

Abwehrsysteme

E. M. APP, R. BALS, J. BEHR, G. DÖRING, M. GRIESE, H. LINDEMANN, A. SCHUSTER, C. VOGELMEIER

| | | |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| INHALT | 4.1 Husten- und mukoziliäre Clearance 121 | 4.4.3 Zusammenfassung 155 |
| | 4.1.1 Physiologie 121 | 4.5 Proteasen – Antiproteasen 156 |
| | 4.1.2 Husten- und mukoziliäre Clearance 122 | 4.5.1 Proteasen in den CF-Atemwegen 156 |
| | 4.1.3 Interaktion zwischen Husten- und mukoziliärer Clearance 125 | 4.5.2 Wirkungen der Neutrophilen-Proteasen 157 |
| | 4.1.4 Diagnostische Methoden der Clearancebestimmung 127 | 4.5.3 Antiproteasen in den Atemwegen 159 |
| | 4.1.5 Klinik des Hustens 128 | 4.5.4 Das Proteasen-Antiproteasen-Ungleichgewicht bei CF 160 |
| | 4.1.6 Therapeutische Konzepte zur Verbesserung der Clearance 128 | 4.5.5 Zusammenfassung 160 |
| | 4.1.7 Zusammenfassung 130 | 4.6 Sauerstoffradikale 161 |
| | 4.2 Rheologie des Sputums 131 | 4.6.1 Oxidanzien 161 |
| | 4.2.1 Allgemeine Grundlagen 131 | 4.6.2 Oxidanzien-Protease-Kooperation 163 |
| | 4.2.2 Biophysikalische Analyse (Rheologie) 133 | 4.6.3 Antioxidanzien 164 |
| | 4.2.3 Rheologische Methodik 135 | 4.6.4 Redox-Imbalance 165 |
| | 4.2.4 Methoden der Clearancebestimmung 136 | 4.6.5 Antioxidative Therapie 166 |
| | 4.2.5 Rheologie und Clearance 136 | 4.6.6 Zusammenfassung 167 |
| | 4.2.6 Mukolytische Einzel- und Kombinationstherapie 137 | 4.7 Immunologie der bakteriellen Lungeninfektion 167 |
| | 4.2.7 Zusammenfassung 138 | 4.7.1 Ursachen bakterieller Lungeninfektionen 167 |
| | 4.3 Körper eigene antimikrobielle Abwehrsysteme 139 | 4.7.2 Mechanismen bakterieller Persistenz 169 |
| | 4.3.1 Großmolekulare (MG>10000) antimikrobielle Substanzen der Atemwegsflüssigkeit 139 | 4.7.3 Expression von Zytokinen 169 |
| | 4.3.2 Kleinmolekulare (MG<10000) antimikrobielle Substanzen der Atemwegsflüssigkeit 144 | 4.7.4 Stickoxid und Lymphozyten 169 |
| | 4.3.3 Zusammenfassung 148 | 4.7.5 Antikörperantwort und Immunkomplexbildung 170 |
| | 4.4 Surfactant-System 149 | 4.7.6 Neutrophile Granulozyten: Reaktionen lysosomaler Proteinase 171 |
| | 4.4.1 Biophysikalische Funktion von Surfactant 149 | 4.7.7 Neutrophile Granulozyten: Reaktionen reaktiver Sauerstoffverbindungen und Arachidonsäuremetabolite 171 |
| | 4.4.2 Immunmodulatorische Funktionen von Surfactant 152 | 4.7.8 Zusammenfassung 173 |
| | | Literatur 173 |

4.1

Husten- und mukoziliäre Clearance

E. M. APP, M. GRIESE, H. LINDEMANN

Als *Mukus* wird das tracheobronchiale Sekret bezeichnet, das von sekretorischen Zellen (Becherzellen, Clarazellen) und Drüsen (submuköse Drüsen) gebildet wird und seröse (serumvergleichbare) und muköse (schleimige) Anteile besitzt.

Sputum ist eine Mischung aus Mukus und Entzündungszellen, Zellbestandteilen, Bakterien sowie einer Beimischung von Speichel.

4.1.1

Physiologie

Anatomisch und funktionell gliedert sich die Lunge in obere und untere Atemwege sowie den Alveolar-

raum, in dem der Gasaustausch stattfindet. Blut wird diesem System über die Pulmonalarterien (*Vasa privata*) zur Oxygenierung und die Bronchialarterien (*Vasa nutritia*) zur Ernährung zugeführt.

Die Grenze zwischen oberen und unteren Atemwegen bildet der Kehlkopf. Die Bronchiolen (Bronchioli terminales) bilden das distale Ende der luftleitenden Atemwege. Die Bronchioli respiratorii bilden die Übergangszone zwischen luftleitendem und gasaustauschendem System. Der Querschnitt der Atemwege beträgt in der Trachea beim Erwachsenen ca. 2 cm² und in den Bronchioli terminales, als Summe der Einzelquerschnitte, 80 cm² („Trompeten-Modell“ nach Weibel [1]). Entsprechend dem Atemwegsquerschnitt verlangsamt sich der Atemstrom von der Trachea zur Peripherie. Trachea und Bronchien werden von einem mehrreihigen Flimmerepithel ausgekleidet, dessen Höhe mit zunehmender Verzweigung in den Atemwegen abnimmt. Die vier wichtigsten Zelltypen des Epi-

thels sind Basalzellen, Flimmerzellen, Becherzellen und die sog. hellen Zellen.

Basalzellen haben eine Pyramidenform, deren Basis der Basalmembran aufsitzt und mit der Spitze zur Epitheloberfläche zeigt, diese in der Regel jedoch nicht erreicht. Sie sind die Stammzellen des Epithels und können zu Zilien- und Becherzellen differenzieren.

Die *Flimmerzellen* dominieren zahlenmäßig, ihr Verhältnis zu Becherzellen beträgt im oberen und mittleren Bronchialsystem 4:1. Die Oberfläche einer Flimmerzelle trägt zwischen 200 und 300 Zilien mit einem mittleren Durchmesser von 0,2–0,3 µm und einer Länge von 5 µm. Jede Zilie kennzeichnet die typische Innenstruktur von zwei zentralen Mikrotubuli und neun ringförmig angeordneten peripheren Mikrotubuli (9+2-Struktur). Die zentralen und peripheren Mikrotubuli sind durch radiär angeordnete Filamente (Radspeichenstruktur) miteinander verbunden. Die peripheren Mikrotubuli besitzen je 2 Dynein-Arme (äußere und innere), die gewissermaßen den Motor der Zilienbewegung darstellen. Durch Gleiten der Mikrotubuli innerhalb einer Zilie gegeneinander, je nach Bewegung und aktiver Verankerung, wird die Bewegung der Zilie durch ihre Dynein-Arme (kontraktile Proteine) gesteuert. Ein Basalkörperchen verankert jede Zilie, das in einem wurzelähnlichen Fortsatz ausläuft und eine Verbindung zur Basalmembran herstellt. Einzelne, komplett isolierte Flimmerzellen zeigen daher insgesamt die Form einer Karotte. Zwischen den Zilien auf der Oberfläche der Epithelzellen befinden sich in regelmäßiger Anordnung Zytoplasmaausstülpungen, Mikrovilli, welche für die Produktion der periziliären Flüssigkeit des Epithels von Bedeutung sind.

Becherzellen produzieren neben den submukösen Drüsen den Mukus, die schleimige Gelschicht des Epithels. In dem Becher dieser Zellen werden Mukoglykoproteine in gefalteter Konfiguration in Sekretgranula sezerniert. An der Epitheloberfläche der Becherzellen werden diese Sekretgranula ins Lumen der Atemwege freigesetzt, die gefalteten Mukoglykoproteine werden dort freigegeben und entfaltet. Bei dieser Entfaltung werden diese Proteine zum einen hydriert und andererseits mit den in der periziliären Flüssigkeit vorhandenen Elektrolyten beladen. Die physikalisch-rheologischen Eigenschaften des bronchialen Mukus werden an dieser Stelle primär festgelegt.

Die „hellen Zellen“, von Kulschitzki erstmalig beschrieben, entstammen dem APUD-System („amine precursor uptake decarboxylase“) und besitzen endokrine Funktionen. In diesen Zellen werden Katecholamine etc. gespeichert und abgebaut. Vergleichbare Zellen kommen im Pankreas, Urogenitaltrakt und Endokrinium vor. Die definitive biologische Bedeutung ist jedoch noch nicht im Einzelnen aufgeklärt.

Der weit überwiegende Anteil des bronchialen Mukus des Menschen wird in den submukösen Drüsen als gemischt-seromuköses Sekret gebildet und über einen gemeinsamen Drüsenausführungsgang auf die Schleimhaut freigesetzt.

Die Mukosa der distalen *Bronchioli terminales* ist flacher ausgebildet als in den größeren Atemwegen, der Flimmerepithelzellbesatz ist geringer und die Zilienlänge dieser Flimmerzellen kürzer. Im Vordergrund dieser Region steht die metabolisch hoch aktive, sekretorische Clara-Zelle, die Proteine, Polysaccharide, Cholesterin und Surfactant produziert.

Die *Innervation der Bronchien* erfolgt über Äste des Vagus und den thorakalen Sympathikusgrenzstrang. Stimulation des Vagus führt zu Bronchokonstriktion, einer erhöhten Aktivität der Drüsen und Becherzellen sowie zu einer geringen Dilatation der Pulmonalgefäße. Sympathikusinnervation aktiviert die Flimmerzellen, modifiziert die Zusammensetzung der Sekrete und relaxiert die Bronchialmuskulatur.

Die *Hydrierung des respiratorischen Epithels* erfolgt mittels aktivem und passivem Wassertransport. Die Homöostase des Wasserhaushaltes am Epithel ist sowohl für die relative Hydrierung der Gelphase (Mucus), und somit für seine viskoelastischen Eigenschaften, von Bedeutung als auch für die absolute Höhe der Solphase, und damit direkt für das Zusammenspiel von Zilien und Mucus [2]. Sowohl ein erhöhter wie auch ein verminderter Wassergehalt (Höhe des periziliären Layers) reduziert beträchtlich die Effektivität der mukoziliären Clearance [3]. Während durch die interzellulären Verbindungen („tight junctions“) Wasser, einem osmotischen Gradienten folgend, passiv fließen kann, wird es trans-epithelial primär durch Elektrolyttransport aktiv transportiert. Durch ein kompensatorisches Wechselspiel auf das Epithel zwischen aktiver Chloridsekretion und Natriumrückresorption an der apikalen Seite der Epithelzelle wird dieser Vorgang gesteuert (vgl. Abschn. 9.2).

4.1.2 Husten- und mukoziliäre Clearance

Die Schleimhaut des Respirationstraktes steht unmittelbar mit der Umwelt in Kontakt. Zur Abwehr exogener Noxen stehen physikalische, zelluläre und biochemische Mechanismen zur Verfügung. Die hier beschriebenen physikalischen Abwehrmechanismen der Mucusclearance, Husten- und mukoziliäre Clearance, werden primär über Mucussekretion und den Mukustransport gesteuert.

Für den klinischen Alltag sollte jedoch keinesfalls vergessen werden, dass bereits die *oberen Atemwege*,

Nase und Glottis, entscheidende Schutzfunktionen für die Lunge durch ihre physiologischen Funktionen besitzen [4, 5]:

- Filterung von Partikeln aus der Atemluft, bereits ab einem Durchmesser von 100 nm,
- Befeuchtung der Einatemluft von 35% auf nahezu 100% relativer Luftfeuchte,
- Anwärmung der Einatemluft auf Körpertemperatur,
- Abpufferung (pH-Neutralisierung) von eingeatmeten Gasen und Aerosolen,
- reflektorischer Glottisschluss beim Schlucken.

In die unteren Atemwege gelangt auf diese Weise eine bereits grob gefilterte, erwärmte, neutralisierte und befeuchtete Luft. Passieren dennoch Schadstoffe die Glottis, so werden diese normalerweise durch die mukoziliäre Clearance, den Hustenmechanismus sowie die Barriere-, Puffer- und Immunfunktion der Mukosa neutralisiert, unterstützt durch den darüberliegenden Mukus [6].

Mukoziliäre Clearance

Die wesentlichste Aufgabe der mukoziliären Clearance ist die gemeinsame Entfernung von inhalierten und deponierten Fremdkörpern sowie Schadstoffen zusammen mit dem in den Atemwegen gebildeten Mukus [7]. Der Zilienschlag erfolgt physiologisch in Richtung des Mukustransportes 2- bis 3-mal schneller („effective stroke“) als entgegengesetzt („recovery stroke“), mit einer Frequenz von 10–20 Hz [8]. Die Koordination der 200–300 Zilien pro Flimmerzelle sowie der Zilien der verschiedenen Zellen untereinander erfolgt durch mechanische Koppelung über adhäsive Kräfte in der Periziliarflüssigkeit. Hierbei setzt sich jeweils die Bewegung der Einzelzilie auf die Nachbarzilie fort und durch den seitlich ausgeführten Erholungsschlag werden Nachbarzilien angeregt. Die Gesamtrichtung ist dabei nach zentral bzw. nach oral gerichtet und wird in metachronen Feldern koordiniert, vergleichbar einem Kornfeld, über welches der Wind weht. Das intakte mukoziliäre System der Lunge funktioniert wie eine Rolltreppe, die aus zwei Teilen besteht [9], einer Solphase (periziliäre Flüssigkeit mit meist serumidentischen Proteinen) und einer dickflüssigen Gelphase, dem Mukus, mit hochmolekularen Glykoproteinen (wie neutrale Fukomuzine, saure Sialomuzine und saure Sulfomuzine), die primär für die viskoelastischen Eigenschaften des Bronchialsekrets verantwortlich sind. Ein geringer Elastizitätsmodul und eine niedrige Viskosität stellen die besten rheologischen Voraussetzungen für eine Elimination des Sekrets dar (vgl. Abschn. 4.2). Neben den rheologischen Mukuseigenschaften sind für die Effektivität des Gesamtsystems eine delikate Abstimmung

aller Komponenten, Mukusbeschaffenheit, Zilienschlagfrequenz und Richtung sowie die Höhe der periziliären Schichtdicke von Bedeutung. Der Zilienschlag erfolgt hierbei in zwei Phasen, einem effektiven Schlag („effective stroke“), in dem sich die Zilie in ihrer gesamten Länge aufrichtet und schnell und kräftig oralwärts zuschlägt sowie einem Erholungsschlag („recovery stroke“), bei dem die Zilie sich aktiv beugt und langsam in die Ausgangsposition zurückkehrt. Während des effektiven Schlages taucht die Zilie ihre Spitze in die Gelphase (Mukusschicht) und beschleunigt diese. Während des Erholungsschlages zieht sie sich in die dünnflüssigere, niedervisköse Periziliarflüssigkeit (Solphase) zurück. Ob noch eine dritte Schicht diesem System zugerechnet werden muss, ein surfactantähnlicher Phospholipidbilayer, wird kontrovers diskutiert [10, 11]. Dass surfactantähnliche Phospholipide im Bronchialmukus vorhanden sind, steht jedoch außer Frage. Ob jedoch eine kontinuierliche Schicht zwischen Gel- und Solphase besteht oder aber nur einzelne, nicht zusammenhängende Vesikel vorkommen, ist, ebenso wie deren prinzipielle Bedeutung, weiterhin unklar.

Die Transportgeschwindigkeit des Mukus nimmt von peripher nach zentral zu, da einerseits die Zilienbewegungen nach zentral schneller werden und andererseits der Zilienbesatz in gleicher Richtung zunimmt. Die mittleren Transportgeschwindigkeiten nach Messungen in Hundelungen bei 22°–26°C betragen in der Trachea 12,6, im Lappenbronchus 8,2, im Segmentbronchus 4,0 und im Subsegmentbronchus 1,6 mm/min [12].

Hustenclearance

Als weiteres, sekundäres Klärsystem stellt die Hustenclearance einen Ersatz- oder Kompensationsmechanismus dar, wenn die mukoziliäre Clearance ineffektiv ist oder gar ausfällt. Dies kann primär z. B. bei der angeborenen primären ziliären Dyskinesie, Sonderform Kartagener-Syndrom, oder aber sekundär oder erworben z. B. beim Raucher oder bei bronchialer Infektion vorkommen.

Husten wird definiert als eine reflektorisch ausgelöste, explosionsartige Atmung. Seine Aufgabe ist es, Fremdkörper und Sekrete aus dem Pharynx, Larynx und dem Tracheobronchialsystem zu eliminieren. Der Husten beginnt mit einer raschen, kurzen Inspiration, gefolgt von einem Schluss der Stimmritzen innerhalb von weniger als 0,2 s. Durch aktive Muskelkontraktion erhöht sich nun der intrathorakale und intraabdominelle Druck gegen die dicht verschlossene Glottis bis zu Werten von 100 mmHg. Durch eine weitere Erhöhung des abdominalen Druckes steigt der intrathorakale Druck nochmals ruckartig an, worauf sich die Glottis abrupt öffnet

und die Luft explosionsartig mit Spitzengeschwindigkeiten bis zu 300 km/h aus der Lunge ausströmt [13]. Dieser explosionsartige Luftstrom wird begleitet von dem typischen Hustengeräusch, das durch die Oszillation der intrabronchialen Luftsäule entsteht. Das Ausströmen der Luft während der Expiration wird durch erneuten Verschluss der Glottis und konsekutiven Druckausgleich zwischen Alveolen und Atemwegen beendet. Entscheidend für die Effektivität des Hustenstoßes ist die Höhe des intrathorakalen Druckes, welcher kurz vor Öffnung der Glottis erreicht wird, und die Komprimierbarkeit der Atemwege. Diese dynamische Kompression der Atemwege führt zur Einengung des Bronchialquerschnitts und gleichzeitig zu einer enormen Erhöhung der lokalen Flussgeschwindigkeit, welche für das Abscheren von Sekret von der Bronchialwand sowie dessen Transport entscheidend ist. Wird der Querschnitt der Atemwege durch expiratorische Kompression z. B. nur um 20% verringert, so steigt dadurch die lineare Flussgeschwindigkeit um über 500%.

Der Luftfluss in einer Röhre ist um so größer, je größer die Druckdifferenz zwischen zwei Messpunkten, je geringer die Länge der Röhre und je weiter das Lumen der Röhre ist. Umgekehrt wird nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz, bei laminarer Strömung, unter sonst gleich bleibenden Bedingungen, der Fluss in einer Röhre entscheidend durch den Durchmesser in der 4. Potenz zum Radius beeinflusst. Bei ruhiger Atmung liegt der größte Druckabfall an den größten Engstellen wie Nase und Glottis. Unterhalb der Stimmritzen nimmt der Gesamtquerschnitt der Atemwege exponentiell zu (Trompeten-Modell der Atemwege, s. o.) und der Gesamtemwegswiderstand kontinuierlich ab, obwohl das Kaliber der einzelnen Bronchien stromabwärts kleiner wird. Ab einem Atemwegsdurchmesser von 2 mm ist der Gesamtquerschnitt des Atemtraktes so groß, dass der Anteil des Atemwegswiderstandes dieser Region am Gesamtemwegswiderstand unter 10% absinkt [1]. Die Atemwege sind jedoch keine starren Röhren, sondern dehn- und komprimierbar. Sie folgen den atem-synchronen Druckschwankungen im Brustkorb, weiten sich bei der Einatmung und werden bei der Ausatmung enger. Das Zusammenspiel zwischen der Stabilität der intrathorakalen Atemwege und den elastischen Eigenschaften der Lunge wird am Konzept des „equal pressure point“ deutlich. Die intrathorakalen Atemwege gehen danach bei Einatmung infolge des transmuralen Druckgradienten auf und verengen sich bei Expiration. Bei forcierter Ausatmung verstärkt sich dieser Effekt. Der Druckgradient von der Alveole bis zum Mund fällt während der Expiration entlang der Atemwege so lange ab, bis der intrabronchiale Druck gleich groß ist im Vergleich zum Druck, der durch die Atemmuskulatur erzeugt

wird und dem auf die Pleura übertragenen Umgebungsdruck entspricht. Distal von diesem Druckausgleich gelegene Atemwege (Down-Stream-Segmente) werden komprimiert, sofern sie über kein stabiles Eingerüst wie Knorpelspannen etc. verfügen. Kommt es dann zu einem Verschluss, steigt der alveolareitige Druck sprunghaft an und öffnet die Stenose wieder. Dieser Prozess kann sich in kurzen Abständen wiederholen, der Bronchus oszilliert gewissermaßen zwischen „offen“ und „verschlossen“.

Pathophysiologie der Mukusclearance

Bei der cystischen Fibrose wird auf Grund des Gendefektes das Genprodukt, der sogenannte CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“), verändert. Bereits im Mutterleib verursacht der veränderte CFTR an allen exokrinen Drüsen und Schleimhäuten eine Sekretveränderung, die im Atemtrakt zu einer Chloridverminderung, Natriumverminderung und sekundär auch zu einer Kaliumvermehrung (vermutlich durch Zelluntergang) führt. Über die Elektrolyte Natrium und Chlorid wird die Homöostase des Wasserhaushalts der Schleimhäute reguliert, so dass diese Veränderungen eine Reduktion des Mukus-Wassergehaltes bewirken und dadurch eine Viskositätserhöhung der Sekrete verursachen. Die Viskositätserhöhung bedingt wiederum eine reduzierte Clearance der Sekrete aus den Atemwegen und begünstigt somit das Angehen von Infektionen und schließlich eine Kolonisierung von opportunistischen Keimen in den Atemwegen. Diesen Untersuchungsergebnissen der vergangenen Jahre [2, 14] wurde teilweise durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Welsh widersprochen [15], die mit einer Filterpapier-Proben-Technik sogar einen erhöhten Kochsalzgehalt im Bronchialsekret von CF-Patienten fand. Im Gegensatz dazu zeigen die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Boucher einen normalen Kochsalzgehalt [16]. Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse ist eine abschließende Beurteilung des Elektrolytgehalts von Bronchialsekreten bei CF derzeit nicht möglich. Allerdings unterstützt die moderne elektrophysiologische Diagnostik die Hypothese der Arbeitsgruppe von Boucher (vgl. Abschn. 9.2).

Unbestritten ist, dass durch mikrobielle Infektionen und ganz besonders durch eine bakterielle Besiedelung der Atemwege der Patienten eine massive Einwanderung von Leukozyten, vor allem von neutrophilen Granulozyten, die über chemotaktische Mechanismen zur Infektabwehr in die Atemwege „gelockt“ werden, verursacht wird. Dabei sind es in erster Linie nicht die Mikroorganismen wie Bakterien, welche die Lunge schädigen, wie früher angenommen wurde, vielmehr schädigt die patienten-

eigene Infektabwehr (Immunsystem) zunächst das Epithel und nachfolgend, vor allem durch eine massive Freisetzung von Proteasen, das Lungengewebe [17]. Außer Proteasen werden auch eine Vielzahl von Zellbestandteilen freigesetzt, die mit dem Bronchialsekret interagieren [18]. Für die Clearance des Bronchialsekrets sind hierbei besonders die langkettigen DNA-Moleküle aus dem Zellkern, aber auch Teile des Zytoskeletts (F-Aktinmoleküle) der zugrundegehenden Zellen selbst von großer Bedeutung [19]. Beide sind in der Lage, mit der primären Vernetzungsstruktur (Glykoproteine) des Mukus zusätzliche Verbindungen aufzubauen, und steigern auf diese Weise die durch die relative Dehydratation der Schleimhaut schon ohnehin erhöhte Viskosität des Mukus. Andererseits bilden die langkettigen DNA-Moleküle zusammen mit den F-Aktinmolekülen des Zytoskeletts ein eigenes, Muzin-unabhängiges, sekundäres Netzwerk und machen so das Bronchialsekret noch rigider (vgl. Abschn. 4.2). Das sehr große Molekulargewicht und die relativ inflexible Struktur der DNA-Moleküle sowie die große Menge der im CF-Sputum vorkommenden DNA (bis 43 mg/g Sputum) [20] begünstigen dieses sekundäre Netzwerk, das in seinen physikalischen Eigenschaften bezüglich der Rigidität das primäre Netzwerk der Muzine noch übertrifft. Eine effektive Mukusclearance findet nun nicht mehr statt, so dass es schließlich zum Verschluss von kleineren und mittelgroßen Atemwegen kommt. Dieser Circulus vitiosus muss durchbrochen oder zumindest abgeschwächt werden, damit die Patienten nicht an ihren eigenen Sekreten „ersticken“.

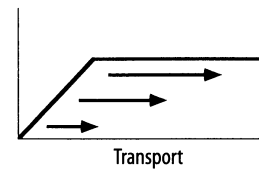
Rheologie und Hustenclearance

Die Hustenclearance übernimmt die Reinigung der Atemwege bei einer Überladung mit Mukus oder bei inadäquater mukoziliärer Clearance.

Eine Untersuchung des viskösen Verhaltens von Mukus kann wesentlich zum Verständnis der Bedeutung des Hustens für die Clearance von Sekreten beitragen (vgl. Abschn. 4.2). Die explosionsartige Ausstoßung von Luft aus den Lungen vermittelt sehr hohe Scherkräfte auf den Mukus, der die Atemwege auskleidet. Wird Mukus einer hohen Scherkraft ausgesetzt, dann fließt er mühelos vorwärts, da seine effektive Viskosität bzw. mechanische Impedanz unter diesen Bedingungen niedrig ist. Im Anschluss an den Hustenstoß fließt das Sekret nicht mehr zurück, da es nur noch der moderaten Scherkraft der Gravitation ausgesetzt ist. Seine effektive Viskosität ist nach einer Scherkraftverdünnung zwar nicht mehr so hoch wie vor dem Hustenmanöver, jedoch noch hoch genug, um nicht in die Peripherie der Lunge abzufließen. In dieser Hinsicht ist tracheobronchialer Mukus mit gut konstruierter Farbe vergleichbar, die, wenn sie zügig gestrichen wird, gut fließt, wohingegen

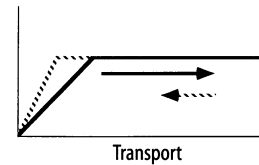
Viskosität

- Primärvariabel
- Newton-Gesetz



Spinnbarkeit

- Große Verformungs-
elastizität, inhibiert
Verformung



Adhäsivität

- Oberflächenspannung,
inhibiert Wellenbildung,
vermindert Luft-Mukus-Interaktion

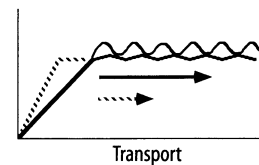


Abb. 4.1. Determinanten der Hustenclearance (Erläuterungen s. Text)

gen sie nach beendetem Streichen an den Wänden kleben bleibt.

Die Phänomenologie der Beziehung zwischen Hustenclearance und Mukusrheologie lässt sich mittels eines Hustensimulators näher untersuchen [21, 22]. Die Abhängigkeit der Hustenclearance von der Mukusviskosität, Elastizität und Adhäsivität ist in Abb. 4.1 dargestellt (s. Newton-Gesetz, Abschn. 4.2.). Die Mukusviskosität (Fließwiderstand) ist dabei die wichtigste Variable, welche die Hustenclearance beeinflusst. Die Elastizität kommt hierbei als sogenannter Recoil-Effekt ins Spiel, mit einem möglichen Zurückspringen des Mukus zum Ausgangspunkt vor dem Hustenstoß. Eine hohe Spinnbarkeit oder ein niedriges Viskosität/Elastizität-Verhältnis inhibieren die Hustenclearance ebenso wie eine hohe Adhäsivität oder Oberflächenspannung [23]. Letztere unterdrückt die Mukus-Luftstrom-Interaktion, welche sich während eines Hustenmanövers als Wellenformation zeigt. Zahm et al. konnten zeigen, dass die Mukus-Thixotropie oder Scherkraftverdünnung bedeutsam für die Beschreibung der Bewegung von Mukus bei wiederholten, raschen Hustenmanövern sowie bei hoch frequenter Oszillation ist [24].

4.1.3

Interaktion zwischen Husten- und mukoziliärer Clearance

Patienten mit CF haben primär keine reduzierte mukoziliäre Clearance, wie dies in älteren Arbeiten mit Beschreibung eines zilienhemmenden Faktors vermutet wurde [25, 26]. Jedoch vermindern fortschreitende Entzündungsreaktionen in den Atemwegen der Patienten die Effektivität der ziliären Mukusclear-

ance durch epitheliale Defekte an der respiratorischen Schleimhaut und exzessive Überlastung des Systems mit zähem Bronchialsekret [27].

Warum nun die mukoziliäre Clearance bei CF, trotz der Wasser- und Elektrolytstörung mit zähem Mukus, anfangs noch normal ist, könnte durch tierexperimentelle Arbeiten von Iravani et al. [8] erklärt werden. Sie beobachteten bei Kaliumzugabe eine Beschleunigung der mukoziliären Elimination. So könnte der Kaliumreichtum des Mukus der CF-Patienten der erhöhten Viskosität des Mukus und damit Einschränkung der Clearance initial entgegenwirken.

Dass eine Störung der mukoziliären Clearance allein keine entscheidende pathogenetische Relevanz bei der CF bedeuten müsste, zeigen eindrucksvoll die Krankheitsverläufe der Patienten mit primärer ziliärer Dyskinesie. Durch mikroanatomische Strukturstörungen der Zilien (2+9-Struktur) verfügen diese Patienten über keine mukoziliäre Clearance. Aufgrund dieser Tatsache entwickeln alle diese Patienten eine chronische Bronchitis, meist mit Bronchiektasen und entsprechenden Folgeschäden wie Cor pulmonale und Lungenemphysem. Dennoch sind die Krankheitsverläufe dieser Patienten viel milder als bei der CF, denn sie erreichen heute eine fast normale Lebenserwartung [28].

Bei Störung oder Ausfall der mukoziliären Clearance – angeboren oder erworben – kommt es normalerweise zu einer kompensatorischen Zunahme der Hustenclearance. Für ein effektives Hustenmanöver ist hierbei eine bestimmte Mukusmenge und ein bestimmter Expirationsfluss, abhängig vom Bronchialdurchmesser, erforderlich. In diesem Sinne stellt die Entwicklung einer „Bronchitis“, durch Sekretionssteigerung bzw. Drüsenvermehrung, einen sinnvollen Anpassungsmechanismus dar, der bei CF zwar auch gefunden wird, jedoch aufgrund des rheologisch veränderten Bronchialsekretes, das die Expektoration hemmt, sowie oft vorhandener bronchialer Instabilität nicht effektiv genug ist.

Die primäre Reinigung der Atemwege von inhalierten Schadstoffen wird durch eine effiziente ziliäre Clearance, d.h. optimale Interaktion zwischen Zilien und Mukus, bewerkstelligt. Ist diese gestört, übernimmt die Hustenclearance, Luftstrom-Mukus-Interaktion, als sekundäre Reinigungsfunktion diese Aufgabe. Bei Patienten mit *chronischer Bronchitis* funktioniert dieser sekundäre Mechanismus entsprechend, wie in Abb. 4.2a zu sehen ist. Bei Patienten mit guter mukoziliärer Clearance ist die Hustenclearance nur gering. Im Gegensatz hierzu ist bei schlechter ziliärer Mukusclearance dieser Patienten die Hustenclearance weit effektiver. Eine ineffiziente mukoziliäre Clearance wird bei diesen Patienten durch eine effiziente Hustenclearance sehr wirkungsvoll kompensiert.

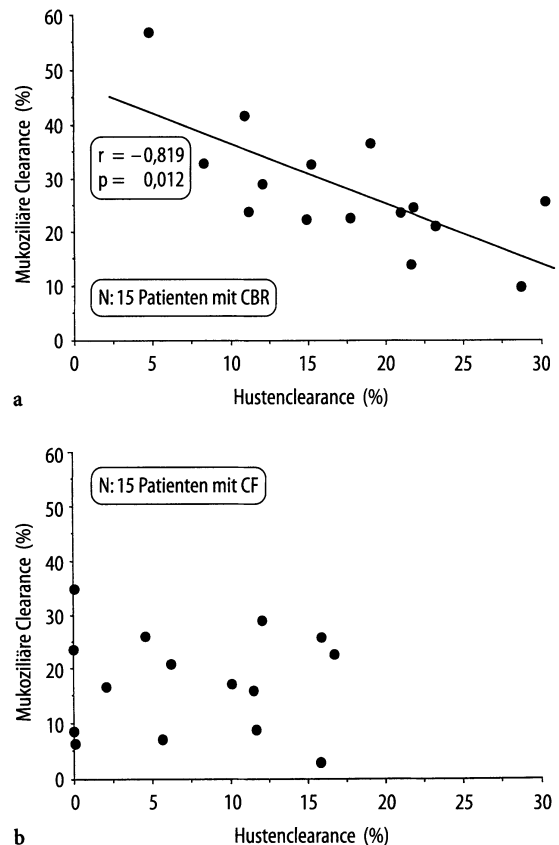


Abb. 4.2. Beziehungen zwischen mukoziliärer Clearance und Hustenclearance bei Patienten mit chronischer Bronchitis (CBR) und cystischer Fibrose (CF)

Bei Patienten mit *CF* ist dieser Zusammenhang beider Clearanceformen, trotz einer weiten Streuung der ziliären Effektivität (Patienten mit guter und schlechter Clearance) nicht nachweisbar. Selbst Patienten mit reduzierter mukoziliärer Clearance haben keine adäquate Hustenclearance, wie in Abb. 4.2b zu sehen ist. Pathophysiologisch bedeutet dies, wie durch den klinischen Alltag bestätigt wird, dass sich die Lungen der Patienten mit CF ohne weitere Unterstützung ihrer Mukus-Clearance bei mittelschweren bis schwereren Verlaufsformen langsam, aber sukzessive zunehmend mit Mukus füllen.

Bei insgesamt insuffizienter Mukus-Clearance, mukoziliärer Clearance oder Hustenclearance, muss eine wirksame Physiotherapie die Atemwege von den enormen Sekretmassen befreien (vgl. Abschn. 9.2). Wird dies nicht in ausreichendem Maße erreicht, erhöht sich dadurch die mittlere Verweildauer der Sekrete in den Atemwegen, die Bakterienlast der Sekrete steigt und die Entzündungskaskade erreicht einen höheren Level. Das Bronchialsekret (Mukus) ist ein idealer Nährboden für Bakterien und Pilze durch seinen relativ hohen Wassergehalt, Nährstoffreich-

tum (Zucker- und Proteinverbindungen) sowie eine Umgebungstemperatur von ca. 37°C. Nicht selten werden bei schwer kranken Patienten Bakterienzahlen von bis zu 10⁹ Keimen pro Gramm Sputum nachgewiesen [29, 30].

Die Beziehung zwischen Infektion und deren Produkten wie z. B. dem DNA-Gehalt im Sputum von CF-Patienten und der Mukusclearance wird, in analoger Weise zum Verhältnis zwischen mukoziliärer Clearance und Hustenclearance deutlich (Abb. 4.3 a, b): Mit zunehmendem DNA-Gehalt im Sputum von CF-Patienten wird die mukoziliäre Clearance signifikant negativ beeinflusst (quasi halbiert) und die Effektivität der Hustenclearance letztlich sogar ausgelöscht. Diese neueren Untersuchungsergebnisse unterstreichen in eindrucksvoller Weise den pathophysiologisch bedeutsamen Zusammenhang zwischen muko-

ziliärer Clearance und gestörter Hustenclearance bei CF als eine entscheidende Einflussgröße für die Prognose der Erkrankung [2, 8].

4.1.4 Diagnostische Methoden der Clearancebestimmung

Methoden zur Bestimmung des Mukoziliartransportes reichen von direkter In-vitro-Beobachtung (z. B. am Froschgaumen, [3]) bis zu In-vivo-Indikatormethoden (z. B. Inhalation radioaktiver Partikel [2]). Husten- oder Luftstromclearance kann sowohl mit mechanischen Modellen in vitro [21] als auch mit geeigneten Indikatoren in vivo wie Saccharin-Test [31] untersucht werden. Nachfolgend werden exemplarisch der Saccharin-Test und die radioaktive Erythrozyten-Methodik vorgestellt.

Nichtinvasive In-vivo-Diagnostik mittels Saccharin-Test

Zur nichtinvasiven Bestimmung der mukoziliären Clearance der Nase und somit exemplarischen, generellen Funktionstestung wird ca. 100 µg Saccharin-Pulver mittels Applikator auf die Schleimhaut des inferioren Nasengangs, ca. 2–3 cm von der Nasenöffnung entfernt, aufgebracht. Der Patient wird anschließend aufgefordert, regelmäßig, etwa alle 30 s, zu schlucken und den ersten Geschmack von Süßigkeit durch das Saccharin-Pulverpartikel anzuzeigen. Die Saccharin-Pulverpartikel werden mit der mukoziliären Clearance der Nasenschleimhaut von der Nasenöffnung in Richtung Pharynx transportiert, dort verschluckt und bewirken auf diesem Wege eine Anregung der süß empfindenden Geschmacksknospen der Zunge. Normalerweise wird nach einer Latenzzeit von 19 ± 5 min süß geschmeckt. Werte über 30 min sind pathologisch und können, nach Abschluss einer Naseninfektion innerhalb der letzten 14 Tage, einen wertvollen Hinweis auf eine gestörte mukoziliäre Clearance liefern.

In-vivo-Husten- und mukoziliäre Clearance mit radioaktiv Tc^{99m}-markierten Erythrozyten

Patienteneigene Erythrozyten werden nach wiederholten Waschungen mit 0,9%-NaCl-Lösung mit Technetium (Tc^{99m}) radioaktiv markiert und anschließend mit Glutaraldehyd fixiert. Abschließende Waschungen mit 0,9%-NaCl-Lösung erzeugen eine inhalationsfertige Suspension mit radioaktiv markierten Erythrozyten. Diese Suspension wird mittels Düsenvernebler (Pari-Standard) in ein Reservoir (1-l-Gummibeutel) aerosolisiert. Dieses gebrauchsfertige Aerosol wird dann vom Patienten aus dem Reservoir über eine Helix (Spindel) inhaliert. Die Helix garantiert hierbei die Inhalation eines ausschließlich

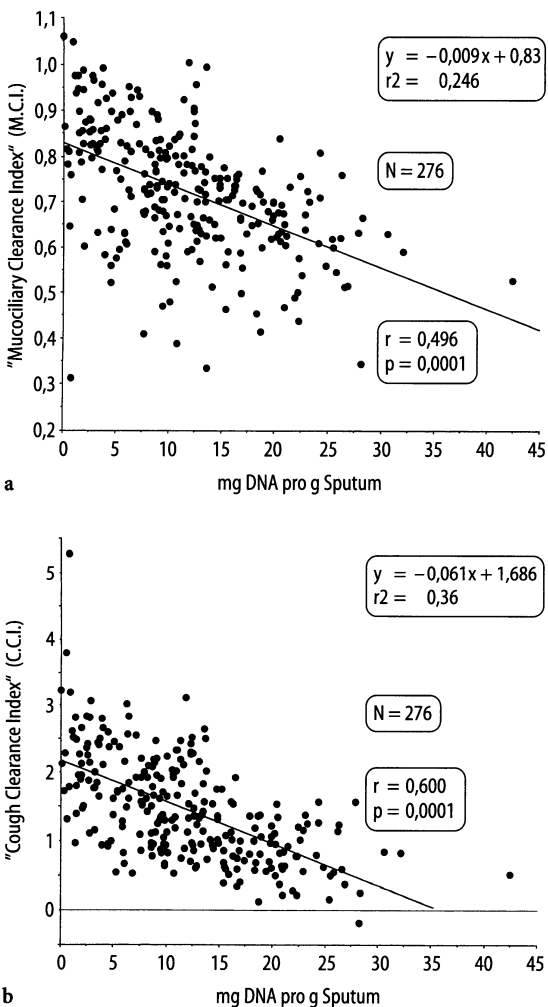


Abb. 4.3. a Beziehungen zwischen mukoziliärer Clearance (M.C.I.) und dem DNA-Gehalt im Sputum von CF-Patienten, b Beziehungen zwischen Hustenclearance (C.C.I.) und dem DNA-Gehalt im Sputum von CF-Patienten

monodispersen Aerosols, da in der Helix alle Doublets und Multiplets (Verklebung von zwei und mehr Erythrozyten aneinander) durch Zentrifugalkraft eliminiert werden. Das jetzt mit langsamen, inspiratorischen Vitalkapazitätsmanövern inhalierte, ausschließlich monodisperse Aerosol garantiert dadurch eine relativ homogene und reproduzierbare Deposition in der Lunge.

Nach erfolgter initialer Depositionsaufnahme mittels Großfeld-Szintillationskamera wird über eine Stunde die ziliäre Elimination der markierten Erythrozyten aus der Lunge gemessen und als prozentuale Clearance im Bezug zum Ausgangswert dargestellt. Anschließend wird über 10 min mit 5 standardisierten Hustenmanövern (FET oder Huffing) die Effektivität des Hustens wieder in Bezug auf die initial radioaktiv deponierte Menge in prozentualer Hustenclearance analysiert. Diese Messungen können unter Baseline-Bedingungen und/oder unter Therapie zur Evaluierung ihrer Effektivität erfolgen.

International wird diese Art der Clearance-Bestimmung als Gold-Standard angesehen, da nur hier ohne sonst notwendige Annahmen und Korrekturen die entsprechende Clearance direkt bestimmt werden kann.

4.1.5

Klinik des Hustens

Husten als klinisches Leitsymptom vieler Patienten muss bei produktivem Husten – wie erwähnt – als Kompensationsmechanismus bei überlasteter oder inadäquater mukoziliärer Clearance verstanden werden, während unproduktiver, nicht Schleim fördernder Husten einen infektiösen oder allergiebedingten Reizzustand der Atemwege oder zumindest des Kehlkopfs anzeigt.

4.1.6

Therapeutische Konzepte zur Verbesserung der Clearance

Optimierung des Wasserhaushalts

Das Bronchialsekret von CF-Patienten hat, wie in Abschn. 4.1.2 beschrieben, im Vergleich zu gesunden Normalpersonen einen reduzierten Basis-Wassergehalt, der die Mukusrheologie und Clearance beeinflusst. Diesem Umstand muss durch eine adäquate orale Flüssigkeitszufuhr Rechnung getragen werden. Allein durch die normale Perspiratio insensibilis durch Diffusion und Verdunstung an der Haut und Schleimhaut kommt es im Tagesdurchschnitt bereits zu einem Wasserverlust von 1–2 l/Tag. Dieser Was-

serverlust muss zumindest ausgeglichen werden, damit vermieden wird, dass durch eine ungenügende Flüssigkeitszufuhr der Körper zur Aufrechterhaltung einer effektiven Zirkulation Wasser in der Peripherie, also auch an den Schleimhäuten, einspart. Die besondere kardiale und renale Situation eines jeden Patienten muss hierbei berücksichtigt werden. Bei Niereninsuffizienz und/oder Herzinsuffizienz muss bei akuter Überwässerung zwar eine Bilanzierung der Flüssigkeitszufuhr vorgenommen werden, eine ausschließliche Nasenatmung sowie mehrmals tägliche Kochsalzinhalationen können in diesem Fall die Schleimhaut zusätzlich rehydrieren, pflegen und schützen. Der Wasserverlust des Körpers ist bei Nasenatmung bedeutend geringer im Vergleich zur Mundatmung [5]. Bei CF ist die Nasenatmung jedoch aufgrund von rezidivierenden Sinusitiden und Nasenpolypen in vielen Fällen behindert, sodass die physiologischen Nasenfunktionen beeinträchtigt sind. Unter Umständen sind wiederholt HNO-Eingriffe erforderlich zur Erhaltung der Nasenatmung.

Pharmakologische Therapie

Im Gegensatz zu Nordamerika ist die herkömmliche Mukolytikatherapie in Europa weit verbreitet. Entsprechend den Wirkungsmechanismen sollen sechs der gebräuchlichsten Therapien im folgenden kurz beschrieben werden: N-Acetyl-Cystein, hypertone Kochsalzlösung, rhDNase, Gelsolin, Surfactant und mechanische Oszillationen [20]. Eine entsprechende Übersicht gibt Abb. 4.4a, b (S. 132).

