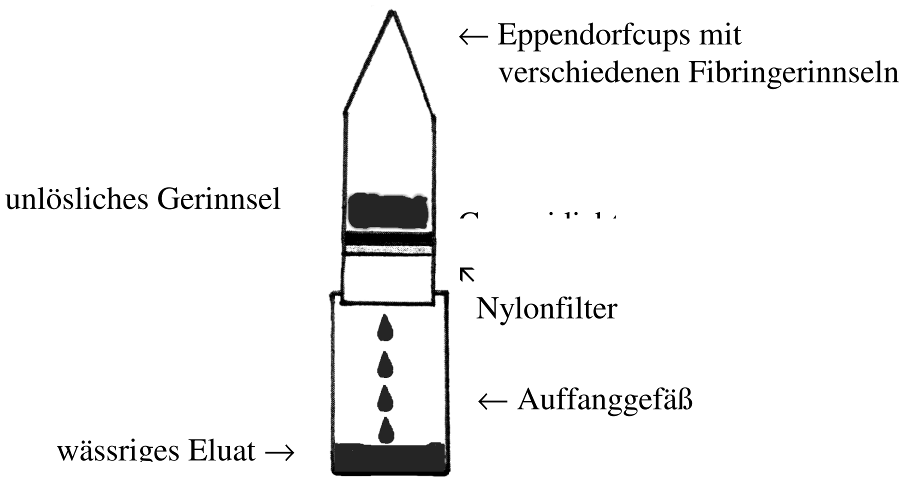
1. Einfluß der Surfactantapoproteine auf die Einbaurate pulmonalen Surfactants in eine Fibrinmatrix.
2. Einfluß der Surfactantapoproteine auf die Fibrinbildung in Gegenwart einer synthetischen Phospholipidmixtur.
3. Ermittlung der Einbaurate der Surfactantapoproteine in ein Fibringerinnsel.

zu 1. Einfluß der Surfactantapoproteine auf die Einbaurate pulmonalen Surfactants in eine Fibrinmatrix

Zur Untersuchung des Einflußes der Surfactantapoproteine auf die Einbaurate pulmonalen Surfactants in eine Fibrinmatrix wurden verschiedene Surfactantlösungen, welche vorher mit ^{3}H-markiertem DPPC (in 1/1000 des Volumens dem Ansatz zugegeben und 1 h bei 37°C präinkubiert) versetzt wurden, mit konstanten oder steigenden Mengen an unmarkiertem Fibrinogen in Eppendorfcups gemischt und anschließend die Gerinnselbildung durch Thrombinzugabe eingeleitet. Alle Versuche wurden in Gegenwart von 150 mM NaCl / 3 mMol Ca^{2+} durchgeführt. Nach Abtrennung der löslichen Phase von dem Fibringerinnsel durch Zentrifugation durch ein Nylonfilter (Abb. 8) erhält man durch Messung der Radioaktivität des Filtrats in einem β-Counter und dem Vergleich mit der Ausgangsaktivität ein Maß für die Einbaurate der Phospholipide in das Gerinnsel.

Abbildung 8

Aufbau der Filterversuche



Zur konkreten Versuchsdurchführung wurden in einem ersten Versuch jeweils 450 µl einer wäßrigen Lösung aus steigenden Mengen an unmarkiertem Fibrinogen (0-4 mg/ml) und

2mg/ml Alveofact bzw. PLX, vorher versetzt mit ^{3}H-markiertem DPPC, in Eppendorfcups pipettiert, intensiv geschüttelt und anschließend für 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.
In einem zweiten Versuchsansatz wurden in einem Endvolumen von 450 µl 4 mg/ml unmarkiertes Fibrinogen mit 2mg/ml einer ^{3}H-markierten Phospholipidmixtur (PLX) gemischt. Die Phospholipidmixtur wurde zuvor mit steigenden Mengen der einzelnen Surfactantapoproteine (0-2 % wt/wt, bezogen auf Gesamtlipidgehalt = 0-0,04 mg/ml) rekonstituiert. Die verschiedenen Präparationen wurden in Eppendorfcups pipettiert, intensiv geschüttelt und anschließend für 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.
In beiden Versuchsansätzen wurde anschließend die Gerinnung durch Zugabe von 50 µl Thrombin (0,01 U/ml) eingeleitet. Nach weiterer Inkubation für 60 min bei 37°C im Wasserbad erfolgte anschließend die Trennung der löslichen Phase von dem Fibringerinnsel durch Zentrifugation (5 min, 170xg) durch ein Nylonfilter mit einer Porengröße von 150 µm (Abb.8). Nach Messung der ^{3}H-Aktivität des Filtrats in einem ß-Counter und Vergleich mit der Ausgangsaktivität erhält man durch Differenzbildung ein Maß für die Einbaurate der Phospholipide in den Clot.
Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

a. Vergleich der Einbaurate eines synthetischen apoproteinfreien Phospholipidgemisches (PLX) mit der des Kälberlungensurfactantextraktes Alveofact

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden jeweils 2 mg/ml PLX bzw. Alveofact, welche vorher mit ^{3}H-markiertem DPPC versetzt wurden, vor der Clotbildung zu steigenden Mengen an unmarkiertem Fibrinogen hinzugefügt.

b. Einfluß der Surfactantapoproteine auf die Phospholipideinbaurate eines synthetischen apoproteinfreien Phospholipidgemisches (PLX)

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden 2 mg/ml des synthetischen Phospholipdgemisches, versetzt mit ^{3}H-markiertem DPPC und steigenden Mengen der jeweiligen Surfactantapoproteine, vor der Clotbildung zu 4 mg/ml unmarkiertem Fibrinogen hinzugefügt.

zu 2. Einfluß der Surfactantapoproteine auf die Fibrinbildung in Gegenwart einer synthetischen Phospholipidmixtur

Zur Untersuchung des Einflußes der Surfactantapoproteine auf die Fibrinbildung in Gegenwart einer synthetischen Phospholipidmixtur wurden 2 mg/ml PLX, alleine oder mit jeweils 1% der verschiedenen Surfactantapoproteine (humanes rekombinantes SP-A, natürliches Kaninchen SP-B und natürliches Kaninchen SP-C) rekonstituiert, zu 4 mg/ml ^{125}J-markiertem Fibrinogen hinzugefügt. Die anschließende Clotbildung und Filterpassage erfolgten wie oben beschrieben. Nach Messung der J-125-Aktivität des Filtrats in einem γ-Counter und Vergleich mit der Ausgangsaktivität erhält man durch Differenzbildung ein Maß für den Umfang der Gerinnselbildung und damit der Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin in Abhängigkeit der verschiedenen, in das Fibringerinnsel inkorporierten Surfactantlösungen.

zu 3. Ermittlung der Einbaurate der Surfactantapoproteine in ein Fibringerinnsel

Zur Ermittlung der Einbaurate der Surfactantapoproteine in ein Fibringerinnsel wurden 0,02 mg/ml der Surfactantapoproteine SP-A und SP-B (rekombinantes humanes SP-A und Kaninchen-SP-B) alleine oder nach Rekonstitution mit 2 mg/ml PLX (= 1% Apoprotein wt/wt, bezogen auf Lipide) zu 4 mg/ml Fibrinogen hinzugefügt und die Fibrinbildung durch Thrombin eingeleitet. Nach Filterpassage wurden die Einbauraten für SP-A und SP-B in das Fibringerinnsel durch Messung der SP-A- und SP-B-Mengen im Filtrat (ELISA) und anschließendem Vergleich mit der Ausgangsmenge an Apoproteinen ermittelt.

