

5. Diskussion

5.1 Standardisierung der AKO-Gewinnung

5.1.1 Abhängigkeit des AKO-Volumens von der Sammelzeit und dem insgesamt exhalierten Volumen

Während der Versuchsplanung wurde die Vorgabe eines insgesamt zu exhalierenden Volumens von 400 Litern als ein geeigneteres Standardisierungskriterium der AKO-Menge gegenüber dem Bezug zu einer festgelegten Sammeldauer bewertet. Da bei allen Kälbern zum jeweiligen Probennahmezeitpunkt das AKO-Gesamtvolumen bestimmt wurde, konnte die je Zeiteinheit und je 100 Liter Exhalat gewonnene AKO-Menge berechnet werden (Tab. A 14). Somit wurden die Volumina unabhängig von der Sammeldauer miteinander vergleichbar.

Die Abscheidung der Flüssigkeit des Exhalates kann dabei nicht als konstanter Vorgang betrachtet werden, da neben der technischen Apparatur sowohl beim Menschen als auch beim Tier die Bedeutung ventilatorischer Parameter beschrieben wurde (Scheideler et al., 1993, Reinhold et al., 1999, Rothe, 2001, Gessner et al., 2001, Hunt, 2002, Becher et al., 2003a,b, Gessner et al., 2001, Schack, 2002, Rothe et al., 2003b, McCafferty et al., 2004, Reinhold et al., 2006).

Mit Ausnahme der Atmungsfrequenz konnte für jeden der untersuchten ventilatorischen Parameter ein signifikanter Einfluss auf das AKO-Volumen nachgewiesen werden. Dabei waren für die je Minute und je 100 Liter Exhalat bestimmte Kondensatmenge gegensätzliche Beobachtungen auffällig (Tab. A 16). Die maximale expiratorische Atemstromstärke, das expiratorische Atemzugvolumen und das exhalierete Atemminutenvolumen korrelierten positiv mit der AKO-Abgabe je Minute. Bei steigender Tiefe und Stromstärke der Atmung war auch ein Anstieg der je Minute kondensierten Flüssigkeit nachweisbar. Dementsprechend konnte mit höheren Exhalatvolumina auch mehr AKO gewonnen werden, was mit Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen an Kälbern, Schweinen und Menschen übereinstimmt (Reinhold et al., 2000, Gessner et al., 2001, McCafferty et al., 2004, Reinhold et al., 2006).

Betrachtet man nun die je 100 Liter Exhalat abgeschiedene Flüssigkeit, so konnte mit steigendem expiratorischen Atemstrom, expiratorischem Atemzugvolumen (hier auch je kg/KM) eine geringere AKO-Menge gewonnen werden. Eine mögliche Erklärung könnte die kurze Passagedauer über der Kondenseroberfläche sein. Auch die Flüssigkeitssättigung des Exhalates selbst könnte sich dadurch vermindern. Turbulenzen innerhalb des Luftstromes würden zwar zu einer höheren Aerosolabgabe führen, die mit einem Anteil von 0,01 bis maximal 0,3 % aber nur in unbedeutendem Maße zur AKO-Volumenerhöhung beiträgt (Rothe, 2001, Effros et al., 2005). Dass das Atemzugvolumen mit der AKO-Menge je 100 l Exhalat negativ korrelierte, also bei flacherer Atmung mehr Flüssigkeit kondensierte, könnte durch eine höhere Atmungsfrequenz erklärt werden, für die dennoch kein direkter Einfluss nachweisbar war. Wie bereits für das Kalb beschrieben wurde, scheinen die leitenden Atemwege (Verhältnis Totraumventilation zum Atemzugvolumen) die Hauptquelle des AKO-Volumens zu sein (Reinhold et al., 2006). Im Gegensatz dazu konnte bei Menschen eine positive Abhängigkeit des expiratorischen Atemzugvolumens zur AKO-Menge je 100 l Exhalat gezeigt werden (McCafferty et al., 2004). Auch hier bestätigt sich die Annahme, dass diese Abhängigkeiten zusätzlich Spezies-spezifischen Besonderheiten unterliegen, wie vergleichende Untersuchungen zwischen Kälbern und Schweinen zeigen (Reinhold et al., 2006).

5.1.2 Abhängigkeit der AKO-Inhaltsstoffe von AKO-Volumen und Exhalat-Volumen

In der Literatur bestehen Hinweise, die eine Pneumonie-bedingte Zunahme des AKO- und damit auch des ASL-Volumens vermuten lassen, die zusätzlich mit dem Ausmaß der Entzündung korreliert (Anaev und Chuchalin, 2004). Daher erscheint es unmöglich, eine Mediator-Konzentration des Kondensates ohne die Verwendung eines geeigneten Verdünnungsparameters, zu beschreiben (Effros et al., 2005). Dieser sollte nicht volatil und hydrophob sein, in der Lunge weder gebildet noch metabolisiert werden sowie frei durch die alveolo-kapilläre Membran permeabel sein. Damit soll eine schnelle Einstellung des Gleichgewichtes in der ASL erfolgen, die idealerweise der des Plasmas entspricht. Als Vorschlag wurde die Elektrolyt-Konzentration [Summe aus Na^+ und K^+] unter der Annahme diskutiert, dass die in den Atemwegen sekretierte Flüssigkeit isotonische Eigenschaften besitzt (Effros et al., 2003a, 2005). Obwohl aber Kalium, Magnesium oder Kalzium höhere Konzentrationen im AKO als im Plasma aufwiesen und auch erkrankungsbedingt hyper-tonische Verhältnisse in der ASL zu vermuten waren, wurde die Gesamtkationen-Konzentration als der Verdünnungsparameter vorgeschlagen (Effros et al., 2003a). Diese kann, bestehend aus der Summe der 4 Elektrolyte abzüglich dem Hauptkation Ammonium, durch die Leitfähigkeit des Kondensates (da Korrelation zwischen Gesamtkationen-Konzentration und Leitfähigkeit) abgeleitet werden. Somit ist durch das Verhältniss zwischen der AKO-Leitfähigkeit und dem Plasma-Elektrolytgehalt, die Verdünnung der ASL nach folgender Gleichung zu berechnen (Effros et al., 2003a).

$$\text{Verdünnung (D)} = \frac{[\text{Natrium}]_{\text{Plasma}} + [\text{Kalium}]_{\text{Plasma}} + 2 [\text{Kalzium}]_{\text{Plasma}} + 2 [\text{Magnesium}]_{\text{Plasma}}}{[\text{Leitfähigkeit}]_{\text{AKO}}}$$

Die Verwendung des Harnstoffs als Verdünnungsmarker [$D_{\text{Harnstoff}}$] mag unter physiologischen Bedingungen mit der Bestimmung der Leitfähigkeit vergleichbar sein, da hier von einer isotonen ASL ausgegangen werden kann. Durch die pathologisch bedingte Dehydratation (Sekretion < Evaporation) und der damit verbundenen Aufkonzentrierung der ASL soll eine stärkere Rückdiffusion des Harnstoffs nachweisbar sein, die für die Elektrolyte nicht zu beobachten war. Demnach liegt auch $D_{\text{Harnstoff}}$ unter der mit Hilfe der Kationen oder der Leitfähigkeit ermittelten Verdünnungsrate und ist damit nicht anzuwenden. Weitere Nachteile sind die geringere und variabelere Plasma-Konzentration, die schwächere Korrelation zur Leitfähigkeit des Atemkondensates und die mögliche mikrobielle Ureaseproduktion. Weitere Marker könnten Creatinin oder Inulin darstellen, die aber eine sehr sensitive Bestimmung erfordern. Auch der Bezug auf den Gesamteiweiß-Gehalt wäre denkbar. Ein Nachteil ist hier eine vom Plasma abweichende Zusammensetzung und Menge (pulmonale Proteine). Spezifische Serumproteine, wie Albumin, unterliegen katabolischen Vorgängen in der ASL und sind daher ebenfalls ungeeignet. Die AUC (area under curve) der Summe aller UV-aktiven Substanzen könnte ebenfalls zur Normierung der AKO-Analyse dienen sowie die Bestimmung eines Quotienten zwischen 2 Substanzen, die einem ähnlichen Entstehungsmechanismus unterliegen (Neumann, 2001, Rothe, 2001).

Bisher steht damit kein geeigneter Verdünnungsmarker zur Standardisierung des AKO-Volumens zur Verfügung. Daher sind die innerhalb des Versuches gewonnenen Einzeldaten kritisch zu bewerten. Um die Konzentration der Mediatoren dennoch in einer von der Kondensatmenge und damit einer Atmungs-unabhängigen Maßeinheit vergleichen zu können,

wurde eine Berechnung der Konzentration in Bezug auf das Exhalat-Volumen vorgenommen (Kapitel 3.8.3) und sollte auch in weiterführenden Untersuchungen genutzt werden.

5.2 Interpretation der Inhaltsstoffe bezüglich ihrer biologischen Bedeutung

5.2.1 Proteine

Um die Eignung der exhalativen Gesamtprotein-Abgabe als Marker für entzündliche Vorgänge der Atemwege bei Kälbern feststellen zu können, wurde die Abscheidung im AKO unter physiologischen und pathologischen Bedingungen vergleichend untersucht.

Die Protein-Abgabe in das Exhalat erwies sich als unabhängig von Fütterung und Alter. Allerdings war ein signifikanter Einfluss des Atmungsmusters auf die Eiweiß-Konzentration im AKO nachweisbar (Tab. A 17). Während die Protein-Konzentration im AKO chronische Entzündungsvorgänge (*Chlamydia psittaci*) nicht widerspiegeln konnte, wiesen die Kälber mit einer experimentell induzierten *Mycoplasma-bovis*-Infektion eine signifikant niedrigere Protein-Konzentration je Milliliter AKO bzw. je 100 Liter Exhalat auf.

Die physiologische Gesamtprotein-Konzentration der 12 Kälber ohne Hinweise auf eine respiratorische Erkrankung lag zwischen 0,9 und 24,0 $\mu\text{g}/100\text{ l}$ Exhalat (Median: 2,6 $\mu\text{g}/100\text{ l}$, $n = 83$) (Abb. 7). Dabei konnte in 94 % der untersuchten Proben eine Gesamtprotein-Konzentration oberhalb der methodischen Nachweisgrenze bestimmt werden, die damit Ergebnissen vorangehender Untersuchungen an klinisch gesunden Kälbern (99 %) entsprach (Reinhold et al., 2006). Auch der von Reinhold et al. (2006) bestimmte Median der Protein-Konzentration von 3,0 μg je 100 Liter Exhalat ist mit unseren Ergebnissen vergleichbar. Im Gegensatz dazu könnten Spezies- oder Gewinnungs-spezifische Besonderheiten für die signifikant höhere Eiweiß-Konzentration (Median: 6,6 $\mu\text{g}/100\text{ l}$) bei den gesunden Schweinen verantwortlich sein (Reinhold et al., 2006).

In der Literatur wurde eine Altersabhängigkeit der Permeabilität der alveolo-kapillären Membran des Menschen und der Ratte für Proteine während der Entwicklung und Reifung der gesunden Lunge beschrieben (Goodman und Wangenstein, 1982, Folkesson et al., 1990). Dabei konnte in Abhängigkeit von der Molmasse verschiedener Proteine bei adulten Ratten eine höhere (Proteine mit 150 kDa), eine unveränderte (Proteine mit 67 kDa) oder auch eine niedrigere Passagerate (Proteine mit 1 kDa) beobachtet werden (Goodman et Wangenstein 1982). Parallel dazu war eine altersabhängige Änderung der Konzentration pulmonal gebildeter Proteine bei gleichzeitig unveränderter Gesamteiweiß-Konzentration innerhalb der ASL mittels BALF-Untersuchungen nachzuweisen (Ratjen et al., 1996). In vergleichenden Untersuchungen des Gesamtprotein-Gehaltes in der BALF lungengesunder Kinder der Altersklasse 3 - 15 Jahre waren dagegen keine signifikanten Unterschiede mehr feststellbar (Ratjen et al., 1996). Zusätzlich bestand unter entzündlichen Bedingungen ein erhöhter pneumonischer Plasmaproteinverlust bei Kindern gegenüber Erwachsenen in vergleichbaren klinischen Situationen (Ratjen et al., 1999). Die altersabhängige Änderung der Proteinabgabe im AKO während Pneumonien wurde bei den Kälbern der Untersuchungsabschnitte 2 und 3 nicht untersucht. Vergleichsdaten ausgewachsener Rinder stehen nicht zur Verfügung.

Direkte (BALF) oder indirekte (AKO) Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Nahrungsaufnahme auf die ASL wurden bisher weder bei Menschen noch bei Tieren vorgenommen. Für Proteine mit einem Molmasse von weniger als 200 kDa wurde eine Abhängig-

keit von deren Serum-Konzentration nachgewiesen (Bell et al., 1981, Kim und Malik, 2003). Damit wäre eine Fütterungsabhängigkeit denkbar, da dies auf Grund der vermuteten Limitierung der Größe des Aerosol-stämmigen Proteins im AKO auf 60 kDa, auf alle Eiweiße des Kondensates zutreffen würde.

Während unter physiologischen Bedingungen kein Einfluss der untersuchten ventilatorischen Parameter auf die Eiweiß-Konzentration je 100 l Exhalat und damit auf die Aerosol-entstehung bestätigt werden konnte, war die Protein-Konzentration pro ml AKO direkt von der maximalen expiratorischen Atmungsstromstärke, dem expiratorischen Atemzugvolumen und dem expiratorischen Atemminutenvolumen sowie der Atmungsfrequenz abhängig.

Je mehr AKO je Minute oder je 100 l Exhalat zu gewinnen war, desto mehr Protein [$\mu\text{g}/100 \text{ l}$] war nachweisbar. Die vermehrte alveoläre Belüftung während höherer Atemzugvolumina scheint damit die stärkere Bedeutung der peripheren gegenüber den leitenden Atemwegen für die Herkunft der AKO-Eiweisse widerzuspiegeln. Dies würde erklären, warum, bedingt durch die *Chlamydia-psittaci*-Infektion, trotz signifikant erhöhter Protein-Konzentration der ASL keine signifikant höhere Konzentration im AKO nachzuweisen war. Allerdings bestand nur im Untersuchungsabschnitt 2, neben der höheren Atmungsfrequenz, ein vermindertes Atemzugvolumen der Chlamydien-positiven Tiere (Tab. A 23 bis A 25). Das Atmungsmuster der *Mycoplasma-bovis*-positiven Kälber unterschied sich nicht von dem der Kontrolltiere, dennoch war im AKO der infizierten Tiere eine geringere Eiweiß-Konzentration zu verzeichnen (Tab. A 31 und A 34). Bei Untersuchungen gesunder menschlicher Probanden konnte eine Korrelation zwischen der Protein-Konzentration im AKO und dem Atemzug- oder dem Atemminutenvolumen nicht bestätigt werden (Mc Cafferty et al., 2004). Bei klinisch gesunden Kälbern und Schweinen konnte in früheren Versuchen auch für die Protein-Konzentration je 100 l Exhalat eine Abhängigkeit zum Atmungsmuster beobachtet werden (Reinhold et al., 2006). Während sich eine positive Korrelation der Protein-Konzentration je ml AKO zum expiratorischen Atemminutenvolumen und zur maximalen expiratorischen Atmungsstromstärke für beide Spezies bestätigte, bestand nur für die Kälber eine direkte Abhängigkeit zum expiratorischen Atemzugvolumen.