■ **N-Acetyl-Cystein (NAC).** NAC ist eine Modifikation von Cystein und kann Thiolgruppen (Disulfidbrücken, S-S) spalten. Dieses Therapieprinzip findet zur mukolytischen Behandlung eine breite Anwendung. Die chemische Struktur von disulfidbrücken-tragenden Proteinen und Peptiden wird durch diese Thiolpräparate verändert. Die veränderte Molekularstruktur und die Verkleinerung der Molekulargröße induzieren physikalische Veränderungen an den bronchialen Glykoproteinen wie Sedimentationsverhalten, Elastizität und Viskosität. Bei dieser Reaktion werden Disulfidbrücken (S-S) zu Sulfhydrylgruppen (-SH) reduziert, die nicht mehr an der Vernetzung der Moleküle teilnehmen. Die Viskosität und Elastizität des Mukus wird reduziert. Die dadurch erreichte Änderung der Mukusrheologie konnte bei In-vitro-Untersuchungen mit dem magnetischen Mikrorheometer analysiert und nachgewiesen werden. Liebermann fand bei seinen In-vitro-Untersuchungen darüber hinaus auch eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung: Je höher die verabreichte NAC-Konzentration, um so größer war die Abnahme der Viskosität [32]. Die für erwachsene Patienten optimale orale Dosierung für NAC beträgt nach unserer Erfah-

rung, basierend auf den Erfahrungen von Patienten mit Lungenfibrose [33], 2- bis 3-mal 600 mg/Tag.

■ **Hypertone Kochsalzlösung.** Hypertone Kochsalzlösung kann ionische Verbindungen im Mukusgel unterbrechen und somit den Vernetzungsgrad des Mukus vermindern sowie seine Viskosität und Elastizität auf diese Weise reduzieren. Zusätzlich kann hypertone Kochsalzlösung Wasser aus dem Interstitium anziehen und somit den intraluminalen Wassergehalt vermehren und die Hydrierung des Mukus steigern, wodurch die Mukusclearance wiederum verbessert werden kann. Nach einer Aerosolapplikation von hypertoner Kochsalzlösung wechselt Wasser aus dem Interstitium über das respiratorische Epithel. Dadurch wird das in den Atemwegen deponierte Kochsalz passager verdünnt. Das auf diese Weise besser hydrierte Bronchialsekret kann nun effektiver mit der mukoziliären Clearance oder Hustenclearance eliminiert werden. In purulentem Mukus kann hypertone Kochsalzlösung die darin enthaltenen DNA-Moleküle von den Glykoproteinen trennen und dadurch zu einem verbesserten enzymatischen Abbau beitragen. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Inhalation von hypertonen Kochsalzlösungen die mukoziliäre Clearance bei Patienten mit chronischer Bronchitis und CF verbessert [34, 35], selbst bei Normalpersonen war eine gesteigerte Clearance nachweisbar [36].

Ein vergleichbarer Wirkungsmechanismus ist auch bei inhalierten Medikamenten nachweisbar, welche die Elektrolytzusammensetzung des Bronchialsekretes durch aktive Einwirkung auf die Schleimhaut verändern, wie z. B. Amilorid (vgl. Abschn. 9.2).

Die Wirkungsdauer von hypertoner Kochsalzlösung beträgt jedoch nur 10–20 min nach Inhalation und unerwünschte Nebenwirkungen durch einen höheren Kochsalzgehalt sind nicht zu erwarten. Sämtliche Inhalationen mit hypertoner wässriger Lösung, Trockenpulver oder Treibgasdosieraerosolen können über unterschiedliche Mechanismen zu einer Irritation der Atemwege führen und dadurch eine vorübergehende Atemwegsobstruktion verursachen. Eine Vorbehandlung mit inhalativen Bronchospasmolytika ist daher in vielen Fällen empfehlenswert.

■ **Rekombinante humane DNase (rhDNase).** Hohe DNA-Konzentrationen im Sputum (bis zu 43 mg/g [20]) bei CF verursachen einen signifikanten Anstieg der Sputumviskosität. Eine inhalative Therapie mit rhDNase vermag innerhalb von wenigen Minuten durch die enzymatische Spaltung der langkettigen DNA-Moleküle die Sputumviskosität zu reduzieren und den Mukus der Atemwege von einem nichttransportfähigen Mukusgel in eine transportierbare Flüssigkeit umzuwandeln. Diese Änderung der physikalischen Mukuseigenschaften ermöglicht es den Pa-

tienten, Sputum leichter abzu husten und ihre Lungenfunktion zu verbessern. Die reduzierte Sputumviskosität korreliert hierbei mit der Abnahme der DNA-Molekülgröße von primär hochmolekularen zu niedermolekularen DNA-Fragmenten. Die endogene oder körpereigene DNase genügt jedoch nicht, um die bei chronischen Entzündungen in großem Umfang anfallende DNA ausreichend zu spalten und zu eliminieren. Mehrere Multicenterstudien haben gezeigt, dass sowohl eine Kurzzeit- als auch Langzeitinhalation mit rhDNase sowohl die Lungenfunktion als auch die Mukusclearance von CF-Patienten zu bessern vermag [37, 38].

■ **Gelsolin.** In fast allen eukaryontischen Zellen bilden F-Aktinfilamente eine klare Grenzschicht zwischen dem Zytoplasma der Zelle und ihrer Zellmembran. Diese gelartige Grenzschicht (Zytoskelett) bedingt auf diese Weise die jeweilige Form einer Zelle. Intrazelluläre Proteine wie Gelsolin können F-Aktinfilamente fragmentieren und somit diese Grenzschicht bei Bedarf modulieren. Bei Zelluntergang werden diese F-Aktinfilamente in großer Anzahl freigesetzt und sind z. B. für 10% des gesamten Leukozytenproteingehalts im Sputum verantwortlich. F-Aktin bildet lange, proteinaseresistente, viskoelastische Filamente. Plasma-Gelsolin, ein natürlicher intra- und extrazellulärer Bestandteil, reduziert die Länge der F-Aktinmoleküle. Aufgrund einer fortwährenden und übermäßigen Entzündung in den Atemwegen von CF-Patienten reicht der dort natürlicherweise vorkommende Gehalt an Gelsolin nicht aus, die anfallenden Entzündungsprodukte wie die langkettigen F-Aktinmoleküle zu eliminieren (vgl. DNase). Die Akkumulation von langkettigen F-Aktinmolekülen kann zusammen mit der exzessiven DNA-Konzentration im Sputum ein weiteres, sekundäres Netzwerk, zusätzlich zur Glykoproteinvernetzung (primäres Netzwerk) des Mukus ausbilden und somit ein hochvisköses und zähes Gel formen (vgl. Abschn. 4.2). Vasconcellos et al. demonstrieren, dass im In-vitro-Versuch die initiale Viskosität der CF-Sputen nach einer Behandlung mit nur 100 nM Gelsolin um 62% vermindert werden konnte, unabhängig von der Höhe der Ausgangsviskosität der unbehandelten Sputen [19]. Dasgupta et al. konnten darüber hinaus einen synergistischen Effekt zwischen Gelsolin und rhDNase in einer In-vitro-Untersuchung nachweisen, der weit effektiver war als der mukolytische Effekt jeder dieser Substanzen für sich allein [39]. Als wahrscheinliche Erklärung für diesen Synergismus dient die Hypothese, dass Gelsolin eine erneute Aggregation der bereits enzymatisch gespaltenen Filamentmonomere blockieren soll. Die Spaltung der F-Aktinfilamente reduziert auf diese Weise nicht nur die Viskoelastizität des Mukus mit conse-

ktiv verbesserter Hustenclearance, vielmehr wird hierdurch auch die Neubildung dieser Filamente unterdrückt. Zur Gelsolin-Therapie gibt es zwar zahlreiche In-vitro-Untersuchungen, als Medikament ist es jedoch bisher noch nicht verfügbar und zugelassen.

■ **Surfactant.** Physiologischerweise bewirkt der Surfactant der Lunge ein Offenbleiben der Alveolen während der Atmung. In den Atemwegen bewirkt er eine „Schmierung“ für die Hustenclearance. Er kann darüber hinaus auch die Interaktion der Zilien verbessern und somit die mukoziliäre Clearance begünstigen. Surfactant kann daher beides, mukoziliäre Clearance und Hustenclearance, verbessern sowie die Oberflächenspannung und die physikalischen Verwicklungen im Mukus herabsetzen. Eine therapeutische Modifikation des Zweiphasenmodells (Gel- und Solphase nach Lucas u. Douglas [9]) der respiratorischen Schleimhaut der Lunge könnte daher durch exogen zugeführten Surfactant die Mukusclearance über pathophysiologisch günstigere Funktionsparameter der Gel- und Solphase verbessern. Schürch et al. berichteten in diesem Zusammenhang, dass exogen zugeführter Surfactant die Bildung eines Bilayers zwischen Mukus (Gelphase) und periziliärer Flüssigkeit (Solphase) begünstigte [40] und die mukoziliäre Clearance verbesserte. Es wird vermutet, dass durch eine vermehrte Bilayerformation des Surfactant zwischen Gel- und Solphase die Übertragung der kinetischen Energie der Zilien auf den Mukus verbessert und dadurch der Mukustransport gesteigert werden kann.

■ **Oszillationen und ihre physikalisch-physiotherapeutische Wirkung.** Externe Oszillationen der Atemwege bewirken eine physikalische Entflechtung der im Mukus enthaltenen Makromoleküle und verursachen dadurch eine Reduktion möglicher Verbindungen im Mukusgel [27]. Diese Zerreißen und Entflechtung der Mukoglykoproteine führt im nicht infizierten Mukus über eine Lockerung der primären Netzwerkstruktur zu einer verbesserten Mukusclearance [41]. Zusätzlich sind höher frequente Oszillationen auch in der Lage, in purulentem Mukus die darin enthaltenen DNA-Moleküle mechanisch zu zerkleinern, da diese langkettigen, inflexiblen Moleküle durch physikalische Einwirkung zerbrochen werden können [20]. Grundlegende Arbeiten auf diesem Gebiet konnten zeigen, dass die Mukusclearance von dem Ausmaß der Netzwerkdichte des Mukus abhängt. Höherfrequente Oszillationen bewirken einen erhöhten Luftfluss in den Atemwegen, vibrieren die Bronchialwände und können die Mukomakromoleküle dadurch zerbrechen und entflechten. Höherfrequente Oszillationen sind auch in der Lage die

Schlagfrequenz der Zilien zu erhöhen [42]. Anwendungen von höher frequenten Oszillationen an der Brustwand und in den Atemwegen stellen durch eine hierdurch bedingte Reduktion der Mukusviskoelastizität und Stimulation der ziliären Schlagfrequenz daher eine weitere gute Alternative zur herkömmlichen, konventionellen Physiotherapie dar [43]. Dieses um so mehr, je geschwächer ein Patient ist, um noch selbst eine effektive Physiotherapie durchführen zu können.

In einem mehr oder weniger geringen Umfang ist dieses Wirkprinzip jedoch bei nahezu allen Physiotherapien, Husten oder sogar sportlichen Aktivitäten für eine verbesserte Mukusclearance aus den Atemwegen der Patienten verantwortlich.

4.1.7 Zusammenfassung

Der aus Becherzellen und submukösen Drüsen sezernierte respiratorische Mukus bedeckt das Epithel der Atemwege und wird mittels ziliärer Aktivität (Zilienschlag) oder Atemfluss (Hustenstoß) in Richtung Larynx transportiert. Unter physiologischen Bedingungen eliminiert das Ziliensystem der Atemwege den respiratorischen Mukus. Die Hustenclearance stellt hierbei zusätzlich zur mukoziliären Clearance einen weiteren oder auch kompensatorischen, sekundären Clearancemechanismus dar, wenn das ziliäre System überlastet oder ineffektiv ist.

Bei Patienten mit chronischer Bronchitis funktioniert dieser sekundäre Mechanismus (Hustenclearance) entsprechend bei einer verminderten mukoziliären Clearance. Eine ineffektive mukoziliäre Clearance wird bei diesen Patienten durch eine effiziente Hustenclearance sehr wirkungsvoll kompensiert. Bei Patienten mit cystischer Fibrose ist dieser Zusammenhang beider Clearanceformen trotz einer weiten Streuung der ziliären Effektivität (Patienten mit guter und schlechter Clearance) nicht nachweisbar. Selbst Patienten mit stark reduzierter mukoziliärer Clearance haben keine adäquate Hustenclearance. Pathophysiologisch bedeutet dies, wie durch den klinischen Alltag bestätigt, dass die Lungen der Patienten mit CF ohne weitere Unterstützung ihrer Mukusclearance vor allem bei mittelschweren bis schweren Verlaufsformen sich langsam, aber sukzessive zunehmend, mit Mukus füllen und einen effektiven Gasaustausch erschweren.

Unter diesen Bedingungen sollten alle verfügbaren Therapiemöglichkeiten, ausreichende Hydratierung der Patienten, Mukolytika und Physio-

therapie (vgl. Abschn. 9.2), eingesetzt werden mit dem Ziel, die Verweildauer der Bronchialsekrete der Patienten zu reduzieren. Auf diese Weise wird darüber hinaus auch das erhöhte bakterielle Kolonisations- und Infektionsrisiko vermindert. Einen entscheidenden Einfluss auf diese Clearance-mechanismen hat zweifelsfrei das Ausmaß der Entzündungsvorgänge in den Atemwegen der Patienten. Infektionen sollten daher primär mit einer möglichst suffizienten antibiotischen Therapie behandelt werden. Je wirkungsvoller eine antibiotische, mukolytische und physiotherapeutische Kombinationstherapie ist, desto geringer dürfte das Risiko der Patienten für eine fortschreitende Lungenschädigung sein. Damit wird die Prognose der Erkrankung sehr wahrscheinlich langfristig gebessert.

4.2

Rheologie des Sputums

E. M. APP

Die Definitionen von *Mukus* und *Sputum* sind Abschn. 4.1 zu entnehmen.

Weitere Definitionen: Viskosität (lat.: viscos = zähflüssig, leimartig) die Zähigkeit; Rheologie (gr.: rheo = fließen, logos = das Wort, die Lehre) die Lehre von den Fließeigenschaften; Rheometrie (gr.: rheo = fließen, metrie = messen) die Messung von Fließeigenschaften; Viskometrie (lat.: viscos = zähflüssig, leimartig, metrie = messen) Viskositätsmessung. Mukoviszidose (mukus = Schleim, lat.: viscos = zähflüssig, klebrig).

4.2.1

Allgemeine Grundlagen

Sputumgewinnung

Ein erstes Problem bei biophysikalischen, rheologischen Untersuchungen von Bronchialsekret stellt die Gewinnung dar. Welches Verfahren hierzu gewählt wird, hängt davon ab, welches Personenkollektiv untersucht werden soll. Bei gesunden Probanden zum Beispiel ist die zu erwartende Ausbeute gering und der Zugriff schwierig. Zusätzlich entscheidet die gewünschte diagnostische Information darüber, welches Gewinnungsverfahren eingesetzt werden kann. Sollen rheologische Parameter analysiert werden, dann muss Mukus oder Sputum auf eine besonders schonende Weise gewonnen werden [5].

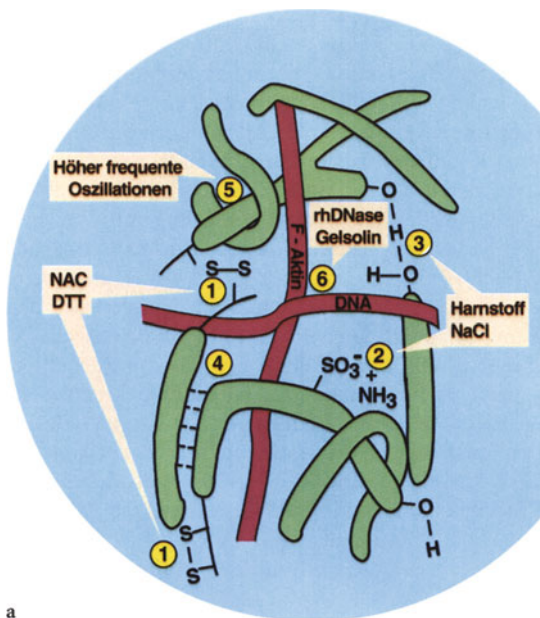
Nichtinvasive Verfahren zur Sekretgewinnung

Bei Lungenerkrankungen, die durch eine chronische Sekrethypersekretion charakterisiert sind, wie bei CF, stellen weder die verfügbare Menge noch deren Gewinnung ein besonderes Problem dar. Der Auswurf (Sputum) ist in diesem Falle das Untersuchungsmaterial der Wahl. Es sollte jedoch Sorge getragen werden, eine Kontaminierung mit Speichel- und Nasensekret zu minimieren. Dies kann dadurch erreicht werden, dass der Patient angehalten wird, vor der Expektoration die Nase zu reinigen und den Mund zu spülen. Die Verwendung von Baumwollröllchen aus dem Dentalbereich, wie es von Puchelle et al. beschrieben wurde [32], ist darüber hinaus sehr nützlich, um Beimischungen von Speichel zu reduzieren. Auch bei CF-Patienten sollte bedacht werden, dass die Produktion von Sputum besonders vom Grad der Exazerbation abhängt und dass Patienten unter einer suffizienten Therapie oft nicht mehr in der Lage sind, die notwendigen Probenmengen zu produzieren.

Die gewonnenen Sputumproben sollten sofort nach dem Abhusten mit leichtem Paraffinöl versiegelt werden, um eine drohende Austrocknung zu vermeiden. Falls eine sofortige Analyse nicht möglich ist, können die Proben auch tiefgefroren werden (80°C Tiefkühltruhe oder Trockeneis). Diese Methode hat sich in den vergangenen Jahren bewährt, als Proben von entfernten Zentren gesammelt und zur Analyse in Speziallabors gesandt wurden [5, 25]. Nach unserer Erfahrung führt auch Kältekonservierung von Sputum zu einer geringen Änderung von seinen viskoelastischen Eigenschaften. Diese Veränderungen liegen jedoch im Bereich der normalen Variation der Messung.

Invasive Verfahren der Sputumgewinnung

Für Patienten, die normalerweise kein Sputum produzieren, gibt es zahlreiche Methoden, um die Sputumproduktion entweder anzuregen oder Mukus invasiv zu gewinnen. Die Sputumproduktion kann hier durch Inhalation eines Irritants wie Zitronensäure oder hypertone Kochsalzlösung angeregt werden. Vor einigen Jahren haben Lopez-Vidriero et al. [27] Histamin, Acetylcholin und Prostaglandin F_{2a} benutzt, um bei Normalpersonen eine Sputumproduktion zu induzieren. Allerdings war dies den Probanden äußerst unangenehm. Da die dort verwendeten Substanzen die rheologischen Eigenschaften von trachealem Mukus zumindest bei Versuchstieren [5] verändern, sollte bedacht werden, dass mit diesem Verfahren möglicherweise ein „abnormaler“ Mukus gewonnen wird. Induktion der Sputum-Produktion ist nützlich für die Gewinnung von Entzündungszellen oder mikrobiologischer Flora der großen Atemwege und erlaubt sicherlich eine chemische Analyse



a

| Bindungen Mukolytika | Molekularstruktur | | | | | | Physikal. Wicklungen |
|--------------------------|-------------------|---------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|-------------------------|
| | DNA | F-Aktin | Disulfid Brücken | Ionische Brücken | Hydrogen Brücken | Ober- flächen Spannung | |
| rhDNase | X | ? | | | | | X |
| Gelsolin | ? | X | | | | | X |
| N-Acetyl- Cystein | | | X | | | | X |
| Hypertone NaCl - Lsg. | | | | X | | | X |
| Harnstoff | X | | | | X | | X |
| Exosurf/ bLES | | | | | | X | ? |
| Oszillation | X | ? | ? | | | | X |

b X = erwartete Interaktion ? = mögliche Interaktion

Abb. 4.4. a Interaktionen im Mukusgel und b therapeutische Ansatzmöglichkeiten. (Nach [37])

des Sputum. Dass ein derartig gewonnener Mukus in Hinblick auf seine physikalischen Eigenschaften repräsentativ für die gesunde Lunge ist, muss allerdings noch untersucht werden [6].

Bestandteile und Strukturen des Sputums

Der respiratorische Mukus ist ein komplexes viskoelastisches Gel, das zu 90–95% aus Wasser besteht und zu 1–2% Muzine (Glykoproteine) enthält. Muzine kommen im Mukus in unterschiedlicher Größe (MG 30000–70000) vor und haben eine außergewöhnliche

Molekularstruktur, die sich von anderen Mukusbestandteilen und anderen Glykoproteinen unterscheidet. Unter normalen Bedingungen sind im Mukus auch ca. 1% Proteine, Lipide und niedermolekulare Ionen enthalten. Im CF-Mukus ist dieser Anteil um das 3- bis 4-fache erhöht [7]. Die physikalischen Eigenschaften des Mukus (Viskosität und Elastizität) werden vornehmlich durch seinen Muzingehalt und seine Zusammensetzung bestimmt [8]. Muzine bestehen aus Glykoproteinen. Mit einer zentralen Proteinkette sind ca. 200 Kohlenhydratketten mit bis zu 50 verschiedenen Strukturen ausschließlich O-glykosidisch über N-Acetylgalaktosamin mit den Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin verknüpft [9]. Diese intramolekularen Verbindungen bilden zusammen mit einer Reihe von weiteren intermolekularen Bindungen (Abb. 4.4), vergleichbar mit einem Gel, eine netzartige Struktur, welche die Viskosität und Elastizität des nicht infizierten Mukus bedingt. In diesem Sinne ist ein Gel eine Lösung, in der die darin enthaltenen Makromoleküle durch zumindest eine Verbindung je Molekül miteinander zu sehr großen Aggregaten vernetzt sind. Diese makromolekulare primäre Vernetzung (*primäres Netzwerk*) des respiratorischen Mukus wird durch folgende Verbindungen hergestellt:

1. kovalente Bindungen (Disulfidbrücken; S-S),
2. ionische Verbindungen (zwischen sulfurierten Zuckergruppen und Aminogruppen),
3. hydrogene Verbindungen (Hydroxylgruppen – kommen in den Oligo-Saccharid-Seitenketten vor),
4. Van-der-Waal-Kräfte (Anziehung zwischen benachbarten Molekülen),
5. physikalische Verwicklungen (mechanisches Umschlingen von benachbarten Polypeptidketten).
Alle diese Verbindungen tragen unter normalen Mukusbedingungen zur primären Vernetzungsstruktur des Mukus bei und können daher für eine Mukolytikatherapie (Abb. 4.4b) gespalten werden (vgl. Abschn. 4.1).
6. Zusätzlich zu den in Abbildung 4.4a in grün dargestellten intermolekularen Verbindungen 1–5, die das *primäre Netzwerk* des Sputums bilden, werden bei Infektion weitere Proteine freigesetzt. Extrazelluläre DNA aus dem Zellkern und F-Aktin vom Zytoskelett der Zelle bauen bei vermehrtem Zelluntergang z. B. bei Infektion (rote Strukturen), ein *sekundäres Netzwerk* (muzinunabhängiges) auf.

Dieses pathophysiologische, *sekundäre Netzwerk* aus DNA-Molekülen sowie F-Aktin-Molekülen verbindet sich mit den normalerweise im Mukus vorkommenden Glykoproteinen des primären Netzwerkes und bildet dadurch ein hochvisköses Bronchialsekret aus. Je höher der DNA-Gehalt des Mukus, desto höher seine Zähigkeit (Viskoelastizität) und, daraus resul-

tierend, desto niedriger seine Clearance aus den Atemwegen (vgl. Abb. 4.3a,b).

4.2.2

Biophysikalische Analyse (Rheologie)

Historisch gesehen wurde bis zur Mitte der Sechzigerjahre der tracheobronchiale Mukus bezüglich seiner mechanischen Eigenschaften wie eine einfache Flüssigkeit behandelt, die allein durch ihre Viskosität charakterisiert werden kann. Folgerichtig wurden Methoden angewandt, die auf der konventionellen Viskometrie beruhten. Aufgrund seiner Eigenschaft Fäden zu bilden (Spinnbarkeit), wurde der Zervikalmukus kurioserweise zur selben Zeit physikalisch nicht als eine einfache Flüssigkeit, sondern als ein elastischer Festkörper beschrieben. Gegen Ende der Sechzigerjahre setzte die Entwicklung von komplexen Theorien sowie Methoden zur Charakterisierung der viskoelastischen Natur von Mukus ein. 1969 beschrieben Davis u. Dippy in England [10] sowie Hwang et al. in den Vereinigten Staaten [11] unabhängig voneinander Methoden, die darauf ausgerichtet waren, das viskoelastische Verhalten von Mukus vollständig zu beschreiben.

Mukus, eine visköse Flüssigkeit?

Wie erstmalig von Newton beschrieben, ist bei einer ausschließlich viskosen Flüssigkeit das Verhältnis zwischen Scherkraft, also der Kraft, die notwendig ist, um Flüssigkeitsschichten gegeneinander zu verschieben und Scherrate (relative Geschwindigkeiten der Schichten zueinander) konstant:

$$\text{! Scherkraft} = \text{Viskosität} \times \text{Scherrate}$$

Materialien, die bezüglich Scherkraft und Scherrate eine lineare Beziehung bilden, werden daher als newtonsch bezeichnet. Wasser und Honig sind z.B. in diesem Sinne newtonsche Flüssigkeiten (ausschließlich viskös). Für Mukus ist das Verhältnis zwischen Scherkraft und Scherrate jedoch nicht linear. Am ehesten kann Mukus als eine Flüssigkeit beschrieben werden, bei der außer einer scherratenabhängigen Viskosität auch eine elastische Komponente beobachtet wird (viskoelastisch). Deshalb muss die Viskosität des Mukus als eine Funktion der Scherkraft untersucht werden. Dieses Verhalten kann damit erklärt werden, dass das Netzwerk, das den Mukus stabilisiert, nicht statisch ist, sondern auf physikalischen Verbindungen beruht (Abb. 4.4a), die sich neu formieren können. Eine zusätzliche Komplizierung entsteht dadurch, dass es bei höheren Scherraten zu ei-

nem Zusammenbruch des Netzwerks kommen kann. Dadurch können bei nachfolgenden Analysen niedrigere Viskositätswerte als zuvor gemessen werden.

Dieses Phänomen kann mit Instrumenten untersucht werden, die es erlauben, die Scherraten so zu steuern, dass periodisch zwischen hohen und niedrigen Raten hin und her geschaltet werden kann [12, 13, 14]. Treten bei hohen Scherraten Brüche in der makromolekularen Kettenstruktur des Mukus-Gelnetzwerkes auf, so kommt es zu einer dauerhaften Viskositätsabnahme. Bei mittleren Scherraten (Gradient der Schergeschwindigkeit $< 10 \text{ s}^{-1}$) führt die Induktion einer angespannten molekularen Konfiguration zu einer temporären Viskositätsabnahme (reversible Scherkraftverdünnung – Thixotropie, s. [15]).

Mukus, ein elastischer Festkörper?

Wird Mukus von einer konstanten Scherkraft verformt, dann führt ein plötzlicher Abbruch der Scherkraft zu einem Rückprall oder einer partiellen Erholung der Verformung. Darin kommt die elastische Eigenschaft von Mukus zum Ausdruck [16, 17]. Wie die Viskosität ist auch die Elastizität wesentlich von der aufgewandten Scherkraft, aber auch von der Beanspruchung bei der Probenaufarbeitung abhängig. Für eine umfassende Beschreibung der Viskoelastizität müssen die Messungen daher unter gleichbleibenden Flussbedingungen (visköse) sowie unter Rückprallbedingungen (elastische) bei unterschiedlicher Höhe der aufgewandten Scherkraft durchgeführt werden.

Die reine Elastizität wird durch das Hook-Gesetz bestimmt, wonach die Scherkraft, die eine Verformung bewirkt, mit dem Grad der Verformung in Beziehung steht:

$$\text{! Scherkraft} = \text{Elastizität} \times \text{Verformung}$$

Das einfachste elastische Material ist ein Gummiband, das sich unter einer Scherkraft verlängert, sobald jedoch die Kraft nachlässt, wieder in den Ausgangszustand zurückspringt (Recoil-Effekt). Mukus hingegen reagiert wie ein unvollständig vernetztes Gummiband. Dies bedeutet, dass er bei Dehnung sich verlängert und nach einer Dehnung sich weitgehend wieder zurückbildet (jedoch nur bei niedriger Amplitude). Bei langsamer Dehnung, oder wenn diese fortbesteht, bildet er sich nur unvollständig zurück. Diese Abweichung von einem idealen elastischen Verhalten wird als eine partielle Erholung verstanden.

Mukus als viskoelastisches Material

Obwohl quasistatische Untersuchungen Informationen über Viskosität und Elastizität des Mukus liefern

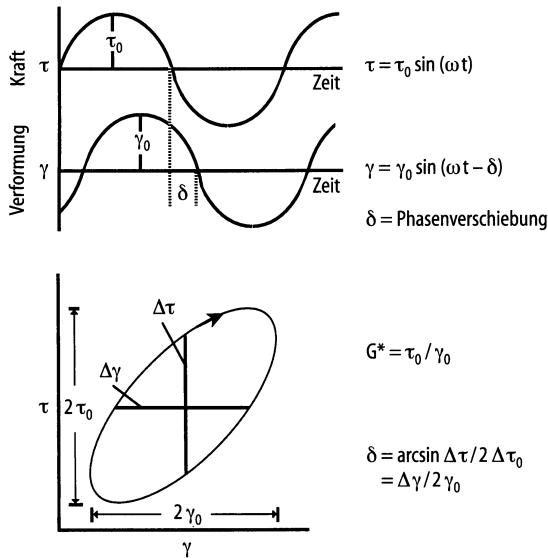


Abb. 4.5. Mathematische Grundlagen einer dynamischen Analyse von Viskosität und Elastizität. δ Phasenverschiebung, ω Messfrequenz in Einheitswinkel (Radius) pro Sekunde, G^* mechanische Impedanz

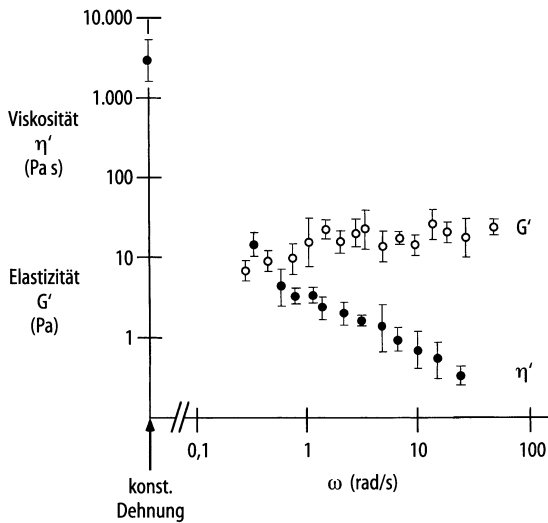


Abb. 4.6. Frequenzabhängigkeit von Elastizität und Viskosität in einer Mukusprobe

können, ist diese Information direkter und informativer über eine dynamische Untersuchung zu gewinnen. Eine dynamische Viskoelastizitätsuntersuchung besteht grundsätzlich aus einer auf eine Probe periodisch applizierten Kraft (gewöhnlich sinusförmig) und der Aufzeichnung der resultierenden Verformbarkeit. Im Gleichgewicht zeigt die Verformbarkeit dieselbe Periodizität wie die Kraft, jedoch aufgrund der Viskosität des Mukus folgt die Verformbarkeit mit einer Verzögerung (Phasenverschiebung). Wird nun eine sinusförmige Kraft gegen eine sinusförmige

Verformung graphisch dargestellt, so ergibt sich hieraus eine Ellipse (Abb. 4.5). Die Größe der Phasenverschiebung (Ellipse) zeigt hierbei das relative Verhältnis zwischen einem viskosen und elastischen Verhalten. Ein rein elastisches Material würde keine Phasenverschiebung aufzeigen (Analysefigur ist eine Gerade), wohingegen für ein rein visköses Material die Phasenverschiebung 90° betragen würde (Analysefigur ist ein Kreis). Die viskoelastischen Eigenschaften werden berechnet aus der relativen Amplitude von Kraft (τ) und Verformung (γ) und der Phasenverschiebung (δ) zwischen diesen beiden (Abb. 4.5). Betrachtet man Mukus als ein viskoelastisches Material, also eine Mischung aus einer elastischen und einer viskosen Komponente, so sind für die Charakterisierung nicht nur die Absolutwerte für Elastizität und Viskosität entscheidend, sondern auch deren relative Anteile an der Gesamtprobe. Eine oszillatorische, sinusförmige Analyse ist daher besonders gut geeignet, diese komplexen viskoelastischen Eigenschaften von Mukus zu untersuchen. Bei einer dynamischen Untersuchung stellt $\tan \delta$ das Verhältnis zwischen Viskosität und Elastizität dar; dies ist auch unter dem Begriff einer tangentialen Abnahme bekannt und kann auch als ein Rückprallfaktor (recoil effect) aufgefasst werden. G^* ist die Vektorsumme aus Viskosität und Elastizität und wird oft auch als mechanische Impedanz (Rigiditätsfaktor) bezeichnet. Wenn z.B. bei konstanter Kraft (τ) die Verformung (γ) klein ist, so ist der Quotient aus diesen beiden (G^*) hoch, der Mukus somit rigide.

Ein typisches Beispiel für die dynamischen Viskoelastizitätseigenschaften von Mukus zeigt Abb. 4.6. Diese Messungen wurden mit Trachealmukus unter Verwendung des magnetischen Mikrorheometers (s. unten) durchgeführt. Die rasche Abnahme der Viskosität η' mit einem gleichzeitigen, moderaten Anstieg der Elastizität G' über den untersuchten mittleren Frequenzbereich zeigt hierbei ein typisches Ergebnis. Die Form dieser Kurven reflektiert die gelartige Natur von Mukus. Die Höhe der elastischen Komponente in dem flachen, mittleren Frequenzbereich dient als Index der Vernetzungsdichte des makromolekularen Netzwerkes, das ein Gel formt. Die dynamische Viskosität ist sehr stark scherratenabhängig. Bei hoher Analysenfrequenz ist die Viskosität niedrig, da bei dieser nur lokale Veränderungen zwischen benachbarten makromolekularen Einheiten genug Zeit haben, sich zu etablieren. Bei niedriger Frequenz ist die Viskosität hoch, da die Reaktion auf eine applizierte Kraft Veränderungen im gesamten Gelnetzwerk verursachen. Bei einer langsamen, konstanten Dehnung ist die Viskosität am höchsten (5000 Pa/s).

Es sollte jedoch nicht vergessen werden, dass alle experimentellen Untersuchungsmethoden für einen

Tabelle 4.1. Normalwerte für die Viskosität und Elastizität des Mukus bei unterschiedlicher Messfrequenz ω (1 und 100 rad/s) als Mittelwerte mit geometrischen Standardabweichung (GSD) im Vergleich mit anderen Substanzen

| Rheologische Vergleichsdaten (bei Raumtemperatur und Normaldruck) | | |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| | Viskosität (Pa/s) | Elastizität (G') (Pa) |
| Wasser | 1×10^3 | 0 |
| Getriebeöl | 0,15–0,8 | 0 |
| Sirup | 1–10 | 0 |
| Mukus (bei 1 rad/s) | $4,27 \pm 2,09$ (GSD) | $15,3 \pm 2,09$ (GSD) |
| Mukus (bei 100 rad/s) | $0,27 \pm 2,14$ (GSD) | $28,2 \pm 2,14$ (GSD) |
| Gelatine (80% H ₂ O) | – | 20 |
| Naturgummi | – | 86 |

gewissen Grad eine Zerstörung oder „Vorscherung“ der Mukusprobe durch Beladung eines Rheometers verursachen können. Abhusten von Sputum stellt für sich selbst bereits eine Form der „Vorscherung“ dar und obgleich dies bisher nicht ausreichend untersucht wurde, dürfte dieser Vorgang bereits zu einer permanenten Veränderung des Gelnetzwerkes führen. Dennoch sind Vergleiche zwischen Proben bei gleicher Handhabung geeignet, wertvolle Information über Veränderungen der Viskoelastizität des Sputums, z. B. unter Therapie oder Infektzustand, zu liefern.

Normwerte für die Mukusviskosität und Mukuselastizität sind in Tabelle 4.1 im Vergleich mit anderen Substanzen dargestellt. Bezüglich seiner Viskosität ist Mukus mit Sirup vergleichbar, wohingegen seine Elastizität in der Größenordnung von Gelatine liegt, die zu 80 % aus Wasser besteht. Bei einer niedrigen Analysenfrequenz (1 rad/s) ist die Viskosität des Mukus höher und seine Elastizität niedriger als bei einer höheren Frequenz (100 rad/s).

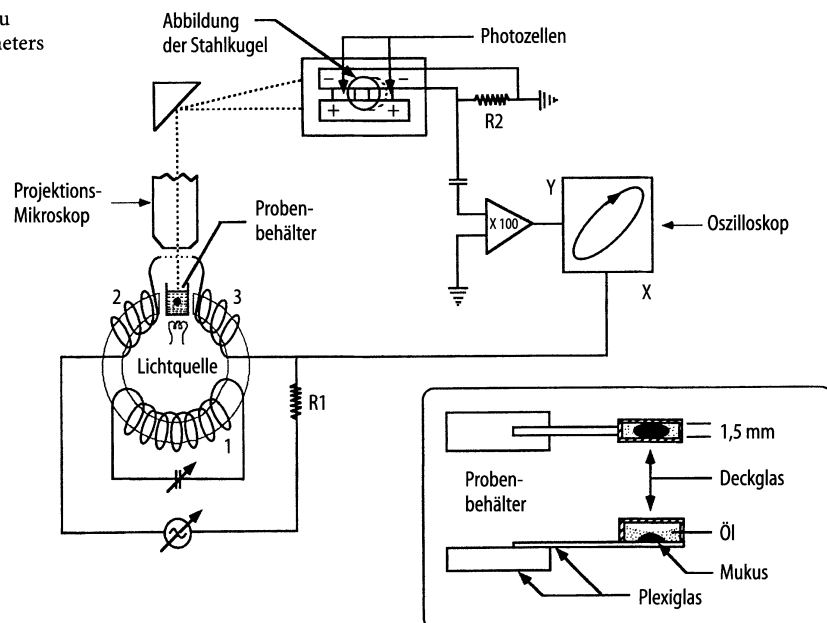
4.2.3 Rheologische Methodik

Um die basale Viskoelastizität des Sputums zu bestimmen oder die Effektivität einer Mukolytikatherapie evaluieren zu können, müssen geeignete und standardisierte Messverfahren für die biophysikalische (rheologische) Untersuchung des Mukus eingesetzt werden. Hierzu gehören die sog. Gießbarkeit [17], die ein historisches Verfahren darstellt, sowie die aktuellen Messverfahren mithilfe der kontrollierten Scherratenrheometrie [10, 14] und die Ermittlung der rheometrischen Sputumeigenschaften mittels der magnetischen Mikrorheometertechnik [3, 22, 28, 29] oder des Filancemeters [32, 38, 24].

Die magnetische Mikrorheometer-Technik

Der magnetische Mikrorheometer ist ein rheologisches Instrument, um viskoelastische Eigenschaften von sehr kleinen Sputumproben zu untersuchen (Abb. 4.7). Ein 10–100 μm großes Stahlkügelchen

Abb. 4.7. Schematischer Aufbau des magnetischen Mikrorheometers



wird in eine 1–5 µl große Sputumprobe eingebracht und mittels eines externen Elektromagneten bei standardisierten Frequenzen oszilliert. Die Amplitude des Ausschlags des Stahlkugelchens und seine Phasenverschiebung, relativ zur treibenden Kraft (oszillierendes Magnetfeld), werden verwendet (elliptische Analysenfigur in Abb. 4.5 und 4.8), um die Viskoelastizität des Sputums zu bestimmen [21–23]. Der magnetische Mikrorheometer arbeitet sehr gut mit Mikrolitermengen von Mukus, tatsächlich sogar besser als mit größeren Mengen, da er von einem optischen Detektorsystem abhängt und Sputum nur halbdurchlässig für Licht ist. Es ist jedoch sehr schwierig, mit wässrigen Proben zu arbeiten, da das Stahlkugelchen von der Probe nicht gehalten wird und auf den Boden des Behältnisses sinkt. Dieses Problem konnte gelöst werden, indem der Rheometer auf die Seite geneigt und eine Vorspannung an den Magneten angelegt wurde, um der Schwerkraft, die auf der Kugel lastet, entgegenzuwirken [24].

Der magnetische Mikrorheometer ist sehr wahrscheinlich unempfindlich gegenüber der Anwesenheit von Surfactant in einer Probe, da die rheologische Sonde (Stahlkugelchen) vollständig in der Mukusprobe liegt und nur den Eigenschaften der Hauptbestandteile ausgesetzt ist. Die gemessenen Parameter sind $\tan \delta$ (Quotient aus Viskosität und Elastizität) und $\log G^*$ (mechanische Impedanz = Vektorsummenprodukt aller viskösen und elastischen Kräfte in einer Probe).

Wie bei allen mikrorheologischen Analyseverfahren sollte man sich jedoch der von Natur aus heterogenen rheologischen Eigenschaften des Mukus bewusst sein, so dass wiederholte Messungen von Aliquots einer Probe generell notwendig sind.

Von jedem erhaltenen rheologischen Meßwert können zwei Parameter, M.C.I. („mucociliary clearability index“) und C.C.I. („cough clearability index“), aufgrund von umfangreichen In-vitro-Beziehungen aus Modellstudien [2, 3, 19] errechnet werden. Der M.C.I. gibt die Clearancefähigkeit dieser Sekrete unter normaler Ziliarfunktion wieder und wird aus $\log G^*$ und $\tan \delta$ bei einer Analysenfrequenz 1 rad/s aufgrund zahlreicher Froschgaumenexperimente errechnet, wohingegen der C.C.I. die Clearancefähigkeit dieser Sekrete in der Hustensimulationsmaschine (standardisiertes Hustenmanöver) wiedergibt, errechnet aus $\log G^*$ und $\tan \delta$ bei einer Analysenfrequenz 100 rad/s. Beide Parameter korrelieren negativ mit $\log G^*$. M.C.I. korreliert auch negativ mit $\tan \delta$, wohingegen C.C.I. positiv mit diesem korreliert.

Die diesbezüglichen Formeln sind folgende:
 • $MCI = 1,62 - 0,22 \cdot \log G^* - 1 - 0,77 \cdot \tan \delta$
 $CCI = 3,44 - 1,07 \cdot \log G^* - 100 + 0,89 \cdot \tan \delta$

4.2.4

Methoden der Clearancebestimmung

Um die Messergebnisse der Sputumrheologie in Perspektive zur klinisch relevanten Mukusclearance bewerten zu können, müssen geeignete Clearanceuntersuchungen zusätzlich durchgeführt werden. Die Bestimmung der mukoziliären Clearance und Hustenclearance kann mithilfe der sog. Froschgaumen-Methode [18, 36] oder der Hustensimulationsmaschine [1, 5, 6] erfolgen.

4.2.5

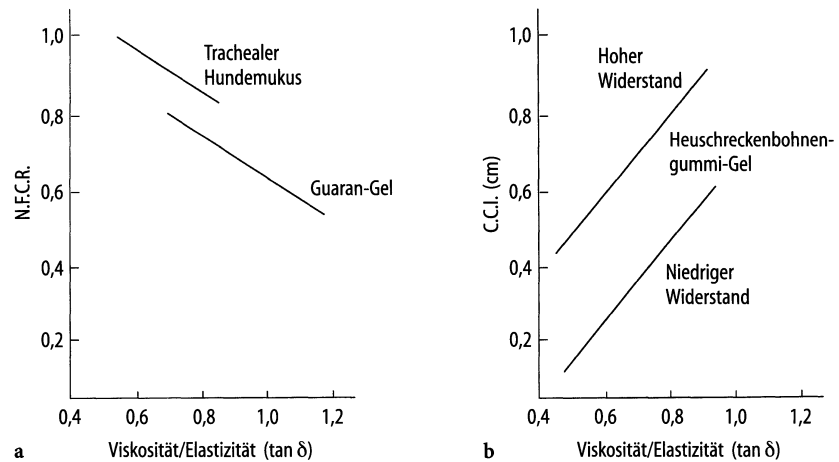
Rheologie und Clearance

Zilien schlagen mit einer Frequenz von 10–20 Hz und einer Amplitude von 5 µm, woraus sich eine Mukus-Transportgeschwindigkeit in der Trachea von 0,5–2 cm/min ergibt. Die Geschwindigkeit (Frequenz mal Amplitude) beim Husten ist jedoch etwa 100-mal größer. Daher sind Messergebnisse der Viskoelastizität von Mukus bei niedriger Frequenz (1 rad/s) geeignet zum Vergleich mit Messungen der mukoziliären Clearance, wohingegen Messungen bei hoher Frequenz (100 rad/s) sich besser für die Vorhersage der Effektivität einer Hustenclearance eignen [28]. Ein hohes $\tan \delta$ (Verhältnis von Viskosität und Elastizität) bei hohen Frequenzen charakterisiert einen viskösen Mukus, der die Hustenclearance begünstigt (Abb. 4.8b). Ein niedriges $\tan \delta$ bei niedriger Frequenz repräsentiert einen elastischen Mukus, der die ziliäre Clearance begünstigt (Abb. 4.8a). Ein hohes G^* (mechanische Impedanz) inhibiert beide Arten der Clearance.