3. Ergebnisse

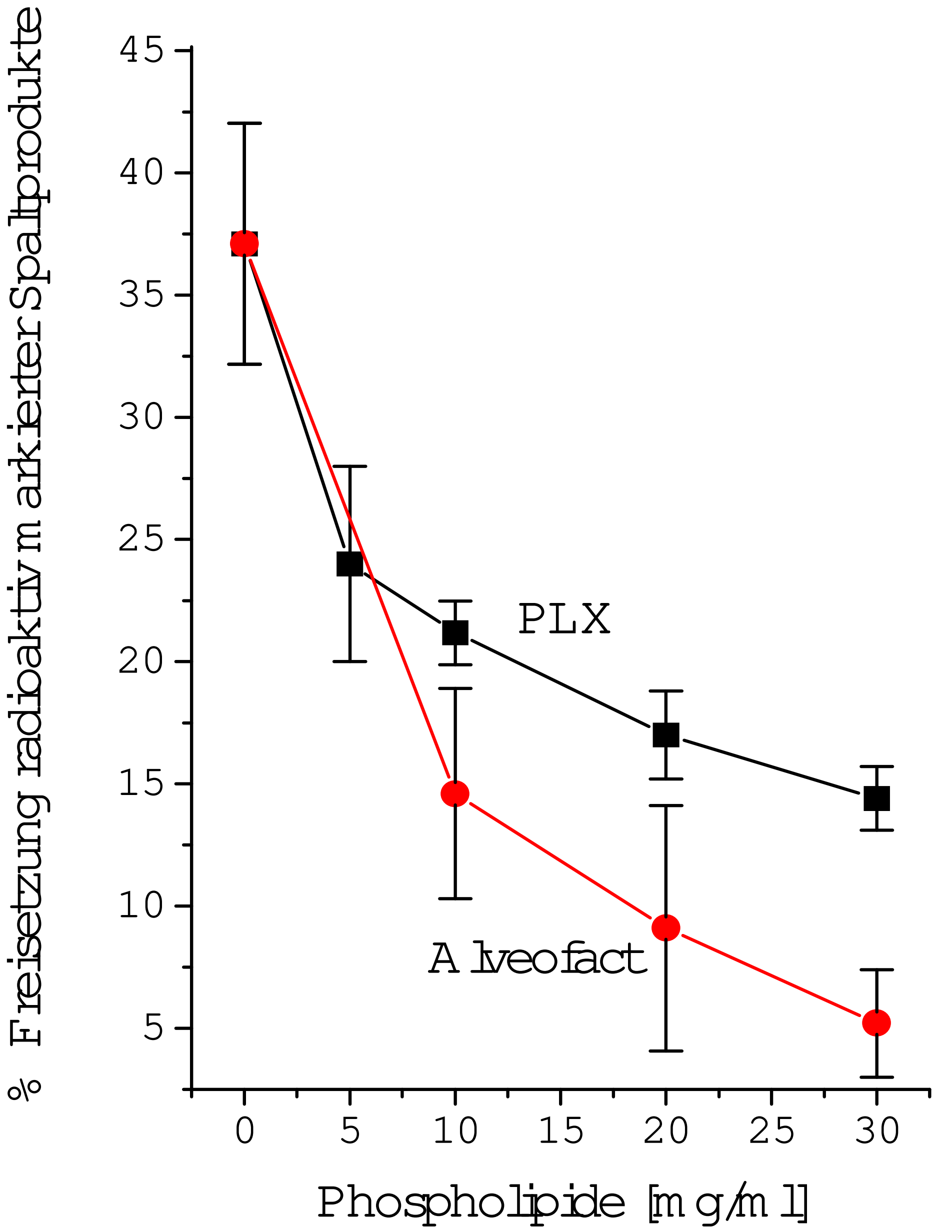
3.1. Ergebnisse der Fibrin Plate Assays

3.1.1. Einfluß des Kälberlungensurfactantextraktes Alveofact auf die Fibrinolyse im Vergleich zu einem apoproteinfreien synthetischen Phospholipidgemisch (PLX)

Die Inkubation eines radioaktiv markierten Fibringerinnsels mit Plasmin führte in Abwesenheit von Surfactant zu einer zeitabhängigen Freisetzung von radioaktiv markiertem Material in den Überstand als Ausdruck der stattgefundenen Fibrinolyse. Nach 120 Minuten lag die Freisetzung radioaktiv markierter Fibrinspaltprodukte im Bereich von 30-45 % der Ausgangaktivität (Abb 9, Kontrollwert auf Y-Achse).
Der Einbau steigender Mengen (5-30 mg/ml) sowohl des Kälberlungensurfactantextraktes Alveofact als auch des apoproteinfreien synthetischen Phospholipidgemisches PLX in das Fibringerinnsel führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der Freisetzung radioaktiv markierter Fibrinspaltprodukte in den Überstand und somit zu einer Hemmung der Fibrinolysekinetik (Abb. 9).
Allerdings konnte gezeigt werden, daß das synthetische apoproteinfreie Phospholipidgemisch PLX eine deutlich geringere Hemmwirkung auf die plasmininduzierte Fibrinolyse besitzt als der Kälberlungensurfactantextrakt Alveofact. So fand sich bei der höchsten Konzentration (30 mg/ml) für Alveofact eine Reduktion des durch Plasmin freigesetzten radioaktiv markierten Materials auf ca. 5 % der Ausgangsaktivität (entspricht 15 % des Kontrollwertes), im Falle des PLX jedoch nur auf ca. 15 % der Ausgangsaktivität (entspricht 40 % des Kontrollwertes) (Abb. 9).

Abbildung 9

Einfluß steigender Mengen Alveofact bzw. PLX auf die plasmininduzierte Fibrinolyse



Darstellung der plasmininduzierten Fibrinolyse in Abhängigkeit von der Menge an inkorporiertem Alveofact bzw. PLX. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus 4 unabhängigen Versuchen dar; eingezeichnet sind außerdem die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM).

3.1.2. Einfluß der „large surfactant aggregates“ (nativ, organische Phase, wäßrige Phase) auf die plasmininduzierte Fibrinolyse

Bei gleichen experimentellen Rahmenbedingungen wie unter 3.1.1. beschrieben betrug die Freisetzung radioaktiv markierter Fibrinspaltprodukte nach 120minütiger Inkubation mit Plasmin in Abwesenheit von Surfactant hier ebenfalls ca. 32,5 % der Ausgangsaktivität (Abb. 10, Kontrollwert auf Y-Achse).

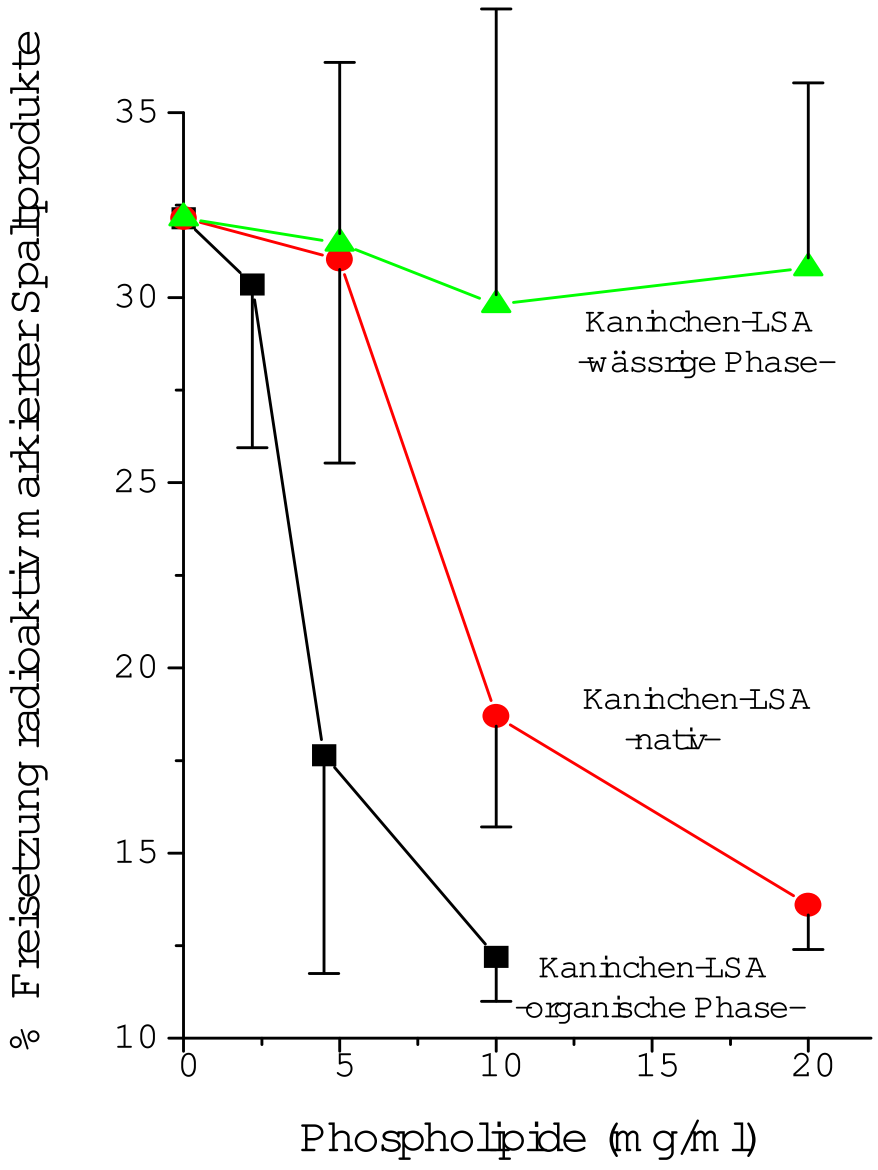
Der Einbau steigender Mengen sowohl der nativen „large surfactant aggregates“ als auch äquivalenter Mengen eines wäßrig rekonstituierten organischen Extraktes der „large surfactant aggregates“ in das Fibringerinnsel führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der Freisetzung von radioaktiv markiertem Material in den Überstand und somit zu einer Hemmung der Fibrinolysekinetik (Abb10). Wie aus dieser Abbildung ebenfalls ersichtlich, bewirkte der organische Extrakt der „large surfactant aggregates“ eine deutlich ausgeprägtere Hemmwirkung auf die plasmininduzierte Fibrinolyse als die nativen „large surfactant aggregates.“ So fand sich bei einer Konzentration von 10 mg/ml Phospholipiden für diese lipophilen Komponenten der „large surfactant aggregates“ eine Reduktion des durch Plasmin freigesetzten radioaktiv markierten Materials auf ca. 12,5 % der Ausgangsaktivität (entspricht 38 % des Kontrollwertes), im Falle der nativen „large surfactant aggregates“ jedoch nur auf 18,5 % der Ausgangsaktivität (entspricht ca. 57 % des Kontrollwertes) (Abb.10). Demgegenüber ließ sich für die hydrophilen Komponenten der „large surfactant aggregates“ kein wesentlicher Einfluß auf die plasmininduzierte Fibrinolyse erkennen (Abb.10).

Beim Vergleich der inhibitorischen Kapazität der verschiedenen, getesteten Surfactantlösungen (Versuche 3.1.1. und 3.1.2.) fiel auf, daß das synthetische apoproteinfreie Phospholipidgemisch PLX und die nativen „large surfactant aggregates“ (enthalten alle Apoproteine) eine ähnliche inhibitorische Kapazität besitzen (Reduktion der Freisetzung radioaktiv markierten Materials in den Überstand auf ca. 46 % bzw. 43 % des Kontrollwertes bei 20 mg/ml Phospholipiden). Andererseits zeigten sowohl der Extrakt aus den „large surfactant aggregates“ wie auch der Kälberlungensurfactantextrakt Alveofact eine vergleichbar gesteigerte Hemmung der plasmininduzierten Fibrinolyse (Reduktion der Freisetzung radioaktiv markierten Materials in den Überstand auf ca. 38 % bzw 39 % des Kontrollwertes bei 10 mg/ml Phospholipiden) (Abb. 9 + 10).

Diese Ergebnisse legten also eine differentielle Beeinflussung der Fibrinolysekinetik durch die Surfactantapoproteine nahe und führten zu den nachfolgend geschilderten Versuchen.