Neben einer auch unter physiologischen Bedingungen bestehenden bidirektionalen Permeabilität ist unter entzündlichen Einflüssen, nach Zerstörung der interzellulären tight junctions, eine erhöhte Proteinclearance und der Eiweiß-Abtransport durch die mucociliäre Clearance überlebenswichtig, da die Proteinanreicherung in der ASL die Oberflächenaktivität des Surfactant senken und demzufolge einen Kollaps der Alveolen auslösen würde (Folkesson et al., 1991, Hansson et al., 1992, Folkesson et al., 1996). Inflammatorische Lungenerkrankungen werden somit durch die gesteigerte bidirektionale Proteinpassage in Folge einer Permeabilitätserhöhung der alveolo-kapillären Membran charakterisiert (Doyle et al., 1997). Als Auslöser werden durch Entzündungszellen freigesetzte Mediatoren, z.B. das Stickstoffmonoxid, beschrieben (Bhalla et al., 1992, Li et al., 1995, Bernareggi et al., 1997, Li et al., 1998). Durch Sekretionsprodukte pulmonaler oder inflammatorischer Zellen, Proteinfreisetzung aus zerstörten Epithelien und den gesteigerten Plasmaproteineinstrom in die ASL während entzündlichen Vorgängen ist in der Literatur ein Anstieg der Protein-Konzentration auch im AKO, z.B. bei der COPD und dem Asthma des Menschen, nachweisbar (Gessner et al., 2001, Simpson et al., 2004) (Tab. 1). Eine signifikant höhere Eiweiß-Konzentration je 100 l Exhalat war für die *Chlamydia-psittaci*-tragenden Kälber des UA 2 nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnte im Untersuchungsabschnitt 3 bei der statistischen Auswertung aller *post infectionem* gewonnenen Proben der experimentell mit *Mycoplasma-bovis*-

infizierten Gruppe eine signifikant niedrigere Proteinabgabe je 100 Liter Exhalat beobachtet werden (Tab. A 34). Auf Grund eines zu geringen Stichprobenumfanges beschränkte sich die Auswertung hier auf den 3. bis 14. Tag *p.i.* Bezüglich der Protein-Abgabe je 100 l Exhalat sind in der Literatur keine vergleichbaren Untersuchungen beschrieben. Die BALF zeigt unter der Annahme, dass diese einen genaueren Überblick über die ASL ermöglicht, ein anderes Bild. Hier konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen des AKO eine signifikant höhere Gesamteiweiß-Konzentration in der *Chlamydia-psittaci*-belasteten Gruppe nachgewiesen werden. Die niedrigere Abscheidungsrate im Exhalat der *Mycoplasma-bovis*-infizierten Kälber schien ebenfalls nicht durch eine Änderung der ASL-Zusammensetzung bedingt zu sein, da ein Unterschied der Protein-Konzentration der broncho-alveolären Spülprobe nicht zu bestätigen war (Tab. A 33). Eine direkte Abhängigkeit zwischen der BALF und dem AKO konnte ebenso wie für die Kälber des Untersuchungsabschnittes 1, in vorangehenden Versuchen auch für klinisch gesunde Schweine nicht bewiesen werden (Reinhold et al., 2001c). Im Gegensatz dazu konnte bei Menschen (unbekannte BALF-Indikation) bezüglich der Protein-Konzentration als auch –Zusammensetzung ein Zusammenhang zwischen beiden Untersuchungsmedien gezeigt werden (Patocka et al., 1999). Als Ursache dieser widersprüchlichen Ergebnisse sind Spezies- oder Gewinnungs-spezifische Besonderheiten möglich. Vergleichende Studien bestätigen die Bedeutung einer standardisierten AKO als auch BALF-Probenentnahme (Papineni und Rosenthal, 1997). Eine genauere Untersuchung des Proteinmusters (z.B. Molmasse, Ladung) wurde aus Kostengründen nicht durchgeführt.

Da die Aerosolfraktion nur maximal 0,3 % (Rothe, 2001) zur gesamten Atemkondensat-Menge beiträgt, erscheint die Abhängigkeit der Protein-Konzentration vom AKO-Volumen hier von untergeordneter Bedeutung. Dies erklärt die zum Teil nur schwach ausgeprägte Korrelation der Protein-Konzentration zum gewonnenen AKO Volumen je Minute und je 100 Liter Exhalat (Tab. A 17). In der Literatur finden sich dazu gegensätzliche Aussagen. Bei Untersuchungen an menschlichen Probanden konnte ein Zusammenhang zwischen dem AKO-Volumen und der Protein-Konzentration nicht nachgewiesen werden (Müller et al., 2000), obwohl für gesunde Kälber und Schweine mit zunehmendem Volumen [ml/100 l] die Zunahme der Proteinabgabe je 100 Liter Exhalat sowie eine Abnahme in Bezug auf den ml AKO statistisch signifikant war (Reinhold et al., 2006).

Wie sich in unseren Untersuchungen bestätigte, könnte das unter entzündlichen Bedingungen veränderte Atmungsmuster der Tiere der entscheidende Faktor der Aerosol-entstehung und Proteinabgabe über das Exhalat darstellen. Die Mycoplasmen-Infizierung verursachte innerhalb des Untersuchungszeitraumes keine signifikante Änderung der BALF und damit der ASL-Protein-Konzentration. Da sich die untersuchten ventilatorischen Parameter nicht signifikant änderten, scheint die Atmung hier nicht für die niedrigere Protein-Anreicherung [$\mu\text{g/ml}$, $\mu\text{g}/100\text{ l}$] verantwortlich zu sein. Die Eiweiß-Bestimmung im Atemkondensat stellt somit für den Untersuchungsabschnitt 3 kein geeignetes diagnostisches Medium dar, um akute entzündliche Vorgänge innerhalb der ASL widerzuspiegeln.

Die Chlamydien-Infektion der Kälber scheint chronische Veränderungen in den Atemwegen verursacht zu haben, wie die Ergebnisse der BALF im Hinblick auf die ASL vermuten lassen. Auch wenn die Konzentration im AKO [je ml AKO, je 100 l Exhalat] auf keine signifikant höhere Proteinabgabe hindeutet, ist durch das niedrigere Atemzugvolumen der *Chlamydia-psittaci*-tragenden Kälber dennoch von einer erhöhten Protein-Exhalation auszugehen. Der Eiweiß-Gehalt in Bezug auf 100 l Exhalat bietet trotz der geringeren Abhängigkeit vom AKO-

Volumen keinen verlässlicheren Überblick über die Verhältnisse innerhalb der ASL. Die Proteinbestimmung im AKO kann insbesondere unter pathologischen Bedingungen nur im Zusammenhang mit dem Atemmuster interpretierbare Ergebnisse liefern. Die höhere Sensitivität der Gesamteiweiß-Bestimmung im AKO gegenüber der BALF, entzündliche Vorgänge der Atemwege widerzuspiegeln, konnte nicht bestätigt werden. Auch der AKO-Volumen unabhängige Bezug auf 100 Liter Exhalat stellte für beide Untersuchungsmodelle keine geeignetere Maßeinheit dar.

5.2.2 8-Isoprostan

Unter physiologischen Bedingungen konnte bei den Tieren des Untersuchungsabschnittes 1 eine Unabhängigkeit der 8-Isoprostan-Konzentration von der Atmung, dem Alter und der Fütterung nachgewiesen werden. Eine chronische Chlamydien-Infektion zeigte widersprüchliche Ergebnisse in AKO und BALF, während innerhalb der Mycoplasmen-tragenden Kälbergruppe in beiden Untersuchungsmedien kein signifikanter Unterschied [pg/ml AKO, pg/100 l, pg/ml BALF] auf die vermuteten akuten Entzündungsvorgänge hindeutete.

Innerhalb der klinisch gesunden Kälbergruppe lagen 86 % aller AKO-Proben oberhalb der methodischen Nachweisgrenze. Je 100 l Exhalat waren zwischen 2,7 und 50,7 pg 8-Isoprostan (Median: 8,3 pg/100 l, n = 72) nachweisbar (Abb. 9). Dies steht im Widerspruch zu Untersuchungen des Menschen, bei denen eine Bestimmung dieses Entzündungsmediators ausschließlich während entzündlichen Vorgängen der Atemwege gelang (Becher und Schlichthaar, 2003). Auch in vorangehenden Arbeiten an klinisch gesunden Kälbern (n = 6) lag die 8-Isoprostan-Konzentration in der Mehrheit aller Atemkondensatproben (n = 140/144) unterhalb der Nachweisgrenze von 3,9 pg/ml (Knobloch, 2006). Insofern ist bei den im Rahmen dieser Studie untersuchten Kälber davon auszugehen, dass selbst bei den klinisch unauffälligen Kälbern des Untersuchungsabschnittes 1 subklinische entzündliche Veränderungen oder aber ein erhöhtes Abwehrgeschehen vorgelegen haben könnte.

In der Literatur wird eine altersbedingte Zunahme der Radikalbildung und Lipidperoxidation beschrieben (Sohal et al., 1994, 1995, Meydani et al., 1995, Wang et al., 1995, Gabbita et al., 1997). Bei den Kälbern des Untersuchungsabschnittes 1 war kein Anstieg der 8-Isoprostan-Konzentration innerhalb der ersten 7 Lebensmonate nachweisbar. Vergleichbare Daten zur physiologischen 8-Isoprostan-Konzentration erwachsener Rinder existieren nicht. Im Kondensat gesunder menschlicher Probanden konnte eine Korrelation zum Alter der Versuchspersonen ebenfalls nicht bestätigt werden (Montuschi et al., 1999).

Innerhalb des Versuches konnte durch den Vergleich der unter nüchternen und gefütterten Bedingungen gewonnenen AKO-Proben keine Abhängigkeit von der Futteraufnahme nachgewiesen werden. Bei Menschen konnte ein zirkadianer Rhythmus der 8-Isoprostan-Bildung unter physiologischen Zuständen nicht gezeigt werden, was ebenfalls einen signifikanten Einfluss der Nahrungsaufnahme ausschliessen könnte (Wang et al., 1995, Helmersson und Basu, 1999). Allerdings bezogen sich die Untersuchungen hier auf die Exkretionsrate im Urin und betrachteten auch keinen 24-stündigen Zeitverlauf. Die Bedeutung der alimentären Zuführung exogener Antioxidantien oder die Radikalbildung induzierender Substanzen ist für den basalen 8-Isoprostanspiegel denkbar, würde aber unter pathologischen Zuständen in den Hintergrund treten.

Eine Abhängigkeit der 8-Isoprostan-Konzentration je ml AKO und auch je 100 l Exhalat von der Rektaltemperatur der Kälber bestand nicht. Auch bei Menschen konnte eine Korrelation

beider Parameter nicht nachgewiesen werden (Antczak und Gorski, 2003). Ebenso bestätigte sich auch die Unabhängigkeit von der Sammeldauer (Carpenter et al., 1998). Eine Korrelation zwischen den untersuchten ventilatorischen Kenngrößen und der Anreicherung je Milliliter AKO konnte nicht gezeigt werden. Mit steigender Flüssigkeitsabgabe je 100 l Exhalat nachweisbar (Tab. A 18), was durch den gemeinsamen Abgabemechanismus innerhalb der Dampfphase des Exhalates zu begründen ist. Dass bei der Abnahme der maximalen expiratorischen Atmungsstromstärke, des expiratorischen Atemzugvolumens, dem expiratorischen Atemminutenvolumen und der Atmungsfrequenz mehr AKO je 100 l zu gewinnen war, bestätigte auch die vermutete negative Abhängigkeit der Exhalationsrate des 8-Isoprostan gegenüber diesen Parametern. Beim Menschen konnte ein Einfluss des physiologischen expiratorischen Atemzug- und Atemminutenvolumens sowie der Atmungsfrequenz auf die Konzentration im AKO ebenfalls nicht gezeigt werden (Montuschi et al., 2003b). Andere Autoren bestätigen zusätzlich eine Unabhängigkeit der 8-Isoprostan-Konzentration im AKO von der maximalen expiratorischen Atmungsstromstärke und vermuten daher die Alveolarregion als Hauptquelle dieses flüchtigen Markers (Montuschi et al., 2003b). Eine Differenzierung zwischen lokaler Produktion und pulmonaler Exkretion, insbesondere unter entzündlichen Bedingungen ist damit erschwert. Auch in der Literatur bestehen Zweifel, ob die Anreicherung dieses volatilen Mediators im AKO auf lungenspezifische Vorgänge hindeuten kann (Carpenter et al., 1998).

Wie in Abb. 26 (S. 100) dargestellt, wird die Anreicherung freigesetzter Oxidantien (ROS) in der ASL unter physiologischen Bedingungen enzymatisch (SOD = Superoxiddismutase) limitiert. Die Entzündungszell-stämmigen Radikale stellen bei Überschreitung der SOD-Aktivität die Hauptinduktoren der pathologischen Lipidperoxidation und auch der RNS-Bildung dar. Durch den Einfluss der Mycoplasmen konnte eine signifikante Änderung der 8-Isoprostan-Konzentration im AKO nicht nachgewiesen werden (Tab. A 38 und A 39). Die Ergebnisse werden durch die Untersuchung der broncho-alveolären Spülflüssigkeit bestätigt, da auch hier kein Hinweis auf entzündliche Vorgänge innerhalb der ASL vorlag (Tab. A 33). Die *Chlamydia-psittaci*-positiven Kälber zeichneten sich dagegen durch eine niedrigere 8-Isoprostan-Konzentration im AKO aus (Tab. A 27). Im Gegensatz dazu war in deren BALF eine 3,7-fach höhere Konzentration nachweisbar (Abb. 23). Dies bestätigt für dieses Medium eine stärkere Sensibilität, die in keinem Zusammenhang zum AKO steht. Auf Grund der negativen Korrelation der 8-Isoprostan-Abgabe je 100 l Exhalat von der maximalen expiratorischen Atmungsstromstärke, dem expiratorischen Atemzug- und Atemminutenvolumen sowie der Atmungsfrequenz wäre bei den Tieren des UA 2 (*Chlamydia psittaci*) auch auf Grund der signifikant niedrigeren Atemzugvolumina ein Anstieg des je 100 l exhalieren 8-Isoprostan zu erwarten. Obwohl sich die 8-Isoprostan-Konzentration je 100 Liter Exhalat nicht signifikant unterschied, müsste dennoch von einer niedrigeren Abgabe ins Kondensat ausgegangen werden. Auch hier zeigt sich die Bedeutung einer parallelen Bestimmung der ventilatorischen Parameter und deren Einfluss auf den jeweils zu untersuchenden Mediator. Da bei jedem Kalb jeweils 400 l Exhalat gewonnen wurde, aber sowohl durch die *Chlamydia-psittaci*- als auch die *Mycoplasma-bovis*-Infektion (nicht signifikant) grössere AKO-Volumina [je 100 l] zu gewinnen waren, ist bei einer gesteigerten entzündlichen Lipidperoxidation auch eine geringere oder unveränderte AKO 8-Isoprostan-Konzentration denkbar, wenn man von einer parallelen Verdünnung der ASL und/oder des Kondensates ausgeht. In der Literatur wird ein entzündlich bedingter Anstieg der 8-Iso-

prostan-Konzentration im AKO beschrieben, z.B. bei der Mucoviscidose, der COPD, dem Asthma sowie der akuten Schädigung und Versagen der Lungenfunktion (Carpenter et al., 1997, 1998, Montuschi et al., 1999, 2000a,b) (Tab. 2). Sowohl durch die Bestimmung der Konzentration je ml AKO, als auch in Bezug auf 100 l Exhalat dieses Arachidonsäure-Metaboliten im AKO konnten diese Vermutungen nicht gestützt werden. Die vergleichende Untersuchung der BALF der *Chlamydia-psittaci*-, nicht aber der *Mycoplasma-bovis*-positiven Kälber deutete hier auf eine höhere Anreicherung in der ASL. In unseren Untersuchungen stellte sich aber weder die Bestimmung der AKO-Konzentration je ml AKO noch je 100 l Exhalat als geeignet heraus, diese chronischen Atemwegsveränderungen anzuzeigen. Dennoch bestätigen diese Ergebnisse die Eignung des 8-Isoprostan als Entzündungsmediator.