Aufgrund dieser Untersuchungen scheint eine Reduktion von entweder der Elastizität oder der Viskosität-Elastizität-Verhältnisses von Mukus die ziliäre Clearance zu verbessern. Dies trifft jedoch nur bis zu einem gewissen Maße zu. Die ziliäre Transportrate verbessert sich bei kontinuierlicher Reduktion der Mukuselastizität bis zu einem Maximum, um bei einer weiteren Reduktion wieder abzunehmen [34]. Obgleich dieser Effekt bei Gesunden und intaktem Mukus bislang nicht nachweisbar war, zeigte sich dies sehr eindrucksvoll in pathologischem Humanmaterial [17] und im Tierversuch [35].

Da es einen optimalen Bereich für die viskoelastischen Eigenschaften von bronchialem Mukus gibt und zudem aus klinischer Sicht oft genug die Notwendigkeit für eine Verbesserung der mukoziliären Clearance und/oder Hustenclearance besteht, sollte bei einem therapeutischen Ansatz, der die Mukusrheologie beeinflusst, der initiale viskoelastische Status des Mukus berücksichtigt werden und das Moni-

Abb. 4.8. Der Einfluss des Viskosität-Elastizitätsverhältnisses ($\tan \delta$) einer Probe auf die mukoziliäre Clearance und Hustenclearance



toring der viskoelastischen Eigenschaften des Mukus einen essentiellen Teil einer Mukus modifizierenden Therapie darstellen.

4.2.6 Mukolytische Einzel- und Kombinationstherapie

Eine Vielzahl von verschiedenen Medikamenten und Physiotherapien (Abb. 4.4b) reduzieren die viskoelastischen Eigenschaften des Bronchialsekrets und verbessern dadurch direkt oder indirekt die Mukusclearance aus den Atemwegen von CF-Patienten. Vergleicht man die Viskoelastizität von CF-Sputum mit Mukus von nicht rauchenden Normalpersonen, so fällt auf, dass sowohl $\log G^*$ (Viskoelastizität = Rigidität) als auch $\tan \delta$ (Verhältnis zwischen Viskosität und Elastizität) erhöht sind (Tabelle 4.2). Allein hieraus resultiert eine um ca. 30% reduzierte mukoziliäre Clearance (MCI) und sogar über 50% verminderte Hustenclearance (CCI). Inhalieren CF-Patienten nur $2 \text{ ml } 10^{-3} \text{ mol Amilorid}$ Lösung, so konnten diese Unterschiede zwar nicht vollständig aufgehoben, doch immerhin hochsignifikant in Richtung Normalisierung verbessert werden [3]. Eine Substanzklasse allein kann bei Patienten mit hochviskösem Mukus, wie bei CF, in vielen Fällen das Bronchialsekret nicht

ausreichend verflüssigen, so dass eine sinnvolle mukolytische Kombinationstherapie erforderlich ist. So kann z.B. eine Oszillationstherapie (hochfrequente Thoraxwandoszillation oder Flutter) physikalisch und die rhDNase-Therapie (Pulmozyme) enzymatisch die rigide Helixstruktur von DNA-Molekülen in kleinere Fragmente zerlegen. Beide Therapieformen zeigen jedoch bei einer Kombination darüber hinaus aufgrund ihres unterschiedlichen Wirkmechanismus bei In-vitro-Untersuchungen einen klaren synergistischen Effekt (Abb. 4.9) [36].

Ein weiteres Beispiel für eine synergistische mukolytische Kombinationstherapie stellt die Applikation von rhDNase und Gelsolin dar. Beide Einzelsubstanzen können das sekundäre Netzwerk des Mukus, entstanden durch inflammatorische Mukusbeimischungen (DNA, F-Aktin), zerkleinern und in Kombination die gewünschte rheologische Wirkung noch vermehren. Das Protein Gelsolin fragmentiert die langen Aktin-Filamente (F-Aktin) in monomeres Aktin (G-Aktin) in vergleichbarer Weise wie rhDNase langkettige DNA-Moleküle.

Durch eine sinnvolle mukolytische Kombinationstherapie könnte auch eine mögliche Toxizität der Einzelsubstanzen vermindert werden. Weitere diesbezügliche unabhängige Untersuchungen sind jedoch dringend erforderlich.

Tabelle 4.2. Rheologie und Clearanceparameter in CF-Sputum im Vergleich mit normalem Mukus von gesunden Kontrollpersonen

| - | 1 rad/s (Analysenfrequenz) | | 100 rad/s (Analysenfrequenz) | | Clearance | |
|-----------|----------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | $\log G^*$ | $\tan \delta$ | $\log G^*$ | $\tan \delta$ | M.C.I. | C.C.I. |
| Kollektiv | | | | | | |
| Normal | $2,17 \pm 0,08$ | $0,29 \pm 0,16$ | $2,56 \pm 0,08$ | $0,93 \pm 0,06$ | $0,91 \pm 0,02$ | $1,52 \pm 0,03$ |
| CF | $2,92 \pm 0,10$ | $0,41 \pm 0,02$ | $3,32 \pm 0,09$ | $0,95 \pm 0,06$ | $0,66 \pm 0,03$ | $0,73 \pm 0,09$ |
| CF (Am) | $2,41 \pm 0,14$ | $0,32 \pm 0,04$ | $2,67 \pm 0,13$ | $1,04 \pm 0,06$ | $0,84 \pm 0,06$ | $1,51 \pm 0,18$ |

Gemessene und errechnete Parameter: $\log G^*$ (mechanische Impedanz = Vektorsummenprodukt aller viskosen und elastischen Kräfte), $\tan \delta$ (Quotient aus Viskosität und Elastizität), M.C.I. („mucociliary clearability index“) und C.C.I. („cough clearability index“) sowie der therapeutische Effekt einer Amiloridinhalaationstherapie von $2 \text{ ml } 10^{-3} \text{ mol Amilorid}$ Lösung bei CF-Patienten.

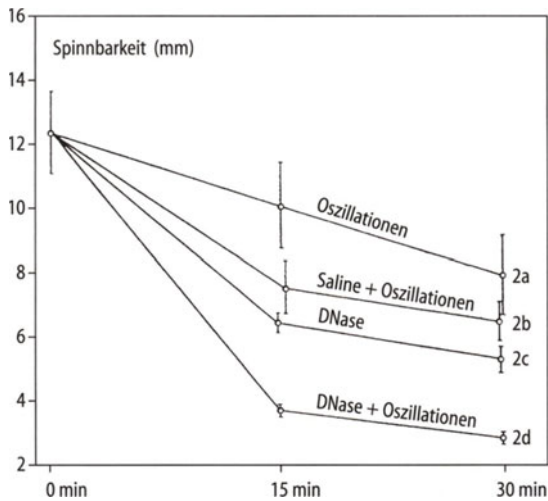


Abb. 4.9. Effektivität (Spinnbarkeitsänderungen in mm) einer Einzel- und Kombinationstherapie mit Kochsalz (Saline) oder DNase mit und ohne Oszillationen bei In-vitro-Untersuchungen in CF-Sputum [12]

4.2.7

Zusammenfassung

Sputum ist ein viskoelastisches Gel, das aus Wasser und hochmolekularen, vernetzten Glykoproteinen besteht und außerdem Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und Zellbestandteile enthält. Die makromolekulare primäre Vernetzung (*primäres Netzwerk*) des respiratorischen Mukus wird durch verschiedene intermolekulare Verbindungen zwischen Mukoglykoproteinen hergestellt. Extrazelluläre DNA aus dem Zellkern und F-Aktin vom Zytoskelett der Zelle bauen bei vermehrtem Zelluntergang z. B. bei Infektion ein weiteres, *sekundäres Netzwerk* auf. Dieses pathophysiologische, *sekundäre Netzwerk* verbindet sich mit den normalerweise im Mukus vorkommenden Glykoproteinen des *primären Netzwerkes* und bildet dadurch ein hochvisköses Bronchialsekret aus. Für eine biophysikalische (rheologische) Untersuchung sollte Mukus idealerweise möglichst ohne Verunreinigungen (Speichel etc.) gesammelt und alsbald analysiert werden. Eine solche Gewinnung ist jedoch ohne ein invasives Verfahren nicht immer möglich, sodass aus praktischen Gründen häufig diese Analyse an Sputum (Auswurf) durchgeführt wird. Die viskoelastischen Mukuseigenschaften

sind als solche wenig aussagekräftig, wenn sie nicht auf ihre Beziehung zur Mukusclearance untersucht werden. Die Mukusclearance in den Atemwegen wird durch die Eigenschaften der serösen, paraziliären Flüssigkeit zwischen Mukus und respiratorischem Epithel, der Funktion der die Atemwege auskleidenden Zilien sowie durch Interaktionen zwischen Mukus und Luftströmung oder Mukus und Zilien, hauptsächlich aber durch die physikalischen (rheologischen) Eigenschaften des Mukusgels selbst beeinflusst. Rheologische Analysen des Mukus dienen der Charakterisierung seiner Fließfähigkeit sowie Verformbarkeit. Es werden Methoden zur Mukusgewinnung sowie zur Lagerung und Analyse von Mukus aus dem Respirationstrakt vorgestellt und ihre physikalischen Grundlagen diskutiert. Darüber hinaus werden einfache Assays zur Bestimmung von mukoziliärer Clearance und Hustenclearance vorgestellt und Zusammenhänge zwischen Mukusrheologie und Mukusclearance aufgezeigt. Exemplarisch werden Mikrotechniken vorgestellt, wie der magnetische Mikrorheometer und Filancemeter, die es ermöglichen, rheologische Eigenschaften von kleinsten Probenmengen zu analysieren. Vergleicht man die Viskoelastizität von CF-Sputum mit Mukus von nicht rauchenden Normalpersonen, so fällt auf, dass sowohl die Rigidität als auch das Verhältnis zwischen Viskosität und Elastizität erhöht sind. Allein hieraus resultiert eine um ca. 30% reduzierte mukoziliäre Clearance und sogar über 50% verminderte Hustenclearance. Eine Inhalation von Amiloridlösung kann bei CF-Patienten diese Unterschiede zwar nicht vollständig aufheben, jedoch immerhin hochsignifikant verbessern. Eine Substanzklasse allein kann jedoch bei Patienten mit hochviskösem Mukus, wie bei CF, in vielen Fällen das Bronchialsekret nicht ausreichend verflüssigen, sodass eine sinnvolle mukolytische Kombinationstherapie wie zum Beispiel Oszillationstherapie und rhDNase oder rhDNase und Gelsolin erforderlich ist. Wenn aus klinischer Sicht die Notwendigkeit für eine Verbesserung der mukoziliären Clearance und/oder Hustenclearance besteht, sollte bei einem therapeutischen Ansatz, der die Mukusrheologie beeinflusst, der initiale viskoelastische Status des Mukus berücksichtigt werden und das Monitoring der viskoelastischen Eigenschaften des Mukus einen essentiellen Teil einer mukusmodifizierenden Therapie darstellen.

4.3

Körper eigene antimikrobielle Abwehrsysteme

Die Atemwegsflüssigkeit in der Lunge stellt die Grenzfläche zwischen Umwelt und Organismus dar. Täglich inhalieren erwachsene Menschen ca. 17 kg Luft mit darin suspendierten Mikroorganismen, Antigenen und partikulären Substanzen. Daher wird sofort klar, dass wir über ein gut funktionierendes Abwehrsystem in der Lunge verfügen müssen, welches jederzeit bereit steht und effizient arbeitet und so eine aufwendigere Mobilisierung zellulärer und immunologisch komplexerer Abwehrmechanismen unnötig macht. Diese Aufgabe wird dem System der sog. nichtadaptiven Immunabwehr zugeschrieben. Hier stehen sofort und ohne aktuelle Anpassung oder Regulation des Organismus Abwehrmoleküle bereit, die fremde Substanzen oder Mikroorganismen erkennen und eliminieren können.

Die Effektorsubstanzen, die sich in der Atemwegsflüssigkeit finden, sind vorwiegend aufgrund ihrer direkten antimikrobiellen Wirkung identifiziert worden. Sicherlich sollten sie nicht für sich allein betrachtet werden, sondern als ein komplexes Netzwerk, welches untereinander und mit den zellulären Elementen verknüpft ist. Naturgemäß ist die Hauptfunktion der meisten der aufgeführten Komponenten nicht eindeutig, da einerseits weitere Funktionen bekannt sind wie z.B. für den Protease-Inhibitor SLPI und andererseits viele potentielle Funktionen noch nicht aufgedeckt sind. Die vorgenommene Einteilung der Faktoren nach dem Molekulargewicht ist rein pragmatisch und beschreibt die enorme Bandbreite der involvierten Moleküle und die Heterogenität der assoziierten Mechanismen und Funktionen. Ziel der beiden folgenden Abschnitte ist es, einerseits einen Überblick über die Komponenten des pulmonalen nichtadaptiven Immunabwehrsystems zu geben und andererseits deren potentielle Bedeutung für die cystische Fibrose herauszuarbeiten.

4.3.1

Großmolekulare (MG > 10 000) antimikrobielle Substanzen der Atemwegsflüssigkeit

M. GRIESE, R. BALS

Einleitung

Die genauen pathogenetischen Zusammenhänge, die zu einer gesteigerten Anfälligkeit des Atemtraktes bei CF gegenüber bestimmten bakteriellen Erregern führen, sind nach wie vor unbekannt. Eine Rolle könnten in diesem Zusammenhang die schon nor-

malerweise in großer Zahl in der Atemwegsflüssigkeit vorkommenden spezifischen, antimikrobiellen Substanzen spielen. In diesem Abschnitt werden die großmolekularen Bestandteile des pulmonalen, nichtadaptiven, d.h. vorgebildeten, Abwehrsystems der Lunge („innate host defense system“) beschrieben und ihre Organisation bei CF besprochen. Einflüsse, die im direkten Zusammenhang mit den Mutationen des CFTR (z. B. veränderte Glykolisierungsmuster) stehen oder durch indirekte Faktoren, z. B. in der Folge von ablaufenden Entzündungsprozessen, können dazu führen, dass die funktionelle Integrität des nichtadaptiven Abwehrsystems dauerhaft oder episodisch bei CF gestört ist. Daher ist es von großer Bedeutung, die Funktionszustände aller antimikrobiellen Bestandteile der Atemwegsflüssigkeit bei CF genau zu kennen um Abweichungen korrigieren zu können. Eine abschließende Beurteilung der Relevanz einzelner oder mehrerer Faktoren ist nur durch klinische Substitutionsstudien (exogene Gabe, Modulation der Genexpression u. ä.) möglich.

Surfactantprotein A (SP-A)

SP-A ist ein kalziumabhängiges Lektin, d.h. ein Protein, welches in Anwesenheit von ausreichenden Mengen an Kalzium Kohlenhydratsequenzen auf mikrobiellen oder zellulären Oberflächen erkennen und binden kann. Die Bindungsfähigkeit von SP-A-Monomeren wird dadurch erhöht, dass sich immer 18 dieser Monomereinheiten wie ein Strauß Blumen zusammenlagern, wobei die Blüten die Kohlenhydrat-Erkennungsdomänen („carbohydrate recognition domain“, CRD) darstellen (Abb. 4.10). Damit ist SP-A strukturell ähnlich der Komplementkomponente C1q aufgebaut. Die CRD-Komponente ist hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich, für die Immunabwehrfunktion von SP-A verantwortlich. SP-A wird ab der 15. Schwangerschaftswoche vor allem in den Epithelzellen der größeren Bronchien gebildet [40]. Es ist insbesondere das SP-A2-Gen, welches in fetaler Trachea und Bronchien, nicht jedoch in der peripheren Lunge, exprimiert wird [9]. Beim erwachsenen Menschen wird das SP-A2-Gen in den submukösen Atemwegsdrüsenzellen exprimiert [31]. SP-A wird darüber hinaus beim Menschen im geringen Ausmaß auch in den Clara-Zellen der kleinen Atemwege gebildet, die stärkste Expression (SP-A1-Gen) findet sich jedoch in den alveolären Typ-II-Pneumozyten. Alveolarmakrophagen enthalten SP-A, produzieren jedoch selbst keines. SP-A kann LPS und Kapselpolysaccharide von gramnegativen Bakterien, grampositiven Bakterien sowie Influenza-Virus A und Herpes-simplex-Virus binden (s. Abschn. 4.4.2). Darüber hinaus beeinflusst SP-A die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, die Chemotaxis von Ma-

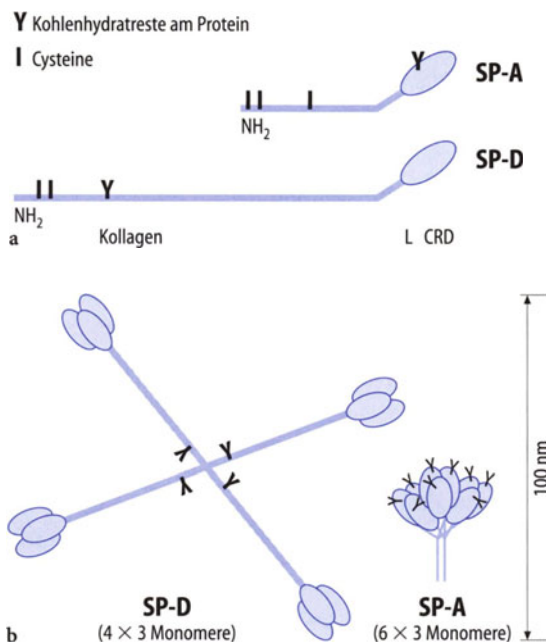


Abb. 4.10. a SP-A und SP-D werden zunächst als monomere Proteine synthetisiert. Sie bestehen als Kollektine typischerweise aus einem Lektinanteil (CRD = carbohydrate recognition domäne) und einem langgestreckten Kollagenanteil, die über eine Verbindungsbrücke (*L linking*) zusammenhängen. b Je drei dieser Monomere lagern sich eng zusammen zu Trimeren zusammen, von denen dann wiederum sechs (SP-A) bzw. vier (SP-D) die molekulare Struktur schaffen, in der diese Moleküle extrazellulär in der Lunge vorliegen

krophagen, die Sekretion von Zytokinen und Immunglobulinen aus Lymphozyten sowie die Proliferation dieser Zellen. Diese vielfältigen Funktionen machen SP-A zu einem zentralen Bestandteil der nichtadaptiven Immunabwehr der Lunge [6, 24, 39].

Bei CF findet sich in der bronchialen Lavage eine erhöhte Konzentration von SP-A bei denjenigen Säuglingen und Kleinkindern, die an einer akuten Exazerbation litten (mehr als 50% neutrophile Granulozyten, erhöhter IL8-Spiegel) [18]. Im symptomfreien Intervall hatten Kleinkinder und Säuglinge mit CF dieselbe SP-A-Konzentration wie normale Kontrollen. In einer Untersuchung von Sputum und Sputumsolphasen fanden wir bei erwachsenen Patienten mit CF ebenfalls erhöhte Konzentrationen von SP-A im Vergleich zu Kontrollpatienten [13]. Im Gegensatz dazu fanden sich im alveolären Kompartiment der BAL bei älteren Patienten mit schwerer chronischer Atemwegserkrankung reduzierte Konzentrationen an SP-A [12, 27]. Diese Daten zeigen, dass SP-A bei CF nicht primär reduziert ist, sondern in Abhängigkeit vom jeweiligen Erkrankungsgrad in seiner Konzentration und wahrscheinlich auch seiner protektiven Funktion verändert wird [11].

Surfactantprotein D (SP-D)

Auch SP-D ist ein Lektin, welches mit seiner Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne (CRD) kalziumabhängig Kohlenhydratstrukturen auf Mikroorganismen oder Zellen erkennen und binden kann. Die Zuckerspezifität von SP-D (Maltose >Fukose, Mannose >Glucose >Galactose, Laktose >N-Acetylglucosamin) unterscheidet sich von derjenigen des SP-A (N-Acetylmannosamin >Fucose >Maltose >Glucose >Mannose). Ähnlich wie beim SP-A wird durch die Zusammenlagerung der Proteinmonomere ein polymeres Molekül erzeugt, welches aus 4-mal 3 SP-D-Untereinheiten (12-mer) besteht und die Form eines Kreuzes hat (Abb. 4.10). Diese Moleküle haben eine Spanne von bis zu 100 nm und können sich zur weiteren Steigerung ihrer Affinität gegenüber Kohlenhydratstrukturen zu noch höheren Polymeren zusammenlagern. SP-D ist in der Lage, die Oligosaccharide des LPS von gramnegativen Bakterien zu binden. Grampositive Bakterien werden nicht gebunden, jedoch Bestandteile von Influenzavirus A, Pilzen (*Aspergillus*) und *Pneumocystis carinii*. Darüber hinaus bindet SP-D an die Oberflächen von Leukozyten und ähnlich wie SP-A auch an verschiedene Rezeptoren von Lungenepithelzellen. Auch SP-D kann durch Interaktion mit zellulären Elementen die Chemotaxis von Neutrophilen und Monozyten steigern und die Produktion von freien Radikalen durch Alveolarmakrophagen stimulieren. Diese Eigenschaften machen SP-D ebenfalls zu einem zentralen Molekül der nichtadaptiven Immunabwehr der Lunge [6].

Bei jungen Patienten mit CF ist die Konzentration von SP-D in der Atemwegsflüssigkeit bisher nicht bekannt. Während Postle et al. bei CF-Patienten mit relativ milder Lungenerkrankung extrem erniedrigte Spiegel an SP-D fanden [27], konnten wir keinen Unterschied im SP-D-Gehalt zwischen Kindern mit CF, die eine deutliche inflammatorische Reaktion in der bronchoalveolären Lavage hatten und gesunden Kontrollkindern (unpublizierte Ergebnisse) nachweisen [11].

Mukus-Proteinase-Inhibitor (MPI, SLPI, ALP, BSI)

Der Mukus-Proteinase-Inhibitor (MPI) ist ein in Schleimhautsekreten (Bronchialsekret, Speichel, Seminalplasma, zervikaler Mukus etc.) des menschlichen Körpers enthaltener und von den exokrinen Drüsen lokal produzierter Serin-Proteinase-Inhibitor. Synonyme Bezeichnungen für MPI sind sekretorischer Leukozyten-Proteinase-Inhibitor (SLPI), Antileukoproteinase (ALP), Bronchialsekret-Inhibitor (BSI). Darüber hinaus wird dieses Molekül beim Menschen zumindest auch von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gebunden, wenn auch nicht exprimiert [10, 14]. Neben der bekannten und

in Abschn. 4.5 besprochenen antiproteolytischen Aktivität weist dieses Molekül auch eine kürzlich entdeckte antibakterielle Aktivität auf und ist somit in die Reihe der pulmonalen Abwehrmoleküle einzuordnen.

MPI ist säurestabil [14] und besteht aus einer Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 11 700. Das cysteinreiche Protein ist in Form von 2 konsekutiven strukturell homologen Domänen angeordnet, welche jeweils 4 intramolekulare Disulfidbrücken enthalten. Dies führt zu einer starren, unflexiblen Proteinstruktur (Abb. 4.11). Während die COOH-terminale Domäne für die Proteinase-Inhibitor-Aktivität verantwortlich ist, weist nur die N-terminale Domäne antibakterielle Aktivitäten auf. Der pI-Wert ist größer als 9. Das Molekül ist nicht glykolisiert und stark basisch.

Die antibakterielle Aktivität von MPI ist sowohl gegen *Escherichia coli* als auch *Staphylococcus aureus* gerichtet [16]. Auf molarer Basis ist sie etwas schwächer ausgeprägt als die Aktivität von Lysozym oder den α -Defensinen. Darüber hinaus findet sich

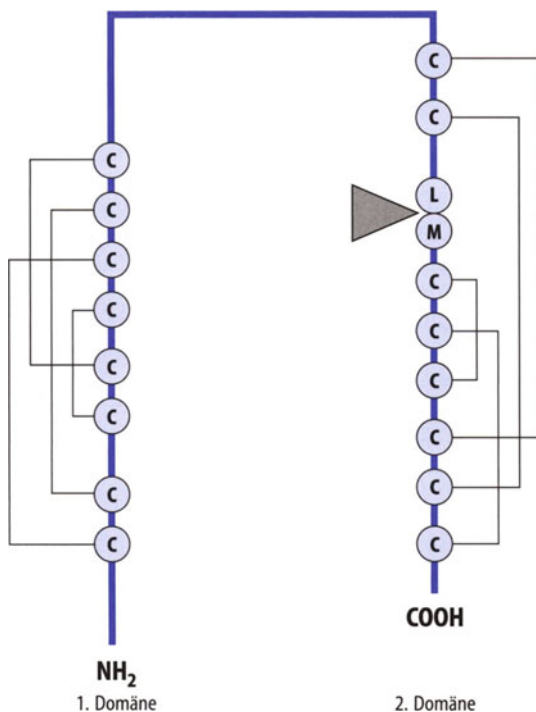


Abb. 4.11. Molekulare Struktur des Mukus-Proteinase-Inhibitors (MPI, SLPI, ALP, BSI). Das Protein besteht aus 2 Domänen, die jeweils sehr viele Cystein-Aminosäuren (C) enthalten, zwischen denen jeweils Disulfidbrücken ausgebildet sind. Die antimikrobielle Aktivität ist in der NH_2 -terminalen, ersten Domäne lokalisiert, während das enzymatisch aktive Zentrum für die Inhibition der proteolytischen Aktivität in der COOH-Domäne, zwischen den Aminosäuren Methionin (M) und Leucin (L) lokalisiert ist

eine antivirale Aktivität gegenüber HIV-1-, Influenza-A- und Sendai-Viren [3, 26, 38]. In Experimenten mit Maus-MPI wurde gezeigt, dass die Substanz auch von Makrophagen als Antwort auf bakterielle Polysaccharide (LPS) synthetisiert und sezerniert wird. MPI hemmt in diesem System die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen, die z. B. durch *Pseudomonas aeruginosa* stimuliert wurden [20, 21]. Humaner MPI tötet darüber hinaus *Aspergillus fumigatus*-Conidien, die in wässrigem Milieu inkubiert wurden (50% fungizide Aktivität bei 5,8 μmol) und *Candida albicans* (50% fungizide Aktivität bei 10,0 μmol) [36]. Ferner wird eine *Aspergillus*-Protease durch MPI gehemmt [36].

Immunzytochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass MPI vor allem in serösen trachealen und bronchialen submukösen Drüsen sowie in den nicht mit Flimmerepithelien versehenen Epithelzellen der Bronchien und in den Clara-Zellen und Schleimzellen der Bronchiolen exprimiert wird. Darüber hinaus findet sich MPI in der Bindegewebsmatrix der menschlichen Lunge in Assoziation mit elastischen Fasern und zum Teil gebunden an Makrophagen und Granulozyten [14]. Auch die Schleimhaut der Sinus maxillaris färbt sich positiv für MPI an.

Während die Konzentration an MPI bei cystischer Fibrose im Normalbereich liegen soll [34], ist die funktionelle antiproteolytische Aktivität bei CF sicher eingeschränkt. Die inhalative Gabe von rekombinantem MPI an Patienten mit CF führt zu einer Reduktion der IL8-Spiegel in der Atemwegsflüssigkeit der Lunge [25]. Diese und ähnliche Untersuchungen bei CF sind bisher immer mit der Intention durchgeführt worden, die antiproteolytische Aktivität zu steigern. Inwieweit die Zufuhr von MPI auch die antimikrobielle Aktivität in der Lunge ändert oder antiinflammatorisch wirkt, ist bisher leider nicht untersucht worden. Die genannten In-vitro-Befunde machen dies jedoch wahrscheinlich.

Im Zusammenspiel mit den anderen antimikrobiellen Substanzen könnte MPI zu einer verbesserten Elimination CF-relevanter Erreger wie *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* beitragen. Dies muss jedoch in prospektiven Studien noch untersucht werden.

Lysozym (Muramidase)

Lysozym ist ein lysosomales Enzym mit einer seit langem bekannten bakteriolytischen Aktivität. Substrat sind die Mukopolysaccharide der bakteriellen Zellwände, deren β -1,4-glykosidische Bindungen zwischen N-Acetylglukosamin und N-Acetylmuraminsäure gespalten werden. Lysozym ist also eine Muraminidase. In vitro ist Lysozym gegenüber mu-

koiden und nicht-mukoiden Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* oder *Staph. aureus* nicht bakterizid [17]. Lysozym kann jedoch die Bakterien schädigen und synergistisch mit antimikrobiellen Peptiden *Pseudomonas aeruginosa* abtöten [1, 2]. Lysozym wird sowohl von den Atemwegsepithelien als auch den neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gebildet.

Im Serum finden sich bei CF-Patienten etwa doppelt so hohe Werte an Lysozym wie bei gesunden Kindern [17]. Dagegen ist die Konzentration im Speichel im Vergleich zu gesunden Kontrollkindern nicht erhöht. Im Sputum von Patienten mit zystischer Fibrose finden sich im Vergleich zu Asthma oder Bronchitis dieselben Konzentrationen [5]. Die Konzentration von Lysozym bleibt im Sputum bei Patienten mit CF im Rahmen einer schweren Infektion unverändert [19], während im Rahmen einer akuten Pneumonie bei ansonsten gesunden Kindern erhöhte Werte gefunden wurden [15]. Die Konzentration von Lysozym im Bronchialtrakt ist etwa 5-mal so hoch wie im alveolären Bereich [35]. Bei CF fanden sich ähnlich wie bei chronischer Bronchitis, obstruktiver Bronchitis und Bronchiektasen etwa doppelt so hohe Lysozymkonzentrationen wie bei Kontrollkindern [8, 15, 33]. Viele der aufgeführten Untersuchungen sind allerdings schwierig zu interpretieren, da adäquate Kontrollen meist nicht vorhanden sind.

Aufgrund der bisher vorliegenden Daten zu synergistischen Effekten zwischen anderen lokalen Abwehrmolekülen und Lysozym erscheint es jedoch sinnvoll, bei deren Bestimmung auch die Lysozymkonzentration zu erfassen und bei therapeutischen Interventionen die Wechselwirkungen von Lysozym mit anderen lokalen Abwehrfaktoren zu berücksichtigen. Für einen banalen Defekt von Lysozym bei CF gibt es keine Anhaltspunkte.

Laktoferrin

Humanes Laktoferrin ist ein 80000-MG-Glykoprotein, welches in den meisten Körperflüssigkeiten und Sekretionen von Nase, Genitaltrakt, Tränen und Atemtrakt vorkommt. Es wird aus den neutrophilen Granulozyten freigesetzt und wurde auch als Index für die neutrophile Aktivität verwendet. Im unteren Atemtrakt stammt es wohl vorzugsweise aus den großen Atemwegen [35], da hier mehr als 10-fach höhere Konzentrationen gefunden werden als im alveolären Bereich. Die antimikrobielle Aktivität von Laktoferrin soll einerseits auf seiner Fähigkeit Eisen zu fixieren beruhen. Die Mikroorganismen werden so von diesem essentiellen Nährstoff depletiert. Ferner gibt es Hinweise auf Mechanismen, die unabhängig von dieser Eigenschaft sind und zu einer raschen Freisetzung von Lipopolysacchariden aus der Ober-

fläche gramnegativer Bakterien und zu konsekutiv veränderter Permeabilität der Bakterienmembran führten [37].

Während die Konzentrationen von Laktoferrin sowohl in der bronchialen als auch in der alveolären Lavage von Patienten mit chronischer Bronchitis im Vergleich zu gesunden erwachsenen Probanden erhöht waren [35], fanden sich bei Kindern mit chronischer Atemtraktinfektion sowohl erhöhte [41] als auch erniedrigte [8] Werte. Im Sputum von Patienten mit CF war Laktoferrin während einer akuten Exazerbation nicht erhöht [19]. Auch Pryjma fand, dass bei Kindern mit chronischer Bronchitis erniedrigte Laktoferrin-Konzentrationen in der Bronchiallavage vorlagen, während Kinder, die mit *Haemophilus infizierten* waren, erhöhte Konzentrationen dieses Proteins aufwiesen [28]. Bei einer Untergruppe von CF-Patienten war Laktoferrin in der Solphase von Sputum erhöht, während sich bei einer anderen Untergruppe von CF-Patienten kein Unterschied zu Patienten mit Asthma oder Bronchitis fand [5].

In-vitro-Experimente zeigten einen Synergismus von Laktoferrin und antimikrobiellen Peptiden beim Abtöten von *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* [1, 2]. Laktoferrin ist durch *Pseudomonas-Elastase* und/oder *Neutrophilen-Elastase* zum großen Teil hydrolysiert und mag daher nur begrenzte Aktivität in den Atemwegen von chronisch infizierten Patienten mit CF haben [4].

Die vorliegenden, meist älteren Studien weisen auf normale oder erhöhte Spiegel von Laktoferrin in den Atemwegssekreten hin. Allerdings wurde bisher nur die immunologisch nachweisbare Masse und nicht die funktionelle Laktoferrin-Aktivität allein oder in Kombination mit anderen Defensinen bei CF bestimmt. Erst derartige Untersuchungen ermöglichen eine Abschätzung, ob eine Verstärkung der lokalen Immunität hinsichtlich dieser Faktoren durch therapeutische Gabe sinnvoll ist oder nicht.

Fibronektin

Fibronektin ist ein großes (MG 220 000 ± 20 000), multifunktionales Adhäsionsglykoprotein mit einer weiten Verteilung im Organismus. Funktionell ist es in die Organisation der extrazellulären Matrix, die Zellverankerung, die Blutstillung, die Chemotaxis und die Opsonierung von Bakterien involviert. Viele seiner biologischen Effekte sind auch in proteolytischen Fragmenten präsent, die darüber hinaus eigene Eigenschaften haben. Fibronektin findet sich vor allem in sich entwickelnden oder reparierenden Geweben. Es wird von Fibroblasten, Makrophagen, Hepatozyten und Epithelzellen produziert. Fibronektin kann *Staphylococcus aureus* und die Oberfläche von Makrophagen binden. Daher ist es möglich, dass

Fibronectin eine Rolle bei der makrophagenabhängigen Immunabwehr gegen Bakterien spielt.

Phospholipase A2

Die humane sekretorische Phospholipase A2 ist ein 13 900-MG-Molekül, welches in vielen Geweben einschließlich der Lunge und neutrophilen Granulozyten vorkommt [29]. Mehr als 60 verschiedene sekretorische Phospholipasen A2 sind in den verschiedensten Geweben nachgewiesen worden, die jedoch beim Menschen alle Genprodukt eines einzigen Gens sind. Sekretorische Phospholipase A2 hat einen hohen Anteil an intramolekularen Disulfid-Bindungen und eine konservierte 3-dimensionale Struktur. Alle Phospholipasen A2 hydrolisieren Phospholipide, in dem sie die sn-2-Fettsäure-Acylreste abspalten und so equimolare Mengen an freier Fettsäure und Lyso-phospholipiden bilden. Die Aktivität dieser Phospholipasen ist abhängig von einer ausreichend hohen Kalziumkonzentration. In der Lunge sind darüber hinaus kalziumunabhängige Phospholipasen gefunden worden, die von Surfactantprotein A gehemmt werden und wahrscheinlich eine Rolle im Metabolismus von Surfactant-Phospholipiden durch Typ-II-Pneumozyten spielen [7]. Phospholipase A2 führt zur Bildung verschiedener Lipidmediatoren einschließlich plättchenaktivierendem Faktor und den Eicosanoiden.

Phospholipase A2 kommt in der normalen humanen Lavageflüssigkeit vor [32] und ist im Rahmen eines ARDS erhöht [22]. Lavagedaten zu Patienten mit cystischer Fibrose liegen zur Zeit noch nicht vor, indirekte Daten aus Sputum weisen jedoch auf eine erhöhte Aktivität an Phospholipase A2 hin. So ist der Prozentanteil an Lyso-Phosphatidylcholin erhöht, während Phosphatidylcholin erniedrigt ist [13].

Für die unterschiedlichen Phospholipide besteht eine hohe Substanzspezifität insofern, als z.B. Phosphatidylglycerol mehrere 100-mal schneller hydrolysiert wird als Phosphatidylcholin. Während Phosphatidylcholin ein Hauptbestandteil der menschlichen Zellmembranen ist, findet sich Phosphatidylglycerol vor allem in mikrobiellen Membranen und Lungensurfactant.

Als wichtigste Komponente der antibakteriellen Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* ist in der Tränenflüssigkeit eine Phospholipase A2 nachgewiesen worden. Sie ist breit bakterizid gegen Staphylokokken und andere grampositive Bakterien, nicht jedoch gegen gramnegative Organismen wie *Pseudomonas aeruginosa* [29]. Erhöhte Konzentrationen an Phospholipase A2 in infizierten Geweben, entzündlichen Flüssigkeiten und im Plasma wurden bisher fast ausschließlich als schädlich angesehen, die potenten bakteriziden Eigenschaften dieser sekretorischen

Phospholipase sollten jedoch berücksichtigt werden [29], wenn an den therapeutischen Einsatz von synthetischen Inhibitoren gedacht wird.

Histonproteine

Histon-H1-Proteine werden normalerweise im Zellkern eukaryontischer Zellen exprimiert. Histone sind antibakteriell wirksam [30]. Sie finden sich auch im Zytoplasma und können vor allem aus untergehenden Epithelzellen freigesetzt werden und so ihre antibakterielle Aktivität entfalten. Daten zu Patienten mit CF liegen bisher nicht vor.

Komplement

Das Komplementsystem spielt ebenfalls eine wichtige Rolle als primäres, humorales Immunabwehrsystem in der Atemwegsflüssigkeit. Die Aktivierung erfolgt einerseits über den klassischen Pfad, nämlich durch die Bildung von komplementbindenden Immunkomplexen aus IgG oder IgM und den passenden Antigenen, andererseits auch über den alternativen Pfad, nämlich durch Bakterien- oder Pilzbestandteile, verschiedene Endotoxine oder IgA. Das Komplementsystem findet sich am Übergang zwischen nichtadaptiver und adaptiver Immunabwehr. Die Komplementfaktoren der Lungen stammen sowohl aus dem Serum als auch aus lokaler Synthese durch Alveolarmakrophagen.

Hinweise für eine Komplementaktivierung über beide Pfade in der Lunge von CF-Patienten liegen vor. Im Sputum von CF-Patienten können Immunkomplexe und die Aktivierung des Komplementsystems nachgewiesen werden [23]. Aus der Lavageflüssigkeit von Patienten mit CF in unterschiedlicher Krankheitsausprägung liegen bisher kaum Daten vor.

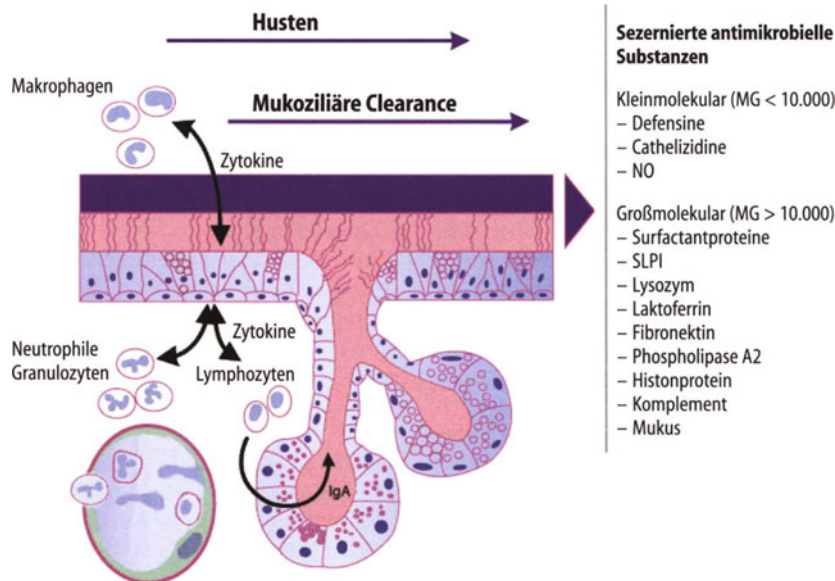
Pseudomonas aeruginosa im Sputum von CF-Patienten ist mit Immunglobulinen und Komplement C3 bedeckt und führt (s. Abschn. 3.3) zur Bildung potenter neutrophiler chemotaktischer Moleküle wie C5a, ein Anaphylotoxin, welches auch Mastzellen aktivieren kann.

Im hochgradig proteolytisch aktiven Milieu der CF-Lunge kann jedoch ein relativer opsonophagozytärer Defektzustand entstehen, da IgG, C3, C4, Fibronectin, der C3b-Rezeptor auf Neutrophilen und Komplement, das an *Pseudomonas* gebunden hat, durch verschiedene Proteasen inaktiviert wird (s. auch Abschn. 3.3). Daher ist es nicht nur wichtig die Menge an antimikrobiellen Substanzen in der Atemwegsflüssigkeit zu bestimmen, sondern auch deren funktionelle Aktivität, die durch verschiedene Mechanismen wie oxidativen Stress, Proteolyse oder lipolytische Aktivität verändert sein kann.

Atemwegsmucus

Die biophysikalischen Kläreigenschaften des ziliaren Mukussystems und des Hustens sind in Abschn. 4.1 ausführlich beschrieben. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass sich alle bisher genannten antimikrobiellen Substanzen im komplexen Netzwerk der Atemwegssekrete befinden. Die meisten Komponenten haben aufgrund ihrer extremen kationischen Ladungseigenschaften (Defensine, MPI, Phospholipase A2) oder aufgrund anderer Wechselwirkungen (z.B. Kohlenhydratbindungsaktivität von SP-D und SP-A) eine enge biochemische Beziehung zum Mucus. Wahrscheinlich von pathogenetisch großer Bedeutung, jedoch in seinen Auswirkungen hinsichtlich der pulmonalen Erregerabwehr noch unzureichend erforscht, ist in diesem Zusammenhang die veränderte biochemische Zusammensetzung des Mucus bei CF.

Abb. 4.12. Schematische Darstellung des Abwehrsystems des Respirationstraktes. Das Abwehrsystem der Atemwege, das effizient gegen Kolonisation und Infektion schützt, ist bei CF defekt. Im Normalfall tragen viele einzelne Komponenten zu diesem System bei. Zelluläre Bestandteile, wie das respiratorische Epithel und verschiedene Entzündungszellen (Alveolarmakrophagen, neutrophile Granulozyten), bilden die Grundlage des „innate host defense system“. Sekretorische Proteine oder Peptide werden von den genannten Zelltypen gebildet und haben pro-/antiinflammatorische, oxidierende/antioxidierende und proteolytische/antiproteolytische Funktionen. Das Textfeld weist Substanzen mit antimikrobieller Funktion aus. Die mukoziliäre Clearance und die Hustenclearance sind ebenfalls wichtige Komponenten in der Eliminierung von Pathogenen. Dieses Abwehrsystem hält die Lunge ab dem Niveau der Segmentbronchien im Allgemeinen keimfrei. (Nach [4])



4.3.2

Kleinmolekulare (MG < 10000) antimikrobielle Substanzen der Atemwegsflüssigkeit

R. BALS, M. GRIESE

Einleitung

Wie der Defekt des „cystic fibrosis transmembrane conductance regulators“ (CFTR), eines Ionenkanals, zu rezidivierenden Lungeninfektionen führt, ist im Wesentlichen ungeklärt. Es existieren verschiedene Modellvorstellungen, um die gesteigerte Anfälligkeit des Respirationstraktes gegenüber bakteriellen Pathogenen zu erklären:

1. Durch den molekularen Defekt des CFTR resultieren Verschiebungen der Wasser- und Elektrolytzusammensetzung der Atemwegssekrete, die zu einer Veränderung physikalischer Eigenschaften der Atemwegsflüssigkeit („airway surface fluid“, ASF) führen [26, 30]. Die resultierende Steigerung der Viskosität führt zu einer Beeinträchtigung der Clearancefunktion und zu vermehrter Kolonisation und Infektion der Atemwege [8].
2. Oberflächenmoleküle respiratorischer Epithelzellen sind bei cystischer Fibrose (CF) verändert, (insbesondere Glykoproteine, wie asialo-GM₁) was zu einer vermehrten Bindung von Bakterien führt [21].
3. CFTR auf der Oberfläche von Epithelzellen kann Bakterien binden und so zu ihrer Elimination beitragen. Diese Funktionen sind bei CF gestört [28].