Abbildung 10

Einfluß steigender Mengen nativer „large surfactant aggregates“, ihrer lipophilen und hydrophilen Komponenten auf die plasmininduzierte Fibrinolyse



Darstellung der plasmininduzierten Fibrinolyse in Abhängigkeit von der Menge an inkorporierten nativen „large surfactant aggregates“ bzw. ihrer lipophilen oder hydrophilen Komponenten.

Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus 4 unabhängigen Versuchen dar; eingezeichnet sind außerdem die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM).

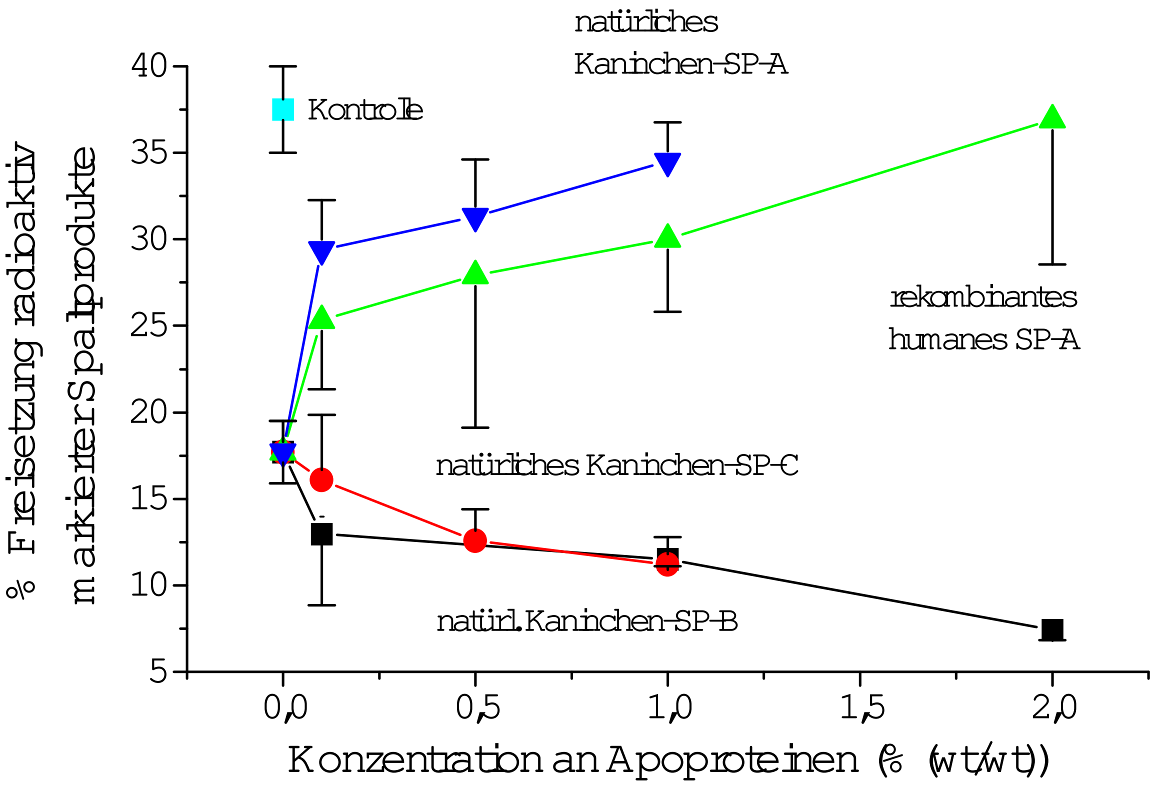
Die hydrophilen Komponenten der „large surfactant aggregates“ nach Butanolextraktion wurden in äquivalenter Dosierung wie die nativen large surfactant aggregates eingesetzt.

3.1.3. Modulation der durch ein synthetisches Phospholipidgemisch (PLX) hervorgerufenen Hemmung der plasmininduzierten Fibrinolyse durch Rekonstitution mit isolierten Surfactantapoproteinen

Der Einbau des synthetischen apoproteinfreien Phospholipidgemisches PLX (20 mg/ml) in ein Fibringerinnsel führte, wie schon in Versuch 3.1.1. gezeigt, zu einer reduzierten Freisetzung von radioaktiv markiertem Material in den Überstand und somit zu einer Hemmung der Fibrinolysekinetik (Abb. 11). Die Rekonstitution des PLX mit jeweils den hydrophoben Apoproteinen SP-B und SP-C bewirkte eine dosisabhängige Verstärkung der Fibrinolysehemmung; SP-B und SP-C waren hierbei ähnlich effektiv. So konnte bei einem Apoproteinanteil von 1% SP-B bzw. SP-C eine Reduktion des durch Plasmin freigesetzten radioaktiven Materials auf ca. 68 % des Wertes der PLX-Mixtur ohne Apoproteine festgestellt werden. Bei 2 % SP-B lag dieser Wert sogar bei 44 % (Abb. 11).
Demgegenüber führte die Rekonstitution des PLX mit dem hydrophilen Apoprotein SP-A unabhängig von der Quelle (humanes rekombinantes SP-A versus isoliertes SP-A vom Kaninchen) zu einer dosisabhängigen Aufhebung der Hemmwirkung des PLX, d.h. zu einer in Abhängigkeit von der SP-A-Konzentration zunehmenden Menge an Fibrinspaltprodukten. Das hydrophile Apoprotein SP-A wirkt also der durch Phospholipide hervorgerufenen Hemmung der plasmininduzierten Fibrinolyse entgegen; durch Rekonstitution des PLX mit 2 % des humanen rekombinanten SP-A wurde die PLX-induzierte Hemmung der Fibrinolyse sogar fast vollständig antagonisiert (Abb. 11, siehe Kontrollwert der Fibrinspaltproduktfreisetzung in Abwesenheit von Surfactant „Kontrolle“).

Abbildung 11

Modulation der durch ein synthetisches Phospolipidgemisch (PLX) hervorgerufenen Hemmung der plasmininduzierten Fibrinolyse durch Surfactantapoproteine



Darstellung der plasmininduzierten Fibrinolyse in Abhängigkeit von der Zugabe steigender Mengen an Surfactantapoproteinen (0,1-2 % wt/wt bezogen auf Gesamtphospholipidgehalt) zu einem synthetischen apoproteinfreien Phospholipidgemisch (PLX; 20mg/ml). Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus 4 unabhängigen Versuchen dar; eingezeichnet sind außerdem die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM). Die Kontrolle stellt die Freisetzung von radioaktiv markiertem Material in den Überstand in Abwesenheit von Surfactantkomponenten dar.

3.1.4. Einfluß einzelner, isolierter Surfactantapoproteine auf die Fibrinolyse

In separaten Versuchen wurde überprüft, inwieweit die einzelnen Surfactantapoproteine die Fibrinolysekinetik in Abwesenheit von Surfactantphospholipiden beeinflußen. Hierbei wurden Apoproteinkonzentrationen von 0,2 mg/ml (entsprechend dem 1 % Apoproteinanteil bei 20 mg/ml Phospholipid der Versuche in 3.1.3) eingesetzt. Ausgehend von der unbehandelten Kontrolle (plasmininduzierte Fibrinolyse in Abwesenheit jeglicher Surfactantkomponenten) mit einer freigesetzten Aktivität von 36,6 % ± 4,2 % konnten in Gegenwart des humanen rekombinanten SP-A 38,2 % ± 5,9 %, in Gegenwart des Kaninchen-SP-B 36,9 % ± 4,1 % und in Gegenwart des Kaninchen-SP-C 39,3 % ± 0,7 % an freigesetzter Aktivität beobachtet werden (alle Daten stellen den Mittelwert ± SEM aus 4 unabhängigen Versuchen dar). Es zeigt sich also, daß keines der Surfactantapoproteine alleine, d.h. in Abwesenheit der Phospholipide, einen wesentlichen Einfluß auf die plasmininduzierte Fibrinolyse besitzt.

3.2. Ergebnisse der Filterversuche

3.2.1. Phospholipidinkorporation in ein Fibringerinnsel: Vergleich zwischen dem synthetischen, apoproteinfreien Phospholipidgemisch PLX und dem Kälberlungensurfactantextrakt Alveofact

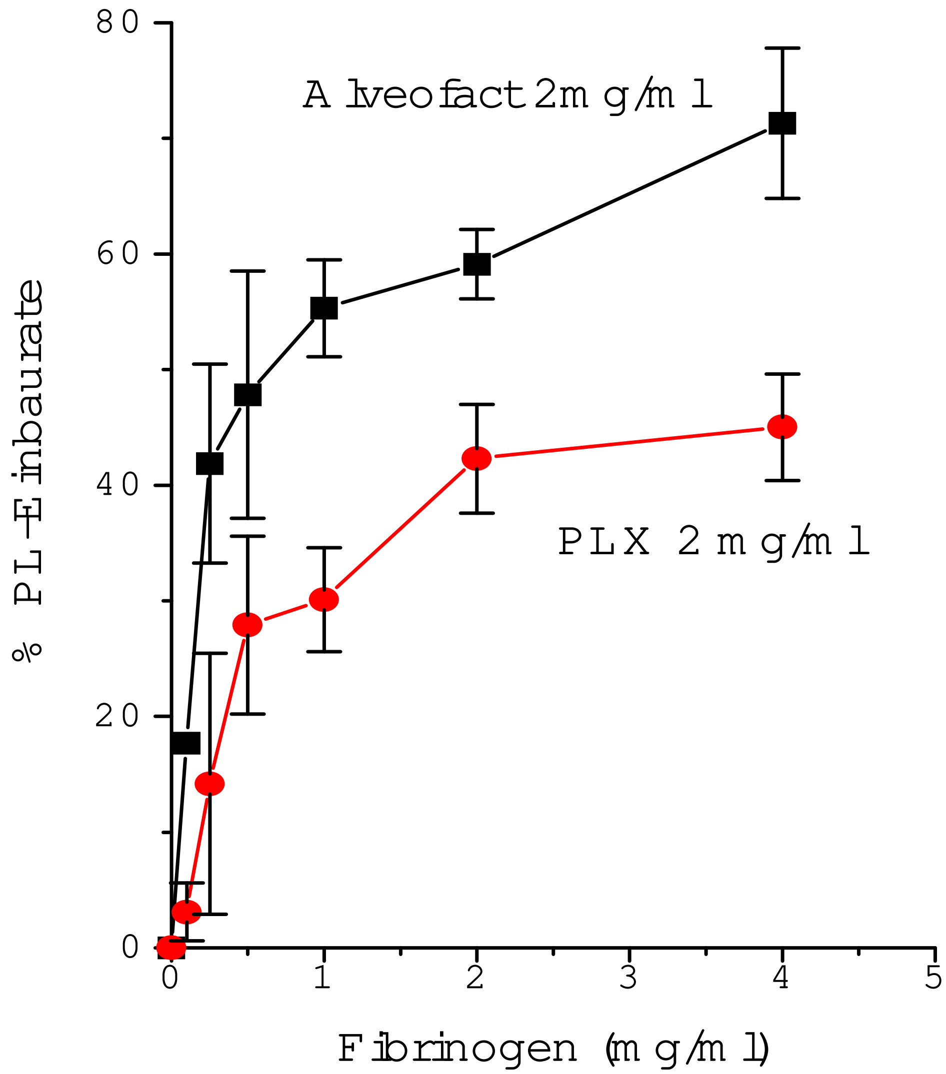
Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Ergebnisse stellte sich die Frage, ob die differentielle Beeinflußung der PL-induzierten Hemmung der Fibrinolyse durch die einzelnen Surfactantapoproteine auf einer Beeinflußung der Phospholipideinbaurate in Fibrin beruht. Hierzu wurden die nachfolgend dargestellten Untersuchungen durchgeführt.