5.2.3 Leukotrien B₄

Auf die Bestimmung der Leukotrien-B₄-Konzentration wurde innerhalb der Untersuchungsabschnitte 1 und 2 aus Kostengründen verzichtet. Um den Einfluss der Mycoplasmen-Infizierung auf die Kälber des Untersuchungsabschnittes 3 zu prüfen, wurden Ergebnisse des AKO und der broncho-alveolär gewonnenen Flüssigkeit ausgewertet. Eine Beschreibung der Abhängigkeit von den physiologischen Einflüssen der ventilatorischen Kenngrößen, des Alters und der Fütterung wurde daher nicht durchgeführt. Wie in Tab. A 35 dargestellt, schwankte die physiologische LTB₄-Konzentration je 100 l Exhalat im AKO der *Mycoplasma-bovis*-freien Kälber des Untersuchungsabschnittes 3 zwischen 3,6 und 11,6 pg/100 Liter Exhalat (Median: 4,4 pg/100 l) und ist mit den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen vergleichbar (Knobloch, 2006).

Eine altersabhängige Steigerung der metabolischen Aktivität der 5-Lipoxygenase und auch der Expression des 5-Lipoxygenase-aktivierenden Proteins (FLAP) in bovinen Alveolar-makrophagen war *in vitro* nachweisbar (Lu et al., 1996). Ein direkter Einfluss des Alters oder der Nahrungsaufnahme auf die LTB₄-Konzentration im AKO wurde bisher weder bei Menschen noch bei Tieren untersucht. Angaben bezüglich der Bedeutung ventilatorischer Parameter beschränken sich in der Literatur auf Untersuchungen gesunder Nichtraucher, in denen eine Abhängigkeit der Leukotrien B₄-Konzentration im AKO vom Atemzugvolumen nicht nachgewiesen werden konnte (Hofer et al., 2001). Auch bei experimentell mit *Pasteurella multocida* infizierten Kälbern (n = 7) zeigte sich die Unabhängigkeit vom Atemzugvolumen und von der Atmungsfrequenz (Reinhold et al., 1999). Dennoch könnten bei diesem flüchtigen Arachidonsäure-stämmigen Metaboliten bedingt durch parallele Abgabemechanismen auch 8-Isoprostan-ähnliche Abhängigkeiten von ventilatorischen Kenngrößen erwartet werden.

Durch den Einfluss der *Mycoplasma-bovis*-Infizierung konnte eine signifikant höhere LTB₄-Abscheidung je 100 Liter Exhalat nachgewiesen werden. Da die Untersuchung der BALF keinen Hinweis auf eine entzündlich bedingte höhere Konzentration innerhalb der ASL lieferte, könnte bei diesem flüchtigen Mediator allein die Ventilation für die stärkere Anreicherung im kondensierten Exhalat verantwortlich zu sein. Möglicherweise könnte auch eine höhere Sensitivität des Atemkondensates bestehen, noch vor dem Nachweis signifikanter Änderungen dieses flüchtigen Markers innerhalb der ASL mit Hilfe der BALF, akute Entzündungsvorgänge anzuzeigen. Dennoch wurden bei der Gegenüberstellung der Leukotrien B₄-Konzentration der *Mycoplasma-bovis*-infizierten Kälber mit bekannten Ergebnissen lungenkranker Kälber, Pferde und Hunde die hier bestimmten sehr niedrigen Konzentrationen nahe der methodischen Bestimmungsgrenze deutlich (Tab. 3). Als Ursachen dafür

wäre die inter-individuelle Variabilität der Kälber oder der Leukotrien-Nachweis selbst denkbar (Reinhold et al., 2000, Montuschi et al., 2003c). Die Bestimmung der Leukotrien B₄-Konzentration je 100 l Exhalat lieferte sensiblere Ergebnisse als die Untersuchungen der Konzentration pro ml AKO und in der BALF (Tab. A 33 und A 35). Damit konnte die exhalative Abgabe dieses Arachidonsäure-Metaboliten auf *Mycoplasma-bovis*-bedingte entzündliche Vorgänge innerhalb der Atemwege hinweisen, noch bevor Konzentrationsänderungen der ASL mittels BALF sichtbar waren. Die Bestimmung der LTB₄-Konzentration je 100 l Exhalat kann damit, im Gegensatz zur Angabe in Bezug auf das AKO-Volumen als ein geeigneter Marker für akute entzündliche Abläufe der Atemwege im AKO bezeichnet werden.

5.2.4 Nitrit

Trotz widersprüchlicher Meinungen in der Literatur in Bezug auf die eigentliche Quelle des AKO-Nitrit sollte seine Eignung als Entzündungsmediator überprüft werden. Als physiologische Einflussfaktoren konnten, mit Ausnahme der Fütterung, des Alters und der Atmungsfrequenz, alle weiteren untersuchten ventilatorischen Parameter bestätigt werden. Weder bei den *Chlamydia-psittaci*- noch den *Mycoplasma-bovis*-positiven Kälbern wurde eine höhere Nitrit-Konzentration als bei den entsprechenden Kontrolltieren (gilt sowohl mit Bezug auf ml AKO als auch auf 100 l Exhalat) beobachtet.

In der Literatur wurde bisher weder bei Tieren noch Menschen eine Altersabhängigkeit der Nitritabgabe über das Atemkondensat untersucht. Bei den klinisch gesunden Kälbern war über den 7 monatigen Untersuchungszeitraum keine altersbedingte Änderung des Nitrit-Gehaltes zu beobachten. Ungeachtet der exogenen und endogenen Kontaminationsquellen konnte unter der Annahme, dass Nitrit als ein Marker der NOS-Isoenzymaktivität gilt (Ho et al., 1998), beim Menschen eine altersbedingte Änderung des Stickstoffmonoxid-Gehaltes im Exhalat weder bei klinisch gesunden noch bei asthmatischen Patienten nachgewiesen werden (Yurdakul et al., 2000). Untersuchungen an Kindern ließen hingegen eine altersabhängige NO-Abgabe vermuten (Franklin et al., 1999, 2006, Latzin, 2003). Zusätzlich wurde dabei zwischen der konstanten alveolären und der altersbedingt ansteigenden bronchialen Stickstoffmonoxid-Abgabe, die durch die Zunahme der Lungenvolumina während des Wachstums begründet sein soll, unterschieden (Franklin et al., 1999, Phillip et al., 2002). Auch ist ein entwicklungsbedingter Einfluss auf die basale Stickstoffmonoxid-Produktion denkbar, der durch den Aktivierungszustand des Immunsystems sehr junger oder alter Tiere bedingt sein könnte. Neueste Untersuchungen konnten dagegen einen altersbedingten Abfall der NO-Exhalation nachweisen (Franklin et al., 2006). Für Nitrosothiole hingegen, die sensiblere Inflammationsmarker als das exhalierete Stickstoffmonoxid selbst darstellen, konnte weder bei Gesunden noch Lungenkranken ein Einfluss des Alters nachgewiesen werden (Corradi et al., 2001). Eine mögliche Abhängigkeit der AKO-Nitrit-Konzentration je ml AKO von der Fütterung konnte bei klinisch gesunden Schweinen nicht nachgewiesen werden (Reinhold et al., 2004b). Dies bestätigte sich in der Untersuchung der 12 klinisch gesunden Kälber, auch wenn die Tiere nicht als völlig nüchtern angesehen werden können (Heu *ad libitum*). Die Aufnahme nitratreicher Nahrung soll die Nitrit- und auch die Stickstoffmonoxid-Exhalation beim Menschen erhöhen, da neben einer mikrobiellen auch eine Magensäure-abhängige Nitrit-Reduktion vermutet wird (Olin et al., 2001). Das Ausmaß der Nitrit-Bildung im Speichel soll dabei von der aufgenommenen Nitrat-Menge und der oralen Mikroflora abhängig sein (Tannenbaum et al., 1976). Für die klinisch gesunden

Kälber konnte mit zunehmender maximaler expiratorischer Atmungsstromstärke, sowie mit steigendem expiratorischen Atemzug- und Atemminutenvolumen eine geringere Nitrit-Konzentration je 100 l Exhalat und eine niedrigere Konzentration je Milliliter AKO nachgewiesen werden (Tab. A 19). Die negative Abhängigkeit der je ml AKO bestimmten Nitrit-Konzentration zur Atemtiefe wäre zwar unter der Annahme, dass das Aerosol hauptsächlich dem Alveolarraum entstammt nicht zu erwarten, dennoch scheint die Abhängigkeit von den ventilatorischen Parametern auf eine geringe Bedeutung der exogenen Kontamination hinzuweisen. Auch ist infolge der nasalen Atmung der von uns untersuchten Tiere nur eine schwache orale mikrobielle Nitritanreicherung zu vermuten. Bei klinisch gesunden Schweinen konnte einerseits die Abhängigkeit der Nitritkonzentration im AKO von der Atmungsfrequenz bestätigt werden, der Einfluss zu weiteren expiratorischen Atmungsparametern (maximale Atmungsstromstärke, Atemzug- und Minutenvolumen) wurde dagegen nicht belegt (Reinhold et al., 2004b). Da die Tiere sediert und in einer Hängematte fixiert waren, sind jedoch diese Ergebnisse nur bedingt mit anderen Untersuchungsmethoden vergleichbar. Die Sammelzeit könnte die Stickstoffmonoxid-Abgabe in die ASL durch die Dauer der Kompression der alveolären Epithelien ebenso wie durch die Apoptose-induzierende Streckung der Zellen, beeinflussen (Edwards et al., 2000, Gessner et al., 2003a). Aber auch bei spontan atmenden menschlichen Probanden bestand keine Korrelation zum expiratorischen Atemzug- oder Atemminutenvolumen (Mc Cafferty et al., 2004).

Die auf 100 Liter Exhalat bezogene Nitrit-Konzentration der Kälber des Untersuchungsabschnittes 1 lag zwischen 0,5 und 5,4 $\mu\text{M}/100\text{ l}$ (Median: 1,4 $\mu\text{M}/100\text{ l}$, $n = 84$). Dabei konnten in allen untersuchten Proben Konzentrationen oberhalb der methodischen Nachweisgrenze bestimmt werden (Abb. 11). Im Vergleich zu aus der Literatur bekannten Daten fällt hier ein größerer Streubereich der Messwerte auf. Auch liegt der Median der Nitrit-Konzentration (je 100 l Exhalat) oberhalb der bei 6 klinisch gesunden Kälbern bestimmten Ergebnisse (Knobloch, 2006).

Auch wenn bisher eine Abhängigkeit zwischen der Nitrit-Konzentration des Atemkondensates und dem NO-Gehalt des Exhalates mit Ausnahme einer Publikation (Horváth et al., 1997) nicht nachzuweisen war (Ho et al., 1998, Balint et al., 2000b, Horváth et al., 2002, Csoma et al., 2001a, Latzin, 2003, Geldmacher et al., 2004, Zetterquist et al., 2004, Horak et al., 2004, Ojoo et al., 2005 ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$)), wird im internationalen Schrifttum Nitrit als ein Marker für entzündliche Veränderungen der Atemwege bezeichnet (Hunt et al., 1995, Jang et al., 1999, Wood et al., 1999). Der Abbau des Nitrit unter entzündlichen Bedingungen könnte aber auch eine verminderte Anreicherung in der ASL erwarten lassen (Abb. 5). Die NO (Stickstoffmonoxid) und ONOO⁻ (Peroxynitrit) abhängige Natriumabsorptionshemmung (Guo et al., 1998), die unter inflammatorischen Bedingungen eine verminderte Flüssigkeitsreabsorption in den Atemwegen verursacht, würde eine erhöhte ASL-Nitrit-Konzentration überdecken. Weitere Untersuchungen über den Einfluss eines erhöhten Volumens der Flüssigkeitsschicht der Atemwege auf das Verhältniss zwischen der Aerosolbildung (Nitritabgabe) und dem wasserdampfabhängig entstandenen AKO-Volumen wären auch hier erforderlich. Die broncho-alveoläre Spülflüssigkeit lieferte bei den *Chlamydia-psittaci*-positiven Kälbern den Hinweis auf einen signifikant erniedrigten Nitrit-Gehalt der ASL, der sich durch die Nitrit-Konzentration im AKO nicht widerspiegelte (Tab. A 29 und A 30). Die vermutete NO-abhängige Zunahme des ASL-Volumens könnte dabei für ein möglicherweise falsch-niedriges Ergebniss verantwortlich sein. Auch durch die Berechnung der Nitrit-

Konzentration je 100 l Exhalat wäre dies nicht zu differenzieren. Der Einfluss des niedrigeren Atemzugvolumens könnte auf Grund der negativen Abhängigkeit zum AKO-Nitrit [$\mu\text{M/l}$, $\mu\text{M}/100\text{ l}$] dennoch die höhere Abscheiderate über das Exhalat verursacht haben und damit die Befunde des AKO und der BALF erklären.

Die *Mycoplasma-ovis*-Infizierung beeinflusste dagegen weder die Nitrit-Konzentration pro ml AKO noch die pro 100 l kondensierten Exhalates (Tab. A 38 und A 39). Auch die Untersuchung der BALF lieferte keinen Hinweis auf eine Nitrit-Anreicherung in der ASL (Tab. A 33).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das kondensierte Exhalat, ohne die Untersuchung zusätzlicher Stickstoffmonoxid-Umwandlungsprodukte keine Beurteilung der vermuteten Entzündungsvorgänge innerhalb der ASL erlaubt (Abb. 5). Die ventilatorischen Veränderungen innerhalb der *Chlamydia-psittaci*-tragenden Kälbergruppe könnten die widersprüchlichen Untersuchungsergebnisse zwischen dem AKO und der BALF erklären. Damit bestätigt sich auch hier die Bedeutung der parallelen Dokumentation der Atmungsparameter, ohne die gewonnene Ergebnisse des Kondensates nicht zu interpretieren sind. Die direkte Gewinnung der broncho-alveolären Spülflüssigkeit ist dennoch auch für diesen vermuteten Entzündungsmarker vorzuziehen, unter der Annahme, dass diese die Bedingungen innerhalb der ASL widerspiegeln kann.

5.2.5 Harnstoff

Die Bestimmung der Harnstoff-Konzentration je ml Atemkondensat erwies sich für die Kälber des Untersuchungsabschnittes 1 als unabhängig von physiologischen Einflussfaktoren, wie der Fütterung, dem Alter und den ermittelten Atmungsparametern. Eine Änderung der exhalativen Abgabe über das Atemkondensat konnte weder durch die natürlich erworbene *Chlamydia-psittaci*-Infektion, noch im Anschluss an die experimentelle *Mycoplasma-ovis*-Infizierung beobachtet werden.