Eine andere Hypothese wurde durch wegweisende Untersuchungen im Wesentlichen zweier Labors er-

arbeitet. Kultivierte Zellen in verschiedenen Modellsystemen zeigten, dass Sekrete von CF-Zellen einen Defekt ihrer antimikrobiellen Aktivität aufweisen [14, 35]. Sekrete von CF-Atemwegszellen sind nicht in der Lage, verschiedene Bakterien effektiv abtöten zu können. Dies waren die ersten Hinweise, dass der CFTR-Defekt einen Ausfall basaler Abwehrmechanismen verursacht, der dann in gesteigerter Kolonisation mündet. Ausgehend von diesen Befunden erfolgte in den letzten Jahren eine intensive Suche nach antimikrobiellen Substanzen in der ASF, deren Dysfunktion mit der Pathogenese der CF-Lungenerkrankung verbunden sein könnte [4].

Im Rahmen dieses Abschnitts sollen kleinmolekulare antimikrobielle Substanzen, die in die Atemwege sezerniert werden, und ihre Beziehungen zur Entwicklung der pulmonalen Erkrankung bei CF beschrieben werden. Diese sekretorischen Abwehrsubstanzen sind Bestandteil eines basalen Abwehrsystems („innate host defense system“), welches mit seinen zellulären Bestandteilen (Abwehrfunktion von Epithelzellen oder Phagozyten) im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem (B-, T-Lymphozyten mit akzessorischen Zellen) steht (Abb. 4.12). Das „innate immune system“ stellt nicht nur zeitlich und räumlich eine erste Barriere gegen Pathogene dar, sondern ist auch für die Initiierung der adaptiven Immunantwort wichtig [10]. Das Abwehrsystem des Respirationstraktes besitzt darüber hinaus mit der Barrierefunktion des Epithels und der mukoziliären Clearance weitere wichtige Schutzeinrichtungen (Abb. 4.12). Dieser Apparat hält im Normalfall den Respirationstrakt keimarm und verhindert Infektionen. Bei CF führt ein Ausfall der CFTR-Funktion zu einem Defekt des „innate host defense systems“ [4]. Antimikrobielle Peptide stellen einen Effektormechanismus dieses Abwehrsystems dar. Ihr Vorkommen in den Atemorganen wurde in den letzten Jahren entdeckt. Auf den nächsten Seiten werden kleinmolekulare Substanzen beschrieben, die antimikrobielle Funktionen besitzen. In Abschn. 4.3.1 werden großmolekulare antimikrobielle Substanzen abgehandelt. Viele dieser Abwehrstoffe wirken synergistisch mit anderen sezernierten Bestandteilen der ASF und sind als Bestandteil des „innate immune systems“ zusammen mit zellulären Bestandteilen wichtig für die Funktion des Respirationstraktes.

Antimikrobielle Peptide

Peptidantibiotika sind integraler Bestandteil des Abwehrsystems von Tieren und Pflanzen [7, 39]. Organismen, die lediglich über ein „primitives“ Immunsystem verfügen, welches ohne B- und T-Zellen auskommt, sind in der Lage, ihren Körper gegen eindringende Mikroorganismen zu schützen. Bestand-

teile dieses altertümlichen Abwehrsystems sind auch beim Menschen vorhanden und haben neben ihrer ursprünglichen direkten Abwehrfunktion auch Aufgaben, das adaptive Immunsystem zu regulieren. Antimikrobielle Peptide als Teil dieses basalen Immunsystems werden von individuellen Genen kodiert und in der Regel als Präpro-Peptide produziert (Abb. 4.13). Nach Prozessierung und teilweiser Speicherung in sekretorischen Granula erfolgt die Freisetzung, die entweder konstitutiv oder als Folge einer Stimulation durch Entzündungsmediatoren abläuft.

Allen antimikrobiellen Peptiden sind zwei Eigenschaften gemeinsam: Zum einen besitzen sie bei neutralem pH stets eine positive Nettoladung, zum anderen resultiert ihre dreidimensionale Struktur in einer hydrophoben und in einer hydrophilen Seite des Moleküls (Abb. 4.15) [17]. Diese Struktureigenschaften sind für den Wirkungsmechanismus wichtig (Abb. 4.14). Durch die positive Ladung des Moleküls kommt es zu Interaktionen mit negativen Ladungen auf der Oberfläche von Mikroorganismen, insbesondere mit Lipopolysacchariden. Diese ladungsabhängigen Interaktionen verleihen antimikrobiellen Peptiden eine relative Spezifität gegenüber Zellmembranen von Mikroorganismen, da diese im Allgemeinen mehr negative Ladungen aufweisen als eukaryotische Zellen. Diese elektrostatischen Wechselwirkungen können durch erhöhte Salzkonzentrationen gemindert werden. Dadurch erklärt sich die Inaktivierung der Aktivität kationischer antimikrobieller Substan-

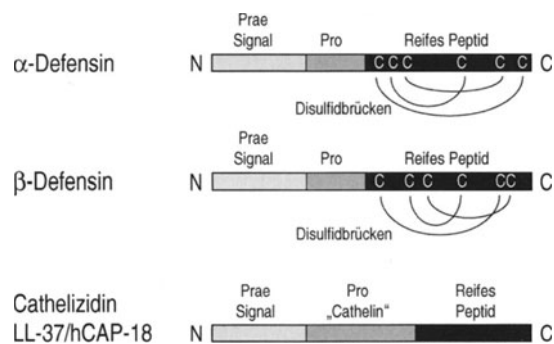


Abb. 4.13. Schematische Darstellung der Molekülstruktur antimikrobieller Peptide des Menschen. Antimikrobielle Peptide werden von individuellen Genen kodiert und in der Regel als Präpro-Peptide produziert. Nach Prozessierung und teilweise Speicherung in sekretorischen Granula erfolgt die Freisetzung. Defensine sind antimikrobielle Peptide, die drei intramolekulare Disulfidbrücken besitzen und hauptsächlich β -Faltblattstruktur aufweisen. α - und β -Defensine unterscheiden sich unter anderem in der Position der Cysteine und der Ausbildung der Disulfidbrücken. Cathelizidine, die keine Disulfidbrücken ausweisen, sind antimikrobielle Peptide, die sich durch eine konservierte Proregion („cathelin“) und eine variable C-terminale antimikrobielle Peptiddomäne auszeichnen. Das einzige humane Cathelizidin ist LL-37 oder hCAP-18

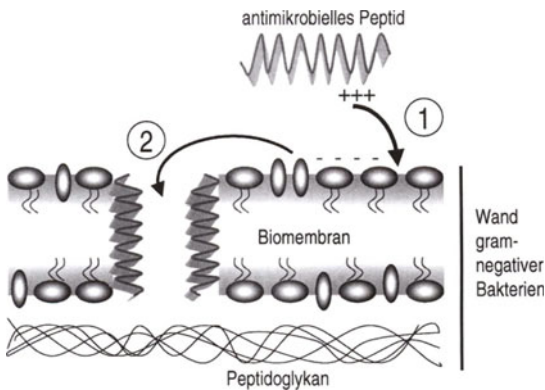


Abb. 4.14. Schematische Darstellung der Wirkungsweise kationischer antimikrobieller Peptide. In einem ersten Schritt (1) kommt es zu Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Peptid und negativ geladenen Substanzen der Oberfläche von Mikroorganismen, wie z. B. Lipopolysaccharid. Die amphipathische Eigenschaft der Peptide erlaubt beim Vorliegen ausreichender Konzentrationen, Kanäle in Biomembranen zu formen (2), in denen die hydrophoben Seiten der Peptidmoleküle nach außen hin zu denen Membranlipiden gerichtet sind, die hydrophilen Seiten die Innenwand des Kanals bilden. Die Ausbildung dieser Poren führt schließlich zur Abtötung des Mikroorganismus. Die Fähigkeit antimikrobieller Peptide, Mikroorganismen in kurzer Zeit (Minuten) abtöten zu können, lässt sich durch diesen Wirkungsmechanismus erklären

zen durch Salze. Durch ihren amphipathischen Charakter (eine Seite des Moleküls hydrophil, die andere hydrophob) können sich antimikrobielle Peptide in Membranen einlagern und in Komplexen mit mehreren Peptiden Kanäle durch die Membran bilden, die schließlich zum Untergang der betroffenen Zelle führen (Abb. 4.13). Weiter werden auch Auswirkungen auf intrazelluläre Bestandteile beschrieben.

Das Wirkungsspektrum antimikrobieller Peptide ist breit und umfasst nicht nur grampositive und -negative Bakterien, sondern auch Pilze und Viren und Lipidhüllen. Obwohl ihre antimikrobielle Aktivität in vitro nicht so hoch ist wie die einiger konventioneller Antibiotika, liegen minimale Hemmkonzentrationen (MHC) gegen multiresistente Organismen mit 1–8 µg/ml im Bereich potenter Antibiotika. Es sind

einige Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber antimikrobiellen Peptiden beschrieben, im Allgemeinen besteht jedoch eine ausgesprochen geringe Tendenz zur Ausbildung von Resistenzen [17]. Einige Bakterienarten besitzen eine endogene Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden, darunter *Burkholderia cepacia*.

Verschiedene Familien antimikrobieller Peptide wurden isoliert (Tabelle 4.3), die außer ihrer bakteriziden Funktion und den oben beschriebenen Eigenschaften keine gemeinsamen Strukturmerkmale besitzen. Beim Menschen sind Defensine und ein Cathelicidin beschrieben worden. Die mögliche Funktion dieser Stoffe als Abwehrsubstanz gegenüber Mikroorganismen wurde im Wesentlichen aus In-vitro-Versuchen abgeleitet, in denen gereinigte Substanzen antimikrobielle Aktivität zeigten. Ob dies bedeutet, dass Defensine oder Cathelicidine im Organismus (nur) diese Funktion besitzen, ist nicht geklärt. Da die Zusammensetzung der Atemwegsflüssigkeit sehr komplex ist, stellt sich die detaillierte Untersuchung der Funktion einer individuellen Substanz als sehr schwierig dar. Genetische Modifikationen in Modellsystemen oder Tiermodellen stellen die Voraussetzungen für weitergehende Untersuchungen dar. So können durch die Überexpression oder die Ausschaltung einer bestimmten Abwehrsubstanz Aussagen über ihre Funktion getroffen werden. Die Klonierung mehrerer β -Defensine der Maus macht Experimente in Knockout-Tieren möglich (s. unten).

Defensine

Defensine sind antimikrobielle Peptide, die drei intramolekulare Disulfidbrücken besitzen und hauptsächlich β -Faltblattstruktur aufweisen. α - und β -Defensine sind zwei Untergruppen, die sich unter anderem in der Ausbildung der Disulfidbrücken unterscheiden (Abb. 4.13) [13]. Derzeit sind beim Menschen sechs α -Defensine und zwei β -Defensine bekannt.

■ **Humane α -Defensine.** Vier der α -Defensine des Menschen, „human neutrophil peptides 1–4“ (HNP

Tabelle 4.3. Übersicht über verschiedene Klassen antimikrobieller Peptide, zusammen mit Strukturmerkmalen, typischen Vertretern und Vorkommen. Die Einteilung hier erfolgt aufgrund von Strukturmerkmalen, wie Zusammensetzung und 3D-Struktur [5]. Es ist auch möglich, antimikrobielle Peptide nach anderen Gesichtspunkten einzuteilen, z.B. nach Homologie ihrer Nukleotid- oder Aminosäuresequenz

| Klasse | Strukturmerkmale | Typische Vertreter und Vorkommen |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Gruppe I | Lineare, α -helikale Peptide ohne Cysteine | Magainine (Frosch), LL-37/hCAP-18 (Cathelicidin, Mensch) |
| Gruppe II | Peptide mit Cysteinen und Disulfidbindungen | Protegrin (Cathelicidin, Schwein), β -Defensine (Defensin, Vertebraten), α -Defensine (Defensin, Vertebraten) |
| Gruppe III | Peptide mit ungewöhnlich hohem Anteil von ein oder zwei spezifischen Aminosäuren | PR-39 (Schwein) Indolicidin (Rind) |

1–4) finden sich v.a. in den primären (azurophilen) Granula neutrophiler Granulozyten, wo sie einen Hauptteil des Granulainhalts ausmachen und einen wichtigen nichtoxidativen Mechanismus zur Abtötung von Mikroorganismen darstellen [25]. Im Verlauf der Akkumulation von Neutrophilen bei der Atemwegsentzündung bei CF kommt es zu hohen Konzentrationen an α -Defensinen in den Atemwegen, welche zytotoxische Effekte zur Folge haben können [19, 36]. „Human defensin 5 und 6“ (HD-5, HD-6) sind in Paneth-Zellen des Dünndarms exprimiert. Neben der antimikrobiellen Aktivität dieser Substanzen wurden auch Funktionen als Entzündungsmediatoren und Ionenkanäle beschrieben.

■ **Humane β -Defensine.** Die ersten β -Defensine, die in Schleimhäuten gefunden wurden, waren „tracheal antimicrobial peptide“ (TAP) und „lingual antimicrobial peptide“ (LAP) des Rindes [9, 37]. Homologe Substanzen des Menschen wurden im folgenden isoliert und „human β -defensin 1“ (hBD-1) und „human β -defensin 2“ (hBD-2) genannt [2, 6, 18]. Beide β -Defensine werden zusammen mit anderen antimikrobiellen Substanzen in serösen Drüsenzellen der Atemwege und in Oberflächenepithelzellen gebildet. hBD-1 ist konstitutiv exprimiert, die Transkription und Sekretion von hBD-2 dagegen wird durch inflammatorische Mediatoren stark stimuliert [2, 34]. Beide Peptide werden in die Atemwegsflüssigkeit sezerniert. Über die Konzentrationen, die in entsprechenden Kompartimenten auf der Oberfläche des respiratorischen Epithels zu finden sind, ist nichts näheres bekannt. Rückschlüsse aus Konzentrationen, die in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit oder in Zellkultursystemen bestimmt wurden, lassen Mengen antimikrobieller Peptide in der Atemwegsflüssigkeit erwarten, die im Bereich wirksamer MHC gegenüber Mikroorganismen liegen. Es ist wahrscheinlich, dass antimikrobielle Peptide wegen ihrer positiven Ladung mit negativen Substanzen der Atemwegsflüssigkeit, wie z. B. Muzinen, interagieren. Die biologische Bedeutung dieser Interaktion ist jedoch nicht klar.

Cathelizidine: LL-37/hCAP-18

Cathelizidine sind antimikrobielle Peptide, die sich durch eine konservierte Proregion („cathelin“) und eine variable C-terminale antimikrobielle Peptid-Domäne auszeichnen (Abb. 4.13) [38]. Beim Menschen wurde nur ein Vertreter dieser Familie gefunden und LL-37 (nach den beiden N-terminalen Aminosäuren des aktiven Peptids) oder hCAP-18 („human cationic antimicrobial peptide“) genannt [16, 24]. Initial wurde LL-37/hCAP-18 in neutrophilen Granulozyten beschrieben, später wurde das Peptid auch auf Körperoberflächen, wie der Haut, gefunden

[11]. In den Atemwegen wird LL-37/hCAP-18 in den gleichen Zelltypen produziert, in denen auch β -Defensine und andere Abwehrsubstanzen gebildet werden [3]. Damit werden in Schleimhäuten des Menschen antimikrobielle Peptide zweier Klassen, der Defensine und der Cathelizidine, gebildet. Auch die Aktivität von LL-37/hCAP-18 wird durch erhöhte Salzkonzentrationen gehemmt.

Beziehung antimikrobieller Peptide zur Pathogenese der cystischen Fibrose

Die Fähigkeit von CF-Atemwegsepithelien bzw. der von ihnen sezernierten Flüssigkeit, Bakterien effektiv eliminieren zu können, ist gestört. Die Ursache dafür ist derzeit nicht geklärt, zwei sich gegenüberstehende Hypothesen werden zum jetzigen Zeitpunkt diskutiert:

1. Die Hypotonic(low salt)-airway-surface-fluid/defensin-Hypothese war die initiale Erklärung für den Ausfall des Abwehrsystems und besagt im Wesentlichen, dass der Defekt des CFTR in einer erhöhten Salzkonzentration der Atemwegsflüssigkeit resultiert. Die Aktivität der meisten antimikrobiellen Substanzen ist mit zunehmender Salzkonzentration gehemmt, wodurch CF-Atemwegsflüssigkeit eine geringere antimikrobielle Aktivität aufweisen würde [35]. Durch technische Probleme, die Salzkonzentrationen in der ASF zu messen, konnte diese Hypothese nicht belegt oder widerlegt werden.
2. Die „isotonic volume transport/mucus clearance hypothesis“ sagt aus, dass bei CF die Rate isotonischer Flüssigkeitsresorption höher ist als im Normalfall. Dies führe zu einer Verminderung der Atemwegsflüssigkeit mit Zunahme ihrer Viskosität und als Folge davon zu verschlechterter Clearancefunktion [8, 22].

Ob eine und welche dieser beiden Hypothesen zutreffen oder ob beide Hypothesen zum Teil anwendbar ist, ist derzeit nicht bekannt. CFTR ist in den Atemwegen im wesentlichen in den selben Zelltypen exprimiert, in denen auch antimikrobielle Substanzen gebildet werden. Dies legt eine weitere Hypothese nahe, um einen Defekt des CFTR mit dem Ausfall des Abwehrsystems zu verbinden. Für CFTR ist auch die Beeinflussung sekretorischer Prozesse beschrieben, so dass Defekte dieses Proteins zu inadäquater Sekretion von Abwehrsubstanzen führen könnten. Die hier und in Abschn. 4.1 beschriebenen Abwehrsubstanzen sind insbesondere in den proximalen Atemwegen exprimiert. Dies legt nahe, dass ein Defekt des Abwehrsystems der proximalen Atemwege eine initiale Kolonisation erlaubt, was schließlich zu einer chronischen Infektion führt. Diese Überlegungen über den Ort, wo der Ausfall des „host defense systems“ zur

Entwicklung von Kolonisation und Infektion führt, sind insbesondere für die Entwicklung neuer Behandlungsverfahren wichtig, die mittels pharmakologischer oder genterapeutischer Eingriffe danach trachten, den Defekt des CFTR zu korrigieren.

Inwieweit der Defekt des pulmonalen Abwehrsystems mit antimikrobiellen Peptiden zusammenhängt, ist unbekannt. Die Klonierung antimikrobieller Peptide der Maus macht eine Untersuchung der Funktionen antimikrobieller Peptide im Rahmen des innate host defense systems möglich. „Mouse β -defensin 1 und 3“ (mBD-1, mBD-3) bzw. „murine cathelin-like protein“ (MCLP, auch „cathelin-related antimicrobial peptide“, CRAMP) sind die homologen Peptide zu hBD-1, hBD-2 und LL-37/hCAP-18 [1, 12, 20, 27, 29].

Clرازzellprotein, NO und andere anorganische Bestandteile der Atemwegsflüssigkeit

Neben antimikrobiellen Peptiden finden sich in der Atemwegsflüssigkeit eine Reihe weiterer Substanzen, die Funktionen im „host defense system“ besitzen (s. Abb. 4.15). Clرازzellen der distalen Atemwege sezernieren *Clرازzell-10000-MG-Protein* („Clara cell secretory protein“, CC10, CCSP, CC16), dem Abwehrfunktionen zugeschrieben werden. Durch seine

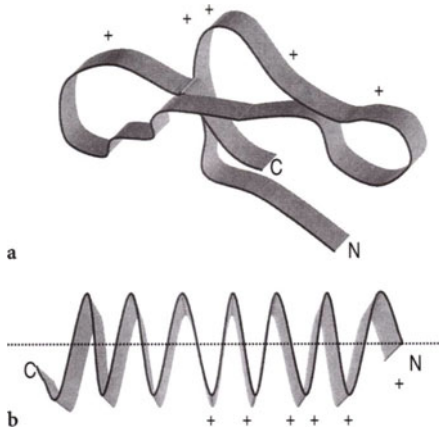


Abb. 4.15 a, b. Schematische Darstellung der Struktur verschiedener antimikrobieller Substanzen. Antimikrobielle Peptide, die in den Atemwegen des Menschen produziert werden, haben unterschiedliche Strukturen. Gemeinsam ist ihnen zum einen das Vorkommen basischer Aminosäuren, die dem Molekül eine positive Ladung verleihen. Zum anderen ist eine Seite des Peptids hydrophob, die andere hydrophil. **a** zeigt die Struktur eines β -Defensins, die insbesondere durch das Vorliegen antiparalleler β -Faltblattstrukturen gekennzeichnet ist. LL-37/hCAP-18 zeichnet sich dagegen durch das Vorliegen einer α -helikalen Struktur aus, deren Bestehen von der Salzkonzentration und dem pH der Lösung abhängt. **b** zeigt eine solche α -Helix, exemplarisch für LL-37/hCAP-18 oder Magainins. Letztere sind eine der ersten antimikrobiellen Peptidklassen, die von Michael Zasloff aus der Haut von Fröschen isoliert wurden

Funktionen, Phospholipase A_2 und Proteasen zu hemmen, kann dieses Protein den Host-defense-Apparat kontrollieren [32, 33].

Die Bedeutung von *Stickoxiden*, insbesondere von NO, für die Regulation verschiedenster Körperfunktionen ist in den letzten Jahren erarbeitet worden. NO hat viele Funktionen, von der Regulation der Vasomotorik, über Mitwirkung bei der Signalübertragung durch Neurone bis hin zu proinflammatorischen und antimikrobiellen Funktionen [31]. In den Atemwegen betrifft dies insbesondere die Regulation des Tonus glatter Muskelzellen, Immunreaktionen und sekretorische Vorgänge. NO wirkt in physiologischen Konzentrationen antibakteriell. Eine genaue Beurteilung, ob NO an der Pathogenese der CF-Lungenerkrankung als schädigender Einflussfaktor oder als protektiver Mechanismus des Abwehrsystems mitwirkt, ist wegen der komplexen Interaktionen und der vielfältigen Wirkungen dieses Stoffes schwierig zu beurteilen. CF-Patienten weisen in der Ausatemluft geringere Konzentrationen an NO auf als Kontrollpersonen [15]. Dies ist insofern interessant, als bei inflammatorischen Erkrankungen eher erhöhte NO-Konzentrationen erwartet würden. Die Ursache für die verminderten Konzentrationen in der Ausatemluft ist möglicherweise ein vermehrter Abbau von NO im Rahmen der Entzündung. Die Anhäufung von Entzündungsmediatoren führt auch zu einer Hemmung der Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), dem Enzym, welches vor allem für die Produktion von NO in Atemwegsepithelien oder Entzündungszellen verantwortlich ist [23].

Weiter finden sich in der Atemwegsflüssigkeit *anorganische Bestandteile*, die v. a. als Stoffwechselprodukte von Epithelzellen oder Phagozyten anfallen. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hypochlorsäure und Thiocyanat besitzen zum Teil antibakterielle Eigenschaften, ihre Funktionen sind jedoch nur wenig untersucht.

4.3.3

Zusammenfassung

In der Atemwegsflüssigkeit findet sich ein basales, erst in den letzten Jahren hinsichtlich weiterer Komponenten detaillierter erforschtes, nichtadaptives Abwehrsystem („innate immune system“). Es stellt die zeitlich und topisch erste Barriere gegen Pathogene dar und ist auch von Bedeutung bei der Initiierung des adaptiven Abwehrsystems (B- und T-Lymphozyten). Seine Komponenten umfassen antimikrobiell wirksame anorganische Substanzen wie NO, H_2O_2 , Hypochlorsäure, Thiocyanat, antimikrobielle Peptide wie die Defensine und die

Cathelizidine und größer molekulare, antimikrobiell aktive Proteine wie Clara-Zellprotein, Surfactantprotein A, Surfactantprotein D, Mukus-Proteinase-Inhibitor (MPI, SLPI, ALP, BSI), Lysozym (Muramidase), Laktoferrin, Fibronektin, Phospholipase A2, Histonproteine, Komplementkomponenten sowie Atemwegsmucus. Primäre, vor allem aber sekundäre Beeinträchtigungen der Funktionszustände einzelner oder mehrerer dieser Faktoren können bei cystischer Fibrose zur Unfähigkeit der kompletten Elimination der Pathogene aus dem Atemtrakt entscheidend beitragen. Nach Definition spezifischer Defektzustände in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium bietet deren Korrektur durch exogene Gabe, Modulation der Genexpression u. ä., vielversprechende therapeutische Optionen.

Das Abwehrsystem der Atemwege ist bei CF als Folge des defekten CFTR gestört. Dies stellt eine attraktive Hypothese dar, den genetischen Defekt mit der Entwicklung der Infektion der Atemwege kausal zu verbinden. Die Gründe für die vermehrte Anfälligkeit gegenüber Kolonisation und Infektion als Folge des Ausfall eines Ionenkanals werden kontrovers diskutiert, sind aber letztendlich unbekannt. Antimikrobielle Peptide stellen einen wichtigen Bestandteil des „innate immune system“ dar und tragen zur antimikrobiellen Funktion der Atemwegsflüssigkeit bei. Viele biologische Funktionen dieser Substanzen sind derzeit noch ungeklärt. Insbesondere ist die Beziehung zwischen antimikrobiellen Peptiden und der Entwicklung der Lungenerkrankung bei CF unklar. Ob einerseits eine erhöhte Salzkonzentration in der Atemwegsflüssigkeit für eine Inaktivierung antimikrobieller Substanzen verantwortlich ist oder ob die Fehlfunktion des CFTR zu einem Mangel an Abwehrsubstanzen führt, ist derzeit unklar. Weitere Erforschung basaler antimikrobieller Funktionen des Atemwegsepithels wird hier in der Zukunft zu neuen Erkenntnissen über die Pathogenese der CF führen. Weitere Entwicklungen auf diesem Gebiet werden mehr Informationen über die Ursache der erhöhten Infektanfälligkeit des Respirationstraktes bei CF bringen und damit die Türen für die Entwicklung neuer Therapieansätze öffnen. Natürlich vorkommende antimikrobielle Proteine und Peptide stellen Ausgangsmaterialien zur Entwicklung neuer Antibiotika-Klassen dar. Dies ist umso wichtiger, als relevante Mikroorganismen zunehmend gegen klassische Antibiotika resistent werden. So befinden sich in den USA mehrere Substanzen für Humanapplikation in Entwicklung oder stehen kurz vor dem Eintritt in den Markt, darunter auch inhalative antimikrobi-

elle Peptide zur Behandlung von Atemwegsinfektionen bei CF. Das Hauptproblem zur Entwicklung dieser Substanzen als Pharmazeutika ist ihre Produktion, da z. B. die chemische Synthese teuer und zum Teil wegen ungewöhnlicher Molekülstruktur unmöglich ist. Auch die Überexpression endogener antibiotischer Substanzen, z. B. durch Stimulatoren ihrer Expression oder durch Gentransfer, kann neue Möglichkeiten zur Behandlung von Atemwegsinfektionen eröffnen.

4.4 Surfactant-System

M. GRIESE

Surfactant ist ein oberflächenaktives, komplexes Gemisch aus verschiedenen Lipiden und Proteinen, welches die innere Oberfläche der Lunge auskleidet. Es gewährleistet das Offenhalten der kleinen bronchiolären Atemwege und des alveolären Gasaustauschraums, unabhängig vom Lungenvolumen während normaler Ruheatmung und forcierter Atmung. Diese Organisation der Luft-Gewebe-Grenzfläche wird als biophysikalische Funktion von Surfactant bezeichnet. Dagegen tragen die immunologischen Surfactantfunktionen entscheidend zur Aufrechterhaltung der nichtadaptiven Abwehr von Erregern und fremden Substanzen bei, die mit dem Atemstrom in die Lunge gelangen.

4.4.1 Biophysikalische Funktion von Surfactant: Stabilisierung und Offenhalten der kleinen, nicht knorpelarmierten Atemwege

Surfactant ist für die Stabilität der peripheren Atemwege verantwortlich [22]. Die hohe Oberflächenspannung wässriger Flüssigkeiten in den engen Atemwegen führt dazu, dass diese das Lumen blockieren können (Abb. 4.16). In Modellversuchen konnte gezeigt werden, dass sich Flüssigkeit aufgrund ihrer Oberflächenspannung gerade an engen Stellen von Kapillaren sammelt und diese dadurch verschließt. Wenn der Druck, z. B. durch die Ausatmung, von einer Seite erhöht wird, wird der Flüssigkeitstropfen von den engen Stellen weggedrückt und die Luft kann frei durch die Kapillare strömen. Wenn es sich bei den Flüssigkeiten um wässrige Salzlösungen handelt, bewegen sie sich bei nachlassendem Druck sofort wieder an die enge Stelle zurück und verschließen die Kapillare erneut. Ist jedoch Lungen-

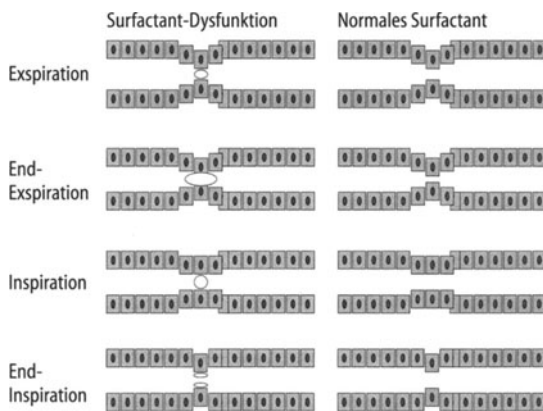


Abb. 4.16. Funktion von Surfactant in den kleinen, nicht knorpelarmierten Atemwegen. Die Anwesenheit eines funktionierenden Surfactants verhindert einen Verschluss der kleinen Atemwege durch Flüssigkeitsansammlungen an engen Stellen während der normalen Atmung

surfactant anwesend, wird die hohe Oberflächenspannung der Flüssigkeitstropfen gesenkt, die Tropfen sammeln sich daher nicht an den engsten Stellen und die Kapillaren werden so offen gehalten. Auch die Flüssigkeit, die einmal durch den Atemstrom aus der engen Stelle entfernt wurde, kam nicht an diese zurück und die Kapillaren bleiben frei für den Luftfluss [5, 20]. Eine Inaktivierung von Surfactant, zum Beispiel durch freigesetzte Phospholipasen C oder A2, führt ebenso wie in die Atemwege transsudiertes Fibrinogen oder Albumin zu einem dosisabhängigen Verlust der oberflächenaktiven Eigenschaften von Surfactant und daher zu sekundären, funktionellen Atemwegsenge [4, 18, 21].

Die biochemischen Faktoren, die für diese Funktion von Surfactant verantwortlich sind, sind vor allem die Phospholipide und die hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C (Abb. 4.17). Sie sind auch die Hauptkomponenten der derzeit verfügbaren therapeutischen Surfactants wie Survanta, Curosurf und Alveofact. Das hydrophile SP-A erhöht darüber hinaus die Resistenz des Surfactants gegenüber einer Hemmung durch Proteine und andere Bestandteile der Atemwegsflüssigkeit. Die Phospholipide Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol sind amphiphile Moleküle, die sich mit ihrem hydrophoben Fettsäureschwanz und der hydrophilen Kopfgruppe zwischen wässriger Phase und Gasphase ausrichten können und so die Oberflächenspannung der wässrigen Phase erheblich senken können. Dies verhindert, dass sich die wässrigen Tropfen abrunden und an engen Stellen konzentrieren. Surfactantprotein B ist ein sehr hydrophobes, positiv geladenes Molekül, mit einem Molekulargewicht von 8000 (Abb. 4.17). Es wird nicht nur in den Typ-II-Pneumozyten der

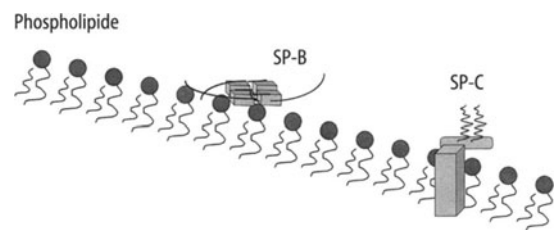


Abb. 4.17. Die hydrophoben Surfactantkomponenten umfassen die Phospholipide und die Surfactantproteine B und C (SP-B, SP-C). Sie sind vor allem für die biophysikalischen oberflächenaktiven Funktionen von Surfactant verantwortlich

Lunge, sondern auch in den Clara-Zellen der Bronchien exprimiert. Es beschleunigt die Bildung des oberflächenaktiven Films aus Phospholipiden, indem es die Adsorptionsrate von Lipiden an die Wasser-Luft-Grenze um mehr als das 150fache steigert. Surfactantprotein C wird in der reifen Lunge ausschließlich von Typ-II-Zellen exprimiert und ist ein extrem hydrophobes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 4000, welches zusätzlich zwei Fettsäuregruppen kovalent gebunden hat (Abb. 4.17). Auch SP-C erhöht die Beschleunigung der Adsorptionsrate von Lipiden an die Luft-Wasser-Grenzschicht und erhöht die Resistenz von Surfactant gegenüber einer Hemmung durch Ödemflüssigkeit und Serumproteine.

■ Biophysikalische Funktionen von Surfactant

- Stabilisierung und Offenhalten der kleinen, nicht knorpelarmierten Atemwege,
- Verbesserung des mukoziliären Transports,
- kleine ($< 6 \mu\text{m}$) eingeatmete Partikel werden in die wässrige Hypophase transloziert,
- Beschleunigung des Abtransports partikulärer Substanzen und von Zelldetritus aus den Alveolen in die größeren Atemwege durch Erniedrigung der endexpiratorischen Oberflächenspannung,
- Verhinderung des Alveolär- und Lungenkollapses während der Expiration und Unterstützung der inspiratorischen Ausdehnung der Lunge.

Verbesserung des mukoziliären Transports

Eine Reihe von Untersuchungen hat gezeigt, dass oberflächenaktive Surfactants sowohl in den oberen Atemwegen [24] als auch in den unteren Atemwegen [16, 26, 29] die mukoziliäre Transportrate um bis zu 50% steigern können. Verschiedene Mechanismen spielen hier eine Rolle. Surfactant verbessert sowohl die rheologischen Eigenschaften als auch die Ober-

flächeneigenschaften von Schleim, was zu einer effektiveren Interaktion zwischen Mukus und Zilien führen kann [29]. Auch wird gleichzeitig die Zilienschlagfrequenz verdoppelt [29]. Die in diesen Untersuchungen verwendeten Surfactantpräparationen waren Phospholipidgemische, die wechselnde, meist geringe Anteile an Surfactantprotein B und C enthielten. In-vitro-Experimente mit Schleim von Patienten mit CF zeigen, dass auch reine Phosphatidylglycerol-Liposomen die Oberflächen- und Transporteigenschaften des Mukus deutlich verbessern [1].

Translokation von partikulären Substanzen in die wässrige Hypophase

Inhalierbare Partikel, die in den Atemwegen deponiert wurden, werden von einem osmiophilen Surfactantfilm aus Phospholipiden umgeben [8]. Die flächeneigenschaften dieses Films sind verantwortlich für die Verlagerung der Partikel in die tiefere wässrige Gel- und Solphase. Die Oberflächenkräfte sind so gerichtet, dass die Partikel immer weiter aus dem Bronchiallumen in Richtung Epithel verlagert werden [6].

Beschleunigung des Abtransports partikulärer Substanzen aus der Lunge

Experimentelle und theoretische Untersuchungen weisen darauf hin, dass Lungensurfactant eine spezifische Rolle für die Elimination von partikulären Substanzen durch hydrodynamische Transportprozesse, die von den Alveolen in die zentralen Atemwege gerichtet sind, spielt [7, 11].

Verhinderung des expiratorischen Kollapses und Unterstützung der inspiratorischen Ausdehnung der Lunge

Die riesige Oberfläche der Lunge und die damit verbundene große Oberflächenspannung des Flüssigkeitsfilms, der die Alveolen benetzt, bewirkt, dass jedes Lungenbläschen die Tendenz hat zu seinem Zentrum hin und weg von anderen zu kollabieren. Diese Oberflächenspannung wird durch die Anwesenheit von Surfactant an der Grenzfläche zwischen Gasraum und Flüssigkeitsfilm drastisch reduziert. So wird verhindert, dass die Alveolen endexpiratorisch zusammenfallen und intrapulmonale Shunts entstehen, die zu einer ungenügenden Oxygenierung des Blutes führen. Der Film aus Phospholipiden bewirkt also eine homogenere Verteilung der Luft während der Inspiration und die hohe Geschwindigkeit der Lipidadsorption durch SP-B und SP-C an die Luft-Flüssigkeit-Grenzfläche ermöglicht es, dass

mit jedem Atemzug die Oberflächenkomponente der Lungenretraktionskraft so niedrig wie möglich gehalten wird und so die Atemarbeit minimiert wird.

Änderung des Einstroms von interstitieller Ödemflüssigkeit

Eine hohe Oberflächenspannung bewirkt auch, dass die hydrostatischen Filtrationskräfte des Interstitiums nicht balanciert werden und ein Nettoeinstrom von Flüssigkeit in den alveolären und den bronchiolären Raum stattfindet. Durch die Erniedrigung der Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeit-Grenzfläche verhindert Surfactant die Ansammlung von Flüssigkeit in den Atemwegen.

Sekundäre Schädigungen von Surfactant im Rahmen der Entzündungsprozesse können also mannigfaltige biophysikalische Auswirkungen haben und stellen Mechanismen dar, die bei Patienten mit cystischer Fibrose in den kleinen Atemwegen aber auch im Rahmen von Exazerbationen im alveolären Bereich zu einem Funktionsverlust und zu Störungen der Gasaustauschfunktion der Lunge führen.

Spezifische Störungen des alveolären und bronchialen Surfactants bei CF

Bronchiallavage-Untersuchungen bei CF-Patienten haben einen extrem reduzierten Gehalt an Phosphatidylcholin [9] und eine erhöhte Molfraktion an Arachidonsäure in den Phospholipiden gezeigt [10]. Diese Ergebnisse ähneln denjenigen, die für tracheobronchiales oberflächenaktives Material, welches aus Sputum gewonnen wurde, gefunden wurden [15]. Der Gehalt an Phosphatidylcholin war erheblich reduziert und die Konzentration an SP-A erhöht. Die biophysikalische Aktivität von Surfactant, gemessen an der Oberflächenaktivität, war vergleichbar derjenigen von erwachsenen Patienten mit Tracheostoma. Im Vergleich zu normalen Kontrollkindern hatten Kinder mit cystischer Fibrose eine erheblich schlechtere Oberflächenaktivität des bronchialen Surfactants [27]. In einer kürzlich publizierten Studie an sehr jungen Säuglingen und Kleinkindern mit cystischer Fibrose fand sich bei Verwendung einer Lavagetechnik, die hauptsächlich bronchiales Material aus den Atemwegen gewinnt, kein Unterschied zwischen stabilen CF-Patienten und gesunden Vergleichskindern, die wegen eines Stridors bronchoskopiert wurden. Jedoch waren bei einer Gruppe von CF-Patienten, die bei der Untersuchung eine deutliche Infektion und bronchiale Entzündungsreaktion aufwiesen, die durch den Nachweis von Bakterien, erhöhten IL6-Spiegeln und einem Anteil von mehr als 50% Neutrophilen an den Lavagezellen

belegt wurde, erhöhte Anteile an SP-A nachzuweisen [17]. Bei diesen Kindern war auch der Gehalt an Phosphatidylcholin signifikant reduziert. Die Oberflächenaktivität unterschied sich jedoch nicht zwischen den 3 untersuchten Gruppen. Diese Untersuchungen zeigen, dass bei Patienten mit cystischer Fibrose keine primäre Abnormalität des bronchialen Surfactantsystems vorliegt, dass jedoch laufende endobronchiale Entzündungsreaktionen zu sekundären Surfactantabnormalitäten und Defizienzen führen.

Bei jugendlichen Patienten mit CF, die eine deutliche chronische Atemwegsentszündung aufwiesen, finden sich erhebliche Alterationen auch im alveolären Kompartiment [13, 28]. Diese Patienten hatten in der Lavage etwa 48% neutrophile Granulozyten, während die Kontrollpersonen nur 2% aufwiesen. Die Zusammensetzung der Phospholipide war erheblich verändert, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylcholin waren deutlich reduziert. SP-A wurde in niedriger Konzentration gefunden, während SP-B in normaler Konzentration vorlag [13]. Die Oberflächenaktivität des Surfactants war erheblich beeinträchtigt. Dies war jedoch nicht auf eine Hemmung durch Serum oder andere in die Atemwege gelangte Substanzen bedingt, sondern wahrscheinlich auf den reduzierten Gehalt an SP-A und oberflächenaktiven Phospholipiden zurückzuführen. Es bestand eine enge Korrelation zwischen FEV₁ bzw. FVC und der Oberflächenaktivität des in der Lavage gewonnenen Surfactants. An einer heterogenen Gruppe von 13 CF-Patienten im Alter von 7,5 Jahren (Spanne 1–15) fanden Postle et al. überraschenderweise keine Änderung der Zusammensetzung der Phospholipide, jedoch Erniedrigungen von SP-A und SP-D [25].

Die Veränderungen des pulmonalen Surfactant bei cystischer Fibrose sind nicht krankheitsspezifisch. Bei bakteriellen Pneumonien finden sich ähnliche Verhältnisse [12].

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass sich bei cystischer Fibrose mit fortschreitender Krankheitsaktivität sowohl funktionelle als auch biochemische Surfactantabnormalitäten entwickeln und dass diesen möglicherweise eine pathogenetische Bedeutung zukommt, wie die Korrelation zwischen Oberflächenaktivität des gewonnenen Surfactants und Lungenfunktionsdaten nahelegt [13].

Surfactantbehandlung bei cystischer Fibrose

In einer doppelblinden, placebokontrollierten Pilotuntersuchung haben wir die inhalative Applikation eines bovinen Surfactants (Alveofact 120 mg) bei erwachsenen Patienten mit mäßig bis stark ausgeprägter CF untersucht [14]. In dieser Untersuchung fan-

den wir keine Verbesserung der Lungenfunktionsparameter oder der Oxygenation. Dies hing wahrscheinlich damit zusammen, dass eine relativ niedrige Menge an Surfactant appliziert wurde. Darüber hinaus ist zu erwarten, dass bei Verwendung eines Surfactants, der mit den hydrophoben Surfactantproteinen bzw. auch SP-A angereichert ist, ein besserer therapeutischer Erfolg erzielt werden kann. Entscheidend ist jedoch die Applikation ausreichend großer Mengen, was durch die Grenzen der heutigen Verneblertechnologie limitiert wird.

Ausblick

Die Verbesserung der biophysikalischen Eigenschaften eines sekundär veränderten Surfactantsystems bei Patienten mit CF könnte zu einer erheblich besseren Lungenmechanik, Gasaustauschfunktion der Lunge und zu einer besseren pulmonalen Klärung von Bakterien und Schleim beitragen. Ähnlich wie bei schweren Pneumonien ist in klinischen Grenzsituationen eine Surfactant-Applikation in Erwägung zu ziehen [3, 31]. Liposomen oder andere Surfactantbestandteile können als Vehikel für den intrapulmonalen Transport von Medikamenten wie Antibiotika [23, 30], DNase oder DNA zum Gentransfer, verwendet werden. In jedem Fall sind Wechselwirkungen zwischen dem endogenen Surfactantsystem und den applizierten Substanzen zu beachten [2, 30].

4.4.2

Immunmodulatorische Funktionen von Surfactant

Zusätzlich zu den bekannteren und namengebenden Funktionen von Lungensurfactant hat Surfactant eine zentrale Rolle in der pulmonalen Erregerabwehr. Dieses Konzept ist mehr als 25 Jahre alt, hat jedoch erheblichen Auftrieb durch die Entdeckung gefunden, dass die beiden Surfactant-Proteine A und D Mitglieder der Familie der Kollektine sind. Kollektine sind Proteine, die sowohl Lectin-Eigenschaften als auch kollagenartige Eigenschaften haben und zentral an der nichtadaptiven, antikörperunabhängigen Erregerabwehr sowohl im Serum als auch in der Lunge beteiligt sind. Die Struktur und grundlegenden Eigenschaften von SP-A und SP-D sind bereits in Abschn. 4.3 besprochen worden. Die Surfactantlipide haben ebenfalls wichtige immunmodulatorische Funktionen. Ziel dieses Abschnittes ist es, die vor allem auf In-vitro-Untersuchungen beruhenden Immunfunktionen von Surfactant zusammenzufassen und so eine Grundlage für die Beurteilung der Bedeutung dieser Faktoren bei cystischer Fibrose zu geben.