Die Inkubation sowohl des synthetischen, apoproteinfreien Phospholipidgemisches PLX als auch des Kälberlungensurfactantextraktes Alveofact (jeweils 2 mg/ml) mit steigenden Mengen Fibrinogen (0-4 mg/ml) führte nach Einleitung der Gerinnung durch Thrombinzugabe zu einer mit steigender Fibrinkonzentration zunehmenden Phospholipidinkorporation in das Fibringerinnsel (Abb. 12). Allerdings konnten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Surfactantlösungen beobachtet werden. So konnte im Falle des Alveofact eine deutlich stärkere Einbaurate der Phospholipide im Vergleich zu dem apoproteinfreien, synthetischen Phospholipidgemisch PLX dargestellt werden. Bei einer Fibrinogenkonzentration von 4 mg/ml betrug die Phospholipideinbaurate für Alveofact ca. 70 %, die des synthetischen, apoproteinfreien Phospholipidgemisches dagegen nur ca. 45 % (Abb. 12).

.

Abbildung 12

Vergleich der Phospholipideinbaurate eines synthetischen apoproteinfreien Phospholipidgemisches (PLX) mit der des Kälberlungensurfactantextraktes Alveofact in polymerisierendes Fibrin



Darstellung der Phospholipideinbaurate radioaktiv markierter Surfactantlösungen (Konzentration konstant 2 mg/ml) in ein Fibringerinnsel in Abhängigkeit steigender Fibrinkonzentrationen. Gegeben ist die ^{3}H-Radioaktivität im Fibringerinnsel bezogen auf die Ausgangsaktivität als Maß für die Phospholipideinbaurate. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus 4 unabhängigen Versuchen dar; eingezeichnet sind außerdem die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM).

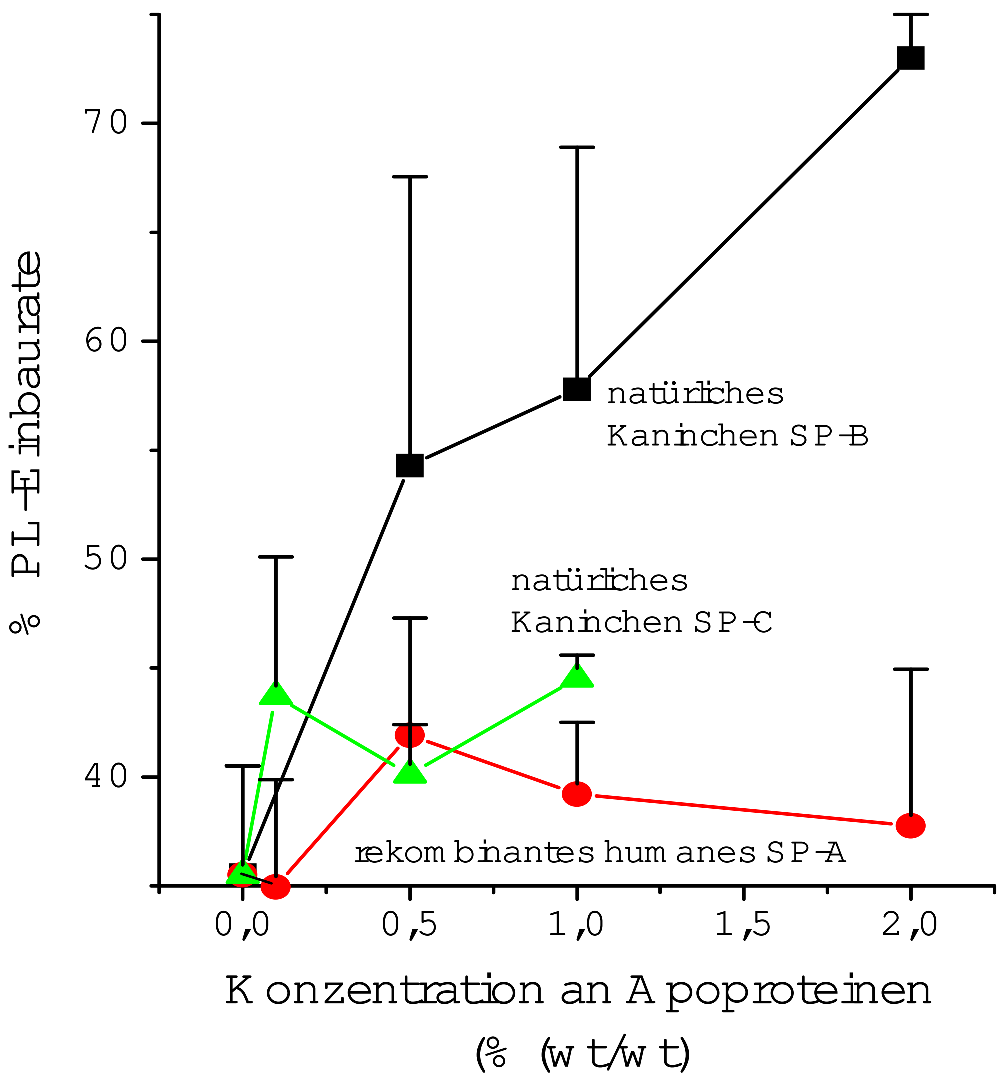
3.2.2. Einfluß der Surfactantapoproteine auf die Phospholipideinbaurate eines synthetischen, apoproteinfreien Phospholipidgemisches (PLX) in ein Fibringerinnsel

Ausgehend von einer Phospholipideinbaurate des synthetischen, apoproteinfreien Phospholipidgemisches PLX (2 mg/ml) von ca. 35-40% in ein Fibringerinnsel (4 mg/ml) wurde in diesem Versuch der Einfluß einzelner Surfactantapoproteine auf die Phospholipideinbaurate untersucht. Weder die Rekonstitution des PLX mit steigenden Mengen (0-2 % wt/wt bezogen auf Lipide) des hydrophilen Surfactantapoproteins SP-A noch die Rekonstitution des PLX mit dem hydrophoben SP-C übten einen wesentlichen Einfluß auf die Phospholipideinbaurate des synthetischen Phospholipidgemisches aus. Demgegenüber führte die Rekonstitution des PLX mit steigenden Mengen des hydrophoben Apoproteins SP-B zu einer deutlichen, dosisabhängigen Zunahme der Phospholipideinbaurate. So zeigte sich bei einem Apoproteinanteil von 2% eine Verdopplung der Phospholipideinbaurate im Vergleich zu dem synthetischen Phospholipidgemisch ohne Apoproteine von 35% auf mehr als 70% (Abb. 13). Weiterhin fiel auf, daß das synthetische Phospholipidgemisch PLX nach Zugabe von 2 % SP-B und der Kälberlungensurfactantextrakt Alveofact (mit einem SP-B-Anteil von ca. 1,7 ±0,3% wt/wt, bezogen auf Gesamtphospholipide) eine vergleichbare Phospholipideinbaurate besitzen: dieser Wert lag bei einer Surfactantkonzentration von 2 mg/ml und einer Fibrinkonzentration von 4 mg/ml bei ca. 70 % (Abb. 12 + 13).

.

Abbildung 13

Einfluß der Surfactantapoproteine auf die Phospholipideinbaurate eines synthetischen apoproteinfreien Phospholipidgemisches (PLX) in ein Fibringerinnsel



Darstellung der Phospholipideinbaurate des synthetischen, radioaktiv (^{3}H) markierten Phospholipidgemisches PLX (2 mg/ml) in ein Fibringerinnsel (4mg/ml) in Abhängigkeit von steigenden Mengen der isolierten Surfactantapoproteine (0,1-2 % wt/wt, bezogen auf Phospholipide).

Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus 4 unabhängigen Versuchen dar; eingezeichnet sind außerdem die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM).

3.2.3. Einfluß des mit verschiedenen Surfactantapoproteinen rekonstituierten PLX auf die Fibrinbildung

In diesen Experimenten wurde untersucht, inwieweit die Rekonstitution des synthetischen apoproteinfreien Phospholipidgemisches PLX mit isolierten Surfactantapoproteinen (humanes, rekombinantes SP-A, Kaninchen-SP-B, Kaninchen-SP-C) zu einer Beeinflußung der Fibrinpolymerisation führt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden - wie oben beschrieben - die Filterversuche mit ^{125}J-markiertem Fibrin(ogen) durchgeführt.