Die physiologische Harnstoff-Konzentration je 100 l Exhalat schwankte bei den klinisch gesunden Kälbern zwischen 3,9 und 121,6 nM/100 l (Median: 21,0 nM/100 l, n = 43). Auffällig war, dass nur 51 % aller Proben oberhalb der Nachweisgrenze für die Bestimmung der Harnstoff-Konzentration lagen (Abb. 13). Ein rechnerischer Bezug zum exhalierten Volumen wurde bereits für humane AKO-Proben vorgenommen (Winsel et al., 1999, Diegel et al., 2000).

Der Einfluss der Ernährung auf den Harnstoff-Gehalt des Atemkondensates wurde bisher in Studien humaner Probanden nicht untersucht. Bei klinisch gesunden, sedierten Schweinen konnte im AKO nach der Fütterung eine auffallend höhere Harnstoff-Konzentration nachgewiesen werden, die sich statistisch aber nicht von denen der nüchternen Schweine unterschied (Reinhold et al., 2004d). Auch bei den Kälbern des Untersuchungsabschnittes 1 konnte keine fütterungsabhängige Konzentrationsänderung im Kondensat nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Spezies-spezifischen Verdauungsphysiologie auf das AKO sind erforderlich. Da Harnstoff im Speichel des Menschen nachgewiesen wurde und bei Rindern bis zu 65 % der Serum-Konzentration und damit theoretisch auch der ASL entsprechen kann, besteht bei oraler Atmung die Gefahr einer Speichel-Harnstoff-Kontamination oder auch der Aerosolentstehung aus der Mundhöhle. Scheideler et al. (1993) vermutete aber nur eine sehr geringe Bedeutung der oralen Aerosolentstehung. Unter der Annahme, dass kommerzielle Sammlungsgeräte eine Speichel-Kontamination ausschließen (Diegel et al., 1999, Corradi et al., 1999, Garey et al., 2000, Gessner et al., 2000a, 2001, 2003b, Hunt, 2002, Griese et al., 2002, Kostikas et

al., 2003a), ist zu vermuten, dass die eigentliche Ursache in einer zu geringen Sensitivität des Amylase-Nachweises besteht (Hunt, 2002).

Eine altersabhängige Änderung der Harnstoff-Konzentration im AKO könnte unter der Annahme erwartet werden, dass durch die Entwicklung zum Wiederkäuer ein Anstieg im Serum und (bei freier Diffusion in die ASL) damit auch eine höhere Abgabe ins Exhalat erfolgen könnte. Ebenso könnte mit zunehmender Körpermasse auch die Ammoniak-Verstoffwechslung über die metabolische Leistung der Leber und Nieren von Bedeutung sein. Eine signifikante Änderung der Harnstoff-Konzentration des AKO konnte für die von uns untersuchten Kälber zwischen dem 2. und 7. Lebensmonat aber nicht festgestellt werden.

Der Nachweis einer Abhängigkeit der Harnstoff-Abgabe von ventilatorischen Parametern beim Menschen beschränkt sich bisher auf Untersuchungen bezüglich des expiratorischen Atemzug- und Atemminutenvolumens, deren Einfluss nicht gezeigt werden konnte (Diegel et al., 2000). Bei klinisch gesunden, sedierten Schweinen konnte dagegen mit sinkender maximaler expiratorischer Atmungsstromstärke und geringeren expiratorischen Atemzug- und Atemminutenvolumina ein Anstieg der Harnstoff-Konzentration des AKO nachgewiesen werden (Reinhold et al., 2004a), was den Alveolarraum und damit die Aerosoltröpfchen als ursprüngliche Quelle zweifelhaft erscheinen lässt. Bei den Kälbern des Untersuchungsabschnittes 1 konnte die Abhängigkeit der Harnstoff-Konzentration des AKO von den untersuchten Kenngrößen der Ventilation statistisch nicht gesichert werden. Auch die Sammelzeit beeinflusste den nachweisbaren Harnstoff-Gehalt im AKO nicht signifikant. Im Gegensatz dazu wurde ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Harnstoff-Konzentration im AKO des Menschen und einem Kältereiz der Atemwege vermutet (Diegel et al., 2000). Wie für alle nicht flüchtigen Substanzen besteht auch hier die Frage, welche dieser Faktoren die Aerosolbildung der Atemwegen fördert, da zusätzlich zur ASL-Konzentration, auch die Menge und die Größe der Tröpfchen für die Konzentrationsbestimmung entscheidend ist.

Da eine Harnstoff-Produktion oder -Verstoffwechslung (Ausnahme: Besiedelung Ureasebildender Mikroorganismen) der Lunge nicht beschrieben ist und auch eine aktive Sekretion in die ASL auszuschließen ist, sollten Veränderungen des Harnstoff-Gehaltes im AKO auf eine Änderung der ASL-Konzentration hindeuten, die durch Schwankungen des Wassergehaltes hervorgerufen werden. Bei den *Chlamydia-psittaci*- und den *Mycoplasma-bovis*-tragenden Tieren konnte keine Änderung der Harnstoff-Abgabe [nM/ml, nM/100 l] beobachtet werden (Tab. A 29, A 30, A 38 und A 39). Dies wäre nur unter Bedingungen zu erwarten, in denen die bronchiale Zirkulation eingeschränkt oder die Evaporationsrate den Flüssigkeitstransport in die ASL übersteigt (Effros et al., 2005), obwohl gleichzeitig auch eine Diffusion entsprechend dem Konzentrationsgefälle zurück ins Blut denkbar ist. Wenn man von einer gleichbleibenden ASL-Konzentration ausgeht, scheint die Begründung in der erkrankungsbedingten Änderung der Belüftung und Aerosolbildung zu liegen, auch wenn im Untersuchungsabschnitt 1 ein signifikanter Einfluss der Atmung auf die Harnstoff-Abscheidung nicht bestand.

Die broncho-alveoläre Spülflüssigkeit lieferte genauere Hinweise auf die Harnstoff-Anreicherung innerhalb der ASL, da durch den Einfluss der *Chlamydia-psittaci*-Infektion eine niedrigere Konzentration nachgewiesen werden konnte (Abb. 25), die im Kondensat statistisch nicht zu sichern war. Als Begründung für die niedrigere ASL-Konzentration wäre hier die positive Abhängigkeit zur Serum-Konzentration denkbar, zumal bei den *Chlamydia*-

psittaci-tragenden Tieren eine niedrigere Harnstoff-Konzentration der BALF nachweisbar war. Eine Zunahme des ASL-Volumens könnte nur unter der Voraussetzung eine Rolle spielen, wenn ein verzögertes Angleichen des Gleichgewichtes zwischen ASL und Serum erfolgen würde.

Die Ergebnisse des Untersuchungsabschnittes 2 entsprechen den unter physiologischen Bedingungen gewonnenen Erwartungen, nach der für keinen der bestimmten ventilatorischen Parametern eine Abhängigkeit zur AKO-Harnstoff-Konzentration bestätigt werden konnte. Da die BALF eine niedrigere Harnstoff-Anreicherung innerhalb der ASL der *Chlamydia-psittaci*-positiven Tiere vermuten lässt, die keine Auswirkung auf die AKO-Anreicherung zu haben schien, kann für diesen Versuch die Bedeutung der Atmung als entscheidender Parameter eines pathologisch geänderten AKO-Gehaltes ausgeschlossen werden. Die BALF stellte sich im Vergleich zum AKO wiederum als ein sensibleres Untersuchungsmedium dar.

5.2.6 Ammonium

Die Eignung des Ammoniums, entzündliche pulmonale Veränderungen anzuzeigen, wird aus verschiedener Hinsicht widersprüchlich diskutiert. Im Rahmen der Untersuchungen zur vorliegenden Dissertationsschrift konnten trotz eines tendenziell niedrigeren Ammonium-Gehaltes im AKO und in der BALF der *Chlamydia-psittaci*- und *Mycoplasma-bovis*-tragenden Tiere ein statistisch signifikanter Einfluss nicht bewiesen werden. Jedoch wurde deutlich, dass die AKO-Konzentration von der Fütterung, dem Alter und dem Atmungsmuster der Kälber abhängt.

Bei den Kälbern des Untersuchungsabschnittes 1 wurde mit zunehmendem Alter ein Abfall der im AKO nachzuweisenden Ammonium-Konzentration beobachtet (Abb. 16). Auch bei Menschen wurde nur eine (jedoch nicht signifikant) höhere Konzentration bei Kindern, im Vergleich zur adulten Versuchsgruppe beschrieben (MacGregor et al., 2003b). Als mögliche Ursache ist das Verhältniss zwischen der Ammoniakankunft und der metabolischen Aktivität der Nieren, der Leber und der Skelettmuskulatur denkbar, auch wenn bei den Kälbern durch die Entwicklung des ruminohepatischen Kreislaufes eine mit dem Menschen vergleichbare Physiologie nicht besteht.

Bei der Untersuchung der Fütterungsabhängigkeit konnte dennoch, obwohl die Kälber jederzeit freien Zugang zu Heu und Wasser hatten, eine signifikant höhere Ammonium-Konzentration im AKO der unfütterten Kälber gezeigt werden (Abb. 16). An Menschen durchgeführte Studien bestätigten eine Abhängigkeit der Ammoniak-Abgabe vom zeitlichen Abstand zur Nahrungsaufnahme (Smith et al., 1999). Insgesamt sollen beim Menschen etwa 1/10 000 des Nahrungsstickstoffs als Ammoniak exhaliert werden (Smith et al., 1999).

Bei den hier untersuchten Kälbern (UA 1) konnte eine negative Abhängigkeit der Ammonium-Konzentration (je ml AKO, je 100 l Exhalat) von der maximalen expiratorischen Atmungsstromstärke, dem expiratorischen Atemzugvolumen (auch je kg/ KM) sowie dem expiratorischen Atemminutenvolumen dokumentiert werden (Tab. A 20). Mit zunehmender Expirationsgeschwindigkeit und zunehmendem Atemzugvolumen sank die Ammonium-Anreicherung im AKO, was durch eine verkürzte Verweildauer des Exhalates im Kondensator sowie mit einem schnelleren Transport der Flüssigkeitströpfchen durch die leitenden Atemwege zu erklären sein könnte. Dies widerspricht Ergebnissen klinisch gesunder, ungefütterter Schweine, bei denen zwischen der maximalen expiratorischen Atmungsstromstärke und der Ammonium-Konzentration je ml AKO eine positive Korrelation nachgewiesen wurde (Reinhold et al., 2004a). Eine Erklärung hierfür könnte, neben dem

Speziesunterschied, die Durchführung der Probennahme (Sedation, Fixation mittels Hängematte) und die damit verbundene Beeinflussung der Atmungsmechanik darstellen. Die Bedeutung des Atemzugvolumens auf die Ammoniak-Exhalation und die mögliche Ammonium-Anreicherung im AKO wurde von Effros genauer untersucht (Effros et al., 2004). Demnach führte eine Verkürzung der Strecke zwischen dem Mundstück und dem Kondensator zu einer geringeren Auffangrate in den Flüssigkeitströpfchen an der Wand entlang des Leitungsweges und damit zu einer höheren Ammoniak-Konzentration in der Gasphase über dem Kondensat. Die Beziehung zwischen dem Atemzugvolumen und der Ammonium-Konzentration wird zusätzlich entscheidend durch die Kohlendioxid-Abgabe aus den Atemwegen beeinflusst, die (infolge einer Erhöhung der Protonen-Konzentration) die Ammoniak-Aufnahme aus dem Exhalat ermöglicht. Zwar konnte, wie bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben (Reinhold et al., 2006), eine negative Abhängigkeit zwischen pH-Wert und dem Kohlendioxid-Partialdruck nachgewiesen werden, aber statistisch konnte bei den klinisch gesunden Kälbern des Untersuchungsabschnittes 1 mit zunehmender Sammelzeit dennoch keine Änderung des PCO_2 (Daten nicht dargestellt) oder der Protonen-Konzentration im AKO nachgewiesen werden (Tab. A 21). Der zu erwartende Abfall des Kohlendioxidgehaltes bei längerer Probennahme würde die positive Korrelation der Ammonium-Konzentration [nM/ml, nM/100 l] zur Sammelzeit bei den Tieren des Untersuchungsabschnittes 1 aber nicht erklären. Damit scheinen sich die Untersuchungen von Effros, der eine alleinige und damit pH-abhängige Ammonium-Anreicherung vermutete, zumindest für die klinisch gesunden Kälber nicht zu bestätigen. Da sich der pH durch die Sammelzeit in unseren Untersuchungen nicht veränderte, ist die Präsenz weiterer saurer AKO-Inhaltsstoffe zu vermuten. Dies gilt nur unter der Annahme, dass die verstrichene Zeit bis zur Bestimmung beider Parameter in der nativen Probe zu vernachlässigen ist und entgegen den Annahmen von Effros eine reproduzierbare aerobe pH-Wert-Bestimmung überhaupt möglich ist (Effros et al., 2004).

Flüchtiges exogenes und endogenes Ammoniak reichert sich im Atemkondensat, in Abhängigkeit von dessen Protonen-Konzentration, neben dem Aerosol-stämmigen Ammonium an. Die Konzentration im Gasgemisch der oberen Atemwege, insbesondere der Mundhöhle, scheint dabei eine Hauptrolle einzunehmen, da bei intubierten Patienten eine Verringerung der Ammonium-Konzentration im AKO nachzuweisen war (Vass et al., 2003b, Effros et al., 2003a, Wells et al., 2005). Im Atemkondensat der klinisch gesunden Kälber konnte eine Abscheidungsrate von 88,6 bis 1304,5 nM je 100 Liter Exhalat (Median: 252,3 nM/100 l) ermittelt werden (Abb. 16). Dabei war Ammonium in jeder der untersuchten Proben nachweisbar. Die Ammoniak-Produktion mikrobieller Ureasen in den Speicheldrüsen scheint bei Wiederkäuern, aber auch bei Menschen eine besondere Rolle zu spielen. Verschiedene Autoren vertreten daher weiterhin die Annahme, dass angesichts der oralen Ammoniak-Inhalation und der pulmonalen Perfusionsrate eine für das AKO bedeutsame lokale Ammonium-Produktion bislang nicht bewiesen ist (Huizenga et al., 1996). Generell soll eine Korrelation des Ammoniaks zwischen dem Serum und dem Exhalat dennoch nicht gegeben sein (Smith et al., 1999, Effros et al., 2002). Zur Änderung der Ammonium-Konzentration im AKO während entzündlicher Veränderungen der Atemwege oder des Lungengewebes bestehen in der Literatur ebenfalls gegensätzliche Meinungen. Die durch proinflammatorische Zytokine ausgelöste Hemmung der Ammonium-bildenden Glutaminase soll sowohl für den Mangel an basischem Äquivalent in der ASL, als auch für die geringere Konzentration im AKO verantwortlich sein (Sarantos et al., 1994, Hunt et al., 2002, MacGregor et al., 2003b). Im Gegensatz dazu führt die Azidität der Flüssigkeitsschicht auf

den Atemwegen, die unter inflammatorischen Bedingungen zunimmt zu einer gesteigerten enzymatischen Expression und Aktivität (Laterza und Curthoys, 2000). Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen der untersuchten Kälber überein, da bedingt durch die chronische *Chlamydia-psittaci*-Belastung eine signifikant niedrigere Ammonium-Konzentration im AKO nachzuweisen war (Tab. A 28), sich die Protonen-Konzentration des AKO dagegen nicht signifikant unterschied (Tab. A 29). Die *Mycoplasma-bovis*-Infizierung zeichnete sich dagegen durch einen niedrigeren pH-Wert bei statistisch unverändertem Ammonium-Gehalt des AKO aus (Tab. A 38, A 39, A 36). Auf den in der Literatur diskutierten und vermutlich zweifelhaften Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und der Ammonium-Konzentration des Kondensates wird in Kapitel 5.3.2 näher eingegangen.