■ Wechselwirkung zwischen Surfactantkomponenten und alveolären Zellen oder deren Produkten

- Phospholipide supprimieren die Proliferation, Immunglobulinproduktion und Zytotoxizität von Lymphozyten,
- Phospholipide hemmen die Zytokinfreisetzung aus Makrophagen,
- SP-D und SP-A modulieren die Phagozytose, Chemotaxis und den oxidativen Burst von Makrophagen,
- Neutralisation exogener Mediatoren.

■ Interaktion von Surfactant und Erregern

- SP-A und SP-D opsonieren verschiedene Bakterien, Viren und Pilze zur besseren Phagozytose,
- Bindung und Abfangen von bakteriellen Toxinen.

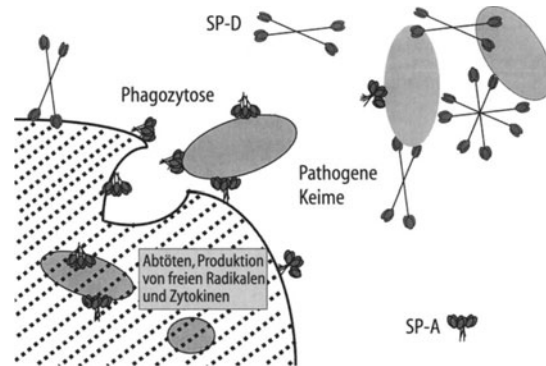


Abb. 4.18. Die hydrophilen Surfactantproteine SP-A und SP-D haben entscheidende Funktionen in der nichtadaptiven Erregerabwehr. Als Kollektine vermögen sie Kohlenhydratstrukturen auf Oberflächen von Mikroorganismen und Zellen zu erkennen, an zellständige Rezeptoren zu binden und die Phagozytose und Elimination der Pathogene zu fördern

Surfactant-Protein A

SP-A-defiziente Knock-out-Mäuse sind vermehrt empfänglich gegenüber pulmonalen Infektionen. Wurden diese rekombinanten Mäuse intratracheal mit mukoiden *Pseudomonas aeruginosa* infiziert, waren bereits 6 und 12 h nach der Infektion wesentlich mehr Bakterien in der Lunge nachweisbar als bei Kontrolltieren. Während die Gesamtzahl an Leukozyten in der Lunge in beiden Versuchsgruppen gleich groß war, fand der Leukozytenzustrom bei den SP-A-defizienten Mäusen viel früher statt. Die Superoxidradikalbildung der Granulozyten war in beiden Gruppen ähnlich, die SP-A-defizienten Mäuse wiesen jedoch erhöhte Nitritwerte auf. Ebenso waren die Konzentrationen an $\text{TNF}\alpha$, IL6 und makrophageninflammatorischem Protein 2 (alles proinflammatorische Zytokine) größer in den SP-A-defizienten Mäusen. Diese Untersuchungen zeigen, dass SP-A eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Infektion der Lunge mit mukoiden *Pseudomonas aeruginosa* spielt [19] (Abb. 4.18).

Wechselwirkung von SP-A mit mikrobiellen Liganden

SP-A interagiert mit einer Vielzahl von mikrobiellen Organismen. Diese umfassen grampositive Bakterien (*Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, A-Streptokokken, *Mycobacterium tuberculosis*), gramnegative Organismen (*Escherichia coli*, *Salmonella*), Pilze (*Cryptococcus neoformans*), *Pneumocystis carinii* und verschiedene Viren (Herpes-simplex-Virus I, Influenzavirus). SP-A fördert die Aufnahme von *Staphylococcus aureus* durch Alveolarmakrophagen sowohl durch Op-

sonisation der Bakterien als auch durch direkte Aktivierung der Makrophagen [32]. *Pseudomonas aeruginosa* wird unabhängig von der Wachstumsphase durch SP-A ebenfalls vermehrt phagozytiert. Allerdings fanden andere Untersuchungen keinen Effekt von SP-A auf die Aufnahme von *Pseudomonas aeruginosa* [32].

Einfluss von SP-A auf die Produktion reaktiver Verbindungen durch Makrophagen

SP-A stimuliert die Bildung von Superoxid durch Alveolarmakrophagen, nicht jedoch durch periphere Monozyten. Allerdings gibt es gegensätzliche Untersuchungen, die zeigen, dass eine stimulierte Superoxidproduktion durch Alveolarmakrophagen auch durch SP-A gehemmt werden kann [32].

Einfluss von SP-A auf die Chemotaxis

Reines SP-A steigert die Migrationsrate von Alveolar- und Peritonealmakrophagen [32].

Einfluss von SP-A auf die Sekretion von Zytokinen und Immunglobulinen

SP-A stimuliert die Produktion von $\text{TNF}\alpha$, IL1- α , IL1- β und IL6 durch periphere mononukleäre Zellen, während die $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung aus Peritonealmakrophagen, die mit Lipopolysaccharid S (LPS) stimuliert werden, gehemmt wird. Die PGE_2 -Produktion aus humanen, mitogenstimulierten Lymphozyten wird durch SP-A gehemmt. Die Bildung der Immunglobuline IgA, IgG und IgM durch B-Zellen, die aus der Milz isoliert wurden, wird durch SP-A stimuliert.

SP-A und Lymphozyten-Proliferation

Die mitogen induzierte Lymphozytenproliferation wird von SP-A stimuliert, ein Effekt, der durch Dipal-

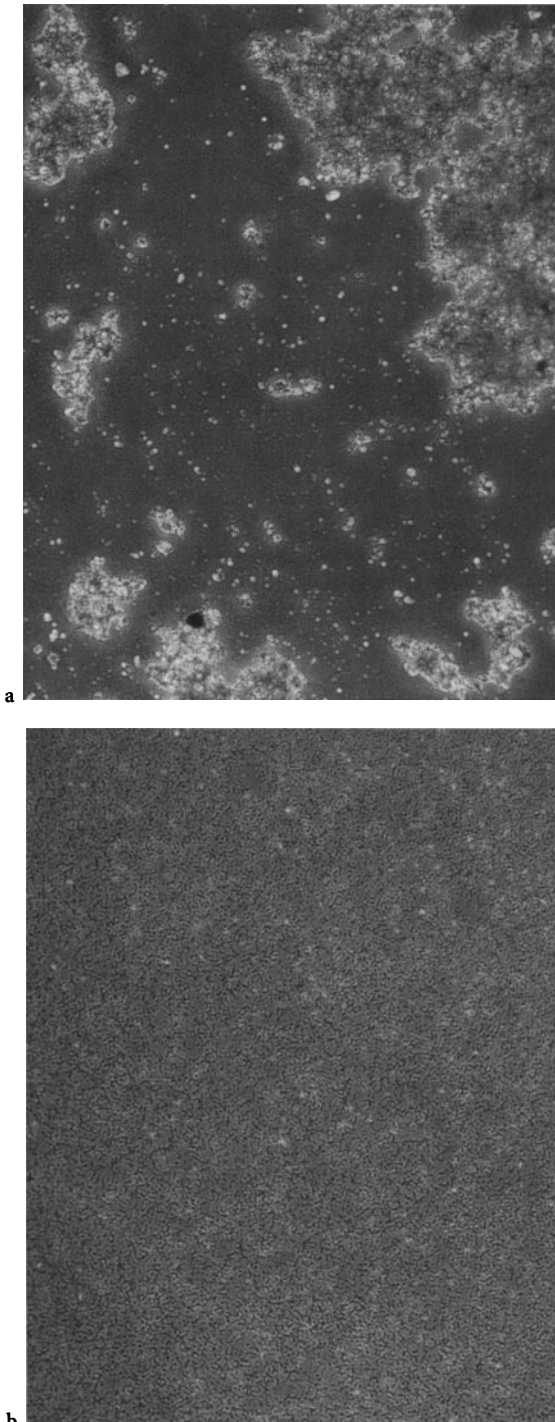


Abb. 4.19. a Aggregation von *Pseudomonas aeruginosa* durch SP-D (5 µg/ml), b reversibel durch Zugabe von EDTA zur Chelatierung des Kalziums oder durch Maltose

mitoyl-Phosphatylcholin und andere Surfactantlipide umgekehrt werden kann. Ebenso unterdrückt SP-A die CD3-stimulierte T-Zellproliferation.

SP-A bei CF

Wie bereits oben beschrieben finden sich in der Bronchiallavage bei Säuglingen und Kleinkindern mit klinisch stabiler CF normale Werte an SP-A, während sie bei akuter inflammatorischer Reaktion ansteigen [17]. Junge Erwachsene mit ausgeprägter endobronchialer Inflammation wiesen hingegen durchweg erniedrigte Werte auf [13, 25]. Diese Daten sprechen für sekundäre Veränderungen von SP-A bei CF.

Surfactantprotein D

Surfactantprotein D scheint für die Oberflächenaktivität von Surfactant keine Rolle zu spielen und ist ebenfalls ein Mitglied der Familie der Kollektine. Die Struktur dieses Proteins wurde in Abschn. 4.3 beschrieben und ist in Abb. 4.18 dargestellt.

Interaktion von SP-D mit mikrobiellen Liganden

Ähnlich wie SP-A bindet auch SP-D an Mikroorganismen, indem es mit deren Kohlenhydrat-Oberflächenbestandteilen interagiert. Allerdings bestehen aufgrund der unterschiedlichen Spezifität beider Lektine auch unterschiedliche Bindungsprofile für verschiedene Mikroorganismen. SP-D bindet gramnegative Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*), Pilz (*Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*), *Pneumocystis carinii* sowie Viren (Influenza-Virus A) [32]. SP-D bindet jedoch nicht grampositive Bakterien wie *Staph. aureus*. Wie hier exemplarisch für *Pseudomonas aeruginosa* dargestellt, bindet und aggregiert SP-D Bakterien extrem stark (Abb. 4.19). Diese Reaktion ist reversibel nach Zugabe von EDTA oder eines Überschusses an kompetitiven Kohlenhydraten, wie Maltose. Die vermehrte Aggregation der Bakterien könnte ihre Elimination mittels mukoziliärer oder Hustenclearance fördern.

Einfluss von SP-D auf die Produktion von freien Radikalen

Während SP-D die Produktion von freien Radikalen in Alveolarmakrophagen fördern kann, findet sich kein Effekt bei neutrophilen Granulozyten.

Einfluss von SP-D auf die Chemotaxis

SP-D ist ein extrem potenter Chemoattraktor für Blutneutrophile und Blutmonozyten. Die Konzentration für maximale Effekte beträgt nur 10^{-11} mol/l.

Surfactant-Protein-D in der Lavage von Patienten mit cystischer Fibrose

Bisher liegen noch kaum publizierte Daten zur SP-D-Konzentration bei CF vor. Während wir in vorläufigen Untersuchungen keine Unterschiede zwischen normalen Kontrollen und Kindern mit milder bis mäßiggradiger Lungenerkrankung fanden, berichten Postle et al. erheblich erniedrigte Spiegel an SP-D bei Patienten mit CF [25].

Surfactant-Lipide

Viele In-vitro-Studien haben den Einfluss komplexer Surfactant-Präparationen und ihrer Lipidkomponenten auf die Immunzellfunktion untersucht. Die meisten dieser Studien sind bereits durchgeführt worden, bevor Informationen zu ihrem Gehalt an spezifischen Surfactantproteinen bekannt waren. Einige z. T. widersprüchliche Befunde lassen sich so auf unterschiedliche methodische Ansätze bei der Surfactant-Isolation zurückführen.

Phagozytose und Abtöten von Mikroorganismen

Die aus früheren Untersuchungen bekannte Steigerung der Phagozytose und des Abtötens von Mikroorganismen kann teilweise auf den Gehalt an SP-A zurückgeführt werden, da diese Effekte durch polyclonale Anti-SP-A-Antikörper reduziert wurden. Die Lipidbestandteile, die hauptsächlich für die Steigerung der Phagozytose und das Abtöten verantwortlich sind, sind Lysophospholipide und freie Fettsäuren, die ebenfalls in Surfactant vorkommen [32].

Produktion von freien Sauerstoffradikalen

Stimulierte Alveolarmakrophagen und Monozyten lassen sich in ihrer Produktion an reaktiven Sauerstoffradikalen durch Surfactant und Surfactantlipide supprimieren. Hier kommt es auf den Gehalt der einzelnen Lipidspezies an. Während Dipalmitoyl-Phosphatidylglycerol hemmend wirkt, stimulieren Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin und Dioleoyl-Phosphatidylcholin die Radikalbildung [32].

Proliferation von Lymphozyten

Surfactantphospholipide unterdrücken die Reaktivität von Lymphozyten gegenüber Mitogenen. Darüber hinaus werden verschiedene Funktionen zytotoxischer T-Zellen und von antikörperbildenden B-Zellen und natürlichen Killerzellen gehemmt. Die Wirkung von Phosphatidylcholin ist am größten, gefolgt von Phosphatidylglycerol und Phosphatidylinositol. Diese Phospholipide machen etwa 80–90% der Surfactant-Phospholipide aus. Hingegen sind solche Phospholipide, die vor allem in Zellmembranen und weniger im Surfactant vorkommen (Phosphatidylethanolamin, Sphingomyelin, Cholesterin), eher pro-

liferationsfördernd. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass eine Änderung der Zusammensetzung der Lipide im Surfactant mit einer veränderten Unterdrückung der Lymphozytenproliferation einhergeht [32]. Während also die Surfactantphospholipide die Immunzellfunktionen in der Lunge supprimieren, werden dieselben Funktionen durch die Surfactantproteine gesteigert.

Surfactantlipide bei cystischer Fibrose

Die Gesamtmenge an Phospholipid in der Lavage von Patienten mit CF und Kontrollen ist nicht unterschiedlich [13, 17]. Surfactant bei Patienten mit CF und mäßiger bis schwerer Krankheitsaktivität ist jedoch dadurch gekennzeichnet, dass der relative Gehalt an Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol erheblich reduziert ist [9, 13]. Diese Befunde stehen im Einklang mit der Hypothese, dass eine derartig veränderte Lipidzusammensetzung von Surfactant eher zu einer reduzierten Hemmung der Lymphozytenproliferation bzw. der Aktivität von B-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen führt. Diese Überlegungen beruhen jedoch auf den oben genannten In-vitro-Ergebnissen und müssen in Ex-vivo-Untersuchungen belegt werden. In einer methodisch sehr aufwendigen, allerdings recht kleinen und inhomogenen Gruppe von CF-Patienten wurden kürzlich, überraschenderweise und trotz der Anwesenheit von vielen Leukozyten, keine Unterschiede in der Phospholipidzusammensetzung des Surfactants im Vergleich zu Kontrollen gefunden [25].

4.4.3 Zusammenfassung

Sekundäre Veränderungen von Komponenten des pulmonalen Surfactantsystems sind auf mannigfaltige Weise in die Pathogenese der Lungenerkrankung bei cystischer Fibrose involviert. So kann die mit einer veränderten Oberflächenaktivität einhergehende, eingeschränkte biophysikalische Kapazität von Surfactant zum Entstehen und zur Aufrechterhaltung von Atelektasen, Dystelektasen, Ventilation-Perfusion-Inhomogenität und konsekutiver Hypoxämie beitragen. Die involvierten Mechanismen betreffen insbesondere die Stabilität und das Offenhalten der kleinen Atemwege während der Respiration. Änderungen der immunmodulatorischen Funktionen von Surfactant können auch bei der Krankheitsentstehung bei CF involviert sein. Die Surfactantproteine SP-A und SP-D sind zentrale Bestandteile der nichtadaptiven Immunabwehr der Lunge. Sie regulieren die Phagozytose, die Chemotaxis, die Produktion re-

aktiver Sauerstoffradikale und die Zytokinfreisetzung aus Immunzellen. Der Gehalt an SP-A ist insbesondere im späteren Krankheitsstadium bei cystischer Fibrose deutlich erniedrigt. Die ebenfalls sekundär veränderten Muster der Surfactantlipide können zu einer veränderten Lymphozytenproliferation beitragen und so den Immunstatus der Lunge beeinflussen. Alle Komponenten des Surfactantsystems sind nicht nur bei therapeutischen Interventionen zur Substitution oder Verstärkung zu berücksichtigen, sondern auch bei gentherapeutischen oder antimikrobiellen Therapieansätzen, die Surfactantbestandteile (z. B. Liposomen) als Träger benutzen.

4.5

Proteasen – Antiproteasen

A. SCHUSTER, M. GRIESE, C. VOGELMEIER

Wie an anderer Stelle ausgeführt, ist die Lungenerkrankung bei CF pathophysiologisch charakterisiert durch eine von neutrophilen Granulozyten dominierte endobronchiale chronische Entzündungsreaktion. Bei der Zellaktivierung, bei der Phagozytose, ob erfolgreich oder frustan, und auch beim Zelltod werden aus den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten proteolytische Enzyme, sog. Proteasen, freigesetzt. Hierbei handelt es sich um die folgenden drei Proteasen: die *Neutrophilen-Elastase*, *Cathepsin G* und *Proteinase-3*. Biochemisch sind dies Serin-Proteasen, alle mit einem Molekulargewicht um 24000–30000. Elastase und Proteinase-3 weisen eine weitgehende Aminosäure-Homologie im Aufbau ihrer aktiven Zentren auf, und die beiden Proteasen liegen in etwa gleich großen Mengen in den azurophilen Granula der Neutrophilen vor.

4.5.1

Proteasen in den CF-Atemwegen

Alle drei Neutrophilen-Proteasen sind in Sputum und Bronchiallavageflüssigkeit von CF-Patienten in exzessiven Konzentrationen mit hoher freier katalytischer Aktivität nachgewiesen worden (Tabelle 4.4): In einer Studie fanden sich im Sputum Konzentrationen an katalytisch aktiver Elastase von über 90 µg/ml und Cathepsin G von ca. 5 µg/ml [7]. Inzwischen wurde auch Proteinase-3 in ähnlich hohen Konzentrationen wie Elastase im Sputum von CF-Patienten nachgewiesen [31]. Vor allem die Elastase ist in einer ganzen Reihe von Studien Gegenstand der Untersu-

Tabelle 4.4. Konzentrationen an Neutrophilen-Proteasen im Sputum von CF-Patienten

| Neutrophilen-Protease | Konzentration (µg/ml) |
|-----------------------|-----------------------|
| Elastase* | 96,1 ± 91,7 |
| Cathepsin G* | 5,9 ± 6,0 |
| Proteinase-3** | 146,7 ± 20,5 |

(Mittelwerte ± Standardabweichung, * nach [7] und ** [31]). Der größte Teil dieser Proteasen ist katalytisch aktiv. Beim Gesunden dagegen gibt es keine proteolytische Aktivität in den Atemwegen.

chung gewesen, und ihr wird eine wichtige Rolle im Rahmen der Pathophysiologie der fortschreitenden Lungenerkrankung zugesprochen. Hohe Elastase-Aktivitäten in den CF-Atemwegen sind nicht nur in fortgeschrittenem Krankheitsstadium zu finden: Bei Untersuchungen der Bronchiallavageflüssigkeit von relativ symptomfreien Patienten ab 12 Jahren, die kein Sputum produzierten, wurde – im Gegensatz zu den gesunden Kontrollprobanden – aktive Elastase in hohen Konzentrationen nachgewiesen [12]. Dies war auch bei sehr jungen Kindern mit minimaler pulmonaler Symptomatik der Fall [2, 4]. Neugeborenen-Screeningprogramme eröffneten zudem die Möglichkeit, die bronchopulmonale Entzündungsreaktion bereits bei sehr jungen, noch klinisch inapparenten Säuglingen mittels Bronchiallavage zu untersuchen. Bei zahlreichen dieser teilweise nur mehrere Wochen alten Säuglinge fanden sich von Granulozyten dominierte Entzündungsreaktionen mit erhöhten Konzentrationen an aktiver Elastase in der Lavageflüssigkeit. Überraschenderweise war dies auch bei Säuglingen der Fall, bei denen kein Anhalt für jedwede bronchopulmonale Infektion bestand, hier allerdings quantitativ geringer als bei den Säuglingen, bei denen auch bakterielle Mikroorganismen nachgewiesen werden konnten [1, 11]. Diese Befunde gaben Anlass zu der Hypothese, dass die durch aktive Proteasen gekennzeichnete entzündliche Reaktion vielleicht sogar der Infektion vorausgeht und nicht erst durch diese induziert wird, dass vielleicht sogar die defekte CFTR-Funktion selbst zur Entwicklung der chronischen bronchopulmonalen Entzündung beiträgt [13]. Die vorliegenden Befunde zusammenfassend muss jedenfalls auch bei klinisch nicht weiter beeinträchtigender Symptomatik bei den CF-Patienten von einer sich äußerst frühzeitig manifestierenden, von neutrophilen Granulozyten dominierten, mit Freisetzung von Proteasen einhergehenden, chronisch-entzündlichen Reaktion in den Atemwegen ausgegangen werden.

Auch *Pseudomonas aeruginosa* kann eine Elastase freisetzen, die biochemisch als Metalloprotease ganz andere Eigenschaften hat als die Neutrophilen-Elas-

tase. Wahrscheinlich aufgrund einer Hemmung der Pseudomonas-Elastase durch spezifische Antikörper kommt dieser Protease in vivo keine pathophysiologische Relevanz zu [26]. Im Folgenden soll auf die Pseudomonas-Elastase daher nicht mehr eingegangen werden, und der Begriff Elastase benennt in diesem Kapitel die Neutrophilen-Elastase. Auch andere Zellsysteme in den Atemwegen, z. B. die Makrophagen, können lokal Proteasen freisetzen, deren Wirkungen jedoch noch nicht sehr weit erforscht sind. Dagegen hat man inzwischen eine recht klare Vorstellung über die pathophysiologischen Auswirkungen der hohen Aktivitäten an Neutrophilen-Proteasen in den CF-Atemwegen – insbesondere der Elastase, der die größte pathophysiologische Relevanz zugesprochen wird.

4.5.2

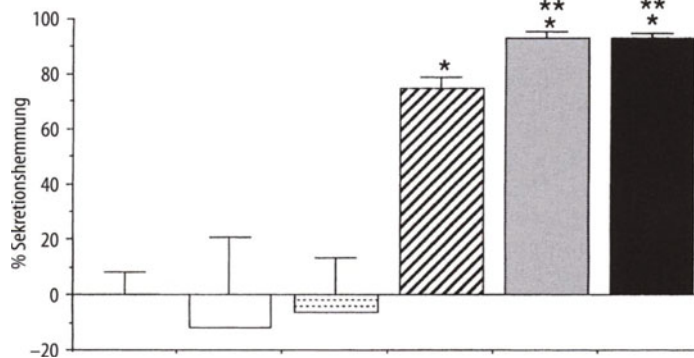
Wirkungen der Neutrophilen-Proteasen

Die Freisetzung von Proteasen aus Granulozyten dient eigentlich zum Wohle des Organismus der Infektionsabwehr. Eine exzessive Freisetzung allerdings, wie es in den CF-Atemwegen der Fall ist, wird mehr Schaden als Nutzen mit sich bringen [3]. Die Bedeutung, die die exzessive Freisetzung von Proteasen im Rahmen der bronchopulmonalen Erkrankung haben kann, ist bislang für die Elastase am besten untersucht worden, und nach den Befunden ist von einer entscheidenden Rolle der Elastase im Rahmen des fortschreitenden pathophysiologischen Geschehens bei der CF auszugehen. Cathepsin G spielt im Vergleich dazu wahrscheinlich nicht so eine große Rolle. Über Proteinase-3 liegen bislang noch nicht sehr viele Daten vor; die wenigen vorhandenen sprechen jedoch dafür, dass auch Proteinase-3 eine wesentliche pathophysiologische Bedeutung hat.

Die Neutrophilen-Proteasen, insbesondere Elastase und Proteinase-3, sind in der Lage, extrazelluläre Strukturproteine des Lungengewebes wie Elastin, Kollagen, Fibronectin oder Laminin abzubauen. Im Tierversuch ist beispielsweise bei Hamstern gezeigt worden, dass die Instillation von Neutrophilen-Proteasen in die Lungen zur Emphysementstehung führt. Auch die Entstehung von Bronchiektasen wird auf die hohe lokale proteolytische Aktivität zurückgeführt. Cathepsin G vermag die elastolytische Wirkung von Elastase noch zu steigern. Biochemische Daten (Nachweis von Desmosin als Elastase-Abbauprodukt im Urin) und histologische Autopsie-Befunde belegen, dass der pathophysiologische Prozess in den Lungen der CF-Patienten durch eine chronische *proteolytische Zerstörung des Lungengerüsts* gekennzeichnet ist. In einer Studie wurde sogar eine signifikante Korrelation zwischen Desmosin-Aus-

scheidung und Schweregrad der Lungenerkrankung (gemäß Score für Thoraxröntgenaufnahme) festgestellt [5]. Andere klinische Untersuchungen ergaben signifikante Korrelationen zwischen den Konzentrationen an katalytisch aktiver Elastase in Sputum bzw. Bronchiallavageflüssigkeit und der Schwere der Lungenerkrankung der CF-Patienten: Je höher die Elastase-Aktivität, desto niedriger die Einsekundenkapazität, desto niedriger der Röntgen-Brasfield-Score und desto niedriger der Shwachman-Score [16].

Jedoch auch in anderer Hinsicht können die Neutrophilen-Proteasen zur charakteristischen Pathophysiologie in den CF-Atemwegen beitragen: Es ist in vitro sowohl im Zellkultursystem (seröse Trachealdrüsenzellen) als auch in verschiedenen Gewebeexplantaten gezeigt worden, dass die Proteasen eine ausgesprochen starke sekretionsfördernde Wirkung für die Sekret produzierenden und freisetzenden Zellen, insbesondere auch für die wichtigen submukösen Drüsenzellen, des Atemwegstrakts haben, weit aus stärker als alle bislang bekannten Sekretagoga [21, 23]. Die stärkste *sekretionsstimulierende Wirkung* hat die Elastase, gefolgt von Proteinase-3 und Cathepsin G. In einer In-vitro-Untersuchung konnte durch Zugabe von CF-Sputum zu kultivierten Trachealdrüsenzellen bereits bei einer Sputumverdünnung von 1:30000 eine signifikante Sekretionssteigerung gemessen werden. Bei einer Sputumverdünnung von 1:15 fand sich eine Sekretionssteigerung um ca. 2500% über Basalsekretion; zum Vergleich: „klassische“ Sekretagoga wie Isoproterenol bewirken im gleichen In-vitro-System Sekretionssteigerungen um ca. 100%. Die durch das CF-Sputum in der genannten Studie in vitro induzierbare Sekretion ließ sich durch Zusatz von Inhibitoren der Neutrophilen-Proteasen vollständig hemmen, so dass darauf geschlossen werden konnte, dass die Proteasen die hauptverantwortlichen Sekretagoga in den CF-Atemwegen sind, wobei Cathepsin G quantitativ allerdings nur eine untergeordnete Rolle zukommt [22] (Abb. 4.20). Kürzlich wurden Rezeptoren charakterisiert, die wahrscheinlich diese Effekte vermitteln. Es handelt sich um sog. proteasenaktivierte Rezeptoren (PAR) [28]. Zusätzlich zur direkten Stimulation der Sekretion ist für die Elastase gezeigt worden, dass sie die mRNA-Expression für Muzin induziert [30]. Da die Hypersekretion ein pathophysiologisch eminent wichtiges Charakteristikum der bronchopulmonalen Erkrankung bei CF und die die Atemwege verlegende Akkumulation von Atemwegssekreten als eine der wichtigsten Todesursachen anzusehen ist [24], kommt der Präsenz der Proteasen, vornehmlich der Elastase, aber wohl auch der Proteinase-3 und zu einem geringeren Grad auch dem Cathepsin G, in den Atemwegen also auch unabhängig von der proteoly-



* Die Sekretionsrate ist signifikant verschieden von der durch 1:30 verdünntes CF-Sputum allein induzierten ($p < 0,0002$).
 ** Die Sekretionsrate ist signifikant verschieden von der Sputum-induzierten, in Gegenwart von ICI 200,355 (10^{-5} M) gemessenen Sekretion ($p < 0,01$).

Inhibitor-Substanzen:

| | | | | | | |
|----------------------------|---|---|---|---|---|---|
| Phosphoramidon 10^{-4} M | - | + | - | - | - | + |
| Chymostatin 50 µg/ml | - | - | + | - | + | + |
| ICI 200,355 10^{-5} M | - | - | - | + | + | + |

Abb. 4.20. Wirkung dreier verschiedener Antiproteasen auf die durch CF-Sputum in vitro induzierte Sekretion. Die Substanzen ICI 200,355 (Inhibitor von Neutrophilen-Elastase und Proteinase-3) plus Chymostatin (Inhibitor von Cathepsin G) führen zur nahezu vollständigen Hemmung der Sputum-induzierten Sekretion. Phosphoramidon (Inhibitor der Pseudomonas-Elastase) dagegen hat keinen Effekt. Die Befunde zeigen, dass Neutrophilen-Elastase und Proteinase-3 die wichtigsten Sekretagoga im Sputum von CF-Patienten sind und dass auch Cathepsin G eine gewisse sekretionsfördernde Wirkung hat. (Nach [22])

tischen Zerstörung des Lungengerüsts eine Bedeutung im fortschreitenden Krankheitsverlauf zu (Abb. 4.21). Zudem können die Proteasen toxische Wirkungen auf das Atemwegsepithel ausüben und die Schlagfrequenz der Zilien beeinträchtigen.

Auch muss von einer *Beeinträchtigung der lokalen immunologischen Abwehrmechanismen* durch das Vorliegen aktiver Proteasen in den CF-Atemwegen ausgegangen werden. Eine unbeeinträchtigte Phago-

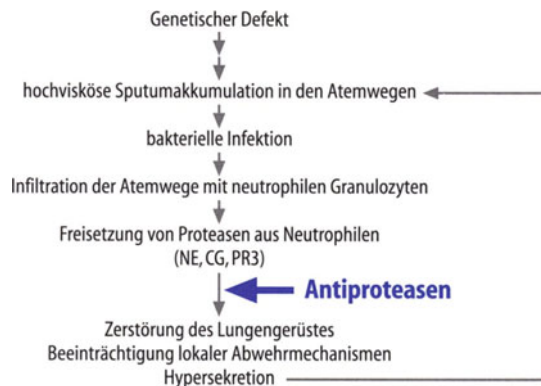


Abb. 4.21. Denkmodell zur zentralen Rolle der Proteasen in der Pathophysiologie der bronchopulmonalen Erkrankung bei CF

zytose von *Pseudomonas aeruginosa* durch neutrophile Granulozyten erfolgt normalerweise nach komplementvermittelter Opsonisierung der Bakterien. Der Komplementrezeptor CR1 auf der Neutrophilen-Oberfläche interagiert dabei mit dem Komplementfragment C3b, der Komplementrezeptor CR3 mit dem Komplementfragment C3bi. Es konnte in vitro gezeigt werden, dass die Elastase einerseits den C3b-Rezeptor (CR1) von der Oberfläche neutrophiler Granulozyten und andererseits das an opsonisierte Pseudomonaden gebundene C3bi proteolytisch abzuspalten vermag. Somit entsteht in zweifacher Hinsicht ein Opsonin-Rezeptor-Mismatch, das in den CF-Atemwegen die Komplement-vermittelten lokalen Pseudomonasabwehrmechanismen durch Neutrophile beeinträchtigen kann. Andere In-vitro-Befunde zeigen darüber hinaus, dass die Neutrophilen-Proteasen Immunglobuline proteolytisch angreifen können, indem z. B. die Elastase den IgG-Fc-Rezeptor III abspaltet und das Cathepsin G menschliches IgM zerstören kann. Des Weiteren können sowohl Elastase als auch Cathepsin G lymphozytäre Oberflächenantigene (CD2, CD4, CD8) angreifen, und die Elastase kann die zytotoxische Wirkung von CD4-positiven Lymphozyten beeinträchtigen. Darüber hinaus werden die lokalen Abwehrmoleküle der pulmonalen, nichtadaptativen Immunabwehr SP-A und SP-D (s. auch Abschn. 4.4) ebenfalls abgebaut [9]. Somit können also die Proteasen durch proteolytische Degradation verschiedenster Komponenten der lokalen Immunabwehr eine funktionelle Beeinträchtigung von essentiellen Abwehrmechanismen in den Atemwegen von CF-Patienten bewirken, was natürlich insbesondere in Bezug auf die Abwehr von Pathogenen wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* pathophysiologische Relevanz haben kann [6, 25]. Unterstützt wird diese Hypothese durch In-vitro-Untersuchungen, bei denen zu CF-Lavageflüs-

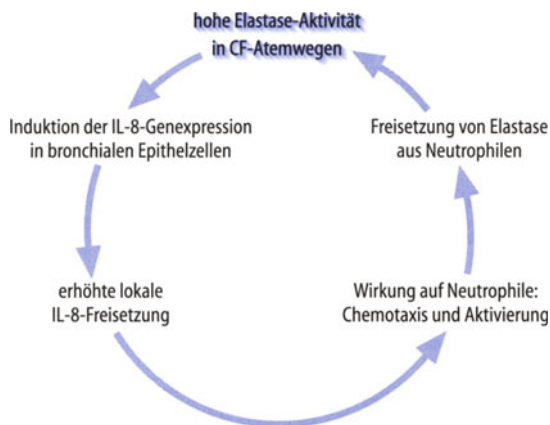


Abb. 4.22. Circulus vitiosus

sigkeit mit hoher Elastase-Aktivität ein antagonisierender Überschuss an α_1 -Antitrypsin hinzugefügt wurde, der dann zu einer signifikant verbesserten Abtötung von *Pseudomonas aeruginosa* durch neutrophile Granulozyten führte [14].

In-vitro-Befunde zeigen, dass die Elastase in einer humanen bronchialen Epithelzelllinie die Genexpression für Interleukin-8 (IL-8) induziert. IL-8 ist der wichtigste chemotaktische Mediator für Neutrophile in den CF-Atemwegen [19], und wie erwartet fand sich nach Inkubation der Bronchialepithelzellen mit Elastase nicht nur eine Akkumulation von IL-8-mRNA-Transkripten, sondern auch eine gesteigerte Neutrophilen-chemotaktische Aktivität als Ausdruck einer IL-8-Wirkung im Medium [15]. Experimente mit verschiedenen Inhibitoren lassen darauf schließen, dass die Elastase sogar der hauptverantwortliche Mediator für die Induktion der IL-8-Produktion in den CF-Atemwegen ist. Somit unterhält die lokale Präsenz von Elastase einen *Circulus vitiosus* (Abb. 4.22), der die *chronisch-entzündliche* Reaktion in den Atemwegen der CF-Patienten aufrechterhält.

Neben den drei aus den Neutrophilen stammenden Serinproteasen könnten auch Metalloproteinasen (z. B. Neutrophilen-Kollagenasen), die im CF-Sputum nachweisbar sind, in den Abbau extrazellulärer Lungenmatrix involviert sein [17]. Ihre pathophysiologische Bedeutung erscheint jedoch nicht so weitreichend wie die der Serinproteasen.

4.5.3

Antiproteasen in den Atemwegen

Die Antiproteasen sind die funktionellen Gegenspieler der Proteasen. Beim Gesunden finden sich – außer im Verlauf von Atemwegsinfektionen – in den Atem-

wegen keine Aktivitäten freier Proteasen, da diese durch Antiproteasen inhibiert werden. In den Atemwegen Gesunder sind vor allem die Antiproteasen *SLPI* („secretory leukoprotease inhibitor“; in der Literatur mancherorts auch bezeichnet als Antileukoprotease, ALP, oder Mukus-Proteinase-Inhibitor, MPI, oder „bronchial mucus inhibitor“, BMI), sowie $\alpha 1$ AT (alpha1-Antitrypsin = alpha1-Proteinase-Inhibitor, $\alpha 1$ PI) und *Elafin* von Bedeutung. Das alpha2-Makroglobulin spielt dagegen möglicherweise keine große Rolle, da es aufgrund seines hohen Molekulargewichts normalerweise die Blutbahn nicht verlässt [27]; allerdings gibt es auch eine geringe lokale Produktion im Atemwegstrakt durch Alveolarmakrophagen.

SLPI, ein Molekül mit einem Molekulargewicht von 12000, wird vor allem von Zellen der Bronchialschleimhaut, von den serösen Zellen der submukösen Tracheal- und Bronchialdrüsen und von den nicht ziliert tragenden Zellen des Bronchien- und Bronchiolen-Epithels, produziert und sezerniert [29]. Darüber hinaus können die phagozytierenden Zellen wie Makrophagen und auch polymorphkernige Granulozyten selbst ebenfalls *SLPI* synthetisieren und binden [8]. *SLPI* wird als die wichtigste Antiprotease im Tracheobronchialbaum angesehen und ist in den unteren Atemwegen wohl von geringerer Bedeutung. *SLPI* inhibiert im molekularen Verhältnis 1:1 die Elastase und das Cathepsin G, nicht aber die Proteinase-3. Es kann freie und elastingebundene Elastase hemmen; die Bindung ist reversibel. Enzymkinetische Untersuchungen ergeben zwar, dass *SLPI* ein etwas weniger potenter Elastase-Inhibitor ist als $\alpha 1$ AT, die Möglichkeit der Inhibition bereits an Elastinfasern gebundener Elastase ist jedoch ein Vorteil gegenüber $\alpha 1$ AT. Zusätzlich zur Fähigkeit der Proteasen-Hemmung hat *SLPI* eine gute antibiotische Aktivität gegen eine ganze Reihe humanpathogener Erreger (u. a. *Pseudomonas aeruginosa*). Durch die Methionin-Residuen im aktiven Zentrum der *SLPI*-Moleküle werden diese oxidativ angreif- und inaktivierbar. In-vitro-Untersuchungen zeigten, dass eine Inkubation von *SLPI* mit Oxidanzien plus Elastase zu einer proteolytischen Spaltung des Enzyms führt [29]. Die rekombinante Herstellung von *SLPI*, auch von oxidationsresistenten Varianten, ist heutzutage möglich [10].

$\alpha 1$ AT, der am längsten bekannte menschliche Elastase-Inhibitor, ist ein größeres, glykosyliertes, komplex gefaltetes Eiweißmolekül (MG 52000–54000). $\alpha 1$ AT wird hauptsächlich in der Leber produziert und gelangt über den Blutstrom in die Lungen; es kann jedoch auch dort in geringem Ausmaß lokal synthetisiert werden. $\alpha 1$ AT entfaltet seine Schutzwirkung gegen die Proteasen wohl vor allem in den unteren Atemwegen. Es bindet nur freie, nicht an Elastin gebundene Elastase, im Gegensatz zu *SLPI* aber irre-

versibel. Neben Elastase hemmt α 1AT auch Cathepsin G und Proteinase-3, jeweils im molekularen Verhältnis 1:1. Auch α 1AT ist wegen eines Methioninrests im aktiven Zentrum oxidativ angreifbar. α 1AT kann heutzutage rekombinant produziert werden, allerdings nur nicht glykosyliert und daher mit deutlich kürzerer biologischer Halbwertszeit als das native Molekül. Praktisch interessanter ist daher wohl die Gewinnung von α 1AT aus der Milch transgener Schafe.

Elafin, ein kleineres, sehr stabiles Molekül von MG 6000–7000, kann von epithelialen Zellen – der Atemwege und der Haut – und von mononukleären Zellen im Blut und in der Lavage produziert werden [8, 20]. Elafin ist ein potenter elastasespezifischer Inhibitor, der natürlicherweise im Bronchialsekret vorkommt und vor allem in akute-Phase-Reaktionen von Bedeutung zu sein scheint. Neben Elastase hemmt Elafin auch Proteinase-3. Daneben hat Elafin eine gewisse antibiotische Aktivität gegen humanpathogene Mikroorganismen. Ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Elafin ist entwickelt worden, jedoch mit ausgesprochen geringer, in größerem Umfang nicht nutzbarer Ausbeute.

Über einen vierten Inhibitor der Neutrophilen-Proteasen, den sog. „Monocyte/neutrophil elastase inhibitor“, weiß man noch nicht so viel wie über die vorab beschriebenen. Es handelt sich um ein komplexes 42000-MG-Molekül, das in Zellen gefunden wird, die an Orten einer Entzündung akkumulieren (Neutrophile, Monozyten, Makrophagen); man nimmt an, dass der Inhibitor an solchen Entzündungsherden eine regulierende Funktion auf die Proteasen Elastase, Cathepsin G und Proteinase-3 ausübt. In-vitro-Untersuchungen mit CF-Atemwegssekret und rekombinantem „monocyte/neutrophil elastase inhibitor“ waren dahingehend aufschlussreich [18].

4.5.4

Das Proteasen-Antiproteasen-Ungleichgewicht bei CF

Bei CF-Patienten besteht keineswegs eine unzureichende Produktion von Antiproteasen, im Gegenteil, es sind hohe Konzentrationen an Antiproteasen in CF-Atemwegen vorhanden. Diese sind jedoch funktionell nicht mehr aktiv. Es herrscht in den CF-Atemwegen nämlich ein Ungleichgewicht zugunsten der im Rahmen der lokalen, von Neutrophilen dominierten chronisch-entzündlichen Reaktion im Übermaß freigesetzten Proteasen, so dass der lokale „Antiproteasen-Schutzschild“ überwältigt wird: Bei Analyse der Antiproteasen SLPI und α 1AT in CF-Atemwegssekreten finden sich diese nicht in funktionell aktiver Form, sondern entweder komplexgebunden mit einer Protease oder aber inaktiviert. Die lokale Inak-

tivierung der Antiproteasen erfolgt vor allem proteolytisch, da die Proteasen neben ihren oben beschriebenen Wirkungen auch SLPI und α 1AT anzugreifen und zu zerstören vermögen; es ist aber auch eine oxidative Inaktivierung (s. Abschn. 4.6) denkbar, da sowohl SLPI als auch α 1AT durch das Vorhandensein von Methionin im aktiven Zentrum oxidativ angreifbar sind. So kann es zu den hohen lokalen Protease-Aktivitäten in den CF-Atemwegen kommen, die pathophysiologisch die beschriebenen Auswirkungen zur Folge haben können [3, 13].

■ Mögliche pathophysiologische Auswirkungen von katalytisch aktiven freien Neutrophilen-Proteasen in CF-Atemwegen

- Proteolytische Zerstörung des Lungengerüsts,
- Hypersekretion in den Atemwegen,
- Beeinträchtigung lokaler immunologischer Abwehrmechanismen,
- toxische Wirkung auf Atemwegsepithel und Zilien,
- proteolytische Degradation von Antiproteasen,
- Induktion von IL-8,
- Unterhaltung des chronisch-entzündlichen Circulus vitiosus, der die fortschreitende strukturelle und funktionelle Lungenschädigung bewirkt.

4.5.5

Zusammenfassung

In den CF-Atemwegen finden sich hohe Konzentrationen an katalytisch aktiven Neutrophilen-Proteasen, nämlich Elastase, Cathepsin G und Proteinase-3. Dies ist nicht nur in fortgeschrittenen Krankheitsstadien der Fall, sondern es sind auch hohe Elastase-Aktivitäten bei Patienten mit guter Lungenfunktion und mildem Krankheitsverlauf sowie sogar bereits bei klinisch symptomfreien jungen Säuglingen nachgewiesen worden. Die lokalen Schutzschilde gegen die Proteasen, die Antiproteasen, sind im Rahmen der chronischen lokalen Entzündungsreaktion funktionell nicht aktiv. Den freien Proteasen, vor allem der Neutrophilen-Elastase wird eine pathophysiologische Relevanz bei der chronisch-progredienten Atemwegserkrankung bei CF zugesprochen. Vor diesem Hintergrund ergibt sich die Frage einer therapeutischen Beeinflussbarkeit durch Verabreichung von Antiproteasen (s. Abschn. 7.3.7).

4.6 Sauerstoffradikale

J. BEHR

Die cystische Fibrose führt zu einer chronischen Entzündungsreaktion und bakteriellen Besiedelung der Atemwege mit massivem Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Lunge, welche als Effektorzellen der unspezifischen Immunabwehr ihre Funktion durch Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Proteasen (Elastase, Cathepsin G etc.) wahrnehmen. Da sie die Erreger (meist Pseudomonaden und/oder Staphylokokken) jedoch nicht eradizieren können, resultiert neben den Schädigungen durch mikrobielle Toxine auch eine andauernde Belastung des bronchopulmonalen Gewebes durch die granulozytären Abwehrstoffe, die nach heutiger Auffassung wesentlich am Krankheitsgeschehen der CF beteiligt sind und schließlich zum Endstadium der CF-Lunge mit generalisierter Bronchiektasie und Destruktion des Lungenparenchyms führen. Im Folgenden soll speziell die Rolle der Oxidanzien innerhalb dieses komplexen Krankheitsprozesses dargestellt werden.