In Abwesenheit von Surfactantkomponenten wurden nach Inkubation von 4 mg/ml Fibrinogen mit Thrombin für 60 min in dem Fibringerinnsel 95,1 % ± 2,1 % der Ausgangsaktivität wiedergefunden, die eine nahezu vollständige Polymerisation des Fibrins nahelegen. Die Aktivitätswerte im Fibringerinnsel erhält man durch Differenzbildung zwischen der Ausgangsaktivität und der gemessenen Aktivität im Filtrat. Die Gegenwart von 2 mg/ml PLX während der Polymerisation beeinflußte die Fibrinbildung nicht (Aktivität im Fibringerinnsel 96,5 % ± 1,9 % der Ausgangsaktivität). Auch die vorherige Rekonstitution des PLX mit jeweils 1% (wt/wt, bezogen auf Lipid) SP-A, SP-B oder SP-C führte zu keiner nennenswerten Beeinflußung der Fibrinbildung, wie aus den Aktivitätswerten im Fibringerinnsels von 95,7 % ± 4,1 % (SP-A), 91,7 % ± 3,3 % (SP-B) und 93,3 % ± 5,1 % (SP-C) sichtbar ist (alle Daten reflektieren den Mittelwert ± SEM aus 4 unabhängigen Versuchen).

3.2.4. Einbau der Surfactantapoproteine in ein Fibringerinnsel

Schließlich wurde mit Hilfe der Filterversuche und unter Anwendung etablierter ELISA-Verfahren geprüft, ob die Surfactantapoproteine SP-A (humanes rekombinantes SP-A) und SP-B (Kaninchen-SP-B) in Abwesenheit oder Gegenwart einer synthetischen Phospholipidmixtur (2mg/ml) an polymerisierendes Fibrin (4mg/ml) binden. Hierbei wurden Apoproteinkonzentrationen von 0,02 mg/ml (entsprechend 1 % wt/wt bezogen auf Lipid) eingesetzt.

In Abwesenheit des PLX wurden 17,4 ± 6,1 % des eingesetzten SP-A und 72,1 ± 3,9 % des eingesetzten SP-B in den Clot eingebaut. In Gegenwart des PLX unterschieden sich diese Werte nicht signifikant (19,6 ± 5,5 % für SP-A und 78,4 ± 4,6 % für SP-B; alle Werte reflektieren den Mittelwert ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten). Es zeigte sich also, daß unabhängig von der Präsenz der Surfactantphospholipide ein Großteil des SP-B an das Fibrinpolymer bindet. Aufgrund fehlender sensitiver Nachweismethoden war diese Fragestellung für das SP-C nicht zu beantworten.

4. Diskussion

4.1. Bewertung der Ergebnisse

In Anlehnung an frühere Studien, in denen ein erheblicher Einfluß pulmonalen Surfactants auf die Fibrinogenolyse und die Fibrinolyse aufgezeigt werden konnte [89, 90, 274], führte auch in der vorliegenden Arbeit der Einbau pulmonalen Surfactants in ein Fibringerinnsel zu einer dosisabhängigen Inhibition der plasmininduzierten Fibrinolyse. Darüber hinaus wurde die Bedeutung der Surfactantapoproteine für diese Inhibition der Fibrinolyse untersucht, indem das Ausmaß der Fibrinolysehemmung verschiedener, in ihrem Gehalt an Surfactantapoproteinen unterschiedlicher Surfactantlösungen bestimmt und miteinander verglichen wurde. Der Proteinanteil lag dabei in einem Bereich (0,1-2 % wt/wt bezogen auf Gesamtlipide), der sich auch für die oberflächenspannungsreduzierenden Eigenschaften als relevant erwies und der auch unter physiologischen Bedingungen in situ vermutet wird [45, 58, 111, 152, 196, 203, 205, 218, 225, 245, 272, 304, 311, 312, 325, 326, 327].

Zusammenfassend zeigte sich, daß die hydrophoben Surfactantapoproteine SP-B und SP-C die durch Surfactantphospholipide hervorgerufene Fibrinolyseinhibition verstärken, während andererseits das hydrophile Surfactantapoprotein SP-A die Fibrinolysehemmung durch Surfactantphospholipide zu antagonisieren scheint.

Diese Feststellung begründet sich auf folgende Versuchsergebnisse:

- Der Kälberlungensurfactantextrakt Alveofact mit den hydrophoben Apoproteinen SP-B und SP-C, jedoch ohne SP-A, zeigte eine deutlich ausgeprägtere Hemmwirkung auf die plasmininduzierte Fibrinolyse als ein apoproteinfreies synthetisches Phospholipidgemisch (PLX).

- Der organische Extrakt der „large surfactant aggregates“ mit den hydrophoben Apoproteinen SP-B und SP-C, jedoch ohne SP-A, zeigte eine deutlich ausgeprägtere Hemmwirkung auf die plasmininduzierte Fibrinolyse als die nativen „large surfactant aggregates“, die zusätzlich das hydrophile Apoprotein SP-A enthalten.

- Der Kälberlungensurfactantextrakt Alveofact und der organische Extrakt der „large surfactant aggregates“ (jeweils mit den hydrophoben Apoproteinen SP-B und SP-C, jedoch ohne SP-A) einerseits und die nativen „large surfactant aggregates“ (mit den Surfactantapoproteinen SP-B, SP-C und SP-A) und ein apoproteinfreies synthetisches Phospholipidgemisch (PLX) andererseits zeigten eine jeweils vergleichbare inhibitorische Kapazität.

- Die Rekonstitution des synthetischen apoproteinfreien Phospholipidgemisches PLX mit den hydrophoben Apoproteinen SP-B oder SP-C bewirkte eine dosisabhängige Verstärkung der Fibrinolyseinhibition, während die Rekonstitution des PLX mit dem hydrophilen Apoprotein SP-A zu einer dosisabhängigen Aufhebung der Hemmwirkung des PLX führte.

Worauf beruht diese Inhibition der plasmininduzierten Fibrinolyse durch pulmonalen Surfactant ? Als naheliegende Erklärung ist die Interaktion der Surfactantphospholipide mit Bindungsstellen und Spaltdomänen des Plasmins am Fibrinmolekül zu betrachten [89, 90]. Carr et al. haben die interfibrillären, wäßrigen Zwischenräume, die im Verhältnis von etwa 4:1 zu den festen Bestandteilen eines Fibringerinnsels stehen, als Flüssigkeitskanäle charakterisiert, die die Diffusion von Molekülen durch das Gerinnsel ermöglichen [31]. Denkbar wäre, daß es, nach Verteilung der Surfactantphospholipide innerhalb dieser wäßrigen Zwischenräume zwischen den Fibrillen der Fibrinmatrix, zu einer membranartigen Interposition und unspezifischen Bindung an hydrophobe oder amphiphile Regionen der Fibrinmatrix kommt. Dies könnte zu Interaktionen mit Bindungsstellen und Spaltdomänen verschiedener Proteasen am Fibrinmolekül führen, so daß diese Proteasen wie z.B. Plasmin nicht oder nur noch eingeschränkt wirken können [89, 90]. Für diese Erklärung sprechen jüngere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe [242, 246, Dissertation A. Elssner, Fachbereich Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen], die ergeben haben, daß lipophile Surfactantkomponenten (PL wie DPPC oder PG, freie Fettsäuren wie PA und SP-B) an polymerisierendes Fibrin gebunden werden und die mittels NMR-Studien einen membranartigen Überzug der Fibrinfibrillen durch pulmonalen Surfactant aufzeigen konnten. Darüber hinaus ergaben Studien von Harpel et al., daß Lipoprotein A und low density lipoprotein durch Bindung an Fibrinogen die Bindung von Plasminogen an das Fibrin(ogen)molekül verhindern [103]. Ein anderer möglicher Erklärungsversuch als Ursache der Fibrinolyseinhibition durch Surfactant, nämlich die direkte Wechselwirkung zwischen Plasmin und Surfactantkomponenten, erscheint weniger wahrscheinlich, insbesondere auch, weil die Proteolyse surfactantfreier Fibringerinnsel durch spätere Surfactantzugabe nicht beeinflußt wird [89, 90].

Welche molekularen Mechanismen könnten den unterschiedlichen Effekten der einzelnen Surfactantapoproteine auf die durch Surfactantphospholipide hervorgerufene Inhibition der plasmininduzierten Fibrinolyse zugrundeliegen ?
Die folgenden, prinzipiell möglichen Mechanismen müssen diskutiert werden:

1. *Beeinflußung der plasmininduzierten Fibrinolyse durch die aufgereinigten Surfactantapoproteine per se*

Die Surfactantapoproteine könnten zu einer direkten, von der Anwesenheit der Surfactantphospholipide unabhängigen Beeinflußung der Fibrinolyse führen. In der vorliegenden Arbeit zeigte allerdings keines der isolierten Apoproteine einen Einfluß auf die proteolytische Spaltung von Fibrin, so daß diese Erklärungsmöglichkeit unwahrscheinlich erscheint. In Übereinstimmung hiermit konnte in einer früheren Studie auch kein wesentlicher Einfluß der isolierten Apoproteine auf die plasmininduzierte Fibrinogenolyse festgestellt werden [89].

2. *Einfluß der Surfactantapoproteine auf die Fibrinbildung*

Die Surfactantapoproteine könnten die Fibrinolyse beeinflussen, indem sie zu einer Veränderung der Fibrinpolymerisation führen. In der vorliegenden Arbeit wurde die thrombininduzierte Fibrinpolymerisation durch keines der Apoproteine in Gegenwart einer synthetischen Phospholipidmixtur beeinflußt, so daß auch diese Erklärungsmöglichkeit unwahrscheinlich erscheint.