Im Gegensatz zu den Befunden dieser Studie konnte im AKO pneumoniekranke Kälber (*Mannheimia haemolytica*) ein signifikanter Anstieg der Ammonium-Konzentration je ml AKO ermittelt werden, der eine zunehmende pulmonale Produktion vermuten ließ (Reinhold et al., 2001a). Da bei den klinisch gesunden Tieren eine negative Korrelation zwischen der Ammonium-Konzentration im AKO [nM/ml, nM/100l] und der maximalen expiratorischen Atemstromstärke, dem expiratorischen Atemzugvolumen, dem expiratorischen Atemzugvolumen je kg/KM und dem expiratorischen Atemminutenvolumen bestand (Tab. A 20), aber neben dem Anstieg der Atemfrequenz nur ein Abfall des expiratorischen Atemzugvolumens (auch je kg/KM) zu beobachten war (Tab. A 23, A 24 und A 25), erklärt die niedrigere Ammonium-Konzentration je ml AKO nicht. Für die *Chlamydia-psittaci*-positiven Kälber könnte dadurch aber auf eine falsch erhöhte Ammonium-Konzentration pro 100 l Exhalat geschlossen werden.

Als Ausgangspunkt der Interpretation dieser widersprüchlichen Ergebnisse steht wieder die Frage nach dem Ursprung des AKO-Ammonium. Nach Effros soll die Änderung der Glutaminaseaktivität nur ein unbedeutender Parameter gegenüber der Ammoniakankunft aus den oberen Atemwegen und der pulmonalen bzw. bronchialen Zirkulation darstellen (Effros et al., 2005). Die Änderung der AKO-Ammonium-Konzentration scheint demnach weniger durch die unter entzündlichen Zuständen variierende Bildungsrate, als durch geänderte Bedingungen der Exhalation, wie z.B. der maximalen expiratorischen Atemstromstärke, dem expiratorischen Atemzugvolumen, dem expiratorischen Atemminutenvolumen, der Sammlungszeit oder der pH-Wert bestimmenden Kohlendioxid-Anreicherung in der Probe beeinflusst zu werden.

Da bei den *Chlamydia-psittaci*-positiven Tieren auch im Serum eine höhere Ammonium-Konzentration nachweisbar war und zwischen dem Serum und der BALF eine positive Korrelation bestand (Tab. 16, Abb. 18), scheint unabhängig von der lokalen Produktion serumstämmiges Ammoniak in die ASL zu gelangen. Dass diese Korrelation nicht gegenüber dem Atemkondensat bestand, könnte ein weiteres Anzeichen für die Unabhängigkeit des AKO- vom pulmonalen ASL-Ammonium sein.

Unabhängig von der Frage, welcher Anteil des exhalierten Ammoniaks, der sich als Ammonium im Atemkondensat pH-abhängig nachweisen lässt, eigentlich aus der ASL stammt, deutete die Bestimmung der AKO-Konzentration je ml AKO im UA 2 auf eine signifikant niedrigere Ammonium-Anreicherung hin, die weder durch die BALF, noch im Bezug auf 100 Liter Exhalat bestätigt werden konnte (Tab. A 28). Auf Grund der widersprüchlichen Befunde der Konzentrationsänderungen des AKO während entzündlichen Veränderungen sowie der unklaren Bedeutung des systemischen und oralen Ammoniaks, steht die Eignung des exhalierten Ammoniaks als Entzündungsmediator des AKO noch in Frage.

5.2.7 pH-Wert

In der Literatur wird die Möglichkeit, mit Hilfe der AKO-Protonen-Konzentration Einblick auf den pH-Wert der Flüssigkeitsschicht der Atemwege zu nehmen, widersprüchlich diskutiert (Gessner et al., 2003b, Vaughan et al., 2003a, Effros et al., 2004, 2006). Bisher konnte zwischen der ASL und dem AKO keine bzw. nur eine sehr schwache und statistisch nicht eindeutig zu sichernde Abhängigkeit nachgewiesen werden (Inglis et al., 2003, Gessner et al., 2003b). Innerhalb der klinisch gesunden Kälbergruppe konnte keine Altersabhängigkeit, dagegen aber ein signifikanter Einfluss der Atmungsstromstärke nachgewiesen werden (Tab. A 21). In den vergleichenden Untersuchungen der nativen AKO-Proben war nur durch die *Mycoplamsa-bovis*-Infizierung ein signifikant niedrigerer pH zu bestätigen (Tab. A 36).

In den nativen AKO-Proben des Kalbes wurde fütterungsbedingt eine signifikant höhere Protonen-Konzentration nachgewiesen (Abb. 20). Dies konnte 4 - 6 Stunden nach der Nahrungsaufnahme auch bei klinisch gesunden Probanden bestätigt werden (Tal-Singer et al., 2004). Nur für den 2. Lebensmonat konnte ein signifikant höherer pH-Wert des AKO gegenüber dem übrigen Untersuchungszeitraum (3. – 7. Lebensmonat) gezeigt werden (Abb. 20). Für Menschen wurde eine Abhängigkeit des AKO-pH vom Alter der Versuchsperson ebenfalls ausgeschlossen (Vaughan et al., 2003a, Tal-Singer et al., 2004, Haight et al., 2004, Paget-Brown et al., 2006). Bei Untersuchungen menschlicher Probanden wurde mit steigender Sammlungsdauer (2 vs. 7 min., $n = 5$) ein Abfall der AKO-Protonen-Konzentration beobachtet, die durch die Ammoniakabsorption aus der Gasphase über der kondensierten Flüssigkeit begründet wird (Hunt und Vaughan, 2002). Bei den 12 Kälbern des Untersuchungsabschnittes 1 konnte diese Korrelation bei Sammlungszeiten zwischen 9 und 29 Minuten dagegen nicht bestätigt werden (Tab. A 21). Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Vaughan, der bei gesunden menschlichen Probanden (R-Tube, Argonspülung) eine Abhängigkeit von der Sammlungsdauer ebenfalls ausschließen konnte (Vaughan et al., 2003a). Als Ursachen könnten die verschiedenen Sammlungssysteme (R-Tube, EcoScreen), das Verfahren der pH-Wert Bestimmung (mit oder ohne vorherige Argon-Deaeration) oder auch inter-individuelle bzw. spezies-spezifische Besonderheiten vermutet werden. Die Exhalation durch die Nase bzw. durch den Mund hatte für den Menschen dagegen nur einen geringen Einfluss auf die Protonen-Konzentration des AKO (Borill et al., 2005).

Auch die Bedeutung der ventilatorischen Parameter auf den pH der nativen Proben wurde innerhalb der klinisch gesunden Kälbergruppe untersucht. Dabei konnte mit steigender Atmungsstromstärke ein Abfall des AKO-pH-Wertes beobachtet werden. Änderungen des expiratorischen Atemzug- oder Atemminutenvolumens sowie der Atmungsfrequenz hatten unter physiologischen Bedingungen dagegen keine Bedeutung (Tab. A 21). Untersuchungen gesunder menschlicher Probanden (EcoScreen, keine Deaeration) bestätigen ebenfalls eine Unabhängigkeit zum Atemzug- und Atemminutenvolumen (McCafferty et al., 2004). Zusätzlich wurde die Änderung der Protonen-Konzentration im AKO in Abhängigkeit von dem je Zeiteinheit und je 100 l Exhalat abgegebenen Kondensatvolumen geprüft. Dabei konnte ein Anstieg des pH bei steigender Kondensat-Abgabe je 100 l Exhalat beobachtet werden (Tab. A 21). Je langsamer (V'_{exmax}) und flacher (V_T , V_T/kg KM) die Tiere also atmeten, desto mehr stieg die Menge [ml/100 l] als auch die Azidität des abgeschiedenen AKO (Tab. A 16 und A 21).

Auf Grund der spezies-spezifisch bestehenden physiologischen Säuerung der ASL konnten bereits bei klinisch gesunden Kälbern in der nativen Atemkondensatprobe Protonen-

Konzentrationen von 5,4 - 6,3 (Median: 5,7; n = 80) bestimmt werden (Abb. 20). Deren Bedeutung besteht, insbesondere unter pathologischen Bedingungen in einer gesteigerten Bildung bakteriotoxischer Substanzen, wie Stickstoffmonoxid (NO), Nitrit (NO_2^-), Peroxynitrit (ONOO^-) sowie der Nitrit-stämmigen- (HNO_2^-) oder der hypochloren Säure (HOCl). Die Protonierung des „NO -Reservoirs“ Nitrit (Hunt et al., 2000) stellt damit einen bedeutenden Abwehrmechanismus bei Säugern dar (Klebanov, 1993) (Abb. 5). Zu den Mechanismen, die eine Änderung der Protonen-Konzentration innerhalb der ASL gewährleisten sollen, zählt z.B. die durch proinflammatorische Zytokine ausgelöste Hemmung der Glutaminase-expression bzw. -aktivität (Sarantos et al., 1994, Hunt et al., 2002, MacGregor et al., 2003b). Parallel dazu ist mit zunehmender ASL-Azidität aber auch eine gesteigerte Ammoniakproduktion nachweisbar (Laterza und Curthoys, 2000) (Abb. 6 und 26). Die bei lungenkranken Patienten zu beobachtende Korrelation des AKO-pH zur Zell- bzw. Neutrophilenzahl des Sputums oder auch zur Neutrophilie des Serums deutet zusätzlich auf die Beteiligung einer entzündungszellbedingten Änderung der Protonenkonzentration innerhalb der Atemwege hin (Kostikas et al., 2002, Tal-Singer et al., 2004, Shoemark et al., 2004). Dabei soll die durch Neutrophilen- bzw. Eosinophilen-stämmige Peroxidasen gebildete hypochlore Säure für den pH-Abfall des Atemkondensates verantwortlich sein (Adolphson et al., 1995). Die Beteiligung des Refluxes von Magensäure an der ASL-Azidität konnte unter antiinflammatorischer Therapie ausgeschlossen werden (Hunt et al., 2000, Kostikas et al., 2002, Effros et al., 2004).

Durch den Einfluss der Chlamydien konnte eine signifikante Änderung des AKO-pH allerdings nicht bestätigt werden (Tab. A 29). Auch wenn sich die Sammelzeiten und demnach der CO_2 -Partialdruck der Proben bei den Kälbern des Untersuchungsabschnittes 2 nicht signifikant unterschied (Tab. A 26), war nur innerhalb der Chlamydien-belasteten Gruppe mit zunehmender Sammlungsdauer ein Abfall des PCO_2 im AKO nachweisbar, obwohl dieser Zusammenhang in vorangegangenen Versuchen auch bei gesunden Kälbern und Schweinen bestand (Reinhold et al., 2006). Die Zeitdifferenz bis zur Bestimmung von pH und PCO_2 wurde, wie in den ATS/ERS Task Force Empfehlungen gefordert, dahingehend standardisiert, dass alle im Rahmen dieser Studie gewonnenen AKO-Proben unmittelbar nach Abschluss der AKO-Gewinnung ohne Zeitverzögerung bezüglich pH und PCO_2 analysiert wurden (Horváth et al., 2005).

Die *Mycoplasma-bovis*-Infizierung verursachte dagegen eine höhere Protonen-Konzentration und damit einen signifikant niedrigeren pH-Wert des AKO (Tab. A 36). Trotz eines unveränderten Kohlendioxid-Partialdruckes der nativen AKO-Probe bestand auch hier, sowohl in der *Mycoplasma-bovis*-freien, als auch innerhalb der –tragenden Kälbergruppe eine negative Abhängigkeit zwischen dem PCO_2 und dem pH des Kondensates (Ergebnisse nicht dargestellt). Diese wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten an gesunden Schweinen und Kälbern beschrieben (Reinhold et al., 2006).

Damit kann die Vermutung bestätigt werden, dass die Bestimmung der Protonen-Konzentration des nativen Atemkondensates Hinweise auf akute entzündliche Vorgänge (*Mycoplasma bovis*) der Atemwege liefern kann, auch wenn nach Effros eine reproduzierbare pH-Wertbestimmung unter aeroben Bedingungen nicht möglich sein soll (Effros et al., 2004). Dennoch sind standardisierte Sammlungs- und Untersuchungsbedingungen erforderlich (Kapitel 2.2.4), die eine bessere Vergleichbarkeit der AKO-pH-Werte erlauben.

5.3 Korrelation der untersuchten Inhaltsstoffe

5.3.1 Physiologische Zusammenhänge zwischen den Untersuchungsmedien AKO, BALF und Serum

Um einen Hinweis auf das Vorliegen physiologischer Zusammenhänge zwischen der Anreicherung eines Markers auf der Atemwegsoberfläche und dessen exhalatorischer Abscheidungsrate zu erhalten, wurden die Konzentrationen der untersuchten Inhaltsstoffe in der broncho-alveolären Spülflüssigkeit und im Atemkondensat auf statistisch signifikante Abhängigkeiten untersucht. Um zusätzlich den Einfluss systemischer Faktoren besser interpretieren zu können, wurden weiterhin auch Korrelationen bezüglich der im Serum ermittelten Konzentrationen überprüft. In diese Betrachtung physiologischer Zusammenhänge wurden die an den 12 klinisch gesunden Kälbern (UA 1) ermittelten Ergebnisse einbezogen.

Die unter physiologischen Bedingungen ermittelten fehlenden Abhängigkeiten zwischen den Untersuchungsmedien stimmen zum Teil mit dem Kenntnisstand der Literatur überein. Dazu gehört die statistisch nicht signifikante Korrelation zwischen den Protein-Konzentrationen des AKO und der BALF sowie zwischen den Nitrit-Konzentration des Serum und der BALF bei klinisch gesunden Schweinen (Reinhold et al., 2001c, 2004b). Bisher waren keine Abhängigkeit zwischen den Harnstoff-Konzentrationen des AKO und der BALF gesunder Schweine sowie zwischen dem AKO und dem Serum des Menschen, der Schweine und der Kälber nachweisbar (Diegel et al., 2000, Reinhold et al., 2001b, c, 2004a). Bei klinisch gesunden Schweinen konnte ebenfalls keine Korrelation zwischen der Harnstoff-Konzentration der BALF und des Serum nachgewiesen werden (Reinhold et al., 2001c). Im Gegensatz dazu konnte bei Kälbern unter physiologischen Bedingungen zusätzlich eine indirekte Abhängigkeit zwischen den Harnstoff-Konzentrationen im Serum und im AKO beschrieben werden (Reinhold et al., 2001a). Vorangehende Arbeiten bezüglich der Ammonium-Konzentrationen in den verschiedenen Untersuchungsmedien klinisch gesunder Tiere bestätigen die Ergebnisse unseres Versuches. Statistisch signifikante Korrelation konnten weder zwischen dem AKO und dem Serum des Kalbes noch zwischen dem AKO und der BALF des Schweines bestätigt werden (Reinhold et al., 2001a, 2004b).

Weitere Abhängigkeiten der physiologischen Mediator-Konzentrationen innerhalb der Untersuchungsmedien AKO, Serum und BALF wurden bisher weder bei Menschen noch Tieren beschrieben. Die Korrelation zwischen der Protonen-Konzentration des Kondensates (nativ) und der broncho-alveolären Spülflüssigkeit wurde in der Kälbergruppe nicht überprüft, konnte jedoch beim Menschen ausgeschlossen werden (Richter et al., 2004).