4.6.1 Oxidanzien

Die Begriffe „Oxidanzien“ und „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) bezeichnen eine Gruppe hochreaktiver chemischer Verbindungen, welche Elektronen von anderen Molekülen übernehmen; liegt dieser Elektrophilie die Präsenz eines ungepaarten Elektrons in der Elektronenhülle zugrunde, so spricht man von einem Radikal.

ROS spielen eine zentrale Rolle in der Infektabwehr sowie als Entzündungsmediatoren. Ihre unterschiedlichen Funktionen sind in Abb. 4.23 aufgeführt. Neben direkten Reaktionen mit Proteinen, Lipiden und DNS beeinflussen ROS den Arachidonsäurestoffwechsel und wirken als Mediatoren an intrazellulären Steuerungsprozessen auf genetischer Ebene mit („Redox-Signalling“).

Größtenteils werden die ROS von der membranständigen NADPH- (Nikotinamadenindinukleotidphosphat) Oxidase gebildet, welche aus molekularem Sauerstoff das Superoxidationradikal generiert [11]. Dieses ist die Ausgangsverbindung für zahlreiche weitere, teils wesentlich toxischere Metaboliten, wie zum Beispiel das Hydroxylradikal oder das Hypochloridanion (Abb. 4.24) [11, 20]. Andere, quantitativ weniger bedeutsame Quellen für ROS sind „Lecks“ des Cytochrom-Systems der Mitochondrien („Atmungskette“), im Zytosol gelegene Oxidasen (z.B. Xanthinoxidase) und autoxidative Effekte kleiner Moleküle im Zytosol. Eine zusätzliche Quelle für Radikale ist die induzierbare Stickstoffmonoxid-(NO) Synthetase, welche im Rahmen von Entzündungsreaktionen aktiviert wird und große Mengen des NO-Radikals freisetzen kann (Abb. 4.23).

ROS spielen eine Schlüsselrolle in der Infektabwehr, indem sie an der Abtötung phagozytierter Erreger mitwirken [11, 20]. Deshalb wird die ROS-Produktion durch die NADPH-Oxidase im Rahmen von Infekten, aber auch bei Phagozytose allgemein stark gesteigert. Ein genetischer Defekt der NADPH-Oxidase führt zum Krankheitsbild der septischen Granulomatose, welches durch letztlich letal verlaufende bakterielle und Pilz-Infekte gekennzeichnet ist. Andererseits können ROS aber auch körpereigene Strukturen schädigen. Unter physiologischen Bedingungen wird dies durch Antioxidanzien verhindert (s. Abschn. 4.6.3) [8].

Abb. 4.23. Pathophysiologische Funktionen von ROS, die bei CF-Patienten infolge von Mukostase und bakterieller Kolonisation der Atemwege in verstärktem Maß im unteren Respirationstrakt freigesetzt werden. Näheres s. Text

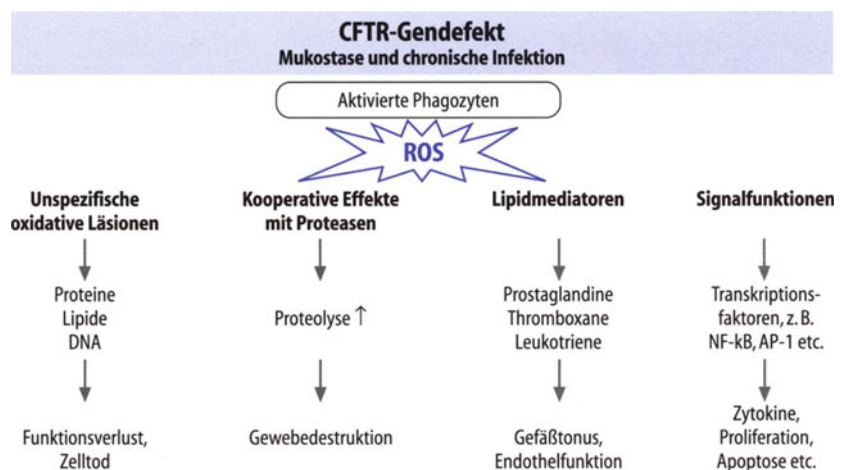
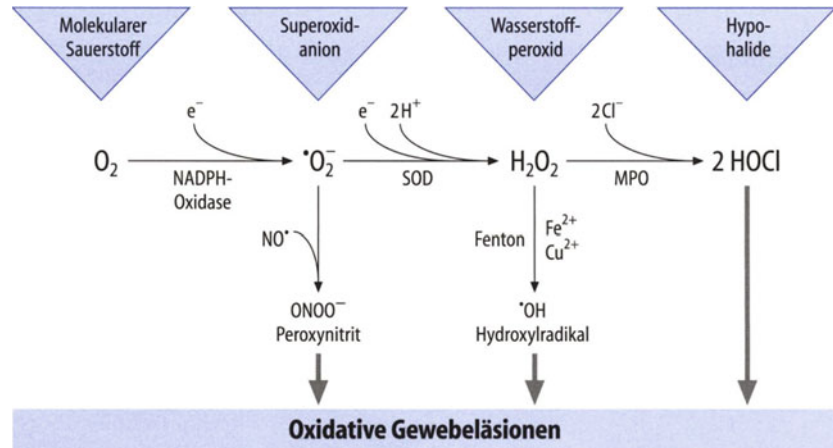


Abb. 4.24. Metabolismus der verschiedenen ROS ausgehend vom Superoxidanion, welches primär von der membranständigen NADPH-Oxidase gebildet wird. Dabei entstehen zunehmend toxischere Metaboliten wie das Hypochloridanion, das Hydroxylradikal und Peroxynitrit



Eine isolierte Betrachtung von ROS ist daher unzulässig, denn erst wenn eine überschießende ROS-Freisetzung die antioxidativen Abwehrsysteme überwindet, können Gewebeläsionen durch ROS auftreten [9]. Aus diesem Grunde ist es notwendig, Oxidanzien und Antioxidanzien als System zu erfassen, welches sich in einer kritischen Balance befindet. Unter bestimmten Voraussetzungen kann sich ein Ungleichgewicht einstellen, welches die Entstehung oxidativer Gewebeläsionen erlaubt.

Grundsätzlich sind alle Gewebe durch oxidative Läsionen bedroht. Aufgrund ihrer Anatomie und Funktion, welche ein feinverzweigtes Bronchialsystem ($>2^{22}$ Bronchialgenerationen) für den konvektiven Atemgastransport und eine sehr große Alveolar- und Kapillaroberfläche (ca. 300 Mio. Alveolen) für den Gasaustausch erfordert, sowie durch den ständigen Kontakt mit der Außenluft mit hohen Sauerstoffpartialdrücken sowie infektiösen und toxischen Noxen, ist die Lunge in besonderer Weise für Schädigungen durch ROS anfällig [4].

In zahlreichen Untersuchungen wurde gezeigt, dass bei der cystischen Fibrose die Akkumulation oxidativ kompetenter Zellen und deren anhaltende Aktivierung einen wesentlichen Beitrag zur intrapulmonalen Redox-Imbalance leisten. Durch hypervisköse Sekrete und sekundäre Infektion vor allem mit Pseudomonaspezies kommt es zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge, deren Zahl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) 100- bis 1000fach höher ist als bei gesunden

Personen [4]. Durch die Freisetzung von Superoxidanionen und Myeloperoxidase resultiert ein enormes oxidatives Potential, welches die Atemwege, speziell das Atemwegsepithel schädigen kann [4, 6, 9].

CF-Patienten mit klinisch signifikanter pulmonaler Manifestation weisen zu 80–90% eine chronische Kolonisation der Atemwege mit Bakterien, meist Pseudomonaspezies oder seltener Staphylokokken und Haemophilus influenzae, sowie mit Pilzen auf. Aspergillen im Sputum sind in bis zu 30% der Fälle positiv, nicht selten liegt eine allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) vor. Im Rahmen der unspezifischen, zellvermittelten Infektabwehr kommt es zum massiven Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Bronchialwand, das Bronchiallumen und das umgebende Lungengewebe. Die Leukozyten können die Infektionserreger aber nicht eliminieren, da diese sich u. a. durch Kapselbildung der Abtötung entziehen [14]. Aus der frustranen Phagozytose resultiert eine anhaltende Aktivierung der Granulozyten, so dass vor allem das Epithel der unteren Atemwege einer verstärkten oxidativen Belastung ausgesetzt ist. Zusätzlich sezernieren die kolonisierenden Bakterien prooxidative Substanzen, z. B. Pyozyanin und Ferripyochelin, welche via Hydroxylradikalbildung zum oxidativen Stress beitragen. Infolge der gesteigerten Stoffwechselaktivität werden auch aus Mitochondrien (Atmungskette) und zytosolischen Oxidasen – z. B. Xanthinoxidase – verstärkt ROS freigesetzt.

Diese CF-spezifischen Pathomechanismen führen zu einem prooxidativen Milieu, welches messbare oxidative Effekte in der Lunge hervorruft (s. folgende Liste).

■ Indikatoren der Oxidanzbelastung bei CF. (Mod. nach [19])

- Indikatoren in Blut und Blutplasma:
 - Organische Hydroperoxide ↑
 - 9,11-di-en-Fettsäuren ↑
 - Oxidierbarkeit von Lipoproteinen ↑
 - Peroxid-induzierbare Hämolyse ↑
- Indikatoren in der Ausatemluft:
 - Pentane ↑
- Indikatoren in BALF und Sputum:
 - Neutrophile Granulozyten und Makrophagen: Zahl und Oxidase-Aktivität ↑
 - Chloramine ↑
 - Myeloperoxidase ↑
 - „freie“, katalytisch aktive Eisenionen ↑
 - Proteinoxidation ↑

So wurden im CF-Sputum große Mengen an aktiver Myeloperoxidase und an Chloraminen gemessen [14, 21]. Mittels Hydrokarbonatemtest konnte eine gesteigerte Lipidperoxidation in der Lunge gezeigt werden, die auch zu erhöhten Malondialdehydspiegeln im Plasma führte. Der Nachweis einer vermehrten Ausscheidung von 8-Hydroxydesoxyguanosin im Urin legt das Auftreten von DNS-Schäden nahe [21]. Darüber hinaus fanden sich auch prooxidative Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, IL1 und IL8 vermehrt in BALF und Plasma von CF-Patienten.

Die histomorphologischen Veränderungen der Lunge bei cystischer Fibrose sind ebenfalls gut vereinbar mit pathophysiologisch relevanten oxidativen Schädigungsmechanismen. So werden fibrotische Veränderungen durch Oxidanzien gefördert, indem diese die Fibroblastenproliferation und die Expression von Kollagen und Kollagenasen induzieren. Die direkte oxidative Schädigung des Bronchialepithels fördert die Mukussekretion und leistet dem entzündlichen Umbau des Bronchialsystems Vorschub, welcher letztlich zur chronischen Atemwegsobstruktion und zur Ausbildung von Bronchiektasen beiträgt. Auch die lokale Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten – Prostaglandine, Thromboxan und Leukotriene – wird durch ROS stimuliert, wodurch eine zusätzliche Verstärkung lokaler Entzündungsprozesse resultiert.

! Insgesamt sprechen zahlreiche Befunde für eine überschießende Aktivierung neutrophiler Granulozyten als Hauptursache für die exzessive Oxidanzbelastung bronchopulmonaler Strukturen bei der cystischen Fibrose, die schließlich zur Entstehung der CF-Lunge einen wesentlichen Beitrag leisten. Auch das Auftreten oxidati-

ver Läsionen kann – wie zum Beispiel bei der Lipidperoxidation – als gesichert gelten. Die Frage, welchen Stellenwert oxidative Pathomechanismen innerhalb des komplexen Krankheitsgeschehens bei cystischer Fibrose tatsächlich haben, ist aber nicht abschließend geklärt, sondern Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion [1, 7, 19, 25].

Neben der Lunge werden entzündliche und oxidative Pathomechanismen auch für die häufig mit der CF assoziierten Lebererkrankungen bis hin zur Leberzirrhose (ca. 10%) in einen ursächlichen Zusammenhang gebracht. Auch hierbei wird den ROS-vermittelten proinflammatorischen und profibrotischen Wirkungen eine entscheidende Rolle zugeschrieben, wenngleich die Datenlage im Falle der Leberbeteiligung bei cystischer Fibrose weniger umfangreich ist als für die pulmonale Manifestation [17].

4.6.2

Oxidanzien-Protease-Kooperation

In Abhängigkeit von Redoxpotential, Ladung und Hydro- bzw. Lipophilie können Oxidanzien mit nahezu allen Verbindungen, die im Intra- oder Extrazellulärraum eines Organismus vorkommen, reagieren, wobei für einzelne Oxidanzien aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften Präferenzen bezüglich ihrer Reaktionspartner bestehen. Das Ergebnis sind folgenschwere Veränderungen der betroffenen Moleküle, die schließlich zur Beeinträchtigung von Zell- und schließlich auch von Organfunktionen führen können. Eine besondere Interaktion existiert zwischen ROS und dem Protease-Antiprotease-System.

! So können ROS einerseits Proteasen (z. B. Kollagenase) aktivieren und andererseits Antiproteasen (z. B. α 1-Antitrypsin und „secretory leukoprotease inhibitor“) inaktivieren, wobei häufig die Oxidation von Methioninresten für die Änderung des Funktionszustandes des jeweiligen Moleküls entscheidend ist [18]. ROS fördern auf diese Weise ein propeptolytisches Milieu („kooperativer Effekt“), welches seinerseits an der entzündlichen Gewebsdesintegration maßgeblich beteiligt ist [9, 14, 20].

Zusätzlich können oxidierte Proteine leichter proteolytisch abgebaut werden.

Im Fall der cystischen Fibrose ist die Neutrophilen-Elastase (NE) eine der wichtigsten Proteasen. Ne-

ben ihrer direkten proteolytischen Wirkung induziert sie auch die Freisetzung von Zytokinen (z. B. Interleukin-8) und unterhält so die Entzündungsreaktion. Im Bronchialsekret von CF-Patienten wurde freie NE-Aktivität gefunden, so dass offensichtlich keine ausreichende Inhibition durch Antiproteasen stattfindet. Da die Konzentration der Antiproteasen, insbesondere $\alpha 1$ -Antitrypsin ($\alpha 1$ PI) und „secretory leukoprotease inhibitor“ (SLPI) eigentlich eine vollständige Hemmung der NE gewährleisten würde, muss die Funktion der Antiproteasen beeinträchtigt sein. Hierfür sind in erster Linie oxidative Mechanismen verantwortlich, denn sowohl $\alpha 1$ PI als auch SLPI wird durch Oxidation von Methioninresten im aktiven Zentrum vollständig inaktiviert [9,18]. Für die oxidative Inaktivierung der Antiproteasen spricht nicht nur die Präsenz der entsprechenden ROS in den unteren Atemwegen, sondern auch die Beobachtung, dass die Substitution des antioxidativ wirksamen β -Karotin die NE/ $\alpha 1$ PI-Balance günstig beeinflusst [22].

4.6.3 Antioxidanzien

Die pathophysiologische Relevanz der Oxidanzienbelastung kann nur im Kontext mit der vorhandenen antioxidativen Kapazität bewertet werden. Unter physiologischen Bedingungen werden die ROS durch Antioxidanzien weitgehend neutralisiert [4, 8].

Man kann dabei primäre, sekundäre und tertiäre antioxidative Abwehrmechanismen unterscheiden (s. folgende Liste).

■ Antioxidative Abwehrmechanismen

- Antioxidanzien erster Ordnung:
 - Chelatbildner: Coeruloplasmin, Transferrin, Laktoferrin etc.
- Antioxidanzien zweiter Ordnung:
 - Enzymsysteme: Superoxiddismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathionredoxzyklus, γ -Glutamylzyklus, u. a.
 - Scavenger: Harnsäure, Albumin, Taurin, Vitamin C, Vitamin E, Glutathion u. a.
- Antioxidanzien dritter Ordnung:
 - Reparaturenzyme der DNA etc.

Primäre Abwehrmechanismen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie die Bildung von Oxidantien verhindern. Hierzu zählen u. a. Metallionen bindende Mole-

küle wie Transferrin, Laktoferrin und Coeruloplasmin, welche durch Bindung von freien Eisen- und Kupferionen die Entstehung von Hydroxylradikalen via Fentonreaktion verhindern. Sekundäre Abwehrmechanismen sind dagegen auf die Entgiftung bereits gebildeter ROS gerichtet. Tertiäre antioxidative Schutzmechanismen haben schließlich die Reparatur oder Beseitigung oxidativ geschädigter Moleküle zum Ziel.

Zu den sekundären antioxidativen Schutzmechanismen zählen Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD) und die Catalase (CAT), welche hoch effizient spezifische ROS abbauen und dabei entsprechend ihrer Enzymnatur als Katalysator fungieren und somit nicht verbraucht werden. Im Gegensatz dazu stehen die sog. Scavenger, die durch die Reaktion mit ROS verbraucht werden, wodurch ihre antioxidative Kapazität begrenzt ist. Hierzu zählt der Großteil der Antioxidanzien wie die Vitamine C und E, Provitamin A (β -Karotin) sowie Taurin, Harnsäure, Albumin und andere Serumproteine.

Aufgrund der für die cystische Fibrose typischen, exokrinen Pankreasinsuffizienz besteht bei diesen Patienten eine Resorptionsstörung vor allem für die fettlöslichen Vitamine A und E, die demzufolge nur in verminderter Konzentration zur Verfügung stehen [21]. Die Datenlage für Vitamin C ist weniger eindeutig, aber auch hier wurden verminderte Spiegel berichtet [21], die zudem mit einer verstärkten pulmonalen Inflammation assoziiert waren [23]. Durch Einwirkung von ROS und aktivierten Proteasen werden außerdem Metallionen bindende Plasmaproteine alteriert, so dass sie ihre primär antioxidative Wirkung verlieren. Bei den daraus resultierenden erhöhten Konzentrationen freier Eisen- und Kupferionen ist neben der Fentonreaktion auch eine prooxidative Wirkung von Vitamin C möglich, welches seine antioxidativen Effekte nur in Abwesenheit von freien Metallionen entfaltet. Es besteht somit eine intensive Verflechtung zwischen den unterschiedlichen Antioxidanzien. Diese wird noch verstärkt durch die Fähigkeit verschiedener Antioxidanzien, sich gegenseitig zu regenerieren. So kann die oxidierte Form der Vitamine C (Dehydroascorbat) und E (Tocochinon) durch reduziertes Glutathion (GSH) wieder zu Ascorbat und Tokopherol reduziert werden, wobei die oxidierte Form von Glutathion – Glutathiondisulfid (GSSG) – entsteht. Diese kann ihrerseits durch die Glutathionreduktase in die reduzierte Form (GSH) zurücküberführt werden. Für das Provitamin A (β -Karotin) sind in vitro antioxidative Effekte beschrieben, deren Wirksamkeit in vivo noch nicht eindeutig belegt ist.

Im Fall der cystischen Fibrose ist nicht nur die Konzentration der fettlöslichen Vitamine vermindert, sondern es besteht auch ein Mangel an Gluta-

thion im epithelialen Flüssigkeitsfilm des Alveolarepithels (ELF) sowie im Serum der Patienten [16]. Glutathion, ein Tripeptid aus γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin, spielt eine zentrale Rolle im Antioxidantienhaushalt der Lunge. Insbesondere in der ELF, der „first line of defense“, liegt die Glutathionkonzentration 100- bis 150fach höher als im Serum, so dass GSH hier das quantitativ dominierende Antioxidans darstellt [2, 3].

Glutathion nimmt in der Gruppe der sekundären Antioxidantien eine Sonderstellung ein, da es einerseits in seiner reduzierten Form GSH ein klassischer Scavenger ist und durch Reaktion mit ROS zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wird, welches selbst keine antioxidative Wirksamkeit mehr besitzt. Andererseits verfügt Glutathion über ein sehr effektives intrazelluläres Recyclingsystem. Dieses kann entweder mittels Glutathionredoxzyklus GSSG reduzieren, wodurch zwei Moleküle GSH entstehen, oder es spaltet extrazelluläres GSH und GSSG durch die membranständige γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT), transportiert die Bruchstücke in die Zelle, wo daraus mittels des γ -Glutamylzyklus GSH resynthetisiert wird [5, 10]. Letzteres steht teilweise dem Extrazellulärraum von neuem zur Verfügung [5, 10]. Auf diese Weise gelingt es unter physiologischen Bedingungen, sowohl intra- als auch extrazellulär die GSH-Konzentration hoch und die GSSG-Konzentration niedrig zu halten – der relative Anteil des GSSG am Gesamtglutathion beträgt normalerweise weniger als 5%.

Unter Berücksichtigung auch der Schlüsselrolle, die GSH bei der Regenerierung der antioxidativen Vitamine einnimmt, lässt der bei CF-Patienten nachgewiesene, systemische GSH-Mangel auf eine schwerwiegende Beeinträchtigung der pulmonalen antioxidativen Kapazität schließen [16].

Die Ursache für den generalisierten Glutathionmangel bei cystischer Fibrose ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Neben der verminderten enteralen Resorption werden Leberfunktionsstörungen als mögliche Ursache vermutet [16]. Neuere Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass der CFTR auch für den Transport von GSH aus den Zellen eine Rolle spielt und dass dieser Transportweg bei CF-Patienten gestört ist [13]. Dies könnte zur verminderten Glutathionkonzentration in der „epithelial lining fluid“ (ELF) der Lunge von CF-Patienten beitragen und stellt eine direkte Verbindung her zwischen dem Antioxidantienhaushalt und dem der Erkrankung zugrunde liegenden Gendefekt.

Ein weiteres und bedeutendes antioxidatives Enzymsystem stellen die Superoxiddismutase (SOD)

und die Catalase (CAT) dar. Während SOD-Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) dismutiert, setzt die Catalase H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff um. Catalase wird aus nekrotischen oder apoptotischen Granulozyten im Sputum von CF-Patienten freigesetzt und findet sich daher dort in sehr hoher Konzentration und Aktivität. Dementsprechend wird H_2O_2 (nahezu) vollständig entgiftet, noch bevor es durch Reaktion mit Myeloperoxidase toxischere Verbindungen eingehen kann [7, 25]. Hierfür sprechen neuere Untersuchungen, die zeigen, dass im Exhalat von CF-Patienten keine erhöhten H_2O_2 -Konzentrationen nachweisbar sind [25]. Auch die schädigende Wirkung von H_2O_2 auf Epithelzellkulturen ist in Anwesenheit von CF-Sputum aufgehoben, wofür neben der Catalase auch noch andere Faktoren, wie die hohe Protein- und DNS-Konzentration, verantwortlich sind [25]. Für das Kompartiment des CF-Mukus ist daher die Wirksamkeit oxidativer Pathomechanismen in Frage gestellt. Inwiefern diese Ergebnisse auch für die direkte Grenzschicht des Bronchialepithels in vivo zutreffen, ist fraglich. Bedenkt man die Summe der im vorausgegangenen dargelegten Befunde und pathophysiologischen Zusammenhänge, so ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass ROS eine wesentliche Rolle für die Entstehung der CF-Lunge spielen [1, 4, 6, 14, 21].

4.6.4 Redox-Imbalance

Wie aus den vorausgegangenen Abschnitten hervorgeht, besteht in der Lunge von Patienten mit cystischer Fibrose einerseits eine exzessive Belastung durch ROS, der auf der anderen Seite ein Mangel an Antioxidantien gegenübersteht. Auch wenn in Teilbereichen eine Kompensation möglich ist, wie am Beispiel der Catalase im CF-Sputum deutlich wurde [25], so resultieren aus dieser gestörten Redoxbalance Schädigungen, welche sich auf biochemischer Ebene direkt nachweisen lassen. Auf die gesteigerte Lipidperoxidation, oxidative Inaktivierung von Antiproteasen und DNS-Oxidation wurde bereits ausführlich hingewiesen (s. oben „Antioxidative Abwehrmechanismen“).

In zahlreichen Untersuchungen wurde außerdem versucht, einen Zusammenhang herzustellen zwischen den biochemischen Markern der prooxidativen Imbalance und klinischen Parametern der CF, quasi als indirekte Hinweise auf die klinische Relevanz oxidativer Pathomechanismen. In der Tat lassen sich entsprechende Korrelationen zwischen repräsentativen Parametern der oxidativen Belastung und dem Grad der Lungenfunktionseinschränkung herstellen, welche die zugrundeliegende Hypothese unterstützen [1, 14, 21–23], diese jedoch nicht beweisen können.

Eine günstige Beeinflussung von Lipidperoxidation, NE/ α 1PI-Komplexbildung und LDL-Oxidation durch die Substitution mit antioxidativen Vitaminen oder β -Karotin wurde in verschiedenen Studien belegt [21, 22]. Auch diese Befunde untermauern das Konzept, wonach aus dem bei CF-Patienten bestehenden Oxidanzien-Antioxidanzien-Ungleichgewicht oxidative Pathomechanismen resultieren, die das Krankheitsgeschehen maßgeblich mitbestimmen.

Ein direkter Beweis für die klinisch relevante Wirksamkeit dieser oxidativen Schädigungsmechanismen steht jedoch bis heute aus.

4.6.5

Antioxidative Therapie

Etwa 90% der CF-Patienten entwickeln eine Pankreasdegeneration mit exokriner Insuffizienz. In der Folge kommt es zu einer ausgeprägten Resorptionsstörung, insbesondere für fettlösliche Vitamine, die auch durch die Substitution von Pankreasenzymen nicht vollständig ausgeglichen werden kann. Schon früh erkannte man daher, dass die Plasmaspiegel der Vitamine E, D, K, A und C bei vielen Patienten unterhalb des Normbereichs liegen. Die meisten CF-Patienten erhalten bereits aus diesem Grund eine umfangreiche Vitaminsubstitution, welche insbesondere auch die antioxidativ wirksamen Vitamine E und A (als Provitamin β -Karotin) sowie Vitamin C beinhaltet. Hierdurch werden die Plasmaspiegel in den Normbereich angehoben und auch antioxidative Effekte dieser Vitaminsubstitution konnten auf biochemischer Ebene gezeigt werden [21–23]. Inwiefern diese Effekte auch in klinisch messbare Wirkungen umgesetzt werden, bleibt bisher jedoch offen. Der routinemäßige und breite Einsatz dieser Vitaminsubstitution wird voraussichtlich auch in Zukunft die Durchführung von Studien, die eine solche klinische Wirksamkeit zeigen könnten, erschweren oder sogar unmöglich machen, da es kaum Patienten ohne Vitaminsubstitution gibt und es ethisch bedenklich erscheint, bei bekanntem Vitaminmangel eine Substitution vorzuenthalten.

! In Abwesenheit eines direkten Beweises für die klinische Relevanz der oxidativen Pathomechanismen im Rahmen der cystischen Fibrose ist Zurückhaltung geboten, was die Empfehlung antioxidativer Therapieansätze anbetrifft – zumal wenn große Mengen der jeweiligen Substanz langfristig verabreicht werden müssten und potenzielle Nebenwirkungen nicht auszuschließen sind.

Dabei ist insbesondere ungeklärt, inwiefern eine antioxidative Behandlung die bakterielle Besiedelung der CF-Lunge beeinflussen könnte. So sezernieren bestimmte *Pseudomonas*-Stämme Alginate, welches selbst antioxidative Eigenschaften hat und die Bakterien vor der körpereigenen Immunabwehr schützt. Es gibt daher Befürchtungen, dass das Risiko für Infektionen durch eine antioxidative Therapie sogar erhöht werden könnte [19].

Andererseits stützen zahlreiche Befunde die Annahme einer Beteiligung oxidativer Läsionen an der Entstehung speziell der pulmonalen Manifestation der cystischen Fibrose und es konnte gezeigt werden, dass die antibiotische Therapie pulmonaler Exazerbationen der cystischen Fibrose den Antioxidanzienstatus der Patienten insgesamt verbessert [15]. Dementsprechend werden antioxidative Therapieansätze zur Prophylaxe und Behandlung der CF-Lunge diskutiert. Neben den antioxidativen Vitaminen bietet insbesondere das Glutathionsystem einen Erfolg versprechenden Ansatzpunkt. Der GSH-Mangel in der ELF von CF-Patienten ist eine wesentliche Komponente des Oxidanzien-Antioxidanzien-Ungleichgewichts in der Lunge bei dieser Erkrankung, der sich auch in den Glutathionspiegeln peripherer Lymphozyten widerspiegelt [12]. Aufgrund synergistischer Interaktionen mit anderen Antioxidanzien (u. a. Vitamin C und E) vermindert ein GSH-Mangel auch deren Effizienz. Durch Erhöhung des Cysteingehalts an die Zellen (z. B. Pneumozysten Typ II) könnte die endogene GSH-Synthese gesteigert werden [5, 10]. N-Acetylcystein ist ein bekannter Glutathion-Prekursor, der auf diesem Weg zu einem Anstieg der pulmonalen Glutathionspiegel führt, wie Untersuchungen an Patienten mit Lungenfibrose gezeigt haben. Leider liegen entsprechende Daten für CF-Patienten bisher nicht vor. Allerdings vermindert die direkte inhalative Gabe von Glutathion (2-mal 600 mg/Tag) die Oxidanzienfreisetzung aus bronchoalveolären Zellen und erhöht das GSH-Angebot in der ELF von CF-Patienten und stellt so einen möglichen Behandlungsansatz dar [17]. Andere Überlegungen zielen auf eine Steigerung der Glutathionsynthese durch direkte oder indirekte Beeinflussung der Expression von Enzymen des γ -Glutamylzyklus, zum Beispiel durch Inhibition von Zytokinen, die ihrerseits die Expression von Enzymen des γ -Glutamylzyklus unterdrücken oder durch die Substitution von Selen, welches die Aktivität der Glutathionperoxidase determiniert [24]. Die Verbesserung des Antioxidanzienstatus bietet somit vielfältige, Erfolg versprechende Ansatzpunkte für eine antioxidative Therapie der CF-Lunge, die klinische Effektivität muss jedoch in entsprechenden Studien überprüft werden.

Auch der umgekehrte Weg, nämlich die Hemmung der Oxidanzienproduktion, bietet prinzipiell Ansatzpunkte für eine antioxidative Therapie.

In Anbetracht der zentralen Rolle, welche die ROS in der Infektabwehr spielen und der bekannten Tatsache, dass die Atemwege bei den meisten CF-Patienten durch pathogene Mikroorganismen kolonisiert sind, wäre eine Unterdrückung der ROS-Produktion von neutrophilen Granulozyten jedoch mit einem nicht kalkulierbaren Infektionsrisiko verbunden.

4.6.6

Zusammenfassung

In der Lunge von CF-Patienten herrscht ein Oxidanzien-Antioxidanzien-Ungleichgewicht, wobei einerseits die exzessive Freisetzung von ROS aus aktivierten Phagozyten (in erster Linie neutrophile Granulozyten und Makrophagen) und andererseits der Mangel an Antioxidanzien (GSH und Vitamine A, E, C) zu einem prooxidativen Milieu beitragen. Darüber hinaus besteht ein Synergismus mit bakteriellen Toxinen und proteolytischen Enzymen. Die Folgen oxidativer Läsionen lassen sich dementsprechend auf biochemischer Ebene in Gestalt einer gesteigerten Lipidperoxidation, DNS- und Protein-Oxidation nachweisen. Hieraus ergeben sich weitreichende Konsequenzen auf zellulärer und struktureller Ebene, die zumindest partiell die bronchopulmonalen Krankheitserscheinungen erklären können. In Übereinstimmung mit diesem Konzept lassen sich antioxidative Effekte durch die Substitution von Vitamin E und Provitamin A (β -Karotin) erzielen. Die klinische Bedeutung und das tatsächliche Ausmaß der Beteiligung oxidativer Pathomechanismen am Krankheitsgeschehen ist jedoch bis heute Gegenstand der Forschung. Einen Beitrag zur Klärung dieser offenen Fragen könnten spezifische antioxidative Therapieansätze leisten, indem sie die Auswirkungen einer solchen Intervention auf den Krankheitsverlauf dokumentieren. Einen erfolgversprechenden Ansatz für eine antioxidative Behandlung bietet u. a. das Glutathionsystem, weil GSH einerseits eine Schlüsselrolle im Antioxidanzien-System der Lunge spielt und weil andererseits ein GSH-Mangel bei CF-Patienten bereits nachgewiesen wurde. Die weitere Entwicklung erfordert daher in den nächsten Jahren entsprechend konzipierte Studien zur Beantwortung der Frage nach dem Stellenwert von Oxidanzien in der Pathogenese und von Antioxidanzien in der Therapie der cystischen Fibrose.

4.7

Immunologie der bakteriellen Lungeninfektion

G. DÖRING, A. SCHUSTER UND M. GRIESE

Bakterielle Lungeninfektionen bestimmen weitgehend die Prognose der Patienten mit CF und besitzen daher eine zentrale Bedeutung. Ihr chronischer Verlauf ist durch die Bildung von Bronchiektasen, Atelektasen und Fibrosen geprägt und zunehmender Elastizitätsverlust und Einschränkungen der alveolären Oberflächen führen zur fortschreitenden Atemnot und letztlich zum Cor pulmonale [81]. Die Ursachen bakterieller Lungeninfektionen, die hauptsächlich durch die opportunistisch pathogenen Mikroorganismen *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und *Pseudomonas aeruginosa* ausgelöst werden, sind bisher noch nicht eindeutig geklärt. Das Unvermögen, den Respirations-trakt steril zu erhalten, hat vor der Entdeckung des verantwortlichen Gens, des „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR), im Jahr 1989 (s. Kap. 1.1) zu der Annahme geführt, dass die genetische Abnormalität einen Immundefekt hervorruft und dass die CF eine Krankheit des Immunsystems wäre (Übersicht in [127]). Die Erkenntnis, dass CFTR den Ionentransport durch Zellmembranen bewerkstelligt und reguliert (s. Kap. 2.1), und eine Vielzahl von Daten, die ein praktisch normales Immunsystem bei CF-Patienten zeigen, führte zu der Annahme, dass sich die CF immunologisch nicht von anderen chronisch-bakteriellen Lungeninfektionen unterscheidet. In letzter Zeit sind jedoch wiederum Hypothesen aufgestellt worden, die eine immunologische Abnormalität mit dem Auftreten bakterieller Lungeninfektionen bei CF-Patienten in Zusammenhang bringen.

4.7.1

Ursachen bakterieller Lungeninfektionen bei CF-Patienten

Aufgrund der Untersuchung früh diagnostizierter CF-Patienten (< 12 Monate alt), die bei 7 der 16 Patienten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit erhöhte neutrophile Granulozytenzahlen und erhöhte Interleukin(IL)-8-Werte zeigten, ohne dass bakterielle Erreger isoliert werden konnten, wurde angenommen, dass die CF-Lunge bereits vor der Infektion entzündet sei [69]. Auch Mäuse, die in steriler Umgebung aufgezogen wurden, zeigten Symptome von Lungenentzündung [151]. Eine Erklärung für diesen überraschenden Befund bietet die Entdeckung, dass CF-Lungenepithelzellen weniger IL-10 als entspre-

chende Zellen gesunder Probanden bilden und CF-bronchoalveolare Lavageflüssigkeit geringere Konzentrationen des antiinflammatorisch wirksamen Zytokin IL-10 aufweist [17]. Auch T-Zellklone von CF-Patienten bilden weniger IL-10 als entsprechende Zellen von gesunden Individuen [98]. Dadurch könnte ein Ungleichgewicht zwischen entzündungshemmenden und entzündungsfördernden Zytokinen und schließlich eine permanente Entzündung in den Atemwegen der CF-Patienten entstehen. Diese wiederum könnte Infektionen erleichtern, da durch den IL-8-vermittelten Einstrom von neutrophilen Granulozyten Proteinase und reaktive Sauerstoffverbindungen freigesetzt werden, die das Epithel schädigen können. In der Regel binden bakterielle Erreger an entzündlich geschädigten Epithelzellen besser. Diese Vorstellung ist *in vitro* [31, 112], in Tierversuchen [42] und bei anderen Patientengruppen [48] belegt worden. In anderen Studien wurde jedoch kein IL-10-Mangel bei CF-Patienten gefunden [102] und aufgrund großer regionaler Unterschiede in der Lunge ist es auch möglich, dass bei der Bronchiallavage in einem Lungenlappen zwar Entzündungsmarker aber keine Bakterien und im anderen Lappen beide zugleich nachgewiesen werden [91]. Schließlich konnten in einer Studie von 46 früh diagnostizierten CF-Patienten im Alter von < 6 Monaten Entzündungsmarker nur bei Anwesenheit von Bakterien im Respirationstrakt der Patienten nachgewiesen werden [4].

Andere Vorstellungen versuchen, den Basisdefekt mit dem Auftreten bakterieller Lungeninfektionen zu verknüpfen. So wurde vermutet, dass CFTR den pH in den Zellendosomen regelt und damit eine erhöhte Sulfatierung und eine erniedrigte Sialisierung von membranständigen Glykoproteinen bewirkt [8]. Da asialo-GM1 einen Rezeptor für viele bakterielle Pathogene des Respirationstraktes darstellt [74], würde eine Erhöhung von aGM1 auch eine erhöhte Anzahl von Bakterien an die Lungenepithelzellen binden können. Ebenso wurde vermutet, dass eine erhöhte Sulfatierung eine erhöhte Adhärenz von *Staphylococcus aureus* zur Folge hätte [124]. Studien an Zellkulturen belegen tatsächlich diese Vorstellung für die CF-typischen Bakterien *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* [30, 66, 124]. In anderen Studien konnte jedoch weder die pH-Hypothese [125] bestätigt, noch eine unterschiedliche Bindung von *Staphylococcus aureus* [145] oder *Pseudomonas aeruginosa* [111] an Epithelzellen von CF-Patienten oder normalen Individuen gefunden werden.

Eine Hypothese zur direkten Verbindung zwischen mutiertem CFTR und dem Auftreten bakterieller Lungeninfektionen geht davon aus, dass normales CFTR *Pseudomonas aeruginosa* als Rezeptor dient [109]. Normales CFTR nimmt gebundene *Pseudomo-*

nas-aeruginosa-Zellen intrazellulär auf, wodurch diese abgetötet werden können. Mutiertes CFTR bindet nicht mehr *Pseudomonas aeruginosa*, wodurch eine Vermehrung der Bakterien auf dem Lungenepithel möglich ist, die zur Infektion führt [110].

Da durch mutiertes CFTR in Sekret bildenden Drüsen einerseits Chloridionen zurückgehalten werden, andererseits auch die Aufnahme von Chloridionen in die Epithelzellen beeinträchtigt ist, ergeben sich möglicherweise luminal erhöhte Natriumchloridkonzentrationen, die einen negativen Einfluss auf die Wirksamkeit antimikrobieller Verbindungen (Defensine) ausüben und damit als weiterer begünstigender Faktor für das Auftreten bakterieller Lungeninfektionen genannt werden [56, 130]. Die eindeutig nachgewiesene Erhöhung der luminalen Natriumchloridkonzentration steht bisher aus [131] und andere Untersuchungen deuten eher auf einen hypotonischen [19] oder isotonen [87] epithelialen Flüssigkeitsfilm hin, der allerdings in seinem Volumen erheblich reduziert ist [87]. Unter hypotonen Bedingungen könnten neutrophile Granulozyten schlechter agieren [94].

Damit gewinnt die Vorstellung, dass die Beeinträchtigung der mukozillären Clearance wesentlich für das Auftreten bakterieller Lungeninfektionen verantwortlich ist, immer mehr an Bedeutung. Untersuchungen an primären respiratorischen Epithelzellen, die aktive Zilien besitzen und Mukus sezernieren können, zeigen, dass sowohl *Staphylococcus aureus* [145] als auch *Pseudomonas aeruginosa* [Worlitzsch et al., unveröff.] an die Mukusschicht über den Zilien bindet, praktisch gar nicht jedoch direkt an die Zellmembran. Die Bindung an respiratorisches Muzin wurde auch für *Pseudomonas aeruginosa* [120], *Burkholderia cepacia* [118] oder *Haemophilus influenzae* [77] nachgewiesen.

Da bakterielle Lungeninfektionen bei CF-Patienten schon in einem sehr frühen Lebensalter (< 2 Jahre) auftreten, in dem die Reifung der PMN noch nicht abgeschlossen ist und die Chemotaxis der PMN nur eingeschränkt funktioniert [2], könnten dadurch ebenfalls bakterielle Infektionen erleichtert werden [133].

Unabhängig davon, ob die Entzündung vor der Infektion oder erst danach auftritt, ist sie ein Zeichen für die mehr oder weniger schnell eintretende Lungenzerstörung, die schon sehr früh nach der Geburt einsetzen kann und den CF-Patienten sein Leben lang begleitet [73].

Haben die Erreger einmal die tieferen Atemwege der CF-Patienten kolonisiert, führen phänotypische Veränderungen und Adaptationen der Mikroorganismen meist zu längerer Persistenz, so dass chronische Infektionsabläufe resultieren, die chronische Entzündungsmechanismen nach sich ziehen [44].

4.7.2

Mechanismen bakterieller Persistenz

Im Unterschied zur Gaszusammensetzung der normalen Luft (79% Stickstoff, 21% Sauerstoff und 0,03% Kohlendioxid) enthält die Luft im menschlichen Respirationstrakt eine mittlere Kohlendioxidkonzentration von 4%. Dieser Unterschied scheint eine der Ursachen zu sein, dass *Staphylococcus aureus* seinen Phänotyp *in vivo* verändert. Während das Bakterium *in vitro* überwiegend eine Polysaccharidkapsel des Typs 5 oder 8 bildet, wird diese im Respirationstrakt der CF-Patienten durch die Expression der Struktur des Poly-N-succinyl- β 1-4-glucosamins (PNSG) ersetzt [89]. Dadurch können sich wie bei *Staphylococcus epidermidis*, das ein strukturell identisches Polysaccharid bildet, größere Verbände von Bakterien bilden, die möglicherweise die Phagozytose durch Makrophagen oder neutrophile Granulozyten beeinträchtigen können.

Auch bei *Pseudomonas aeruginosa* beruht die Persistenz in der CF-Lunge im Wesentlichen auf der Fähigkeit, seinen Phänotyp nach Infektionsbeginn zu verändern. In der CF-Lunge bildet *Pseudomonas aeruginosa* große Mengen eines alginatähnlichen Exopolysaccharids. Das polymere Netzwerk umgibt viele einzelne Organismen, so dass riesige Bakterienverbände entstehen, die einzelne Bakterienzellen vor der Phagozytose schützen. Die Signale, die für diese phänotypische Umwandlung verantwortlich sind, sind bisher noch nicht zweifelsfrei identifiziert worden, könnten jedoch mit der Entzündung selbst zusammenhängen [86].

Die pathogenetische Bedeutung des phänotypischen Umschaltens von *Pseudomonas aeruginosa* auf mukoides Wachstum beruht darauf, dass das Pathogen damit seine Oberfläche erheblich vergrößert und so die Phagozytose erheblich behindert [23]. Zusätzlich kann Alginat durch seine negativ geladenen Säuregruppen die Abstoßungskräfte zwischen Bakterium und Phagozyte verstärken [23]. Schließlich werden reaktive Sauerstoffverbindungen (s. Abschn. 4.7.7 und 4.6) durch das *Pseudomonas-aeruginosa*-Exopolysaccharid inaktiviert [80, 128]. Weiterhin ist es sehr wahrscheinlich, dass die negativ geladene Alginatmatrix die Effizienz kationischer antimikrobieller Peptide reduziert. Aus diesen Gründen ist es nicht verwunderlich, dass in experimentellen Tiermodellen mukoiden Stämme mehr als nichtmukoiden Stämme persistieren [20]. Auch für *Staphylococcus aureus* könnten aufgrund der Bildung von PNSG ähnliche Überlegungen gelten.

4.7.3

Expression von Zytokinen

Die Auseinandersetzung von Bakterien mit dem menschlichen Wirt führt indirekt über unterschiedliche bakterielle Produkte [33, 93, 104], als auch direkt durch Faktoren verschiedener Wirtszellen [100] schnell zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Nicht überraschend wurden daher in der bronchoalveolären Lavage von CF-Patienten unter anderem Tumor-Nekrosis-Faktor(TNF)- α sowie IL-8 und IL-10 in stark erhöhter Konzentration im Vergleich zu gesunden, nicht infizierten Individuen nachgewiesen [18, 119]. In Nasenspülungen von CF-Patienten sind jedoch keine erhöhten Zytokinwerte gemessen worden [102].

Da davon ausgegangen werden kann, dass die erhöhten ZytokinKonzentrationen nicht lokal auf die Lunge begrenzt bleiben, können sich daraus auf Dauer erhebliche Schädigungen für den Körper ergeben. So kann beispielsweise TNF- α Osteoporose [139] und im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen Kachexie [95] auslösen. Die Zytokinausschüttungen bewirken unter anderem auch einen erhöhten Ruheenergiebedarf, dem der CF-Patient nicht zuletzt durch die Malabsorption nicht annähernd entsprechen kann [135].