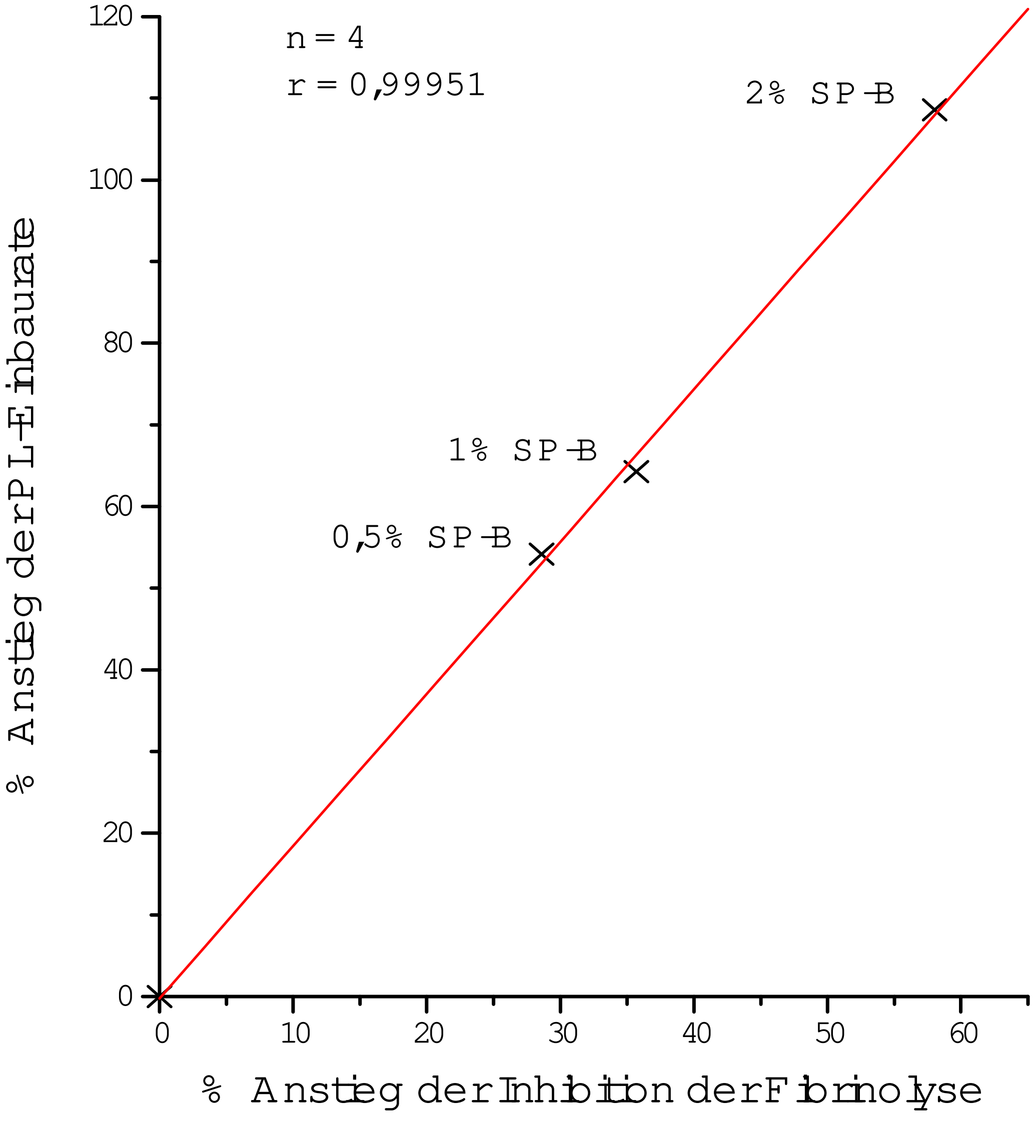
3. *Einfluß der Surfactantapoproteine auf die Einbaurate der Phospholipide in ein Fibringerinnsel*

Die gezeigte Dosisabhängigkeit der Fibrinolyseinhibition durch pulmonalen Surfactant läßt eine durch Surfactantapoproteine veränderte Surfactanteinbaurate in das Fibringerinnsel als mögliche Ursache für die durch Surfactantapoproteine hervorgerufene Modulation der Fibrinolysehemmung erscheinen. Durch die unterschiedliche Surfactanteinbaurate könnte eine unterschiedliche Anzahl von Bindungsstellen oder Spaltdomänen des Plasmins an der Fibrinmatrix blockiert werden [89, 90].

Dieser Aspekt scheint vor allem für das hydrophobe Apoprotein SP-B eine wichtige Rolle zu spielen: SP-B führte zu einer deutlichen Zunahme der Surfactantinkorporation in eine Fibrinmatrix, bei einem Proteinanteil von 2 % SP-B (wt/wt bezogen auf Gesamtlipidgehalt) wurde die Einbaurate sogar annähernd verdoppelt. Denkbar wäre, daß das hydrophobe Apoprotein SP-B die Surfactantinkorporation in eine Fibrinmatrix dadurch erhöht, daß es, durch Interaktionen sowohl mit Surfactantphospholipiden als auch mit hydrophoben oder amphiphilen Regionen des Fibrinmoleküls, die Bindung von Surfactantphospholipiden an die Fibrinmatrix, insbesondere auch an Bindungsstellen oder Spaltdomänen des Plasmins fördert. In diesem Zusammenhang zu erwähnen sind die in zahlreichen Studien aufgezeigten Wechselwirkungen zwischen Phospholipiden und dem hydrophoben Apoprotein SP-B [6, 45, 53, 91, 111, 138, 203, 206, 273, 297, 311, 327] und die in früheren Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe gewonnene Erkenntnis, daß sämtliche lipophile Surfactantkomponenten eines organischen Surfactantextraktes, z.B. auch SP-B, an Fibrin gebunden werden [242, 246, Dissertation A. Elssner, Fachbereich Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen]. Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit durch den zusätzlichen Nachweis einer Bindung des hydrophoben Apoproteins SP-B an Fibrin in Abwesenheit der Surfactantphospholipide erweitert werden. Die Bindung des SP-B an Fibrin hängt möglicherweise mit seiner groben Kringelstruktur zusammen, worüber eine gewisse Strukturverwandtschaft zu den Serinproteasen (Plasminogen, tPa, Urokinase, Streptokinase, Prothrombin) besteht [136, 139].

Die Annahme, daß die Förderung der Phospholipideinbaurate zumindest einen entscheidenden Aspekt für die durch SP-B hervorgerufene Verstärkung der Fibrinolyseinhibition darstellt, wird durch die enge Korrelation zwischen Zunahme der Phospholipideinbaurate und Zunahme der Fibrinolyseinhibition in Gegenwart des SP-B gestützt (Abb. 14).

Abbildung 14
Korrelation zwischen der Zunahme der Phospholipideinbaurate und Zunahme der Fibrinolyseinhibition eines apoproteinfreien Phospholipidgemisches nach Rekonstitution mit steigenden Mengen des hydrophoben Apoproteins SP-B



Für das hydrophile Apoprotein SP-A und das hydrophobe Apoprotein SP-C ließ sich dagegen kein wesentlicher Einfluß auf die Surfactanteinbaurate in ein Fibringerinnsel nachweisen, so daß dieser Aspekt als Ursache für die Modulation der Fibrinolyseinhibition durch diese beiden Apoproteine keine oder allenfalls eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Interessanterweise wies SP-A, im Gegensatz zum SP-B, nur eine sehr geringe Affinität zum Fibrin auf. Letztlich bleibt aber gegenwärtig unklar, warum SP-B, nicht aber SP-A oder SP-C, zu einer veränderten Einbaurate von Phospholipiden in eine Fibrinmatrix führt.

4.Einfluß der Surfactantapoproteine auf die ultrastrukturelle Organisation der Phospholipide

Als weitere mögliche Ursache für die aufgezeigten unterschiedlichen Effekte der Surfactant-apoproteine auf die plasmininduzierte Fibrinolyse kommt eine Beeinflussung der ultrastrukturellen Organisation der Phospholipide durch die Surfactantapoproteine in Betracht. Durch eine solche Veränderung könnte die Verteilung der Surfactantlipide innerhalb der wäßrigen Zwischenräume zwischen den Fibrillen der Fibrinmatrix und deren Interaktion mit Regionen der Fibrinmatrix unabhängig von einer quantitativ veränderten Surfactanteinbaurate beeinflußt werden, was wiederum mit einer veränderten Anzahl an blockierten Bindungsstellen oder Spaltdomänen des Plasmins an der Fibrinmatrix einhergehen könnte [89, 90].

In der Tat konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, daß die Surfactantapoproteine Einfluß nehmen auf die ultrastrukturelle Organisation synthetischer Phospholipidgemische [6, 53, 91, 95, 96, 138, 141, 186, 207, 219, 220, 233, 255, 270, 314]. Williams at al. [314] konnten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, daß dies für alle Surfactantapoproteine gilt. In dieser Studie bildete das apoproteinfreie Lipidgemisch, bestehend aus DPPC und PG (7:3 (wt/wt)), hauptsächlich unilamelläre Vesikel verschiedener Größe aus, nur selten fanden sich auch multilamelläre Strukturen. Die Zugabe des hydrophilen Apoproteins SP-A führte zur Ausbildung großer multilamellärer Strukturen mit bis zu 30 konzentrischen Membranen, die durch Zwischenräume mit kleinen Partikeln, vermutlich SP-A, getrennt wurden [219, 270, 314]. Die Zugabe des hydrophoben Apoproteins SP-B zu dem apoproteinfreien synthetischen Phospholipidgemisch führte vornehmlich zur Ausbildung kleiner, diskoidaler Partikel aus den unilamellären Phospholipidvesikeln, die sich z.T. vertikal übereinander oder in Form flacher Scheiben zu hexagonalen Strukturen oder mehr linear