Zu publizierten Befunden, die allein unter pathologischen Bedingungen nachzuweisen waren, zählen die direkten Abhängigkeiten zwischen den Nitrit-Konzentrationen des AKO und der BALF des Menschen als auch zwischen den Harnstoff-Konzentrationen des AKO und dem Serum des Menschen sowie des Kalbes (Diegel et al., 2000, Reinhold et al., 2001a, Gessner et al., 2003a).

Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben konnten allein für die Harnstoff- und Ammonium-Konzentrationen positive Korrelationen zwischen BALF und Serum nachgewiesen werden (Abb. 15 und 18). Insgesamt bestätigt sich auch hier die Annahme, dass die Konzentrationsbestimmung der Entzündungsmediatoren im AKO unter physiologischen Ventilationsbedingungen keinen Rückschluss auf deren Konzentration in der BALF und somit in der ASL erlaubt. Signifikante Abhängigkeiten der Mediatoren-Konzentrationen des Kondensates

zum Serum waren ebenfalls nicht nachweisbar. Damit ist auch zu erklären, dass sich für den Untersuchungsabschnitt 2 die Lavage im Gegensatz zum AKO als ein sensibleres Medium darstellte, um die subklinisch vorhandenen, chronischen Veränderungen innerhalb der Atemwege widerzuspiegeln. Im Untersuchungsabschnitt 3, dessen experimentell induzierte *Mycoplasma-bovis*-Infektion ein kurzfristiges Entzündungsmodell im subklinischen Bereich darstellte, erschien dagegen das Kondensat als geeigneteres Medium, Veränderungen der ASL-Zusammensetzung anzuzeigen. Der Anstieg der Leukotrien B₄-Konzentration je 100 l Exhalat und die Protonen-Konzentration waren im AKO messbar, noch bevor in der bronchoalveolären Spülflüssigkeit signifikante Unterschiede der Konzentration nachweisbar waren (Tab. A 33, A 35 und A 36).

5.3.2 Korrelationen zwischen den im Atemkondensat untersuchten Inhaltsstoffen

Auf Grund der problematischen Standardisierung der AKO-Gewinnung, die eine Interpretation einzelner Inhaltsstoffe unter physiologischen oder pathologischen Zuständen nur bedingt ermöglicht, könnte eine Änderung gegenseitiger Abhängigkeiten zusätzliche Hinweise auf entzündliche Vorgänge in der ASL liefern. In der Abb. 26 (S. 100) sind mögliche Zusammenhänge inflammatorischer Prozesse auf den Atemwegen dargestellt. Damit wird deutlich, dass die Mediatoren und besonders die Protonen-Konzentration der ASL an einem Netzwerk an ablaufenden Reaktionen beteiligt sind, bei denen neben körpereigenen Abwehrprozessen auch der Erhalt der physiologischen Funktionen gewährleistet sein muss.

In unserem Versuch wurden dazu die Korrelationen zwischen den im AKO bestimmten Inhaltsstoffen (incl. pH) für die Kälber ohne klinische Hinweise auf respiratorische Erkrankungen (n = 12) und für die *Chlamydia-psittaci*-positive Gruppe (n = 10) verglichen. Im Ergebnis ließen sich die statistisch signifikanten Korrelationen in zwei Gruppen einteilen (Tab. 19).

1. Zunächst waren Korrelationen zu beobachten, die sowohl bei den Kälbern des Untersuchungsabschnittes 1 als auch den *Chlamydia-psittaci*-positiven Tieren statistisch gesichert wurden. Dazu gehören die Abhängigkeiten zwischen folgenden Mediatoren: 8-Isoprostan und Ammonium, 8-Isoprostan und Protein, Nitrit und Ammonium, Ammonium und Protonen-Konzentration, Protein und Protonen-Konzentration.

Auffällig ist, dass es sich hier stets um positive Korrelationen, sowohl zwischen Aerosol-inhaltsstoffen als auch zwischen flüchtigen und nicht flüchtigen Markern handelt. Auch bleiben diese innerhalb des jeweiligen Bezugsmediums (AKO, Exhalatvolumen) bestehen. Dass neben der ASL-Zusammensetzung zusätzlich auch die Änderung des Abgabemechanismus eine bedeutsame Rolle spielen könnte, ist wahrscheinlich. Die Korrelationen könnten unabhängig vom vermuteten Vorliegen chronischer Veränderungen der Atemwege sein, oder aber auf eine parallele Induktion hinweisen. Insgesamt scheinen diese damit ungeeignet, Entzündungsvorgänge zu differenzieren.

2. Des Weiteren wurden Korrelationen zusammengefasst, die allein unter physiologischen Bedingungen (Kälber des UA 1) statistisch signifikant waren. In der Gruppe der *Chlamydia-psittaci*-positiven Tiere waren die folgenden Abhängigkeiten dagegen nicht nachweisbar: Nitrit und 8-Isoprostan, Nitrit und Protonen-Konzentration, Protein und Harnstoff. Dies könnte auf eine Änderung der ASL-Konzentration und/oder eine, wenn auch subklinisch, erkrankungsbedingt geänderte Atmung hindeuten. Es waren stets positive Korrelationen nachweisbar, mit der Besonderheit, dass parallel zur direkten Abhängigkeit zwischen der 8-Isoprostan- und Nitrit-Abscheidung je 100 l Exhalat ein indirekter Zusammenhang in Bezug

auf die Konzentration je Milliliter AKO zu beobachten war. Pathognomonische Korrelationen zwischen den Entzündungsmediatoren existierten dagegen nicht.

Tab. 19: Zusammenfassung statistisch signifikanter Korrelationen der Mediatoren-Konzentration je ml AKO und je 100 l Exhalat (incl. pH-Wert) bei 12 Tieren des Untersuchungsabschnittes 1 und 10 *Chlamydia-psittaci*-positiven Kälbern

Untersuchungsabschnitt 1 (n = 12)		Tiere aus Untersuchungsabschnitt 2 (<i>C.-psittaci</i> -positiv, n = 10)	
(AKO) physiologische und pathologische Bedingungen			
8-Isoprostan : Ammonium (e)	+	8-Isoprostan : Ammonium (e)	+
8-Isoprostan : Protein (e)	+	8-Isoprostan : Protein (e)	+
Nitrit : Ammonium (c, e)	+	Nitrit : Ammonium (c, e)	+
Ammonium : pH-Wert (c, e)	+	Ammonium : pH-Wert (c, e)	+
Protein : pH-Wert (e)	+	Protein : pH-Wert (e)	+
(AKO) physiologische Bedingungen		(AKO) pathologische Bedingungen	
Nitrit : 8-Isoprostan (c)	-	-	
Nitrit : 8-Isoprostan (e)	+	-	
Nitrit : pH-Wert (c, e)	+	-	
Protein : Harnstoff (c)	+	-	

Erläuterungen zu Tab. 19:

+ = statistisch signifikante positive Korrelation
 - = statistisch signifikante negative Korrelation
 AKO = Atemkondensat
 c = Mediator-Konzentration pro ml AKO

C. psittaci = *Chlamydia psittaci*
 e = Mediator-Konzentration pro 100 l Exhalat
 n = Anzahl der untersuchten Kälber
 pH = Protonen-Konzentration

Korrelationen, die sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen existierten

8-Isoprostan : Ammonium: Das sich die auf 100 l Exhalat berechnete Konzentration beider Mediatoren im Untersuchungsabschnitt 2 nicht signifikant unterschied, erklärt das Bestehen der positiven Korrelation innerhalb beider betrachteter Kälbergruppen (Tab. A 27 und A 28). Unabhängig von dem Zweifel an der Glutaminase-bedingten und spezifisch pulmonalen Herkunft des AKO-Ammonium (Griffith, 2002, Effros et al., 2004) könnte insbesondere unter akuten Entzündungszuständen eine parallele, eine durch Zytokine induzierte ROS-abhängige Isoprostan-Bildung einer Hemmung der Ammoniak-Bildung gegenüberstehen (Morrow et al., 1994, Sarantos et al., 1994, Hunt et al., 2002, MacGregor et al., 2003b). Ergebnisse der BALF-Untersuchung, die mehr als 3 fach signifikant höhere 8-Isoprostan-gegenüber einer unveränderten Ammonium-Konzentration je ml AKO zeigen, schließen einen Zusammenhang innerhalb der ASL unter den hier vermuteten (chronisch) inflammatorischen Bedingungen aber aus (Abb. 23).

8-Isoprostan : Gesamtprotein: Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied in der Konzentrationen in Bezug auf 100 l Exhalat beobachtet werden (Tab. A 27 und A 30). Innerhalb der BALF dagegen deuteten signifikant höhere Konzentrationen beider Marker bei den *Chlamydia-psittaci*-belasteten Tiere auf eine gemeinsame Induktion in der ASL hin

(Abb. 22 und 23). Eine Erklärung könnte die parallele ROS abhängige Isoprostan- und NF κ B-Induktion bieten (Abb. 26), die zur Expressions-Steigerung zahlreicher Enzyme, Zytokine, Transskriptionsfaktoren, Akute-Phase- und auch Adhäsions-Moleküle führt (Morrow et al., 1994, Wardle, 2001).

Nitrit : Ammonium: In Bezug auf die je 100 l Exhalat berechneten Konzentrationen beider Parameter ließ sich im Untersuchungsabschnitt 2 kein signifikanter Unterschied nachweisen (Tab. A 28 und A 30). Die Ammonium-Konzentration je ml AKO dagegen war niedriger, als in der klinisch gesunden Kälbergruppe (Tab. A 28). Da parallel signifikant verschiedene Nitrit-Konzentrationen im AKO nicht zu beobachten waren, scheint einen kausalen Zusammenhang zwischen diesen Parametern aber auszuschließen (Tab. A 29). Bei Kindern mit asthmatischen Atemwegsveränderungen konnte im Gegensatz dazu eine negative Korrelation zwischen der AKO-Ammonium-Konzentration je ml AKO und dem NO-Gehalt des Exhalates nachgewiesen werden (Carraro et al., 2005). Eine Abhängigkeit zwischen Nitrit (AKO) und Stickstoffmonoxid (Exhalat) wurde bisher nur in einer Publikation beschrieben (Horváth et al., 1997). Auf den vermuteten Zusammenhang zwischen der Protonen-Konzentration und dem ASL-Nitrit wird im Abschnitt Nitrit : pH-Wert näher eingegangen.

Ammonium : pH-Wert: In beiden Kälbergruppen konnte eine positive Korrelation zwischen der Ammonium-Konzentration je ml AKO und auch je 100 l Exhalat zum pH der nativen Proben nachgewiesen werden (Tab. A 40, A 41, A 43 und A 44). Da im UA 2 signifikant niedrigere Ammonium-Konzentrationen je ml AKO bei unverändertem pH vorlagen (Tab. A 28 und A 29), scheint eine Unabhängigkeit beider Parameter zu bestätigen. Auch Wells beschrieb deren Zusammenhang nicht als Ursache und Wirkung, sondern als von einander getrennte Effekte (Wells et al., 2005). Ein Abfall des ASL-pH führt zu einer verstärkten Expression der Ammoniak-produzierenden Glutaminase (Abb. 6 und 26) in den Alveolar- und Atemwegsepithelien (Laterza und Curthoys, 2000), welcher einen bedeutenden Einfluss auf den ASL- und AKO-pH haben soll (Hunt et al., 2002). Zweifel bestehen im Hinblick auf eine bedeutsame pulmonale Herkunft des AKO-Ammonium (Huizenga et al., 1996, Effros et al., 2004), der Messbarkeit des AKO-pH und dessen Zusammenhang zur ASL-Protonen-Konzentration (Effros et al., 2004), aber auch der Bedeutung des oralen Ammoniak (Effros, 2004, Effros et al., 2002, 2003a, 2004, 2005, Vaughan et al., 2003a, Gaston und Hunt, 2003, 2004, Wells et al., 2005, Borill et al., 2005). In der Literatur werden unsere Ergebnisse bestätigt (Hunt et al., 2002, Lehmann et al., 2003a, Gessner et al., 2003b, Wells et al., 2005, Carraro et al., 2005). Nur MacGregor konnte eine (schwach signifikante; $p = 0,052$) negative Abhängigkeit nachweisen, bei der er als Einziger native Proben, aber auch hier gesunde und asthmatische Patienten gemeinsam, untersuchte (MacGregor et al., 2005).

Protein : pH-Wert: Eine positive Korrelation zwischen dem pH und der je 100 l Exhalat berechneten Protein-Konzentration konnte sowohl bei den klinisch gesunden, als auch den *Chlamydia-psittaci*-positiven Tieren statistisch gesichert werden. Im Untersuchungsabschnitt 2 konnte ein signifikanter Unterschied beider Parameter nicht nachgewiesen werden, was damit das Bestehen der Abhängigkeit innerhalb beider Kälbergruppen erklärt. Unter entzündlichen Bedingungen würde die Azidität direkt, z.B. durch Entzündungszell- und Epitheluntergang oder gesteigerte Glutaminaseexpression, als auch indirekt (Aktivierung von NF κ B) zu einer Proteinanreicherung in der ASL führen (Abb. 26) (Laterza und

Courthoys, 2000, Ishizuka et al., 2001, Wardle, 2001, Hunt et al., 2002). Dem gegenüber wird aber auch ein Zusammenhang zwischen Zytokinen und der Glutaminase-bedingten Hemmung der Ammoniak-Bildung angenommen (Sarantos et al., 1994, Hunt et al., 2002, MacGregor et al., 2003b). Dies könnte die Erklärung für die Korrelation zwischen dem AKO-pH und dessen IL-6- und -8 Konzentration liefern (Gessner et al., 2003b). *In vitro* konnte an Epithel- und Alveolarmakrophagen-Zelllinien unter Säurebelastung eine gesteigerte Expression von Stress-Proteinen (72, 78 kDa) gezeigt werden (Cohen et al., 1991). Aber auch die Expressions-Hemmung von Proteinen (MMP-3, -9, TIMP-1, TGF β), die chronische Veränderungen auf den Atemwegen widerspiegeln sollen, wurde beschrieben (Agarwal et al., 2003).

Korrelationen, die unter physiologischen Bedingungen existierten, jedoch unter pathologischen Bedingungen nicht mehr nachweisbar waren

8-Isoprostan : Nitrit: Die unter physiologischen Bedingungen bestehende negative Korrelation der je Milliliter AKO zu bestimmenden Konzentrationen steht einer direkt proportionalen Abhängigkeiten der auf 100 l Exhalat bezogenen Konzentration dieser Marker gegenüber (Tab. A 40 und A 43). Damit bestätigt sich auch hier die Bedeutung einer vom AKO-Volumen unabhängigen Mediatorbestimmung. Innerhalb der Chlamydia-positiven Kälbergruppe waren beide Abhängigkeiten statistisch nicht mehr nachweisbar (Tab. A 41 und A 44). Damit scheint ein kausaler Zusammenhang zwischen beiden Mediatoren unter diesen Bedingungen nicht vorzuliegen. Im Gegensatz dazu liefern hier die BALF-Ergebnisse einen besseren Überblick über die Vorgänge in der ASL. Die bei den Chlamydia-positiven Tieren mehr als dreifach höhere Konzentration des Lipidperoxidationsmarkers (Abb. 23) und die nicht signifikant verschiedenen Nitrit-Konzentrationen (Tab. A 29 und A 30) deuten auf eine ROS-abhängige Isoprostanbildung und NF κ B- sowie Zytokin-bedingte iNOS-Induktion bei gleichzeitigem Abbau des NO-Radikal-Speichers Nitrit zu Nitrogendioxid oder Peroxynitrit (Abb. 6) (Morrow et al., 1994, Wardle, 2001). Auch die radikalinduzierte Inaktivierung antioxidativer Proteine und die Nitrosothiolbildung (NO-Fänger) an schwefelhaltigen Aminosäuregruppen könnte in diesem Gleichgewicht eine Rolle spielen. Eine Korrelation zwischen 8-Isoprostan und Nitrit innerhalb der BALF bestand aber nicht (Tab. A 43).