Die Bildung von Autoantikörpern gegen TNF- α [55] und die Spaltung von Zytokinrezeptoren [40] könnten möglicherweise zytokinvermittelte Folgereaktionen verhindern. In Feedback-Mechanismen bewirken hohe IL-8-Konzentrationen eine Absenkung der IL-8-Rezeptordichte auf neutrophilen Granulozyten [28], und die erhöhte Bildung löslicher IL-1- oder TNF-Rezeptor-Antagonisten. Dennoch führen die erhöhten IL-8-Konzentrationen zu einem massiven Einstrom neutrophiler Granulozyten in die CF-Lunge [44], deren Folgen v. a. in der Lungengewebszerstörung zu sehen sind.

4.7.4

Stickoxid und Lymphozyten

Stickoxid (NO) wird durch die Biotransformation von L-Arginin zu L-Citrullin durch das Enzym NO Synthase (NOS) gebildet [96]. Im Gegensatz zu Patienten mit bronchialem Asthma, die erhöhte NO-Werte in der Ausatemluft aufweisen [9], wird in den chronisch infizierten Lungen der CF-Patienten NO nicht vermehrt gebildet [49, 58, 83]. Die Ursache dafür ist bisher unklar. Offensichtlich bilden jedoch CF-Lungenepithelzellen nur in geringem Maße NO [90]. NO beeinflusst das Immunsystem in vielfältiger Weise. Es inhibiert die Proliferation von Th1-Lymphozyten, sowie deren Produktion von IL-2 und

Interferon(INF)- γ [1] und sollte damit zu einer Th2-Antwort führen. Zusätzlich aktiviert NO CFTR in normalen, jedoch nicht in CF-Lymphozyten [35] und beeinflusst die Aktivität anderer Chloridkanäle [70].

Trotz geringerer NO-Konzentrationen bei CF-Patienten im Vergleich zu Patienten mit anderen Erkrankungen und gesunden Individuen ist für die Pathogenese der chronischen Lungeinfektion bei CF-Patienten aufgrund verschiedener Beobachtungen eine TH2-Antwort postuliert worden. So werden bei einer TH2-Antwort hohe Antikörpertiter gebildet, die dominierenden Phagozyten sind neutrophile Granulozyten und nicht Makrophagen, und Th2-Lymphozyten bilden ein bestimmtes Zytokinmuster, in dem IL-3, IL-4 und IL-5, aber nicht INF- γ dominieren. Interessanterweise kann man in einem Rattentiermodell eine Th2-Antwort durch INF- γ -Gabe in eine Th1-Antwort umformen, deren Krankheitsverlauf leichter verläuft [97]. Das Vorliegen einer Th2-getriggerten Entzündung liegt beispielsweise bei CF-Patienten mit allergischer bronchopulmonaler Aspergillose (ABPA) vor [129].

Unabhängig von der T-Zell-Population scheinen Lymphozyten in Verlauf der chronischen *Pseudomonas-aeruginosa*-Lungeninfektion supprimiert zu werden, wofür Phenazinpigmente der Bakterien verantwortlich gemacht wurden [134]. T-Zellen, die in das Zentrum der bakteriellen Infektion aus dem Gewebe ins Bronchiallumen ausgewandert waren, waren ebenfalls stark in ihrer Funktion eingeschränkt: durch hohe Konzentrationen der Elastase aus neutrophilen Granulozyten wurden eine Reihe von Oberflächenproteinen wie CD2, CD4 und CD8 gespalten, wodurch Antigene von diesen Lymphozyten nicht mehr erkannt werden konnten [45]. Die Annahme, dass bei der CF ein primärer T-Zelldefekt vorläge, hat sich bisher nicht allgemein durchsetzen können.

4.7.5

Antikörperantwort und Immunkomplexbildung

Wie bereits erwähnt, gibt es bisher keine ernst zu nehmenden Hinweise, dass bakterielle Infektionen das Ergebnis einer Immunschwäche der CF-Patienten sind. Im Gegenteil werden als Reaktion auf die bakterielle Kolonisation vor allem bei *Pseudomonas aeruginosa* rasch spezifische Antikörper gebildet, die gegen eine große Zahl bakterieller Antigene gerichtet sind und die mit Hilfe empfindlicher immunologischer Verfahren nachgewiesen werden können [3, 36, 37, 51, 62, 67, 75, 105, 106, 140]. Diese Immunreaktion trägt wesentlich zur Hypergammaglobulinämie der CF-Patienten und damit zur Schwere der Erkrankung

bei [88]. In der Regel steigen die Antikörpertiter einige Wochen nach Kolonisation an, bleiben dann über Jahre auf einem patiententypischem Niveau, das von Patient zu Patient sehr unterschiedlich hoch sein kann und steigen zum Lebensende noch einmal steil an. Spezifische Antikörper reagieren mit entsprechenden Antigenen zu Immunkomplexen. Diese wiederum aktivieren die Komplementkaskade und führen damit zum Einstrom neutrophiler Granulozyten aus dem Blut zum Ort des bakteriellen Geschehens. Dort werden diese nach Bindung der Immunkomplexe aktiviert und setzen Sauerstoffradikale und lysosomale Enzyme mit toxischer Wirkung frei. Dieser Verlauf erfüllt alle Kriterien einer Hypersensibilitätsreaktion des Typs III. Nicht überraschend korrelieren daher hohe Antikörpertiter und Immunkomplex-Werte mit einem schlechten klinischen Verlauf der Patienten [29, 76, 99, 147]. Die Immunkomplexbildung verdeutlicht auch, dass bakterielle Toxine wie das Exotoxin A, die Proteasen oder das LPS von *Pseudomonas aeruginosa* ihre Wirkung nicht direkt in der Patientenlunge oder systemisch entfalten können [38, 39].

Weit unklarer ist das Bild der Antikörperreaktionen bei Infektionen mit *Staphylococcus aureus*, sodass bisher keine Korrelationen zwischen der Schwere der Erkrankung und spezifischen Antikörpertitern oder Immunkomplexen aufgestellt werden konnten. Antikörpertiter gegen *Haemophilus influenzae* [59], *Aspergillus fumigatus* [71, 101] und *Burkholderia cepacia* [5, 78] sind beschrieben worden.

Antikörper gegen die *Pseudomonas-aeruginosa*-Antigene LPS und Alginat isoliert aus Seren von CF-Patienten zeigen in vitro die merkwürdige Eigenschaft, die Phagozytose der Bakterien durch autologe alveoläre Makrophagen zu hemmen [15, 64, 108, 141]. Dieser Effekt nimmt im Laufe der chronischen Infektion zu [142] und scheint daher nicht auf einem primären Immundefekt der CF-Patienten zu beruhen, sondern wahrscheinlich auf einer Immunmodulation aufgrund eines Subklassenshifts. Tatsächlich sind in zahlreichen Untersuchungen verschiedene IgG-Subklassen-Verhältnisse in den Seren *Pseudomonas-aeruginosa*-infizierter CF-Patienten gefunden worden [25, 50, 65, 115]. Hohe IgG2- und IgG3-Antikörpertiter korrelierten mit der Schwere der Erkrankung [25, 115]. Die Empfindlichkeit von Makrophagen gegenüber einem blockierenden Effekt spezifischer Antikörper könnte auf der Beobachtung beruhen, dass nur Makrophagen, nicht aber neutrophile Granulozyten über Fc-Rezeptoren, die hauptsächlich IgG3 binden, phagozytieren [13, 61].

4.7.6**Neutrophile Granulozyten:
Reaktionen lysosomaler Proteinasen**

Als Folge der Bildung von Immunkomplexen werden über die Aktivierung des Complement-Systems [53] und die Bildung von Leukotrienen (LT) [26] zusätzlich zur Bildung von IL-8 weitere chemotaktische Faktoren für neutrophile Granulozyten gebildet [7], die jedoch im Vergleich zu IL-8 geringere Bedeutung besitzen. Diese Aktivitäten haben einen gewaltigen Einstrom neutrophiler Granulozyten zur Folge. Daraus entwickeln sich große Sputummengen, da die einmal ins Lumen der Lunge eingewanderten Zellen dieses nicht mehr verlassen. Die Granulozyten besitzen eine Überlebenszeit von wenigen Stunden und zerfallen danach in ihre Bestandteile. Offensichtlich tritt der programmierte Zelltod (Apoptosis) unter den Umständen in der CF-Lunge nicht ein. Wesentlich verantwortlich dafür könnte ein Sauerstoffmangel im Sputum sein [Worlitzsch et al., unveröff., 63]. Das Sputummaterial besteht aus einem Netzwerk aus DNA und Actinpolymeren zugrundegegangener Granulozyten, intakten Granulozyten und persistierenden Bakterien. Es kann beträchtliche Bereiche der Atemwege verstopfen.

Als Folge des nichtapoptotischen Zerfalls der Granulozyten sowie im Verlauf der erfolgreichen und frustrierten Phagozytose gelangen auch lysosomale Proteinasen in hohen Konzentrationen in das Lumen der Atemwege [16, 57, 92, 123, 137, 149] (s. Abschn. 4.5). Die endogenen Serinproteinase-Inhibitoren α 1-Antitrypsin und Antileukoprotease sind nicht mehr in der Lage, die proteolytischen Aktivitäten (Übersicht in [44]) zu hemmen und intrazellulär zu verstoffwechseln [107] und werden selbst proteolytisch inaktiviert [10, 32, 57, 150]. Bisher ungeklärt sind die Beobachtungen, dass CF-Patienten mit Risikoallelen des α 1-Antitrypsins signifikant früher an einer Pseudomonas-aeruginosa-Lungeninfektion erkranken [43], aber diese eine bessere Lungenfunktion besitzen als CF-Patienten mit dem normalen α 1-Antitrypsin-Phänotyp [85].

Die Folgen des Proteinase-Antiproteinase-Ungleichgewichts zeichnen sich in einem Abbau des Lungenelastins [22, 136] und der Hypersekretion von Becherzellen ab [21, 24, 132]. Ob durch die Hypersekretion die Muzin bindenden bakteriellen Pathogene von der Lungenepithel-Zellmembran entfernt werden, dies also einen Schutzmechanismus darstellt [27], um die Generalisierung der Infektion zu verhindern, ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Von besonderer Bedeutung für die Pathogenese ist die Hemmung der Phagozytose verschiedener bakterieller Pathogene wie Pseudomonas aeruginosa und Staphylococcus aureus durch die freigesetzte Elastase.

Sowohl Immunglobuline [44, 47, 52], Immunkomplexe [47], Bestandteile des Komplement-Systems [143] und Zellrezeptoren der Granulozyten [14, 143] werden gespalten. Unterstützt wird diese Hypothese durch in vitro Untersuchungen, bei denen zu CF-Sputum mit hoher Elastaseaktivität ein Überschuss von α 1-Antitrypsin hinzugefügt wurde, der dann zu einer signifikant verbesserten Phagozytose von Pseudomonas aeruginosa durch gereinigte neutrophile Granulozyten führte (s. Abschn. 4.5). Auf der anderen Seite wird durch den Feedback-Mechanismus der PMN-Elastase eine Freisetzung weiterer PMN-Elastase und damit die wirtseigene Lungenzerstörung zeitweise begrenzt [47, 143]. Damit könnte die Elastase als immunregulatorisches Enzym betrachtet werden [46].

Granulozytenelastase spaltet auch das „letale“ Toxin von Pseudomonas aeruginosa, Exotoxin A [41]. Das erklärt unter anderem, warum CF-Patienten nicht ähnliche Symptome zeigen wie Patienten, die an Diphtherie erkranken, obwohl das Exotoxin von Pseudomonas aeruginosa den identischen molekularen Wirkmechanismus besitzt wie das Diphtheritoxin von Corynebacterium diphtheriae [41]. Letzteres ist gegenüber der Inaktivierung durch Granulozytenelastase sehr viel resistenter [41].

Neben Serinproteinasen aus neutrophilen Granulozyten scheinen auch Metalloproteinasen, sog. Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die spezifisch im Abbau der extrazellulären Matrix involviert sind, eine kausale Rolle in der Pathogenese der Lungenzerstörung bei CF-Patienten zu spielen [103]. Die spezifischen Granula der Neutrophilen lagern MMP-8 in der latenten Proenzym-Form (MG 91000) an [84]. Das aktive Enzym (MG 64000), das die hauptsächlichsten interstitiellen Kollagentypen I, II und III spalten kann [146], ist im CF-Sputum entdeckt worden [114]. CF-Sputum-Konzentrationen von MMP-8 korrespondiert mit einer Freisetzung aus $8,5 \times 10^9$ neutrophilen Granulozyten [114]. Ähnlich hohe Zellzahlen sind in CF-Sputumproben oft zu finden [22]. Zwischen der Kollagenase-Aktivität und der Schwere der Erkrankung besteht ebenfalls eine Korrelation [114], so dass man annehmen kann, dass auch MMP-8 eine Rolle in der Pathogenese der Lungenzerstörung bei CF-Patienten spielt.

4.7.7**Neutrophile Granulozyten:
Reaktionen reaktiver Sauerstoffverbindungen
und Arachidonsäuremetabolite**

Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch körpereigene oder fremde Stimulatoren führt nach 30–40 s zu einer um den Faktor 10 gesteigerten Sauerstoffaufnahme.

Der oft benutzte Begriff des „respiratory burst“ ist insofern irreführend, als die erhöhte Sauerstoffaufnahme in erster Linie zellspezifischen und situationsbedingten Syntheseleistungen dient und kaum, wenn überhaupt, der Zellatmung. Über den membranständigen Enzymkomplex der NADPH-Oxidase wird aus O_2 -Superoxidationradikal O_2^- gebildet [60], das spontan oder über das Enzym Superoxiddismutase (SOD) zu dem stabileren Wasserstoffperoxid, H_2O_2 , und Sauerstoff disproportioniert. Im aktivierten Granulozyten entsteht in einer Myeloperoxidase (MPO)-katalysierten Reaktion aus H_2O_2 in Gegenwart von Halogenionen hypochlorige Säure, HOCl.

Im Entzündungsgeschehen sind reaktive Sauerstoffverbindungen pathogenetisch wichtig, da sie von Phagozyten nicht nur innerhalb des Phagolysosoms zur Abtötung von Mikroorganismen zur Wirkung kommen, sondern auch in beträchtlichem Maße in den extrazellulären Raum gelangen. Das kann u. U. zu Gewebsschädigungen führen. Zu betonen ist jedoch, dass der Begriff der „Schädigung“, speziell in klinischer und biochemischer Hinsicht, schwer eindeutig zu definieren ist. Auch Folgeprodukte der Reaktionen reaktiver Sauerstoffverbindungen können zu weiteren Radikalen oder Verbindungen mit toxischen Eigenschaften führen. Bei der Reaktion von Hypochlorid mit Aminen entstehen N-Chloramine, die in vielen biologischen Reaktionen von Bedeutung sind. Beispielsweise wird N-Chlortaurin aus der schwefelhaltigen Aminosäure Taurin, die bei der Aktivierung PMN aus diesen sekretiert wird, gebildet [6]. Tatsächlich enthalten CF-Sputumproben Chloramine und Taurin in hohen Konzentrationen [148].

Eine Reihe von Wissenschaftlern hat indirekte Hinweise für einen Pathogenitätsmechanismus bei CF-Patienten über reaktive Sauerstoffradikale gefunden [57, 72, 79, 92, 113, 116, 117]. So wurde das Schlüsselenzym MPO in CF-Sputen nachgewiesen [57, 72, 116, 148] und die Lungenfunktion war invers korreliert mit MPO-Konzentrationen [72, 92, 116]. Zusätzlich wurden erhöhte Lipidperoxidationen [111], eine reduzierte Sauerstoffradikalfänger-Eigenschaft [79] und ein veränderter Antioxidantien-Status in CF-Plasmen [79, 113, 117] gefunden. Alle diese Ergebnisse setzen voraus, dass die langlebige Schlüsselverbindung H_2O_2 in erhöhtem Maß in den Atemwegen der CF-Patienten gebildet wird. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein: In der kondensierten Ausatemluft wiesen CF-Patienten im Gegensatz zu Patienten mit Asthma bronchiale keine erhöhten H_2O_2 -Konzentrationen auf [150]. Dieser Befund kann durch die Anwesenheit hoher Mengen des detoxifizierenden Enzyms Katalase erklärt werden, das Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff umwandelt. Die Quelle der Katalase stellen die neutrophilen Granulozyten selbst dar. Andererseits besteht in den Sputen

der CF-Patienten ein erheblicher Sauerstoffmangel, der die Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen gar nicht erst zulässt [Worlitzsch, unveröffentlicht]. Die Diskrepanz zwischen diesen Untersuchungen und den oben zitierten ist bisher noch nicht gelöst worden.

Setzt man die Bildung von H_2O_2 dennoch voraus, so könnte dieses Molekül in vielfältiger Weise in Entzündungsmechanismen eingreifen. Beispielsweise werden Zytokine wie TNF durch „oxidativen Stress“ auf Genebene reguliert, wobei möglicherweise die Beeinflussung des nuklären Faktors κB (NF- κB) durch den Redox-Status der Zelle eine zentrale Rolle spielt. H_2O_2 kann NF κB aktivieren, wobei dieser an die DNA bindet [121] und umgekehrt können Antioxidanzien wie N-Acetylcystein diese Aktivierung inhibieren [122]. Durch H_2O_2 freigesetztes TNF- α kann seinerseits unter anderem in erheblichem Maße neutrophile Granulozyten zur Produktion von O_2^- stimulieren [144]. Als Folge dieses Feedback-Mechanismus kann es unter anderem zu einer erheblichen Lipidperoxidation in vivo kommen. H_2O_2 führt auch zur Aktivierung des interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1) auf Endothelzellen und bewirkt damit eine stärkere Bindung der Granulozyten über deren CD-18-Komplex an ICAM-1 [82]. Neben H_2O_2 kann auch *Pseudomonas aeruginosa* NF κB aktivieren [34].

Auch die bei der Aktivierung der PMN gebildeten Arachidonsäuremetabolite können den Entzündungsverlauf wesentlich beeinflussen. Diese werden dadurch gebildet, dass O_2 mit der aus Phospholipiden durch Phospholipase A_2 freigesetzten Arachidonsäure über die Prostaglandinzyklase zu Prostaglandinen (PG) und über die 5-Lipoxygenase zu LT reagiert. Mengenmäßig übertrifft die LT-Synthese die PG-Synthese erheblich. Fieber und Schmerz können durch Prostaglandine ausgelöst werden. Die Gefäßerweiterung des Kapillarbettes wird unter anderem durch die Wirkung von Prostacyclin, 6-Keto-PGE $_1$, PGE $_1$, NO, LTC $_4$, LTD $_4$ und LTE $_4$ erklärt [54]. LTC $_4$, LTD $_4$ und LTE $_4$ entsprechen der sog. „slow reacting substance of anaphylaxis“. Die Chemotaxis der PMN wird unter anderem von LTB $_4$ stimuliert. Bis auf LTB $_4$ und LTD $_4$ [26] sind diese Entzündungsmediatoren bisher nicht bei CF-Patienten untersucht worden.

Da Entzündungsvorgänge mit erheblicher Zellschädigung einhergehen können, sind regulatorische Prozesse, die schadensbegrenzend sind und schnell auf die Situation reagieren können, von äußerster Wichtigkeit. Es überrascht daher nicht, dass der neutrophile Granulozyt seine unterschiedlichen Aktivitäten in Form von Feedback-Mechanismen selbst regulieren kann. So produziert er das für ihn selbst chemotaktisch wirkende LTB $_4$, welches über die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Granulozytenoberfläche die chemotaktischen und sekretori-

schen Wirkungen auslöst. Diese Wirkung wird jedoch durch die schnelle und fast vollständige Umwandlung von LTB₄ mittels ω -Oxidation in die inaktiven Metabolite 20-OH-LTB₄ und 20-COOH-LTB₄ von den neutrophilen Granulozyten zeitlich kontrolliert [126].

Zwischen Proteinasen und reaktiven Sauerstoffverbindungen bestehen vielfältige komplexe Beziehungen, die sowohl bei zellzerstörenden, als auch bei entzündungsregulierenden Vorgängen zu konzentrierten Interaktionen führen. Vor allem schwefelhaltige Proteine oder Aminosäuren sind gute Radikalakzeptoren und können von reaktiven Sauerstoffverbindungen entweder zu Sulfoxiden oder zu S-S-Brücken oxidiert werden. Methionin-Oxidation scheint ein weit verbreiteter Vorgang zu sein, der bei vielen regulatorischen Vorgängen eine Rolle zu spielen scheint [138]. Als proinflammatorisch wird in diesem Zusammenhang die MPO-katalysierte Oxidation des Methioninrestes (Met³⁵⁸) im aktiven Zentrum des Serinprotease-Inhibitors α 1PI angesehen, dessen inhibitorische Wirkung auf die PMN-Elastase damit 2000-fach abnimmt [68]. Sulfoxidiertes α 1-Antitrypsin ist bei Patienten mit verschiedenen chronischen Lungenerkrankungen in der Bronchiallavageflüssigkeit nachgewiesen worden [11], jedoch noch nicht bei CF.

Abschließend ist die Frage, ob im Zusammenspiel von Sauerstoffradikalen, die bei der Stimulation von Granulozyten oder Alveolarmakrophagen entstehen, mit dem ebenfalls aus Granulozyten freigesetzten Enzym MPO zell- und proteinschädigende Mechanismen auf die entzündete CF-Lunge einwirken, noch nicht mit letzter Sicherheit geklärt.

4.7.8

Zusammenfassung

Bakterielle Lungeninfektionen, hauptsächlich durch die opportunistisch pathogenen Mikroorganismen *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und *Pseudomonas aeruginosa* ausgelöst, bestimmen weitgehend die Prognose der CF-Patienten. Verschiedene Hypothesen versuchen die Ursachen der bakteriellen Kolonisation der CF-Atemwege zu erklären. Phänotypische Veränderungen der Bakterien in vivo tragen zu ihrer Persistenz bei, die chronische Entzündungsreaktionen nach sich zieht. Neutrophile Granulozyten dominieren in einem als Typ-III-Hypersensibilitätsreaktion charakterisierten Infektionsverlauf. Hauptsächlich lysosomale Proteinasen der Granulozyten werden für die Lungenzerstörung verantwortlich gemacht.

Literatur

Literatur zu 4.1

- Weibel E (1963) Morphometry of the human lung. Springer, Berlin Heidelberg New York
- App EM, King M, Helfesrieder R, Köhler D, Matthys H (1990) Acute and long term amiloride inhalation in cystic fibrosis lung disease. *Am Rev Respir Dis* 141:605–612
- King M, Gilboa A, Meyer FA, Silberberg A (1974) On the transport of mucus and its rheological simulants in ciliated systems. *Am Rev Respir Dis* 110:740–745
- Man SFP, Adams GK III, Proctor DF (1979) Effects of temperature, relative humidity, and mode of breathing on canine airway secretions. *J Appl Physiol* 46:205–210
- Williams R, Rankin N, Smith T, Galler D, Seakins P (1996) Relationship between the humidity and temperature of inspired gas and the function of the airway mucosa. *Crit Care Med* 24:1920–1929
- Wanner A (1977) Clinical aspects of mucociliary transport. *Am Rev Respir Dis* 116:73–125
- Giordano AM, Holsclaw D, Litt M (1978) Mucus rheology and mucociliary clearance: Normal physiological state. *Am Rev Respir Dis* 118:245–254
- Iravani J, Melville GN (1975) Wirkung von Pharmaka und Milieuänderungen auf die Flimmertätigkeit der Atemwege. *Respiration* 32:157–164
- Lucas AM, Douglas LC (1934) Principles underlying ciliary activity in the respiratory tract. II. A comparison of nasal clearance in man, monkey and other mammals. *Arch Otolaryngol* 20:518–541
- Schürch S, Gehr P, Im Hof V, Geiser M, Green F (1990) Surfactant displaces particles towards the epithelium in airways and alveoli. *Respir Physiol* 80:17–32
- Godleski JJ, Hastings CL, Katler M, Sweeney TD (1991) Preservation of the relationship of airway mucus and epithelium by slam freezing. Proceedings of the 49th Annual Meeting of the Electron Microscopy Society of America (EMSA), San Francisco Press, pp 72–73
- Asmundsson T, Kilburn KH (1970) Mucociliary clearance rates of various levels in dog lungs. *Am Rev Respir Dis* 102:388–397
- Leith DE (1977) Cough. In: Brain J, Proctor DF, Reid LM. *Respiratory defence mechanism, part 2*, New York, p 545
- Matthews LW, Spector S, Lemm J, Potter J (1963) Studies of pulmonary secretions. I. The overall composition of pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis and laryngectomy. *Am Rev Respir Dis* 88:199–204
- Welsh MJ, Ostedgaard LS (1998) Cystic fibrosis problem probed by proteolysis. *Nat Struct Biol* 5:167–169
- Knowles MR, Robinson JM, Wood RE, Pue CA, Mentz WM, Wager GC, Gatzky JT, Boucher RC (1997) Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. *J Clin Invest* 100:2588–2595
- Boat TF, Cheng PW, Iyer RN, Carlson DM, Polony I (1976) Human respiratory tract secretions: mucous glycoproteins of nonpurulent tracheobronchial secretions, and sputum of patients with bronchitis and cystic fibrosis. *Arch Biochem Biophys* 177:95–104
- Puchelle E, de Bentzmann S, Zahm JM (1995) Physical and functional properties of airway secretions in cystic fibrosis – therapeutic approaches. *Respiration* 62:2–12
- Vasconcellos CA, Allen PG, Wohl ME, Drazen JM, Janmey PA, Stossel TP (1994) Reduction in viscosity of cystic fibrosis sputum in vitro by gelsolin. *Science* 263:969–971

20. App EM, Wunderlich MO, Lohse P, King M, Matthys H (1999) Oszillierende Physiotherapie bei Bronchialerkrankungen – rheologischer und antientzündlicher Effekt. *Pneumologie* 53:348–359
21. King M, Brock G, Lundell C (1985) Clearance of mucus by simulated cough. *J Appl Physiol* 58: 1776–1782
22. King M (1987) Role of mucus viscoelasticity in cough clearance. *Biorheology* 24:589–597
23. App EM (1994) Sekretanalyse und Clearance. *Atemw Lungenkrankh* 20:363–371
24. Zahm JM, King M, Duvivier C, Pierrot D, Girod S, Puchelle E (1991) Role of simulated repetitive coughing in mucus clearance. *Eur Respir J* 4:311–315
25. Newhouse MT, Rossmann CM, Dolovich J, Dolovich MB, Wilson WM (1976) Impairment of mucociliary transport in cystic fibrosis. *Mod Probl Paediat* 19:190–198
26. Rutland J, Penketh A, Griffin WM, Hodson ME, Batten JC, Cole PJ (1983) Cystic fibrosis serum does not inhibit human ciliary beat frequency. *Am Rev Respir Dis* 128: 1030–1034
27. App EM (1996) Vergleichende Mukolytikatherapie. *Pneumologie* 50:845–853
28. Köhler D, App EM, Egelseder A, Matthys H (1986) Unterschiede in der mukoziliären und Hustenclearance bei chronischer Bronchitis mit und ohne Mukoviszidose. *Atemw Lungenkrankh* 12:358–361
29. Bauernfeind A, Bertele RM, Harms K, Hörl G, Jungwirth R, Petermüller C, Przyklenk B, Weisslein-Pfister C (1987) Qualitative und quantitative microbiological analysis of sputa of 102 patients with cystic fibrosis. *Infection* 15: 270–307
30. Bauernfeind A, Przyklenk B (1997) Microbiological background for anti-Pseudomonas aeruginosa vaccination in cystic fibrosis. *Behring Inst, Mitt* 98:256–261
31. Canciani M, Barlocco EG, Mastella G, de Santi MM, Gardi C, Lungarella G (1988) The saccharin method for testing mucociliary function in patients suspected of having primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol* 5:210–214
32. Lieberman J (1968) Measurement of sputum viscosity in a cone-plate viscometer. I. Characteristics of sputum viscosity. *Am Rev Respir Dis* 97:654–661
33. Behr J, Maier K, Degenkolb B, Krombach F, Vogelmeier C (1997) Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 156:1897–1901
34. Pavia D, Thomson ML, Clarke SW (1976) Enhanced clearance of secretions from the human lung after the administration of hypertonic saline aerosol. *Am Rev Respir Dis* 117:199–203
35. Riedler J, Reade T, Button B, Robertson CF (1996) Inhaled hypertonic saline increases sputum expectoration in cystic fibrosis. *J Paediatr Child Health* 32:48–50
36. Wills PJ, Hall RL, Chan WM, Cole PJ (1997) Sodium chloride increases the ciliary transportability of cystic fibrosis and bronchiectasis sputum on the mucus-depleted bovine trachea. *J Clin Invest* 99:9–13
37. Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL (1990) Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9188–9192
38. Shah PL, Scott SF, Knight RA, Marriott C, Ranasinha C, Hodson ME (1996) In vivo effects of recombinant human DNase I on sputum in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 51:119–125
39. Dasgupta B, Tomkiewicz RP, De Sanctis GT, Boyd WA, King M (1995) Mucoytic synergism in cystic fibrosis (CF) sputum with combined rhDNase and gelsolin treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 151:A19
40. DeSanctis GT, Tomkiewicz RP, Rubin BK, Schürch S, King M (1994) Exogenous surfactant enhances mucociliary clearance in the anaesthetized dog. *Eur Respir J* 7: 1616–1621
41. App EM, Kieselmann R, Reinhardt D, Lindemann H, Dasgupta B, King M, Brand P (1998) Sputum rheology changes in cystic fibrosis lung disease following two different types of physiotherapy – Flutter vs Autogenic Drainage. *Chest* 114:171–177
42. Ordemann J (1993) Randomisierte cross-over Untersuchung zur Wirksamkeit des VRP1 Desitin mittels Messung der mukoziliären und tussiven Clearance. Promotionsarbeit. Zentrum Innere Medizin Abteilung Pneumologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
43. Lindemann H (1992) Zum Stellenwert der Physiotherapie mit dem VRP 1-Desitin („Flutter“). *Pneumologie* 46: 626–630

Literatur zu 4.2

1. Agarwal M, King M, Rubin BK und Shukla JB (1989) Mucus transport in a miniaturized simulated cough machine: Effect of constriction and serous layer simulant. *Biorheology* 26:977–988
2. App EM und King M (1990) Tracheal mucus rheology and potential difference in two day old puppies. *Biorheology* 27:515–526
3. App EM, Helfesrieder R, Köhler D, Matthys H (1990) Acute and longterm amiloride inhalation in cystic fibrosis lung disease. *Am Rev Respir Dis* 141:605–612
4. App EM, Zayas JG, King M (1993) Rheology of mucus and transepithelial potential difference: small airways vs. trachea. *Eur Respir J* 6:67–75
5. App EM (1994) Sekretanalyse und Clearance. *Atemw Lungenkrankh* 20:363–371
6. App EM (1996) Vergleichende Mukolytikatherapie. *Pneumologie* 50:845–853
7. App EM, Tomkiewicz RP, Hahn HL, Engler H, Vergin H, King M (1998) The effect of Tasuldine, a bronchosecretolytic agent, on mucus rheology and clearability and the interaction with acetylcholine in ferrets. *Pulm Pharmacol* 10:271–276
8. Barnett B, Dulfano MJ (1970) Sputum viscoelasticity I: New methodology. *Am Rev Respir Dis* 101:773–776
9. Boat TF, Cheng PW, Iyer RN, Carlson DM, Polony I (1976) Human respiratory tract secretions: mucous glycoproteins of nonpurulent tracheobronchial secretions, and sputum of patients with bronchitis and cystic fibrosis. *Arch Biochem Biophys* 177:95–104
10. Braga PC (1988) Sinusoidal oscillation method. In: Braga PC, Allegra L (eds) *Methods in bronchial mucology*. Raven Press, New York, pp 63–71
11. Charman J, Reid L (1972) Sputum viscosity in chronic bronchitis, bronchiectasis, asthma and cystic fibrosis. *Biorheology* 9:185–199
12. Dasgupta B, Tomkiewicz RP, Boyd WA, Brown NE, King M (1995) Effects of combined treatment with rhDNase and airflow oscillations on spinnability of cystic fibrosis sputum in vitro. *Pediatr Pulmonol* 20:78–82
13. Davis SS, Dippy JE (1969) The rheological properties of sputum. *Biorheology* 6:11–21
14. Davis SS (1973) Rheological examination of sputum and saliva and the effect of drugs. In: Gabelnick HL, Litt M (eds) *Rheology of biological systems*. Charles C Thomas, Springfield, Ill, pp 158–194
15. Hwang SH, Litt M und Forsman WC (1969) Rheological properties of mucus. *Rheol Acta* 8:438–448

16. Jeanneret-Grosjean A, King M, Michoud MC, Lioté H, Amyot R (1988) Sampling technique and rheology of human bronchial mucus. *Am Rev Respir Dis* 137:707–710
17. Keal E, Reid L (1970) Méthodes d'étude des modifications de la sécrétion bronchique et de sa viscosité. *Poumon Coeur* 26:52–58
18. King M, Gilboa A, Meyer FA und Silberberg A (1974) On the transport of mucus and its rheological simulants in ciliated systems. *Am Rev Respir Dis* 110:740–745
19. King M (1979) Interrelation between mechanical properties of mucus and mucociliary transport: Effect of pharmacologic interventions. *Biorheology* 16:57–68
20. King M, El-Azab J, Phillips DM, Angus GE (1985) Antigen challenge and canine tracheal mucus. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 77:337–342
21. King M, Brock G, Lundell C (1985) Clearance of mucus by simulated cough. *J Appl Physiol* 58:1776–1782
22. King M, Brock G, Lundell C (1985) Clearance of mucus by simulated cough. *J Appl Physiol* 58:1776–1782
23. King M (1987) Role of mucus viscoelasticity in cough clearance. *Biorheology* 24:589–597
24. King M, Zahm JM, Pierrot D, Vaquez-Girod S, Puchelle E (1989) The role of mucus gel viscosity, spinability, and adhesive properties in clearance by simulated cough. *Biorheology* 26:737–745
25. Knowles MR, Church NL, Waltner WE, Yankaskas JR, Gilligan P, King M, Edwards LJ, Helms RW, Boucher R (1990) A pilot study of aerosolized amiloride for the treatment of cystic fibrosis lung disease. *N Engl J Med* 332:1189–1194
26. Litt M, Khan MA, Chakrin LW, Wardell JR, Christian P (1974) The viscoelasticity of fractionated canine tracheal mucus. *Biorheology* 11:111–117
27. Lopez-Vidriero MT, Das I, Smith AP, Picot R, Reid L (1977) Bronchial secretion from normal human airways after inhalation of prostaglandin P_{2a}; acetylcholine, histamine, and citric acid. *Thorax* 32:734–739
28. Lutz RJ, Litt M, Chakrin LW (1973) Physical-chemical factors in mucus rheology. In: Gabelnick HL, Litt M (eds) *Rheology of biological systems*. Charles C Thomas, Springfield, Ill, pp 158–194
29. Majima Y, Hirata K, Takeuchi K, Hattori M, Sakakura Y (1990) Effects of orally administered drugs on dynamic viscoelasticity of human nasal mucus. *Am Rev Respir Dis* 141:79–83
30. Mariott C, Richards JH (1974) Studies on the variation in the viscosity of bronchial mucus and a technique for reducing such variation. *Biorheology* 11:129–135
31. Puchelle E, Zahm JM, Havez R (1973) Données biochimiques et rhéologiques dans l'expectoration. III Relation des protéines et mucines bronchiques avec les propriétés. *Bull Physiopathol Respir* 9:237–256
32. Puchelle E, Tournier JM, Zahm JM, Sadoul P (1984) Rheology of sputum collected by a simple technique limiting salivary contamination. *J Lab Clin Med* 103:347–353
33. Puchelle E, Zahm JM, Duvivier C (1987) Spinability of bronchial mucus: Relationship with viscoelasticity and mucus transport properties. *Biorheology* 20:239–249
34. Roussel P, Degand P, Lamblin G, Laine A, Lafitte JJ (1978) Biochemical definition of human tracheobronchial mucus. *Lung* 154:241–260
35. Shih CK, Litt M, Khan MA, Wolf DP (1977) Effect of non-dialyzable solids concentration and viscoelasticity on ciliary transport of tracheal mucus. *Am Rev Respir Dis* 115:989–995
36. Spungin B, Silberberg A (1984) Stimulation of mucus secretion, ciliary activity, and transport in frog palate epithelium. *Am J Physiol* 247 (Cell Physiol 16):C299–C308
37. Sturgess J, Palfrey AJ, Reid L (1970) The viscosity of bronchial secretions. *Clin Sci* 38:145–156
38. Zahm JM, Puchelle E, Duvivier C, Didelon J (1986) Spinability of respiratory mucus. Validation of a new apparatus: The Filancemeter. *Bull Eur Physiopathol Respir* 22:609–613

Literatur zu 4.3.1

1. Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson J (1998a) Human beta-defensin 2 is a salt sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 102:874–880
2. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson J (1998b) The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has a broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9541–9546
3. Beppu Y, Imamura Y, Tashiro M, Towatari T, Ariga H, Kido H (1997) Human mucus protease inhibitor in airway fluids is a potential defensive compound against infection with Influenza A and sendai viruses. *J Biochem Tokyo* 121:309–316
4. Britigan B, Hayek M, Doebbeling B, Flick R (1993) Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the Pseudomonas infected lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* 61:5049–5055
5. Brogan T, Ryley H, Neale L, Yassa J (1975) Soluble proteins of bronchopulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, asthma, and bronchitis. *Thorax* 30:72–79
6. Crouch E (1998) Collectins and pulmonary host defense. *Am J Resp Cell Mol Biol* 19:177–210
7. Fisher A, Dodia C, Chander A (1994) Inhibition of lung calcium-independent phospholipase A2 by surfactant protein A. *Am J Physiol* 267:L335–L341
8. Gawels J, Runik J, Pryjma J, Zebrak J, Haluszka J, Rudnik I, Majewska-Zalewska H (1979) Proteins in bronchial secretion of children with chronic pulmonary diseases. *Scand J Resp Dis* 60:63–68
9. Goss K, Kumar A, Snyder J (1998) SP-A2 gene expression in human fetal lung airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:613–621
10. Griese M, Pudenz P, Gebhard W (1998) Inhibitors of Elastase in Airway Lavage Samples from Ventilated Preterm Human Neonates. *Am J Respir Crit Care Med* 158:256–262
11. Griese M (1999) Pulmonary surfactant in health and lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* 13:1455–1476
12. Griese M, Birrer P, Demirsoy A (1997a) Pulmonary surfactant in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 10:1983–1988
13. Griese M, Duroux A, Schams A, Lenz AG, Kleinasser N (1997b) Tracheobronchial surface active material in cystic fibrosis. *Eur J Med Res* 2:114–120
14. Griese M, Schredl M, Hochstrasser K, Gebhard W (1997c) Cellular association of antiproteases in lavages from ventilated preterm human neonates. *Am J Respir Crit Care Med* 155:2064–2071
15. Heczko P, Gutkowski P, Pulverer G (1977) Immunoglobulins A and G and lysozyme in the bronchial secretions of children with acute respiratory tract infections. *Z Erkrank Atemw Org* 147:168–170
16. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH (1996) Antibacterial activity of anti-leukoprotease. *Infect Immun* 64:4520–4524
17. Hughes W, Koblin B, Rosenstein B (1982) Lysozyme activity in cystic fibrosis. *Pediatr Res* 16:874–876
18. Hull J, South M, Phelan P, Grimwood K (1997) Surfactant composition in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 156:161–165

19. Jacquot J, Tournier J, Carmona T, Puchelle E, Chazalette J, Sadoul P (1983) Proteines des secretions bronchiques dans la mucoviscidose, Role de l'infection. *Bull Eur Physiopathol Respir* 19:453-458
20. Jin F, Nathan C, Radzioch D, Ding A (1998) Lipopolysaccharide-related stimuli induce expression of the secretory leukocyte protease inhibitor, a macrophage-derived lipopolysaccharide inhibitor. *Infect Immun* 66:2447-2452
21. Jin F, Nathan C, Radzioch D, Ding A (1997) Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell* 88: 417-426
22. Kim D, Fukuda T, Thompson B, Cockrill B, Hales C, von Bonventre J (1995) Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A2 activities are increased in human adult respiratory distress. *Am J Physiol* 269:L109-L118
23. Kronborg G, Shand G, Fomsgaard A, Højby N (1992) Lipopolysaccharide is present in immune complexes isolated from sputum in patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *APMIS* 100: 175-180
24. Mason R, Greene K, Voelker DR (1998) Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *Am J Physiol* 275:L1-L13
25. McElvaney N, Nakamura H, Birrer P, Hebert C, Wong W, Alphonso M, Baker J, Catalano M, Crystal RG (1992) Modulation of airway inflammation in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 90:1296-1301
26. McNeely T, Shugars D, Rosendahl M, Tucker C, Eisenberg S, Wahl S (1997) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by secretory leukocyte protease inhibitor occurs prior to viral reverse transcription. *Blood* 90: 1141-1149
27. Postle AD, Mander A, Reid KM, Wang JY, Wright S, Moustaki M, Warner J (1999) Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:90-98
28. Pryjma J, Herman T, Zebrak J, Gawels J, Herman S, Scislicki A (1985) Studies on bronchial secretion. The influence of inflammatory response and bacterial infection. *Ann Allergy* 54:60-64
29. Qu X-D, Lehrer R (1998) Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun* 66: 2791-2797
30. Rose F, Bailey K, Keyte J, Chan W, Greenwood D, Mahida Y (1998) Potential role of epithelial cell-derived histone H1 proteins in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract. *Infect Immun* 66:3255-3263
31. Saitoh H, Okayama H, Shimura S, Fushimi T, Masuda T, Shirato K (1998) Surfactant protein A2 gene expression by human airway submucosal gland cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:202-209
32. Samet J, Madden M, Fonteh A (1996) Characterization of a secretory phospholipase A2 in human bronchoalveolar lavage fluid. *Exp Lung Res* 22:299-315
33. Stelzner A, Groh A, Lehnert U (1988) Vergleichende Bronchialesekretuntersuchungen bei Kindern mit chronischen, nichttuberkulösen Lungenerkrankungen. *Allerg Immunol* 34:99-108
34. Stromatt S (1993) Secretory leukocyte protease inhibitor in cystic fibrosis. *Agents Act* 42:103-110
35. Thompson A, Bohling T, Payvandi F, Rennard S (1990) Lower respiratory tract lactoferrin and lysozyme arise primarily in the airways and are elevated in association with chronic bronchitis. *J Lab Clin Med* 115:148-158
36. Tomee J, Koeter G, Hiemstra P, Kaufman H (1998) Secretory leukocyte protease inhibitor: a native antimicrobial protein presenting a new therapeutic option? *Thorax* 53: 114-116
37. Tomita M, Takase M, Wakabayashi H, Bellamy W (1994) Antimicrobial peptides of lactoferrin. Lactoferrin: Structure and function. *Adv Exp Med Br* 357:209-218
38. Wahl S, Worley P, Jin W, McNeely T, Eisenberg S, Fasching C, Orenstein J, Janoff E (1997) Anatomic dissociation between HIV-1 and its endogenous inhibitor in mucosal tissues. *Am J Pathol* 150:1275-1284
39. Wright JR (1997) Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev* 77:931-961
40. Xu P, Hashimoto S, Miyazaki H, Asabe K, Shiraishi S, Suisi K (1998) Morphometric analysis of the immunohistochemical expression of clara cell 10-k-Da protein and surfactant apoproteins A and B in the developing bronchi and bronchioles of human fetuses and neonates. *Virchows Arch B* 432:17-25
41. Zebrak J, Herman T, Werys R, Pryjma J, Gawels J (1979) Proteins in bronchial secretion of children with chronic pulmonary diseases. II. Relation to bronchoscopic and bronchographic examination. *Scand J Respir Dis* 60:69-75