zusammenlagerten [219, 314]. Diese diskoidalen Partikel erinnern an Membranfragmente gespaltener Phospholipidvesikel, weisen die Färbeeigenschaften und die Dicke eines einzelnen Phospholipidbilayers auf und besitzen strukturelle Ähnlichkeit mit diskoidalen Partikeln, die von einer Fraktion der „high-density-lipoproteine", nämlich vom Apolipoprotein A-I, aus Vesikeln gebildet werden [314] . Neben diesen kleinen, diskoidalen Partikeln fanden sich in Gegenwart des SP-B vereinzelt große Vesikel, die zusammengelagerte, dicht gepackte diskoidale Partikel enthielten, und große unilamelläre Vesikel [219, 314]. Auch die Zugabe des hydrophoben Apoproteins SP-C führte vornehmlich zur Ausbildung kleiner, diskoidaler Membranstrukturen [219, 314].
Eine Veränderung der ultrastrukturellen Organisation der Phospholipide als Ursache für die unterschiedlichen Effekte der Surfactantapoproteine auf die plasmininduzierte Fibrinolyse könnte insbesondere bei den Apoproteinen SP-A und SP-C, die ja keinen wesentlichen Einfluß auf die Phospholipideinbaurate in eine Fibrinmatrix zu haben scheinen, eine Rolle spielen. Denkbar wäre zum Beispiel, daß die in Gegenwart des SP-A bevorzugt gebildeten großen, multilamellären Strukturen zu einer inhomogeneren Verteilung des Surfactantmaterials innerhalb der interfibrillären, wäßrigen Zwischenräume und deshalb zu einer eher diskontinuierlichen und weniger engen Interaktion mit entsprechenden Domänen des Fibrins führen. In der Konsequenz würden schließlich weniger Bindungsstellen und Spaltdomänen fibrinolytischer Enzyme blockiert werden [89, 90] .
Demgegenüber kann man annehmen, daß die in Gegenwart des SP-C überwiegend gebildeten kleinen, diskoidalen Partikel zu einer eher kontinuierlichen Auskleidung und zu engeren Interaktionen mit Fibrinfibrillen führen, insbesondere auch mit Bindungsstellen und Spaltdomänen fibrinolytischer Enzyme, die dann für diese Enzyme blockiert werden würden. Dies könnte dementsprechend auch für das SP-B gelten und würde neben der Zunahme der Surfactantinkorporation in die Fibrinmatrix eine weitere Ursache für die in Gegenwart des SP-B beobachtete Verstärkung der Fibrinolyseinhibition darstellen.

Zusammenfassend scheint die aufgezeigte Beeinflussung der plasmininduzierten Fibrinolyse durch Surfactantapoproteine in entscheidender Weise an Protein-Phospholipid-Interaktionen geknüpft zu sein. Als Ursache der Verstärkung der durch Phospholipide hervorgerufenen Fibrinolyseinhibition dürfte im Falle des SP-B insbesondere die Erhöhung der Phospholipidinkorporation in eine Fibrinmatrix von Wichtigkeit sein, während im Falle des SP-C vermutlich eine Änderung der ultrastrukturellen Organisation der Phospholipide mit

Ausbildung kleiner diskoidaler Partikel und einer entsprechend eher kontinuierlichen Anlagerung der Phospholipide an die Fibrinfibrillen von Bedeutung sein dürfte. Die durch SP-A induzierte Reduktion der Fibrinolysehemmung durch Phospholipide könnte entsprechend durch eine Ausbildung komplexer, multilamellärer Phospholipidaggregate mit einer diskontinuierlichen und weniger engen Anlagerung der Phospholipide an die Fibrinfibrillen begründet sein.

4.2. Therapeutische Konsequenzen und Perspektiven

Bislang sind in erster Linie zwei Krankheitsbilder beschrieben, bei denen das klinische Erscheinungsbild wesentlich durch die Störung des Surfactantsystems bestimmt ist.
Beim Atemnotsyndrom des Kindes (IRDS) stellt der Surfactantmangel infolge fetaler Unreife die entscheidende Ursache der respiratorischen Insuffizienz dar, und die transbronchiale Surfactantapplikation führt meist zu einer akuten, deutlichen Verbesserung des Gasaustausches und der Compliance [51, 54, 67, 71, 133, 134, 162, 171, 184, 213, 253, 262, 281]. Die Letalität des IRDS konnte durch die Einführung der Surfactanttherapie etwa halbiert, die Dauer einer intensivmedizinischen Behandlung und die Häufigkeit typischer Komplikationen wie Pneumothoraces, interstitieller Emphyseme, cerebraler Hämorrhagien und bronchopulmonaler Dysplasien deutlich reduziert werden [71, 184, 281]. Trotz dieser Erfolge in der IRDS-Therapie durch Surfactantapplikation bleiben jedoch noch viele Aspekte offen [54, 134, 281], vor allem hinsichtlich der optimalen Zusammensetzung [57], Anzahl und Höhe der Dosierung [100, 171, 262], der Applikationsroute (Aerosol oder intratracheal instilliert) [167, 168, 169], wie auch der Vor- und Nachteile einer prophylaktischen bzw. therapeutischen Surfactantapplikation [66, 67, 71, 147, 184]. Zu den Nachteilen einer Surfactantapplikation gehören unter anderem die Entwicklung eines Links-Rechts-Shunts bei offenem Ductus arteriosus (infolge Verbesserung der Lungenfunktion mit Abnahme des pulmonalvaskulären Widerstandes nach Surfactantgabe), die Ausbildung einer Bradykardie und einer erniedrigten Sauerstoffsättigung (aufgrund einer vagalen Reaktion und der akuten Atemwegsobstruktion infolge des relativ hohen tracheal instillierten Volumens), die Beeinflussung der cerebralen Durchblutung und möglicherweise das Auftreten allergischer Reaktionen [9, 54, 134, 142, 265, 281].

Anders sehen die derzeit eingesetzten und verfügbaren Therapiemöglichkeiten beim akuten Atemnotsyndrom des Erwachsenen (ARDS) aus, bei dem die Inaktivierung des Surfactant durch Plasmaproteine eine entscheidende Rolle spielt. Im Gegensatz zum IRDS wurde bei ARDS-Patienten bisher lediglich in Einzelfällen Surfactant appliziert. Hierunter kam es teilweise zu einer deutlichen akuten Verbesserung der Gasaustauschfunktion der Lunge, ohne daß derzeit jedoch eine Aussage über den Langzeiteffekt der Surfactantapplikation gemacht werden kann, insbesondere auch im Hinblick auf Reduktion von Letalität und Morbidität [83, 105, 113, 140, 163, 164, 169, 195, 228, 241, 246, 263, 264, 307, 303, 308, 313].

Grundsätzlich sind zwei Gruppen an Surfactantpräparationen zu unterscheiden, die gegenwärtig in der Therapie des IRDS eingesetzt werden und in Zukunft in der Therapie des ARDS Verwendung finden könnten [134] :

1. natürliche organische Surfactantextrakte

Bei den natürlichen organischen Surfactantextrakten, zu denen z.B. Infasurf, CLSE, Alveofact (alles Kälberlungensurfactantextrakte), Curosurf (Schweinelungensurfactantextrakt) oder Survanta (Rinderlungensurfactantextrakt versetzt mit DPPC, Palmitinsäure und Tripalmitin zur Verbesserung der biophysikalischen Eigenschaften) gehören und die sich in der Therapie des RDS bewährt haben, handelt es sich um Surfactantpräparationen mit einer Phospholipidzusammensetzung ähnlich der des natürlichen Surfactant. Sie enthalten zusätzlich die hydrophoben Surfactantapoproteine SP-B und SP-C, jedoch kein SP-A [134, 162, 244, 253]. Die Nachteile natürlicher Surfactantextrakte bestehen in ihrer begrenzten Verfügbarkeit und der Möglichkeit des Auftretens allergischer Reaktionen [241]. Allergische Reaktionen nach Surfactantapplikation traten bisher bei RDS-Patienten nicht auf, was aber durchaus mit der limitierten Immunantwort unreifer Frühgeborener zusammenhängen kann [9, 54, 265, 281]. Diese Nachteile werfen die Frage nach der Entwicklung synthetischer Surfactantpräparationen auf:

2. synthetische Surfactantpräparationen

Aus dieser Gruppe wurden bisher synthetische apoproteinfreie Surfactantkompositionen in klinischen Studien bei RDS-Patienten eingesetzt, z.B. ALEC (Gemisch aus DPPC:PG 7:3 wt/wt) oder Exosurf (Gemisch aus DPPC und Hexadecanol und Tyloxapol zur Verbesserung der oberflächenaktiven Eigenschaften) [23, 134, 171, 213, 281, 313]. Diese apoproteinfreien synthetischen Surfactantpräparationen erwiesen sich jedoch im Tiermodell und in in-vitro-Untersuchungen hinsichtlich ihrer oberflächenaktiven Eigenschaften als weniger effektiv als die natürlichen Surfactantpräparationen, die ja die hydrophoben Apoproteinen SP-B und SP-C enthalten [57, 68, 99, 134, 240, 281]; außerdem gibt es Hinweise darauf, daß der positive Effekt synthetischer, apoproteinfreier Surfactantpräparate im Vergleich zu natürlichen Surfactantextrakten bei IRDS-Patienten erst mit einer gewissen Latenz auftritt [23, 50, 99, 137, 147], so daß die Entwicklung und der Einsatz synthetischer Surfactantpräparationen unter Verwendung synthetischer Surfactantapoproteine ein wichtiges Therapiekonzept der Zukunft darstellen könnte.