Nitrit : pH-Wert: Da weder der pH, noch die Nitrit-Konzentration (je AKO-, Exhalat-Volumen) der Chlamydia-tragenden Tiergruppe sich signifikant von den Werten der Kontrolltiere unterschied, aber die positive Korrelation nur innerhalb des UA 1 bestand, schließt einen Zusammenhang aus (Tab. A 29 und A 30). Aber auch hier scheint die BALF, die durch entzündliche Einflüsse bedingte Umwandlung des Nitrit besser widerzuspiegeln (Abb. 24). Die Protonen-Konzentration der ASL kann die Nitrit-Konzentration dabei direkt, durch die Bildung der nitritstämmigen Säure, dem Stickstoffmonoxid oder anderer Nitro-Derivaten beeinflussen (Napolitano et al., 2000, Hunt et al., 2000). Aber auch indirekt wird die Peroxynitrit-, Nitrogendioxidbildung durch die Anreicherung Entzündungszell-stämmiger Peroxidasen oder die NF κ B-abhängige iNOS-Induktion erhöht (Baud et al., 1997, van der Vliet et al., 1997, Ishizuka et al., 2001, Wardle, 2001, Brennan et al., 2002). Mit Ausnahme einer Publikation, konnte bei lungenkranken Patienten bisher kein Zusammenhang zwischen dem pH und Nitrit bzw. NO $_2^-$ /NO $_3^-$ im AKO beschrieben werden (Palaiologou et al., 2000, Kostikas et al., 2002, Ojoo et al., 2005). In anderen Untersuchungen an gesunden Kälbern wurde jedoch die direkte Abhängigkeit beider Parameter bestätigt (Knobloch, 2006).

Protein : Harnstoff. Wie bereits für klinisch gesunde Schweine beschrieben (Reinhold et al., 2001c), wurde eine positive Korrelation zwischen beiden Konzentrationen nur bei den gesunden Kälbern beobachtet. Der Protein- und auch Harnstoffgehalt je Milliliter AKO und auch je 100 l Exhalat unterschied sich in den Vergleichsgruppen nicht, obwohl die Ergebnisse der BALF für Gesamteiweiß eine signifikant erhöhte Konzentrationen in der ASL der Chlamydia-positiven Tiere vermuten lassen (Tab. A 29 und A 30, Abb. 22). In der Lavage der Kälber konnte, ebenso wie für die gesunden Schweine (Reinhold et al., 2001c), keine Korrelation zwischen Harnstoff und Protein nachgewiesen werden (Tab. A 43). Auch hier bestätigt sich die entscheidende Bedeutung der Aerosol-Entstehung und -Abscheidung für die Anreicherung nicht flüchtiger Marker im AKO, die damit eine Aussage über die ASL nicht ermöglicht.

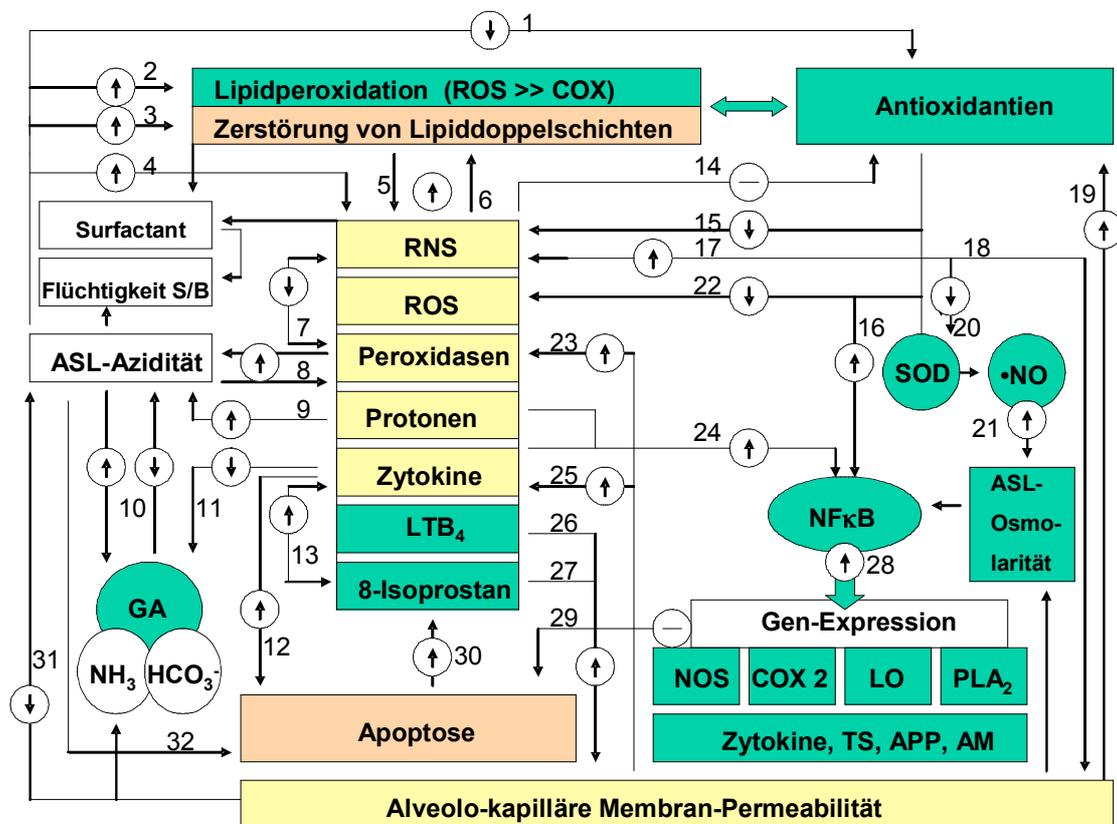


Abb. 26: Schematische Darstellung vermuteter Zusammenhänge zwischen den Entzündungsmediatoren

Tab. 20: Erläuterungen zu den in Abb. 26 ausgewiesenen Reaktionsschritten

Rkt.-schritt	Bemerkung	Autoren
1	ASL-Azidität senkt Antioxidantienaktivität	-
2	Lipidperoxidation (<i>in vitro</i>) pH-abhängig	Radi et al., 1991
3	Epitheluntergang bei hoher ASL-Azidität	Holma et al., 1977
4	pH-abhängiger Nitritabbau zu Stickstoffmonoxid (<i>in vitro</i>)	Hunt et al., 2000
5	Folgen der Membranveränderung an Gewebe und Entzündungszellen	-

6	RNS-abhängige Nitrolinotalbildung		Coles et al., 2002
7	RNS senken Peroxidaseaktivität Peroxidasen senken freien RNS-Spiegel		Klebanoff, 1993
8	HOCl ⁻ -Produktion steigt bei fallendem pH-Wert		Reeves et al., 2003
	pH bedingter Zelluntergang führt zu Anreicherung vakuolärer Enzyme in die ASL		Hunt et al., 2002
9	Abgabe vakuolär Protonen bei Zelluntergang		Hunt et al., 2002
10	Ammoniak- und Bikarbonatproduktion senkt ASL-Azidität		Hunt et al., 2002 Griffith, 2002
	pH-REBP stabilisiert GA mRNA und erhöht Expression		Laterza und Curthoys, 2000
11	Zytokin-abhängige (TNF α , IFN γ , IL-1 β) Expressions- und Aktivitätshemmung der Glutaminase		Hunt et al., 2002 Griffith, 2002
12	TNF α abhängige Apoptosekaskade (<i>in vitro</i>) (negatives Feedback durch NF κ B)		Antwerp et al., 1996
13	8-Isoprostan	Förderung proinflammatorischer Zytokine	Janssen, 2004
	Zytokine (TNF α , IL1 α)	Erhöhung der 8-Isoprostanbildung (<i>in vitro</i>)	Muzaffar et al., 2004
14	RNS inaktivieren antioxidative Enzyme		Lawler und Song, 2002
15	Verhinderung der RNS (Peroxynitrit) –Bildung (SOD-Kapazität von •NO-Konzentration abhängig)		Beckman et al., 1990
16	Oxidantien induzieren NF κ B-Aktivität		Wardle, 2001
17	Thiol-Gruppen in Serum-Proteine wirken als •NO Fänger (Albumin = Hauptspeicher)		Rafikova et al., 2002
18	RNS (zytotoxisch)	Lipide (Nitrolinolate)	Cuzzocrea et al., 2001
		DNA-Deaminierung oder Hemmung von Enzymen der Atmungskette oder der DNA-Synthese	Hibbs et al., 1988 Wink et al., 1991
19	Membranpermeabilität erhöht Antioxidantien (Serum)		-
20	RNS inaktivieren Enzyme (z.B. SOD)		Cuzzocrea et al., 2001
21	•NO	Erhöhung der Plasmaexsudation	Guo et al., 1998
		Hemmung der Natriumabsorption	
22	SOD Aktivität schützt mit Superoxidabbau vor Peroxynitrit-Bildung (Kapazität •NO-abhängig)		Beckman et al., 1990
23	Migration inflammatorischer Zellen erhöht ASL-Peroxidasen-Konzentration		-
24	Induktion des NF κ B	Zytokine	Wardle, 2001
		Protonen	Ishizuka et al., 2001
25	Migration inflammatorischer Zellen und erhöht ASL-Zytokin-Konzentration		-
	Zytokine (TNF α) erhöhen epitheliale Permeabilität		Li et al., 1995
26	LTB ₄	Erhöhung der Vaskularpermeabilität	Stenson et al., 1986
27	8-Isoprostan		Morrow et al., 1992
28	NF κ B-abhängiger Einfluss auf Proteine der ASL		Wardle, 2001
29	NF κ B aktiviert antiapoptotische Gene		
30	Abgabe der Inhalte untergegangener Zellen		-
31	ASL-pH durch Flüssigkeitssekretion erhöht, Pufferungsfunktion anflutender Proteine		-
32	ASL-pH beeinflusst Aktivität der Atmungsketten-Enzyme		Albrich et al., 1981

Erläuterungen zu Abb. 26 und Tab. 20:

AM = Adhäsionsmoleküle

APP = Akute Phase Proteine

ASL = airway surface layer	NOS = Stickstoffmonoxidsynthase
B = basische ASL-Inhaltsstoffe	Peroxidasen = Myelo-, Lakto-, Eosinophilen-Peroxidase
COX = Cyclooxygenase	pH = Protonen-Konzentration
GA = Glutaminase	pH-REBP = pH-response binding protein
HCO_3^- = Bicarbonat	PLA ₂ = Phospholipase A ₂
HOCl = hypochlore Säure	RNS = Stickstoff-Radikale
IL1 β = Interleukin 1beta	ROS = Sauerstoff-Radikale
LO = Lipooxygenase	S = saure ASL-Inhaltsstoffe
LTB ₄ = Leukotrien B ₄	SOD = Superoxiddismutase
mRNA = messenger Ribonucleinsäure	TS = Transskriptionsfaktoren
NF κ B = Nuclear factor kappa B	TNF α = Tumor Nekrose Faktor alpha
NH ₃ = Ammoniak	
•NO = Stickstoffmonoxid	

5.4 Fragestellungen für weiterführende Arbeiten

Ziel einer standardisierten AKO-Gewinnung besteht letztendlich in der Vergleichbarkeit der zwischen verschiedenen Untersuchern erhaltenen Ergebnisse. Dazu ist, wie im Kapitel 2.3 beschrieben, das AKO-Volumen der entscheidende Faktor, der eine Beurteilung der Mediator-Konzentration erschwert. Wie in dieser Arbeit dargelegt, scheint die Berechnung der abgeschiedenen Mediator-Menge je 100 Liter Exhalat eine geeignetere Maßeinheit zu sein. Abhängigkeiten von physiologischen Einflüssen, wie der Atmung, der Fütterung und des Alters, sollte in weiterführenden Arbeiten zu anderen AKO-Inhaltsstoffen auch in Bezug auf diesen Parameter überprüft werden.

Parallel zu den sammlungsmethodischen, umgebungsbedingten und biologischen bzw. individuellen Faktoren (Kapitel 2.3), die Einfluss auf die Kondensation des Wasserdampfes im Exhalates nehmen, wird in der Literatur deren Bedeutung auf die Anreicherung der flüchtigen und nicht flüchtigen Mediatoren teilweise sehr unvollständig oder widersprüchlich diskutiert. Auch diese Fragestellungen sollten daher in weiterführende Arbeiten eingeschlossen werden, um eine Standardisierung der AKO-Gewinnung und damit die Vergleichbarkeit und Interpretation erhaltener Untersuchungsergebnisse zu erreichen.

5.4.1 Methodische Aspekte

Kondenser: Neben der Größe und den verwendeten Materialien der Kondensationsoberflächen tragen die unterschiedlichen Kühlleistungen der Gerätetypen zum Kondensationsvermögen der Flüssigkeit des Exhalates und auch zur Anreicherung der flüchtigen Mediatoren bei. Dabei scheinen für verschiedene Substanzen spezifische Temperaturoptima zu bestehen, wie für Harnstoff, Ammonium oder die Protonen-Konzentration bereits vermutet wurde (Rothe, 2002, Hunt, 2002, Becher et al., 2003a, Lehmann und Rothe, 2003, Wells et al., 2005). Nach Vaughan et al. (2003a) ist der pH-Wert dagegen von der Temperatur unbeeinflusst. Ziel weiterführender Arbeiten sollte es sein, die Temperaturabhängigkeit der Abscheidungsrate für einzelne Mediatoren zu untersuchen, um deren Optima unter Beachtung der verschiedenen Geräteköhlleistungen festzulegen. Die Eignung auf 37 °C erwärmter Filter, die eine Kondensationshemmung der Dampfphase und damit die reine Aerosol-Gewinnung erlauben würde, sollte für die nichtflüchtigen Marker wie Harnstoff, Protein oder Ammonium genauer untersucht werden.

Eine Absorption durch die verschiedenen Beschichtungen der Kondensationsoberflächen wurde bisher nur für Protein (Albumin), 8-Isoprostan, Leukotrien B₄ und Ammonium beschrieben (Larson et al., 1979, Carpenter et al., 1998, Reinhold, 2001, Rosias et al., 2003). Materialien die sich vermutlich auch auf die Anreicherung des Nitrit, Harnstoff oder pH-Wert bestimmender Substanzen auswirken könnten, sollten daher in zukünftigen Studien untersucht werden. Die Größe der Kondenseroberfläche bestimmt die Passagedauer und damit die Kondensationsrate der flüchtigen Marker. Aber auch die Aufnahmezeit in Flüssigkeitströpfchen entlang der Röhrenwand kann dadurch entscheidend beeinflusst werden, wie bisher nur für Ammonium nachgewiesen werden konnte (Effros et al., 2005). Ziel weiterführender Studien sollte es sein, die unterschiedlichen Konstruktionen zur AKO-Gewinnung, insbesondere im Hinblick auf die volatilen Marker genauer bewerten zu können.