Literatur zu 4.3.2

1. Bals R, Goldman MJ, Wilson JM (1998) Mouse beta-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infect Immun* 66: 1225-1232
2. Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Banfa V, Zasloff M, Wilson JM (1998) Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 102:874-880
3. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM (1998) The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9541-9546
4. Bals R, Weiner D, Wilson J (1999) The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* 103: 303-307
5. Barra D, Simmaco M, Boman H (1998) Gen-encoded peptide antibiotics and innate immunity. *FEBS Lett* 430:130-134
6. Bensch KW, Raida M, Magert H-J, Schulz-Knappe P, Forssmann W-G (1995) hBD-1: a novel b-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 368:331-335
7. Boman H (1991) Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* 65:205-207
8. Boucher RC (1994) Human airway ion transport (part one). *Am J Respir Crit Care Med* 150:271-281
9. Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL, Bevins CL (1991) Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3952-3956
10. Fearon D, Locksley R (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272: 50-54
11. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stahle-Backdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH (1997) The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 272:15258-15263
12. Gallo R, Kim K, Bernfield M, Kozak C, Zanetti M, Merluzzi L, Gennaro R (1997) Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J Biol Chem* 272

13. Ganz T, Lehrer RI (1995) Defensins. *Pharmacol Ther* 66: 191–205
14. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM (1997) Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88:553–560
15. Grasemann H, Michler E, Wallot M, Ratjen F (1997) Decreased concentration of exhaled nitric oxide (NO) in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 24:173–177
16. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R (1996) The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem* 238:325–332
17. Hancock REW (1997) Peptide antibiotics. *Lancet* 349: 412–422
18. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroeder J-M (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387:861
19. Hiemstra P, van Wetering S, Stolk J (1998) Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. *Eur Respir J* 12:1200–1208
20. Huttner KM, Kozak CA, Bevins CL (1997) The mouse genome encodes a single homolog of the antimicrobial peptide human beta-defensin 1. *FEBS Lett* 413:45–49
21. Imundo L, Barasch J, Prince A, Al-Awqati Q (1995) Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *PNAS USA* 92:3019–3023
22. Jiang C, Finkbeiner W, Widdicombe J, McCray PJ, Miller S (1993) Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis. *Science* 262:424–427
23. Kelley T, Drumm M (1998) Inducible nitric oxide synthase expression is reduced in cystic fibrosis murine and human airway epithelial cells. *J Clin Invest* 102:1200–1207
24. Larrick J, Hirata M, Balint R, Lee J, Zhong J, Wright S (1995) Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 63:1291–1297
25. Lehrer R, Ganz T, Selsted M (1991) Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell*:229–230
26. Matsui H, Grubb B, Tarran R, Randall S, Gatzky J, Davis C, Boucher R (1999) Evidence for periciliary liquid layer depletion not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airway disease. *Cell* 95:1005–1015
27. Morrison GM, Davidson DJ, Kilanowski FM, Borthwick DW, Crook K, Maxwell AI, Govan JR, Dorin JR (1998) Mouse beta defensin-1 is a functional homolog of human beta defensin-1. *Mamm Genome* 9:453–457
28. Pier GB, Grout M, Saidi TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, Goldberg JB (1996) Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* 271:64–67
29. Popsueva A, Zinoveva M, Visser J, Zijlmans J, Fibbe W, Belyavsky A (1996) A novel murine cathelin-like protein expressed in bone marrow. *FEBS Lett* 391:5–8
30. Quinton P (1990) Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport. *FASEB J* 4:2709–2717
31. Schimdt H, Walter U (1994) NO at work. *Cell* 78:919–925
32. Singh G, Katyal S (1997) Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10). *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:141–143
33. Singh G, Katyal S, Brown W, Kennedy A, Singh U, Wong-Chong M (1990) Clara cell 10 kDa protein (CC10): comparison of structure and function to uteroglobin. *Biochem Biophys Acta* 1039:348–355
34. Singh P, Jia H, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway B, Greenberg E, Valore E, Welsh M, Ganz T, Tack B, McCray PJ (1998) Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14961–14966
35. Smith J, Travis S, Greenberg E, Welsh M (1996) Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85:229–236
36. Soong L, Ganz T, Ellison A, Caughey G (1997) Purification and characterization of defensins from cystic fibrosis sputum. *Inflamm Res* 46:98–102
37. Stolzenberg ED, Anderson GM, Ackermann MR, Whitlock RH, Zasloff M (1997) Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8686–8690
38. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D (1995) Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett* 374:1–5
39. Zasloff M (1991) Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 4:3–7

Literatur zu 4.4

1. Bentzmann D, Pierrot D, Fuchey C, Zahm JM, Morancais JL, Puchelle E (1993) Distearoyl phosphatidylglycerol liposomes improve surface and transport properties of CF mucus. *Eur Respir J* 6:1156–1161
2. Boncuk P, Kaser M, Yu Y, Taeusch HW (1997) Effects of cationic liposome-DNA complexes on pulmonary surfactant function in vitro and in vivo. *Lipids* 32:247–253
3. Creery W, Hashmi A, Hutchinson J, Singh R (1997) Surfactant therapy improves pulmonary function in infants with pneumocystis carinii pneumonia and acquired immunodeficiency syndrome. *Pediatr Pulmonol* 24:370–373
4. Enhorning C, Duffy LC, Welliver R (1995) Pulmonary surfactant maintains patency of conducting airways in the rat. *Am J Respir Crit Care Med* 151:554–556
5. Enhorning G, Holm BA (1993) Disruption of pulmonary surfactant's ability to maintain openness of a narrow tube. *J Appl Physiol* 74:2922–2927
6. Gehr P, Geiser M, Im Hof V, Schürch S, Waber U, Baumann M (1993) Surfactant and inhaled particles in the conducting airways: structural, stereological and biophysical aspects. *Microsc Res Tech* 26:423–436
7. Gehr P, Green F, Geiser M, Im H, Lee M, Schürch S (1996) Airway surfactant, a primary defense barrier: mechanical and immunological aspects. *J Aerosol Med* 9:163–181
8. Gehr P, Schürch S, Berthiaume Y, Im Hof V, Geiser M (1990) Particle retention in airways by surfactant. *J Aerosol Med* 3:27–43
9. Gilljam H, Andersson O, Ellin A, Robertson B, Strandvik B (1988) Composition and surface properties of the bronchial lipids in adult patients with cystic fibrosis. *Clin Chim Acta* 176:29–38
10. Gilljam H, Strandvik B, Ellin A, Wiman LG (1986) Increased mole fraction of arachidonic acid in bronchial phospholipids in patients with cystic fibrosis. *Scand J Clin Lab Invest* 46:511–518
11. Gradon L, Podgorski A, Sosnowski T (1996) Experimental and theoretical investigations of transport properties of DPPC monolayer. *J Aerosol Med* 9:357–367
12. Griese M (1999) Pulmonary surfactant in health and lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* 13:1455–1476
13. Griese M, Birrer P, Demirsoy A (1997a) Pulmonary surfactant in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 10:1983–1988
14. Griese M, Bufler P, Teller J, Reinhardt D (1997b) Nebulization of a bovine surfactant in cystic fibrosis: a pilot study. *Eur Respir J* 10:1989–1997
15. Griese M, Duroux A, Schams A, Lenz AG, Kleinasser N (1997c) Tracheobronchial surface active material in cystic fibrosis. *Eur J Med Res* 2:114–120
16. Heilmann P, Ferron G, Fuerst G, Moellenstadt S, Schumann G, Kreyling WG (1992) Effect of surfactant on airway mu-

- ciliary clearance function. *Eur Respir J* 5 (Suppl 15): 387s
17. Hull J, South M, Phelan P, Grimwood K (1997) Surfactant composition in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 156:161–165
 18. Kurashima K, Fujimura M, Tsujiura M, Matsuda T (1997) Effect of surfactant inhalation on allergic bronchoconstriction in guinea pigs. *Clin Exp Allergy* 27:337–342
 19. LeVine AM, Kurak K, Bruno MD, Stark J, Whitsett JA, Korfhagen TR (1998) Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:700–708
 20. Liu M, Wang L, Li E, Enhorning G (1991) Pulmonary surfactant will secure free airflow through a narrow tube. *J Appl Physiol* 71:742–748
 21. Liu M, Wang L, Li E, Enhorning G (1996) Pulmonary surfactant given prophylactically alleviates an asthma attack in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy* 26:270–275
 22. Macklem PT, Proctor DF, Hogg JC (1970) The stability of peripheral airways. *Respir Physiol* 8:191–203
 23. Nicholov R, Khoury A, Bruce A, DiCosmo F (1993) Interaction of ciprofloxacin loaded liposomes with *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Cells Materials* 3:321–326
 24. Outzen KE, Svane-Knudsen V (1993) Effect of surface-active substance on nasal mucociliary clearance time: A comparison of saccharin clearance time before and after the use of surface-active substance. *Rhinology* 31:155–157
 25. Postle AD, Mander A, Reid KM, Wang JY, Wright S, Moustaki M, Warner J (1999) Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:90–98
 26. Rubin BK, Ramirez O, King M (1992) Mucus rheology and transport in neonatal respiratory distress syndrome and the effect of surfactant therapy. *Chest* 101:1080–1085
 27. Rudnik J, Hanicka M, Pawelek J, Zembrak J, Majewska-Zalawska H, Sowinska E (1983) Pulmonary surfactant contents in bronchial secretion in children with chronic respiratory diseases estimated by physico-chemical methods. *Z Erkrank Atemw* 160:44–47
 28. Sahu S, Lynn WS (1977) Lipid composition of airways secretion from patients with asthma and patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 115:233–239
 29. De Sanctis GT, Tomkiewicz RP, Rubin BK, Schürch S, King M (1994) Exogenous surfactant enhances mucociliary clearance in the anaesthetized dog. *Eur Respir J* 7:1616–1621
 30. Van't Veen A, Mouton J, Gommers D, Kluytmans J, Dekkers P, Lachmann B (1995) Influence of pulmonary surfactant on in vitro bactericidal activities of amoxicillin, ceftazidime, and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1995:329–333
 31. Vos GD, Rijtema MN, Blanco CE (1996) Treatment of respiratory failure due to respiratory syncytial virus pneumonia with natural surfactant. *Pediatr Pulmonol* 22:412–415
 32. Wright JR (1997) Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev* 77:931–961
 - inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 20:63–70
 3. Berger M (1991) Inflammation in the lung in cystic fibrosis. A vicious cycle that does more harm than good? *Clin Rev Allergy* 9:119–142
 4. Birrer P, McElvaney NG, Rådeberg A, Wirz Sommer C, Liechti-Gallati S, Kraemer R, Hubbard R, Crystal RG (1994) Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 150:207–213
 5. Bruce MC, Poncz L, Klinger JD, Stern RC, Tomaszefski JF, Dearborn DG (1985) Biochemical and pathologic evidence for proteolytic destruction of lung connective tissue in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 132:529–535
 6. Döring G, Frank E, Boudier C, Herbert S, Fleischer B, Bellon G (1995) Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4 and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis. *J Immunol* 154:4842–4850
 7. Goldstein W, Doering G (1986) Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 134:49–56
 8. Griese M, Schredl M, Hochstrasser K, Gebhard W (1997) Cellular association of antiproteases in lavages from ventilated preterm human neonates. *Am J Respir Crit Care Med* 155:2064–2071
 9. Griese M, V Bredow C, Birrer P, Obermaier G (1999) Degradation of surfactant protein A and other BAL proteins in patients with cystic fibrosis. *Netherl J Med* 54:187, S71
 10. Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Flohé L (1990) Inhibitory characteristics and oxidation resistance of site-specific variants of recombinant human antileukoproteinase. *Bio-med Biochim Acta* 50:677–681
 11. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DWH (1995) Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 151:1075–1082
 12. Konstan MW, Hilliard KA, Norvell TM, Berger M (1994) Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 150:448–454
 13. Konstan MW, Berger M (1997) Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: Onset and etiology. *Pediatr Pulmonol* 24:137–142
 14. McElvaney N, Hubbard RC, Birrer P, Chernick MS, Caplan DB, Frank MM, Crystal RG (1991) Aerosol α_1 -antitrypsin treatment for cystic fibrosis. *Lancet* 337:392–394
 15. Nakamura H, Yoshimura K, McElvaney NG, Crystal RG (1992) Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest* 89:1478–1484
 16. O'Connor CM, Gaffney K, Keane J, Southey A, Byrne N, O'Mahoney S, Fitzgerald MX (1993) α_1 -Proteinase inhibitor, elastase activity, and lung disease severity in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 148:1665–1670
 17. O'Connor CM, Fitzgerald MX (1994) Matrix metalloproteinases and lung disease. *Thorax* 49:602–609
 18. Rees DD, Roger RA, Cooley J, Mandle RJ, Kenney DM, Remold-O'Donnell E (1999) Recombinant human monocyte/neutrophil elastase inhibitor protects rat lungs against injury from cystic fibrosis airway secretions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:69–78
 19. Richman-Eisenstat JB, Jorens PG, Hebert CA, Ueki I, Nadel JA (1993) Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am J Physiol* 264 (4 Pt 1):L413–L418

Literatur zu 4.5

1. Armstrong DS, Grimwood K, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Phelan PD (1995) Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. *BMJ* 310:1571–1572
2. Balough K, McCubbin M, Weinberger M, Smits W, Ahrens R, Fick R (1995) The relationship between infection and

20. Schalkwijk J, Wiedow O, Hirose S (1999) The trappin gene family: Proteins defined by an N-terminal transglutaminase substrate domain and a C-terminal four-disulfide-core. *Biochem J* 340:569–577
21. Schuster A, Ueki I, Nadel JA (1992) Neutrophil elastase stimulates tracheal submucosal gland secretion that is inhibited by ICI 200,355. *Am J Physiol* 262:L86–L91
22. Schuster A, Fahy JV, Ueki I, Nadel JA (1995) Cystic fibrosis sputum induces a secretory response from airway gland serous cells that can be prevented by neutrophil protease inhibitors. *Eur Respir J* 8:10–14
23. Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, Caughey GH (1990) Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Invest* 85:682–689
24. Tizzano EF, Buchwald M (1992) Cystic fibrosis: Beyond the gene to therapy. *J Pediatr* 120:337–349
25. Tosi MF, Zakem H, Berger M (1990) Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized *Pseudomonas* as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. *J Clin Invest* 86:300–308
26. Tournier JM, Jacquot J, Puchelle E, Bieth JG (1985) Evidence that *Pseudomonas* elastase does not inactivate the bronchial inhibitor in the presence of leukocyte elastase. *Am Rev Respir Dis* 132:524–528
27. Travis J, Fritz H (1991) Potential problems in designing elastase inhibitors for therapy. *Am Rev Respir Dis* 143:1412–1415
28. Vergnolle N, Hollenberg MD, Wallace JL (1999) Pro- and antiinflammatory actions of thrombin: a distinct role for proteinase activated receptor-1 (PAR1). *Br J Pharmacol* 126:1262–1269
29. Vogelmeier C, Hubbard RC, Fells GA, Schnebli HP, Thompson RC, Fritz H, Crystal RG (1991) Anti-neutrophil elastase defense of the normal human respiratory epithelial surface provided by the secretory leukoprotease inhibitor. *J Clin Invest* 87:482–488
30. Voynow JA, Young LR, Wang Y, Horger T, Rose MC, Fischer BM (1999) Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells. *Am J Physiol* 276:L835–L843
31. Witko-Sarsat V, Halbwachs-Mecarelli L, Schuster A, Nussbaum P, Ueki I, Canteloup S, Lenoir G, Descamps-Latscha B, Nadel JA (1999) Proteinase 3, a potent secretagogue in airways, is present in cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:729–736
8. Heffner JE, Repine JE (1989) Pulmonary strategies of anti-oxidant defense. *Am Rev Respir Dis* 140:531–554
9. Henson PM, Johnston RP (1987) Tissue injury in inflammation: oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest* 79:669–674
10. Van Klaveren RJ, Demedts M, Nemery B (1997) Cellular glutathione turnover in vitro, with emphasis on type II pneumocytes. *Eur Respir J* 10:1392–1400
11. Klebanoff SJ (1992) Oxygen metabolites from phagocytes. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R (eds) *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Raven Press, New York, pp 541–588
12. Lands LC, Grey V, Smountas AA, Kramer VG, McKenna D (1999) Lymphocyte glutathione levels in children with cystic fibrosis. *Chest* 116 (1):201–205
13. Linsdell P, Hanrahan JW (1998) Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol* 275 (Cell Physiol 44):C323–C326
14. Meyer KC, Zimmerman J (1993) Neutrophil mediators, *Pseudomonas*, and pulmonary dysfunction in cystic fibrosis. *J Lab Clin Med* 121:654–661
15. Range SP, Dunster C, Knox AJ, Kelly FJ (1999) Treatment of pulmonary exacerbations of cystic fibrosis leads to improved antioxidant status. *Eur Respir J* 13 (3):560–564
16. Rourm JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG (1993) Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* 75 (6):2419–2424
17. Rourm JH, Borok Z, McElvaney NG, Grimes GJ, Bokser AD, Buhl R, Crystal RG (1999) Glutathione aerosol suppresses lung epithelial surface inflammatory cell-derived oxidants in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* 87 (1):438–443
18. Swaim MW, Pizzo SV (1988) Methionine sulfoxide and the oxidative regulation of plasma proteinase inhibitors. *J Leukoc Biol* 43:365–379
19. Van der Vliet A, Eiserich JP, Marelich GP, Halliwell B, Cross CE (1997) Oxidative stress in cystic fibrosis: does it occur and does it matter? *Adv Pharmacol* 38:491–513
20. Weiss SJ (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320:365–376
21. Winkhofer-Roob BM (1994) Oxygen free radicals and antioxidants in cystic fibrosis: the concept of an oxidant-antioxidant imbalance. *Acta Paediatrica* 395 (Suppl):49–57
22. Winkhofer-Roob BM, Schlegel-Haueter SE, Khoschorur G, van't Hof MA, Suter S, Shmerling DH (1996) Neutrophil elastase/alpha 1-proteinase inhibitor complex levels decrease in plasma of cystic fibrosis patients during long-term oral beta-carotene supplementation. *Pediatr Res* (1):130–134
23. Winkhofer-Roob BM, Ellemunter H, Fruhwirth M, Schlegel-Haueter SE, Khoschorur G, van't Hof MA, Shmerling DH (1997) Plasma vitamin C concentrations in patients with cystic fibrosis: evidence of associations with lung inflammation. *Am J Clin Nutr* 65 (6):1858–1866
24. Winkhofer-Roob BM, Tiran B, Tuchschnid PE, van't Hof MA, Shmerling DH (1998) Effects of pancreatic enzyme preparations on erythrocyte glutathione peroxidase activities and plasma selenium concentrations in cystic fibrosis. *Free Radic Biol Med* 25 (2):242–249
25. Worlitzsch D, Herberth G, Ulrich M, Döring G (1998) Catalase, myeloperoxidase and hydrogen peroxide in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 11:377–383

Literatur zu 4.6

1. Brown RK, Wyatt H, Price JF, Kelly FJ (1996) Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress. *Eur Respir J* 9 (2):334–339
2. Cantin AM, Begin R (1991) Glutathione and inflammatory disorders of the lung. *Lung* 169:123–138
3. Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG (1987) Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol* 63:152–157
4. Crystal RG (1991) Oxidants and respiratory tract epithelial injury: pathogenesis and strategies for therapeutic intervention. *Am J Med* 91 (3c):39s–44s
5. Deneke SM, Fanburg BL (1989) Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 257:L163–L173
6. Doelman CJA, Bast A (1990) Oxygen radicals in lung pathology. *Free Radic Biol Med* 9:381–400
7. Döring G (1996) Mechanisms of airway inflammation in cystic fibrosis. *Pediatr Allergy Immunol* 7 (Suppl 9):63–66

Literatur zu 4.7

1. Abrahamson IS, Coffman RL (1995) Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 155:3955–3963

2. Abughali N, Berger M, Tosi MF (1994) Deficient total cell content of CR3 (CD 11b) in neonatal neutrophils. *Blood* 83:1086–1092
3. Anderson TR, Montie TC, Murphy MD, McCarthy VP (1989) *Pseudomonas aeruginosa* flagellar antibodies in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 27:2789–2793
4. Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Gutierrez JR, Hull J, Olinsky A, Phelan EM, Robertson CF, Phelan PD (1997) Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 156:1197–1204
5. Aronoff SC, Quinn Jr FJ, Stern RC (1991) Longitudinal serum IgG response to *Pseudomonas cepacia* surface antigens in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 11:289–293
6. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J (1988) The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J* 256:251–255
7. Banda MJ, Rice AG, Griffin GL, Senior RM (1988) Alpha I-proteinase inhibitor is a neutrophil chemoattractant after proteolytic inactivation by macrophage elastase. *J Biol Chem* 263:4481–4484
8. Barasch J, Kiss B, Prince A, Saiman L, Gruenert D, Al-Awqati Q (1991) Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* 352:70–73
9. Barnes PJ, Liew FY (1995) Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 16:128–130
10. Baumstark JS, Lee CT, Luby RJ (1977) Rapid inactivation of alpha₁-protease inhibitor (alpha₁-antitrypsin) by elastase. *Biochim Biophys Acta* 482:400–411
11. Behr J, Maier K, Krombach F, Adelman-Grill BC (1991) Pathogenic significance of reactive oxygen species in diffuse fibrosing alveolitis. *Am Rev Respir Dis* 144:146–150
12. Berger M (1990) Complement deficiency and neutrophil dysfunction as risk factors for bacterial infection in newborns and the role of granulocyte transfusion in therapy. *Rev Infect Dis* 12:S401–S409
13. Berger M, Norvell TM, Tosi MF, Emancipator SN, Konstan MW, Schreiber JR (1994) Tissue-specific Fc gamma and complement receptor expression by alveolar macrophages determines relative importance of IgG and complement in promoting phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pediatr Res* 35:68–77
14. Berger M, Sorensen RU, Tosi MF, Dearborn DG, Döring G (1989) Complement receptor expression on neutrophils at an inflammatory site, the *Pseudomonas*-infected lung in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 84:1302–1313
15. Biggar WD, Holmes B, Good RA (1971) Opsonic defect in patients with cystic fibrosis of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:1716–1719
16. Birrer P, McElvaney NG, Rudeberg A, Sommer CW, Liechti-Gallati S, Kraemer R, Hubbard R, Crystal RG (1994) Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 150:207–213
17. Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, Panuska JR, Hilliard JB, Berger M (1995) Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:257–261
18. Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, Berger M (1995) Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 152:2111–2118
19. Boucher RC, Stutts MJ, Knowles MR, Cantley L, Gatzky JT (1986) Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest* 78:1245–1252
20. Boucher JC, Yu H, Mudd MH, Deretic V (1997) Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect Immun* 65:3838–3846
21. Breuer R, Christensen TG, Niles RM, Stone PJ, Snider GL (1989) Human neutrophil elastase causes glycoconjugate release from the epithelial cell surface of hamster trachea in organ culture. *Am Rev Respir Dis* 139:779–782
22. Bruce MC, Poncz L, Klinger JD, Stern RC, Tomashefski Jr JF, Dearborn DG (1985) Biochemical and pathological evidence for proteolytic destruction of lung connective tissue in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 132:529–535
23. Cabral DA, Loh BA, Speert DP (1987) Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* resists nonopsonic phagocytosis by human neutrophils and macrophages. *Pediatr Res* 22:429–431
24. Christensen TG, Breuer R, Hornstra LJ, Lucey EC, Stone PJ, Snider GL (1987) An ultrastructural study of the response of hamster bronchial epithelium to human neutrophil elastase. *Exp Lung Res* 13:279–297
25. Cowan RG, Winnie GB (1993) Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG subclass titers in patients with cystic fibrosis: correlations with pulmonary function, neutrophil chemotaxis, and phagocytosis. *J Clin Immunol* 13:359–370
26. Cromwell O, Walport MJ, Morris HR, Taylor GW, Hodson HR, Batten J, Kay AB (1981) Identification of leukotrienes D and B in sputum from cystic fibrosis patients. *Lancet* 1:164–165
27. Cross CE, Halliwell B, Allen A (1984) Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *Lancet* 1:1328
28. Dai Y, Dean TP, Church MK, Warner JO, Shute JK (1994) Desensitisation of neutrophil responses by systemic interleukin 8 in cystic fibrosis. *Thorax* 49:867–871
29. Dasgupta M, Lam J, Dbring G, Harley F, Zuberbuhler P, Lam K, Reichert A, Costerton WJ, Dossetor JB (1987) Prognostic implications of circulating immune complexes and *Pseudomonas aeruginosa*-specific antibodies in cystic fibrosis. *J Clin Lab Immunol* 23:25–30
30. de Bentzmann S, Roger P, Dupuit F, Bajolet-Laudinat O, Fuchey C, Plotkowski MC, Puchelle E (1996) Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 64:1582–1588
31. de Bentzmann S, Roger P, Puchelle E (1996) *Pseudomonas aeruginosa* adherence to remodelling respiratory epithelium. *Eur Respir J* 9:2145–2150
32. Desrochers PE, Jeffry JJ, Weiß SJ (1991) Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) expresses serpinase activity. *J Clin Invest* 87:2258–2265
33. DiMango E, Zar HJ, Bryan R, Prince A (1995) Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest* 96:2204–2210
34. DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A (1998) Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 101:2598–2605
35. Dong YJ, Chao AC, Kouyama K, Hsu YP, Bocian RC, Moss RB, Gardner P (1995) Activation of CFTR chloride current by nitric oxide in human T lymphocytes. *EMBO J* 14:2700–2707
36. Döring G, Høiby N (1983) Longitudinal study of immune response to *Pseudomonas aeruginosa* antigens in cystic fibrosis. *Infect Immun* 42:197–201

37. Döring G, Goldstein W, Röhl W, Schiøtz PO, Høiby N, Botzenhart K (1985) Role of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzymes in lung infections of patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* 49:557–462
38. Döring G, Buhl V, Høiby N, Schiøtz PO, Botzenhart K (1984) Detection of proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in immune complexes isolated from the sputum of cystic fibrosis patients. *Acta Pathol Microbiol [C]* 92:307–311
39. Döring G, Obernesser HJ, Botzenhart K, Flehmig B, Høiby N, Hofmann A (1983) Proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Infect Dis* 147:744–750
40. Döring G (1989) Polymorphonuclear leukocyte elastase: its effects on the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Antibiot Chemother* 42:169–176
41. Döring G, Müller E (1989) Different sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and diphtheria toxin to enzymes from polymorphonuclear leukocytes. *Microb Pathog* 6:287–295
42. Döring G, Dauner HM (1988) Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in different rat lung infection models. *Am Rev Respir Dis* 138:1249–1253
43. Döring G, Krogh-Johansen H, Weidinger S, Høiby N (1994) Allotypes of alpha₁-antitrypsin in cystic fibrosis patients homozygous and heterozygous for delta 508. *Pediatr Pulmonol* 18:3–7
44. Döring G, Knight R, Bellon G (1994) Immunology of cystic fibrosis. In: Hodson ME, Geddes D (eds) *Cystic fibrosis*. Arnold, London, pp 109–140
45. Döring G, Frank F, Boudier C, Herbert S, Fleischer B, Bellon G (1995) Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4 and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis. *J Immunol* 154:4842–4850
46. Döring G (1994) The role of neutrophil elastase in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 150:S114–S117
47. Döring G, Goldstein W, Botzenhart K, Kharazmi A, Schiøtz PO, Høiby N, Dasgupta M (1986) Elastase from polymorphonuclear leukocytes – a regulatory enzyme in immune complex disease. *Clin Exp Immunol* 64:597–605
48. Dal Nogare AR, Toews GB, Pierce AK (1987) Increased salivary elastase precedes gram-negative bacillary colonization in postoperative patients. *Am Rev Respir Dis* 135:671–675
49. Dotsch J, Demirakca S, Terbrack HG, Huls G, Rascher W, Kuhl PG (1996) Airway nitric oxide in asthmatic children and patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 12:2537–2540
50. Eichler I, Joris L, Hsu YP, Van Wye J, Bram R, Moss R (1989) Nonopsonic antibodies in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 84:1294–1304
51. Ericsson-Hollings A, Granström M, Vasil ML, Wretling B, Strandvik B (1987) Prospective study of serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins in cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 25:1868–1874
52. Fick RB, Naegel GP, Squier SU, Wood RE, Gee BL, Reynolds HY (1984) Proteins of the cystic fibrosis respiratory tract. *J Clin Invest* 74:236–248
53. Fick Jr RB, Robbins RA, Squier SU, Schoderbek WE, Ruß WD (1986) Complement activation in cystic fibrosis respiratory fluids: in vivo and in vitro generation of C5a and chemotactic activity. *Pediatr Res* 20:1258–1268
54. Vane JR, Botting RM (1992) The role of chemical mediators released by the endothelium in the control of the cardiovascular system. *Int J Tissue React* 14:55–64
55. Fomsgaard A, Svenson M, Bendtzen K (1989) Auto-antibodies to tumor necrosis factor a in healthy humans and patients with inflammatory diseases and gram-negative bacterial infections. *Scand J Immunol* 30:219–223
56. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM (1997) Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88:553–560
57. Goldstein W, Döring G (1986) Lysosomal enzymes and proteinase inhibitors in the sputum of patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 134:49–56
58. Grasemann H, Michler E, Wallot M, Ratjen F (1997) Decreased concentration of exhaled nitric oxide (NO) in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 24:173–177
59. Greenberg DP, Stutman HR (1990) Infection and immunity to *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae*. In: Moss RB (ed) *Cystic fibrosis. Infection, immunopathology and host response*. Humana Press, Clifton, New Jersey, pp 75–86
60. Halliwell B, Gutteridge JM (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246:501–514
61. Hamilton RG (1987) Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. *Clin Chem* 33:1707–1725
62. Hancock REW, Movat ECA, Speert DP (1984) Quantitation and identification of antibodies to outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* in sera of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 149:220–226
63. Hannah S, Mecklenburgh K, Rahman I, Bellingan GJ, Greening A, Haslett C, Chilvers ER (1995). Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro. *FEBS Lett* 372:233–237
64. Høiby N, Olling S (1977) *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Acta Pathol Microbiol Scand [C]* 85:107–114
65. Hornick DB, Fick Jr RB (1990) The immunoglobulin G subclass composition of immune complexes in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 86:1285–1292
66. Imundo L, Barasch J, Prince A, Al-Awqati Q (1995) Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3019–30233
67. Johansen HK, Norgaard A, Andersen LP, Jensen P, Nielsen H, Høiby N (1995) Cross-reactive antigens shared by *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, and *Haemophilus influenzae* may cause false-positive titers of antibody to *H. pylori*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2:149–155
68. Johnson D, Travis J (1979) The oxidative inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor. Further evidence for methionine at the reactive center. *J Biol Chem* 254:4022
69. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW (1995) Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 151:1075–1082
70. Karnosinska B, Radomski MW, Duszyk M, Radomski A, Man SIT (1997) Nitric oxide activates chloride currents in human lung epithelial cells. *Am J Physiol* 272: L1098–L1104
71. Knutsen AP, Slavin RG (1990) Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. In: Moss RB (ed) *Cystic fibrosis. Infection, immunopathology and host response*. Humana Press, Clifton, New Jersey, pp 103–118
72. Koller DY, Urbanek R, Gotz M (1995) Increased degranulation of eosinophil and neutrophil granulocytes in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 152:629–633

73. Konstan MW, Hilliard KA, Norvell TM, Berger M (1994) Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 150:448–454
74. Krivan HC, Roberts DD, Ginsburg V (1988) Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence Gal NAcl-4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6157–6161
75. Kronberg G, Fomsgaard A, Galanos C, Freudenberg MA, Høiby N (1992) Antibody responses to lipid A, core and O sugars of the *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in chronically infected cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 330:1848–1855
76. Kronborg G (1995) Lipopolysaccharide (LPS), LPS-immune complexes and cytokines as inducers of pulmonary inflammation in patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *APMIS Suppl* 50:1–30
77. Kubiet M, Ramphal R (1995) Adhesion of nontypeable *Haemophilus influenzae* from blood and sputum to human tracheobronchial mucins and lactoferrin. *Infect Immun* 63:899–902
78. Lacy DE, Smith AW, Lambert PA, Peckham D, Stableforth DE, Smith EG, Desai M, Weller PH, Brown MR (1997) Serum IgG response to an outer membrane porin protein of *Burkholderia cepacia* in patients with cystic fibrosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 17:87–94
79. Langley SC, Brown RK, Kelly FJ (1993) Reduced free-radical-trapping capacity and altered plasma antioxidant status in cystic fibrosis. *Pediatr Res* 33:247–250
80. Learn DB, Brestel EP, Seethararna S (1987) Hypochlorite scavenging by *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *Infect Immun* 55:1813–1818
81. Lloyd-Still JD (1983) Pulmonary manifestations. In: Lloyd-Still JD (ed) *Textbook of cystic fibrosis*. John Wright, Boston, pp 165–198
82. Lo SK, Janakidevi K, Lai L, Malik ABI (1993) Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. *Am J Physiol* 264:L406–L412
83. Lundberg JO, Nordvall SL, Weitzberg E, Kollberg H, Alving K (1996) Exhaled nitric oxide in paediatric asthma and cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 75:323–326
84. MacCartney HW, Tschesche H (1980). Latent collagenase from human polymorphonuclear leucocytes and activation to collagenase by removal of an inhibitor. *FEBS Lett* 119:327–332
85. Mahadeva R, Stewart S, Bilton D, Lomas DA (1998) Alpha-1-antitrypsin deficiency alleles and severe cystic fibrosis lung disease. *Thorax* 53:1022–1024
86. Mathee K, Coifu O, Sternberg C, Lindum PW, Campbell JIA, Jensen P, Johnsen AH, Givskov M, Ohman DE, Molin S, Høiby N, Kharazmi A (1999) Muocid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 145:1349–1357
87. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC (1998) Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 5:1005–1015
88. Matthews WJ Jr, Williams M, Oliphant B, Geha R, Colton HR (1980) Hypogammaglobulinemia in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 302:245–249
89. McKenney D, Tibbetts KL, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Döring G, Lee JC, Goldmann DA, Pier GB (1999) Broadly-protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo expressed antigen. *Science* 284:1523–1527
90. Meng Q-H, Springall DR, Bishop AE, Morgan K, Evans TJ, Habib S, Gruenert DC, Hodson ME, Yacoub MH, Polak JM (1998) Lack of inducible nitric oxide synthase in bronchial epithelium: a possible mechanism of susceptibility to infection in cystic fibrosis. *J Pathol* 184:323–331
91. Meyer KC, Sharma A, Rosenthal NS, Peterson K, Brennan L (1997) Regional variability of lung inflammation in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 156:1536–1540
92. Meyer KC, Zimmerman J (1993) Neutrophil mediators, *Pseudomonas*, and pulmonary dysfunction in cystic fibrosis. *J Lab Clin Med* 121:654–661
93. Miller EJ, Nagao S, Carr FK, Noble JM, Cohen AB (1996) Interleukin-8 (IL-8) is a major neutrophil chemotaxin from human alveolar macrophages stimulated with staphylococcal enterotoxin A. *Inflamm Res* 45:386–392
94. Mizgerd JP, Kobzik L, Warner AE, Brain JD (1995) Effects of sodium concentration on human neutrophil bactericidal functions. *Am J Physiol* 269:L388–L393
95. Moldawer LL, Lowry SF (1988) Cachectin: its impact on metabolism and nutritional status. *Annu Rev Nutr* 8:585–609
96. Moncada S, Higgs EA (1991) Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 21:361–374
97. Moser C, Johansen HK, Song Z, Hougen HP, Rygaard J, Høiby N (1997) Chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is more severe in Th2 responding BALB/c mice compared to Th1 responding C3H/HeN mice. *APMIS* 105:838–842
98. Moss RB, Bocian RC, Hsu YP, Dong YJ, Kemna M, Wei T, Gardner P (1996) Reduced IL-10 secretion by CD4+ T lymphocytes expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Clin Exp Immunol* 106:374–388
99. Moss RB, Hsu YP, Lewiston NJ, Curd JG, Milgrom H, Hart S, Dyer B, Larrick JW (1986) Association of specific immune complexes, complement activation and antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide and exotoxin A with mortality in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 133:648–652
100. Nakamura H, Yoshimura K, McElvaney, Crystal RG (1992) Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest* 89:1478–1484
101. Nicolai T, Arleth S, Spaeth A, Bertele-Harms RM, Harms HK (1990) Correlation of IgE antibody titer to *Aspergillus fumigatus* with decreased lung function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 8:12–15
102. Noah TL, Black HR, Cheng PW, Wood RE, Leigh MW (1997) Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis. *J Infect Dis* 175:638–647
103. O'Connor CM, FitzGerald MX (1994) Matrix metalloproteinases and lung disease. *Thorax* 49:602–609
104. Palfreyman RW, Watson ML, Eden C, Smith AW (1997) Induction of biologically active interleukin-8 from lung epithelial cells by *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* products. *Infect Immun* 65:617–622
105. Pedersen SS, Espersen F, Høiby N, Jensen T (1990) Immunoglobulin A and immunoglobulin G antibody responses to alginates from *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 28:747–755
106. Pedersen SS, Espersen F, Høiby N (1987) Diagnosis of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 25:1830–1836

107. Perlmutter DH, Joslin G, Nelson P, Schasteen C, Adams SP, Fallon RJ (1990) Endocytosis and degradation of alpha₁-antitrypsin-protease complexes is mediated by the serpin-enzyme complex (SEC) receptor. *J Biol Chem* 265: 16713–16716
108. Pier GB, Saunders JM, Ames P, Edwards MS, Auerbach HS, Goldfarb J, Speert DP, Hurwitch S (1987) Opsonophagocytic killing antibody to *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in older noncolonized patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 317:793–798
109. Pier GB, Grout M, Zaidi TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, Goldberg JB (1996) Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* 271:64–67
110. Pier GB, Grout M, Zaidi TS (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12088–1209–33
111. Plotkowski MC, Chevillard M, Pierrot D, Altemayer D, Puchelle E (1992) Epithelial respiratory cells from cystic fibrosis patients do not possess specific *Pseudomonas aeruginosa*-adhesive properties. *J Med Microbiol* 36: 104–111
112. Plotkowski MC, Beck G, Tournier JM, Bernardo-Filho M, Marques EA, Puchelle E (1989) Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelium and the effect of leucocyte elastase. *J Med Microbiol* 30:285–293
113. Portal BC, Richard MJ, Faure HS, Hadjian AJ, Favier AE (1995). Altered antioxidant status and increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 61:843–847
114. Power C, O'Connor CM, Macfarlane D, O'Mahoney S, Gaffney K, Hayes J, Fitzgerald MX (1994) Neutrophil collagenase in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 150:818–822
115. Pressler T, Jensen ET, Espersen E, Pedersen SS, Hoiby N (1995) High levels of complement-activation capacity in sera from patients with cystic fibrosis correlate with high levels of IgG3 antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* antigens and poor lung function. *Pediatr Pulmonol* 20: 71–77
116. Regelmann WE, Siefferman CM, Herron JM, Elliott GR, Clawson CC, Gray BH (1995) Sputum peroxidase activity correlates with the severity of lung, disease in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 19:1–9
117. Rourn JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG (1993) Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* 75:2419–2424
118. Sajjan SU, Corey M, Karmali MA, Forstner JF (1992) Binding of *Pseudomonas cepacia* to normal human intestinal mucin and respiratory mucin from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 89:648–656
119. Salva PS, Doyle NA, Graham L, Eigen H, Doerschuk CM (1996) TNF-alpha, IL-8, soluble ICAM-1, and neutrophils in sputum of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* 21:11–19
120. Scharfman A, Kroczyński H, Carnoy C, Van Brussel E, Lamblin G, Ramphal R, Roussel P (1996) Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory mucins and expression of mucin-binding proteins are increased by limiting iron during growth. *Infect Immun* 64:5417–5420
121. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10:2247–2258
122. Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle PA (1992) Dithiocarbarnates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med* 175: 1181–1194
123. Schuster A, Csemok E, Johnston TW, Groß W (1997) Proteinase-3 in cystic fibrosis airways. *Am J Respir Crit Care Med* 155:A49
124. Schwab UE, Wold AE, Carson JL, Leigh MW, Cheng PW, Gilligan PH, Boat TF (1993) Increased adherence of *Staphylococcus aureus* from cystic fibrosis lungs to airway epithelial cells. *Am Rev Respir Dis* 148:365–369
125. Seksek O, Biwersi J, Verkman AS (1996) Evidence against defective trans-Golgi acidification in cystic fibrosis. *J Biol Chem* 271:15542–15548
126. Shak S, Goldstein IM (1984) Omega-oxidation is the major pathway for the catabolism of leukotriene B₄ in human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 259: 10181–10187
127. Shapira E, Wilson GB (1984) Immunological aspects of cystic fibrosis. CRC Press, Boca Raton, Florida
128. Simpson JA, Smith SE, Dean RT (1989) Scavenging by alginate of free radicals released by macrophages. *Free Radic Biol Med* 6:347–353
129. Skov M, Poulsen LK, Koch C (1999) Increased antigen-specific Th-2 response in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 27:74–79
130. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ (1996) Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85:229–233
131. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ (1996) Erratum. *Cell* 87:335
132. Sommerhof CP, Nadel JA, Basbaum CB, Caughey GH (1990) Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Invest* 85:682–689
133. Sordelli DO, Djafari M, Garcia VE, Fontan PA, Döring G (1992) Age-dependent pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in a mouse model: diminished migration of polymorphonuclear leukocytes to N-formyl-methionyl-leucylphenylalanine. *Infect Immun* 60: 1724–1727
134. Sorensen RU, Sern RC, Chase PA, Polmar SH (1981) Changes in lymphocyte reactivity to *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized cystic fibrosis patients. *Am Rev Respir Dis* 123:37–41
135. Steinkamp G, Drommer A, von der Hardt H (1993) Resting energy expenditure before and after treatment for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 57:685
136. Stone PJ, Konstan MW, Berger M, Dorkin HL, Franzblau C, Snider GL (1995) Elastin and collagen degradation products in urine of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 152:157–162
137. Suter S, Schaad UB, Roux L, Nydegger UE, Waldvogel FA (1984) Granulocyte neutral proteases and *Pseudomonas* elastase as possible causes of airway damage in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 149:523–531
138. Swaim MW, Pizzo SV (1988) Methionine sulfoxide and the oxidative regulation of plasma proteinase inhibitors. *J Leukoc Biol* 43:365–379
139. Teramoto S, Matsuse T, Ouchi Y (1997) Increased production of TNF-alpha may play a role in osteoporosis in cystic fibrosis patients. *Chest* 112:574
140. Thansekaraan V, Wiseman MS, Rayner RJ, Hiller EJ, Shale DJ (1989) *Pseudomonas aeruginosa* antibodies in blood spots from patients with cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 64:1599–1603
141. Thomassen MJ, Boxerbaum B, Demko CA, Kuchenbrod PJ, Dearborn DG, Wood RE (1979) Inhibitory effect of

- cystic fibrosis serum on *Pseudomonas* phagocytosis by rabbit and human alveolar macrophages. *Pediatr Res* 13: 1085–1088
142. Tosi MF, Zakem-Cloud H, Demko CA, Schreiber JR, Stern RC, Konstan MW, Berger M (1995) Cross-sectional and longitudinal studies of naturally occurring antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis indicate absence of antibody-mediated protection and decline in opsonic quality after infection. *J Infect Dis* 172: 453–461
143. Tosi MF, Zakem H, Berger M (1990) Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized *Pseudomonas* as well as CRI on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. *J Clin Invest* 86:300–308
144. Tsujimoto M, Yokota S, Vilcek J, Weissmann G (1986) Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 137:1094–1100
145. Ulrich M, Herbert S, Berger J, Bellon G, Louis D, Munker G, Döring G (1998) Localization of *Staphylococcus aureus* in infected airways of patients with cystic fibrosis and in a cell culture model of *S. aureus* adherence. *Am J Respir Crit Care Med* 18:1–9
146. Weiß SJ, Peppin GJ (1986) Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil. Characteristics, regulation and potential function in vivo. *Biochem Pharmacol* 35:3189–3197
147. Winnie GB, Cowan RG (1991) Respiratory tract colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: correlation between anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibody levels and pulmonary function. *Pediatr Pulmonol* 10: 92–100
148. Witko-Sarsat V, Delacourt C, Rabier D, Bardet J, Nguyen AT, Descamps-Latscha B (1995) Neutrophil-derived long-lived oxidants in cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 152:1910–1916
149. Witko-Sarsat V, Halbwachs-Mecarelli L, Schuster A, Nusbbaum P, Ueki I, Canteloup S, Lenoir G, Descamps-Latscha B, Nadel JA (1999) Proteinase 3, a potent secretagogue in airways, is present in cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:729–736
150. Worlitzsch D, Herberth G, Ulrich M, Döring G (1998) Catalase, myeloperoxidase and hydrogen peroxide in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 11:377–383
151. Zahm JM, Gaillard D, Dupuit F, Hinnrasky J, Porteous D, Dorin JR, Puchelle E (1997) Early alterations in airway mucociliary clearance and inflammation of the lamina propria in CF mice. *Am J Physiol* 272:C853–C859