Auf einige Anforderungen, die an solche vollsynthetische Surfactantpräparationen gestellt werden müssen , insbesondere auch im Hinblick auf die gewonnenen Ergebnisse dieser Doktorarbeit, soll im folgenden kurz eingegangen werden. Zunächst sollen die verwendeten Surfactantpräparationen gute oberflächenaktive Eigenschaften aufweisen, wofür, wie oben erwähnt, den hydrophoben Apoproteinen SP-B und SP-C [45, 58, 111, 152, 196, 203, 205, 218, 225, 245, 272, 304, 311, 312, 325, 326, 327], aber vermutlich auch dem SP-A [42, 48, 111, 218, 224, 239, 293, 326], eine entscheidende Bedeutung zukommt. Weiterhin zu berücksichtigen ist die Sensitivität der verwendeten Surfactantpräparationen gegenüber einer Inhibition durch Plasmaproteine, wobei vor allem das SP-B [2, 244, 245, 249, 294], in geringerem Maße aber auch SP-C [2, 244, 245, 249, 294] und vermutlich auch SP-A [48, 293], die Resistenz der Surfactantpräparationen gegenüber den inhibitorisch wirksamen Proteinen zu fördern scheinen. Weitere wichtige Aspekte ergeben sich aus den engen Wechselwirkungen zwischen Surfactant und Fibrin und den Erkenntnissen, daß die Inkorporation in Fibringerinnsel einen bedeutenden Inhibitionsmechanismus pulmonalen Surfactants darstellen dürfte [20, 84, 101, 242, 243, 244, 246, 248, 250, 274], eine Wiederherstellung der oberflächenaktiven Eigenschaften des Surfactant durch Fibrinolyse möglich ist [90], aber das hierbei inkorporierte Surfactantmaterial hemmend auf die Fibrinolyse wirkt [89, 90]. Deshalb sollten auch die Inaktivierbarkeit exogenen Surfactantmaterials durch Fibrininkorporation und der Einfluß des Surfactant auf die alveoläre Fibrinclearance bei der Beurteilung synthetischer Surfactantpräparationen Berücksichtigung finden. In der vorliegenden Arbeit wurde die unterschiedliche inhibitorische Kapazität verschiedener Surfactantpräparationen auf die plasmininduzierte Fibrinolyse dargestellt. Insbesondere das hydrophile Apoprotein SP-A, das sich in den durchgeführten in-vitro-Versuchen als Antagonist der Fibrinolyseinhibition erwies, könnte als Bestandteil synthetischer Surfactantpräparate einer beschleunigten Fibrinolyse nach Inkorporation exogenen Surfactantmaterials förderlich sein und auf diese Weise zur Erhöhung der

Effektivität exogen applizierten Surfactantmaterials beitragen. Die Zugabe des hydrophilen Apoproteins SP-A zu exogen appliziertem Surfactant wäre auch deshalb zu erwägen, weil SP-A in einigen in-vitro-Untersuchungen die oberflächenaktiven Eigenschaften pulmonalen Surfactants verbesserte [42, 49, 111, 218, 224, 239, 293, 326] und der Beeinträchtigung der oberflächenaktiven Eigenschaften pulmonalen Surfactants durch Serumproteine entgegenzustehen scheint [48, 293].
Als weiterer möglicher therapeutischer Ansatz ergibt sich aus den oben aufgeführten Aspekten die Entwicklung von Kombinationspräparaten aus Surfactantbestandteilen und Plasminogenaktivatoren mit dem Ziel der Wiedergewinnung von Surfactant durch möglichst selektive Lyse von Fibringerinnseln mit inkorporiertem Surfactant. Als Surfactantbestandteil würde sich aufgrund der in der vorliegenden Arbeit gezeigten hohen Affinität zu Fibrin die Verwendung des hydrophoben Apoproteins SP-B anbieten. Erfolgversprechende Untersuchungen werden derzeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.
Eine Beeinflussung des alveolären Umsatzes von Fibrin erscheint angesichts des hohen surfactantinhibitorischen Potentials also therapeutisch erstrebenswert. Weitere Argumente hierfür ergeben sich außerdem aus der Vermutung, daß auch die fibrotischen Umbauvorgänge nach ARDS ihren Ausgangspunkt in der durch gestörte Surfactantfunktion und Fibrinverklebung bedingten dauerhaften Apposition der Alveolarwände haben (Konzept der „collapse induration“ nach Burkhardt) [8, 20, 30, 85, 122, 123, 124, 125, 126, 128, 169, 190, 240, 241, 246, 328]. Eine persistierende und überschießende Fibrinbildung im alveolären Kompartiment könnte also einen wesentlichen Pathomechanismus sowohl der akuten respiratorischen Insuffizienz wie auch der daraus sich entwickelnden Fibrose darstellen. Aufgrund der möglicherweise lebensbedrohlichen Komplikationen einer kompartimentalisierten Lysetherapie muß dieses Konzept in extensiven tierexperimentellen Ansätzen weiter überprüft werden.

5. Zusammenfassung

Störungen des pulmonalen Surfactantsystems spielen eine wichtige Rolle bei zahlreichen pulmonalen Erkrankungsbildern, insbesondere auch beim akuten Atemnotsyndrom des Erwachsenen (ARDS). Als bedeutenden Inhibitionsmechanismus pulmonalen Surfactants betrachtet man beim ARDS die Inkorporation des Surfactant in intraalveoläre Fibringerinnsel, die sich im Gefolge einer Exsudation von Plasmaproteinen und einer gesteigerten prokoagulatorischen Aktivität des alveolären Kompartiments bilden. Umgekehrt nimmt aber auch der pulmonale Surfactant Einfluß auf die Fibrino(geno)lyse.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit unter in-vitro-Bedingungen untersucht, welchen Einfluß die Surfactantapoproteine auf die Hemmung der plasmininduzierten Fibrinolyse durch pulmonalen Surfactant und auf die Inkorporation pulmonalen Surfactants in eine Fibrinmatrix ausüben. Zur Beantwortung dieser Fragestellung kamen vor allem ein Mikrotiterplatten-basierender Fibrinolyse-Assay, wie auch ein Filterverfahren zur Trennung unlöslicher Gerinnselkomponenten von löslichen Komponenten nach vorheriger radioaktiver Markierung zur Anwendung. Untersucht wurden natürliche Surfactantpräparationen oder synthetische Phospholipidgemische, denen isolierte Surfactantapoproteine in steigenden Konzentrationen beigefügt wurden.

Zusammengefaßt ergaben sich hierbei folgende Befunde:

Alle untersuchten Surfactantlösungen, das synthetische apoproteinfreie Phospholipidgemisch (PLX = DPPC:PG 7:3 wt/wt), der Kälberlungensurfactantextrakt Alveofact, native „large surfactant aggregates“ vom Kaninchen, wie auch die organisch extrahierten Komponenten dieser „large surfactant aggregates“, führten nach Einbau in ein Fibringerinnsel zu einer dosisabhängigen Inhibition der plasmininduzierten Fibrinolyse. Hierbei fiel auf, daß die Surfactantlösungen, die ausschließlich Surfactantlipide (synthetisches apoproteinfreies Phospholipidgemisch PLX) oder neben den Surfactantlipiden alle drei Surfactantapoproteine SP-B, SP-C und auch SP-A (native „large surfactant aggregates“) enthalten, eine deutlich geringere inhibitorische Kapazität besitzen als Surfactantlösungen, die neben Surfactantlipiden nur die hydrophoben Apoproteine SP-B und SP-C enthalten (Kälberlungensurfactantextrakt Alveofact, organischer Extrakt der „large surfactant aggregates“). Die daraufhin geäußerte Vermutung, daß einerseits die hydrophoben Surfactantapoproteine SP-B und SP-C die durch Surfactantphospholipide hervorgerufene

Inhibition der plasmininduzierten Fibrinolyse verstärken, andererseits das hydrophile Surfactantapoprotein SP-A dieser Inhibition entgegensteht, bestätigte sich in einem Versuch, in dem der Einfluß einzelner Surfactantapoproteine auf die Fibrinolyseinhibition des synthetischen Phospholipidgemisches PLX untersucht wurde. Während Zugabe von jeweils 1 % (wt/wt, bezogen auf Lipide) Kaninchen-SP-B und -SP-C zum PLX die Freisetzung radioaktiv markierter Fibrinspaltprodukte von ca. 17,5% (nur PLX) auf ca. 12 % weiter reduzierte, führte die Zugabe von 1 % SP-A vom Kaninchen zu einer nahezu kompletten Antagonisierung der Fibrinolysehemmung des PLX: im Vergleich zum Kontrollwert (ca. 37 % Freisetzung in Abwesenheit jeglicher Surfactantkomponenten) wurden ca. 35 % radioaktiv markierte Spaltprodukte ermittelt.

Als Ursache für diese unterschiedliche Modulation der durch Surfactantphospholipide hervorgerufenen Inhibition der Fibrinolyse durch Surfactantapoproteine ließ sich ein Einfluß der Surfactantapoproteine per se auf die Fibrinbildung und die Fibrinolyse weitgehend ausschließen. Demgegenüber zeigte sich, daß das hydrophobe Apoprotein SP-B dosisabhängig die Einbaurate der Phospholipide in ein Fibringerinnsel deutlich verstärkt (bei 2 % SP-B wt/wt: Verdopplung der PL-Einbaurate), während SP-C und SP-A die Einbaurate der Phospholipide in ein Fibringerinnsel nicht wesentlich beeinflussen. Bei diesen beiden Apoproteinen, zusätzlich auch beim SP-B, könnte jedoch die unterschiedliche Beeinflussung der ultrastrukturellen Organisation der Surfactantpräparationen durch SP-A (multilamelläre, große Vesikel) versus SP-B und SP-C (Ausbildung kleiner, diskoidaler Partikel) den beobachteten Effekten auf die Fibrinolysehemmung zu Grunde liegen.

Die hier gewonnenen Ergebnisse führen zu folgendem Fazit:

In Fibrin inkorporierte Phospholipide hemmen die plasmininduzierte Fibrinolyse in vitro. Diese Inhibition wird durch die hydrophoben Apoproteine SP-B und SP-C verstärkt, durch das hydrophile SP-A antagonisiert. Für SP-B läßt sich dies zumindest partiell durch eine gesteigerte Inkorporation der Phospholipide in das Fibringerinnsel erklären; für SP-A und SP-C, aber auch für das SP-B, könnte vor allem eine Veränderung der ultrastrukturellen Eigenschaften der Surfactantpräparationen durch die Apoproteine eine Rolle spielen.