Probengewinnung: Fragestellung, die den Prozess der AKO-Gewinnung betreffen, beziehen sich auf den sicheren Ausschluss einer Mediatoranreicherung aus nicht pulmonalen Quellen. Dazu gehört die Kontamination durch die Umgebungsluft, sowie der Nasen- und Mundhöhle. Für den Nachweis von Harnstoff, Protein, Nitrit, 8-Isoprostan, Leukotrien B₄ und Ammonium spielt die Möglichkeit der Speichelanreicherung im AKO eine entscheidende Rolle, da hier zum Teil vielfach höhere Konzentrationen nachgewiesen werden konnten (Zakrzewski et al., 1987, Scheideler et al., 1993, Duncan et al., 1997, Grasemann et al., 1998, Zetterquist et al., 1999, Mc Kinney et al., 2000, Vass et al., 2003b, Barnes, 2005). Bei Verwendung des EcoScreen wird eine Kontaminationsgefahr durch Speichel ausgeschlossen (Diegel et al., 1999). In Atemkondensaten, die mit anderen Kondensatoren gewonnen wurden, ist jedoch der positive Nachweis der α -Amylase beschrieben (Manke et al., 2000, Cunningham et al., 2000, Effros et al., 2002, Huszar et al., 2002, Machado et al., 2003). Da unter pathologischen Bedingungen auch die Möglichkeit der pulmonalen Bildung dieses Enzymes besteht und die Sensibilität der Nachweisverfahren eher gering ist, sollte in folgenden Untersuchungen ein zusätzlicher Marker gefunden werden, der eine saliväre Kontamination sicher ausschließt (Otsuki et al., 1977, Hayashi et al., 1986, Lenler-Petersen et al., 1994, Manke et al., 2000, Hunt, 2002).

Eine Beeinflussung der Mediator-Konzentration des AKO durch die oberen Atemwege ist für Nitrit, Protein (Aminosäuren, Adenosin), Ammonium, den pH-Wert, Harnstoff, 8-Isoprostan und Leukotrien B₄ möglich (Norwood et al., 1992, Horwarth et al., 2000, Gratiou et al., 2003, Vass et al., 2003a, c, Marteus et al., 2004a, c, Effros et al., 2004, 2005). Zukünftige Studien sollten Mediator-spezifische Empfehlungen zur Sammlungsmethodik (oral, nasal, tracheal) liefern, die eine Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten ermöglicht.

Eine ansteigende Umgebungstemperatur soll, bedingt durch die pulmonale Vasodilatation einen Anstieg des NO-Gehaltes der Expirationsluft hervorrufen (Paredi et al., 2003). Weiterführende Arbeiten sollten daher Marker wie Ammonium oder Harnstoff, die einem systemischen Einfluss unterliegen, untersuchen. Grundsätzlich gilt für alle flüchtigen ASL-Inhaltsstoffe eine Abhängigkeit deren Löslichkeit von der Temperatur. Die Sammlungsdauer sollte hierbei, im Hinblick auf den vermuteten Einfluss des Kältereizes auf die Atemwege oder auf das Verhalten flüchtiger AKO-Inhaltsstoffe und exogener Gase einbezogen werden. Untersuchungen an Kälbern wurden dazu bislang nicht durchgeführt. Bisherige Arbeiten, die einen Anstieg der Harnstoff- und Protonen-Konzentration im AKO mit zunehmender Gewinnungsdauer nachweisen konnten beziehen sich auf Menschen (Diegel et al., 2000, Hunt und Vaughan, 2002). Andere Autoren schlossen den Einfluss der Sammlungsdauer für 8-Isoprostan und den pH-Wert dagegen aus (Carpenter et al., 1998, Vaughan et al., 2003a,

Gessner et al., 2004c). Mit unserem Versuch konnten die Beobachtungen von Diegel et al., (2000) sowie Hunt und Vaughan (2002), die für die AKO-Harnstoff-Konzentration je ml AKO und den pH-Wert einen Einfluss der Sammelzeit beschrieben, nicht bestätigt werden. Dies ist zu erklären, da die signifikant verschiedenen Zeitpunkte der Probennahmen für die pH-Wert Bestimmung mit 2 bzw. 7 Minuten im UA 1 (Spannweite: 9 – 29 min) überschritten wurden. Im Gegensatz dazu wurde eine 45 minütige AKO-Gewinnungszeit, die bedingt durch den auf die Atemwege einwirkenden Kältereiz, die Harnstoff-Exhalation signifikant erhöhte, in unserem Versuch nicht erreicht. Auch die 8-Isoprostan-Abscheidung [pg/100 l] korrelierte bei den gesunden Kälbern positiv mit der Sammelzeit. Es bestätigte sich aber die von Vaughan et al., (2003a) beschriebene fehlende Abhängigkeit zum AKO-pH. Die bisher beim Menschen nicht untersuchten Änderungen der Ammonium- oder Protein-Abscheidung im AKO lassen nach den Ergebnissen unserer Untersuchungen eine direkte bzw. indirekte Abhängigkeit vermuten. Die Nitrit-Konzentration je Volumen AKO und auch je 100 l Exhalat korrelierte positiv mit der Sammelzeit. In nachfolgenden Arbeiten sollte neben der Untersuchung des Leukotrien B₄, die Ursache für die wider-sprüchliche Abhängigkeit des pH-Wertes von der Sammlungsdauer gesucht werden.

Analytik: Fragestellungen, die in bisherigen Untersuchungen nicht ausreichend geklärt wurden, beziehen sich auf die Nachweis-Sensibilität der unterschiedlichen Testsysteme oder die Bedingungen, die eine reproduzierbare Bestimmung der AKO-Inhaltsstoffe ermöglichen. Um eine Aufkonzentrierung der Probe zu erreichen, könnte für nicht flüchtige Marker (wie Proteine) die Gefriertrocknung (Lyophilisation) Vorteile bieten. Auch ist die Frage offen, in wie weit allein der Nachweis des Proteinmusters (Proteom) bzw. der Molekulargewichte spezifische Aussagen zur Permeabilität der alveolo-kapillären Membran zulässt.

Die derzeit für 8-Isoprostan zur Verfügung stehenden Testsysteme (EIA, RIA, Massenspektroskopie) scheinen sich in deren Reproduzierbarkeit deutlich zu unterscheiden (van Hoydonck et al., 2004, Montuschi et al., 2003d). Da auf Grund der Flüchtigkeit eine Lyophilisation nicht möglich ist, wird die Vakuum-Zentrifugation zur Konzentrationserhöhung im AKO diskutiert (van der Meer et al., 2002).

Ziele weiterführender Untersuchungen zur Nitrit-, Ammonium-, Harnstoff- und Protonen-Konzentration des Atemkondensates sollte es sein, die Reproduzierbarkeit durch den Ausschluß möglicher Kontaminanten zu erhöhen. Beispiele hierfür wären die Verwendung der Nitrat-Reduktase oder eine Korrektur der Harnstoff-Konzentration durch Abzug des bestimmten Ammonium (Sittipunti et al., 2001, Reinhold et al., 2001a). Die Eignung der Lyophilisation, der Deaeration oder der parallelen PCO₂-Bestimmung werden dabei für die Protonen- und auch die Ammonium-Konzentration diskutiert. Weiterer Untersuchungsbedarf ergibt sich hier aus den zum Teil gegensätzlichen Ansichten, die im Schrifttum zu finden sind.

Die Bedeutung des Umgebungs-Kohlendioxidgehaltes auf den pH-Wert des AKO oder auf dessen Ammonium-Anreicherung wurde beschrieben (Effros et al., 2005). Da neben einem signifikanten Anstieg des pH-Wertes, in einer Publikation aber auch ein Abfall beschrieben wurde, steht die Frage nach den eigentlichen Wirkungen der Argon-Spülung (Hunt et al., 2000, Niimi et al., 2004, Borill et al., 2005). Nach Ansicht einiger Autoren soll die Deaeration bereits nach 5 Minuten zu einer vollständigen Entfernung des CO₂ und einer Stabilisation des AKO-pH führen, andere halten eine vollständige Entfernung des CO₂ und auch des Ammonium unter aeroben Bedingungen nicht für möglich (Gessner et al., 2003b,

Borill et al., 2005, Effros et al., 2005). Die Lyophilisation dagegen führte zu einer mehr als 95 % igen Entfernung des Ammonium im Kondensat. Die Bestimmung des Abstandes zwischen der AKO-Gewinnung und der Ermittlung des nativen pH-Wertes wird zwar empfohlen, ist aber bisher noch nicht standardisiert (Horváth et al., 2005). Da eine PCO_2 und damit pH-Abhängigkeit der Ammoniak-Abgabe aus dem Kondensat anzunehmen ist, sollte dies auch für den Ammonium-Nachweis gelten (Effros et al., 2005). Weiterer Untersuchungsbedarf in Bezug auf die Ammonium- und pH-Wert-Bestimmung ergibt sich daher allein aus der Fragestellung, inwieweit durch standardisierte Sammlungszeiten- oder Temperaturen der Einfluss des Umgebungs-Kohlendioxides minimiert werden kann, bis einheitliche Untersuchungsverfahren gefunden wurden.

Lagerung: Die Lagerungsstabilität der verschiedenen Marker kann in frischem und auch in gefrorenem Zustand erheblich variieren. Grundsätzlich liegt sie für flüchtige Substanzen niedriger als bei nichtflüchtigen AKO-Inhaltsstoffen. Für 8-Isoprostan wurde daher vor dem Einfrieren die Zugabe von Lipid-Peroxidationshemmern oder Metall-Chelatoren beschrieben, da ebenso wie für Leukotrien B_4 eine Lagerungsfähigkeit von nur wenigen Wochen möglich ist (Rahman, 2004). Im Gegensatz dazu soll eine reproduzierbare pH-Wert und Ammonium-Bestimmung noch nach 2 Jahren (- 80 °C) gegeben sein (Vaughan et al., 2003a, Gessner et al., 2004c, Borill et al., 2005, Wells et al., 2005). Die Festlegung einheitlicher Lagerungszeiten und Bedingungen, sowie die Kenntniss über mediatorspezifische Ab- und Umbau-Vorgänge sollten demzufolge ebenfalls ein Ziel zukünftiger Untersuchungen sein.

5.4.2 Biologische Aspekte

Die Vorgänge innerhalb der ASL sind weder durch das AKO noch die BALF eindeutig zu beschreiben. Sie können aber ergänzende Informationen, z.B. durch Differentialzellbilder liefern oder Veränderungen in pathologisch veränderten Bronchial- oder Alveolarabschnitten darstellen, die ventilatorisch nicht mehr erreicht werden. Folgende Arbeiten sollten auch den parallelen Nachweis von Mediator-Metaboliten oder Vorläufern weiter untersuchen, um Zusammenhänge unter entzündlichen Bedingungen besser bewerten zu können. Klärungsbedarf besteht auch bei den nachgewiesenen Korrelationen innerhalb des AKO, sowie zwischen den Untersuchungsmedien AKO, Serum und BALF. In der Literatur bestehen unterschiedliche Annahmen, inwieweit diese Mediatoren auf lungenspezifische Veränderung hindeuten, bzw. eine Kontamination durch exogene oder systemische Quellen, sowie der oberen Atemwege widerspiegelt (Kapitel 2.2). Eine Aufklärung biologischer Zusammenhänge ist aber erst möglich, wenn methodische Unklarheiten bezüglich der AKO-Gewinnung, der Mediator-Untersuchung und Proben-Lagerung beseitigt sind.

Protein: Unklar ist auch die Bedeutung systemischer Erkrankung, die sich in der ASL widerspiegeln. Daher könnte die Bestimmung lungenspezifischer Marker gegenüber dem Gesamteiweiß eine Interpretation pathologischer Veränderung der Lunge erleichtern. Für alle Proteine mit weniger als 200 kDa, damit also alle im AKO nachweisbaren Eiweisse, spielt die Konzentration des Serums möglicherweise eine entscheidende Rolle. Der Einfluss der Nahrungsaufnahme, -abstinenz oder auch organischer Erkrankungen (Leber, Niere) könnten somit die physiologische ASL-Konzentration mitbestimmen. Weiteren Forschungsbedarf erfordert die Frage nach der Ursache einer fehlenden Korrelation zwischen der Harnstoff-

und Protein-Konzentration im AKO oder der Einfluss der Alter- und Reifeabhängigkeit der alveolo-kapillären Membran.

8-Isoprostan: Ziel weiterführender Arbeiten sollte die Klärung biologischer Zusammenhänge betreffen, die eine Geschlechts- und Alters-Spezifität, den zirkadianen Rhythmus, die Auswirkungen des Rauchens, des Alkohols sowie der Arzneimitteleinnahme auf die 8-Isoprostan-Bildung unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen entscheidend beeinflussen.

LTB₄: Unklarheit besteht in der Ursache einer fehlenden Abhängigkeit des AKO-Leukotrien-B₄ zur Anzahl der alveolären Makrophagen in der BALF, in denen eine altersabhängige Leukotrien-Bildung nachgewiesen wurde. Eine Aufklärung dieser biologischen Zusammenhänge sollte damit das Ziel weiterer Untersuchungen darstellen.

Nitrit: Angesichts des nicht gesicherten Zusammenhanges zum exhalieren NO und der beschriebenen Nitrit-Kontaminationsmöglichkeiten ist überhaupt unklar, ob trotz eines NO-Verlustes von ca. 95 % über die pulmonale Zirkulation, eine lungenspezifische Aussagekraft des AKO-Nitrit gegeben ist. Weiteren Forschungsbedarf erfordert die Aufklärung der fehlenden Korrelation zwischen dem exhalieren NO und AKO-Nitrit. Die oberen Atemwege, insbesondere der Speichel (Nahrungsaufnahme), aber auch die Nase und die Nasennebenhöhlen stellen bedeutende Kontaminationsquellen dar, deren Bedeutung in folgenden Arbeiten eingehender zu klären ist.

Harnstoff: Bedingt durch die möglichen physiologischen Unterschiede der untersuchten Spezies (Wiederkäuer, Allesfresser) sind die Mechanismen der Nahrungsaufnahme und des Entwicklungszustandes (Alter, metabolische Körpermasse) die eine Harnstoffanflutung in die ASL und deren Abscheidung ins AKO beeinflussen noch unklar. Auch die vermutete Eignung des Harnstoffs als Permeabilitätsmarker der alveolo-kapillären Membran ist mit dem bisherigen Forschungsstand nicht abschließend geklärt.

Ammonium: Ziel weiterführender Arbeiten sollte es sein, die Ursache für die bei Mensch und Tier beschriebene Altersabhängigkeit und den Einfluss der Nahrungsaufnahme auf die Anreicherung im Serum und in der ASL zu untersuchen. Die wichtigste und gleichzeitig strittigste Frage stellt sich aber nach dem Verhältniss zwischen dem pulmonalen und dem oralen bzw. systemischen Ammoniak. Auch bestehen gegensätzliche Ansichten im Hinblick auf das erwartete Verhalten der Ammonium-Konzentration des AKO während Entzündungsvorgängen.

pH-Wert: Die Bedeutung eines Magensäurereflux, der Hyper- oder Hypoventilation, des arteriellen oder alveolären PCO₂ und eine durchgeführte Therapie mit Antibiotika oder Corticosteroiden werden diskutiert und sollten auch in weiterführende Arbeiten untersucht werden. Auch ist der Einfluss der speziesspezifischen, intra-individuellen und auch tageszeitlich variierenden ASL-Pufferkapazität, des systemischen Säure/Basen Haushaltes oder der Nahrungsaufnahme auf den AKO-pH ungeklärt. Unabhängig von der Frage nach der Bestimmbarkeit und der Identität der pH bestimmenden Faktoren besteht das entscheidende Problem darin, deren Ursprung zu definieren.