

7. Zusammenfassung

Die innere Oberfläche der Lunge wird von einem "Surfactant" ausgekleidet, das die Oberflächenspannung stark herabsetzt und dadurch den Gasaustausch erst ermöglicht. Das Surfactantsystem besteht aus verschiedenen Phosphorlipiden und Proteinen.

In der vorliegenden Dissertation wurde ein Meßsystem für surfactant-assoziiertes Protein A (SP-A), die quantitativ bedeutendste Proteinkomponente des Surfactants, erarbeitet. Das Meßsystem wurde an bronchoalveolärer Lavage (BAL) von Ratten aus zwei inhalationstoxikologischen Untersuchungen des Fraunhofer Instituts für Toxikologie und Aerosolforschung (Fh-ITA) auch biologisch evaluiert. Einige ergänzende Versuche beschäftigten sich in ähnlicher Weise mit dem surfactant-assoziierten Protein B (SP-B).

Für den Aufbau des Meßsystems standen zwei Antikörper zur Verfügung:

1. Ein monoklonaler Antikörper, der gegen die globuläre Struktur des SP-A Moleküls gerichtet ist:

Er diente dem Aufbau eines empfindlichen und spezifischen "Enzyme-linked Immunosorbent Assay" (ELISA). Dieser Antikörper bindet kein reduziertes oder denaturiertes SP-A. Er war deshalb zur Darstellung des SP-A mittels Western Blot Analyse nur bedingt geeignet.

2. Ein polyklonales Serum vom Kaninchen:

Dieser Antikörper reagiert außer mit SP-A auch mit kollagenen Strukturen. Er war deshalb für den Gebrauch im ELISA-Meßverfahren ungeeignet, weil er zu artifiziell erhöhten Meßwerten auch in Abwesenheit von SP-A führte. Da dieser Antikörper aber auch reduziertes und denaturiertes SP-A bindet, konnte er mit Erfolg im Western Blot und für den histochemischen SP-A Nachweis eingesetzt werden.

Zunächst wurden die Bedingungen des ELISA für die SP-A Messung in BAL Proben optimiert. Es wurden die Reaktanten ausgewählt und ihre Konzentrationen im Test, wie auch weitere Bedingungen festgelegt. Als Standard wurde gentechnologisch

hergestelltes menschliches SP-A verwendet. Das schließlich etablierte Meßverfahren erlaubte eine zuverlässige Bestimmung des SP-A in 1 μ l BAL der Ratte (bzw. 100 μ l 1:100 verdünnte Probe). Der Variationskoeffizient (VK) in Serie betrug 5,6%, der VK von Tag zu Tag 9,1%. Durch Aufstockungs- und Verdünnungsversuche wurde die Richtigkeit des quantitativen Nachweises überprüft. Kreuzreaktionen mit Kollagen und mit Serumproteinen ergaben sich nicht. Die Empfindlichkeit der Methode betrug 0,5 μ g SP-A/l BAL.

Im Western Blot ließ sich das SP-A nach elektrophoretischer Trennung ebenfalls in BAL von Ratten nachweisen. Es stellte sich in mehreren Banden bei 28 kDa, 32-36 kDa und 60 kDa dar, die der Literatur entsprachen. Anhand der Intensität der Banden konnte eine Abschätzung des SP-A Gehaltes erfolgen und ggf. das Auftreten untypischer Banden erkannt werden.

Der polyklonale Antikörper wurde exemplarisch auch für die histochemische Darstellung des SP-A in Lungenschnitten verwendet. Hier wurden Pneumozyten-Typ-II und Makrophagen, nicht aber Pneumozyten-Typ-I in Übereinstimmung mit den bekannten Synthese- bzw. Abbauorten angefärbt.

Beide Meßsysteme wurden schließlich in zwei inhalationstoxikologischen Studien an Ratten eingesetzt, um im Vergleich mit am Fh-ITA bisher in der BAL bestimmten Analyten Aussagen über die diagnostische Sensitivität des Meßsystems zu gewinnen.

In der ersten Studie waren Gruppen von Ratten unterschiedlich lang verschiedenen Konzentrationen eines Isozyanat (MDI)-Aerosols ausgesetzt. In der zweiten Studie wurde Gruppen von Ratten Ruß intratracheal instilliert, und teilweise zusätzlich mit Ozon in der Atemluft behandelt. In beiden Studien wurde dosisabhängig ein deutlicher SP-A Anstieg in der BAL beobachtet. Die Ergebnisse wurden exemplarisch an einigen BAL Proben aus der MDI-Studie auch mittels Western Blot bestätigt. Die quantitativen Veränderungen des SP-A waren deutlicher ausgeprägt als die üblicherweise in der BAL bestimmten Analyten (Gesamtprotein, LDH, β -Glucuro-

nidase), so daß geschlossen werden kann, daß der in dieser Arbeit etablierte ELISA für SP-A in BAL toxisch induzierte Veränderungen in der Lunge früher und empfindlicher anzeigt als die herkömmlichen Analyten.

8. Summary

A. Kühn

Qualitative and quantitative determination of the surfactant-associated protein A in bronchoalveolar lavage fluid of rats.

The internal surface of the lung is covered with "surfactant", that reduces surface tension and by that gas exchange is ensured. The surfactantsystem consists of several phospholipids and proteins.

In this investigation a method for determination of the surfactant-associated protein A, the quantitative most prominent component of surfactant, was established. The assay was evaluated biologically in rats bronchoalveolar lavagefluid (BAL) received from two toxicological inhalation studies of the "Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung (Fh-ITA) Hannover". Furthermore some trials dealt with the surfactant-associated protein B in a similar way.

Two antibodies were available for the assay:

1. A monoclonal antibody, prepared against the globular structure of SP-A: This antibody was used to develop a sensitive and specific "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA). The antibody did not react with reduced and denaturated SP-A. Therefore it was not suitable for the identification of SP-A in Western blot analysis.
2. A polyclonal serum from rabbit: This antibodies reacted with SP-A and moreover with collagenous structures. The serum could not be applied in ELISA measurement, because it led to artificially increased values also in absence of SP-A. But it could be used successfully in Western blot analysis and immunocytochemistry, because it detected SP-A also under reducing conditions and after denaturation.

First the ELISA conditions for measurement of SP-A in lavagefluid were optimized. The reactants were selected and their amounts and other conditions in the assay were

investigated. A "recombinant" human SP-A was used for standardisation. The assay was capable for determination of SP-A in 1 μ l BAL of rats (or 100 μ l of 1:100 dilution) with a coefficient of variation (VC) in serie of 5,6 % and a VC from day to day of 9,1 %. The accurancy of quantitative evaluation was approved by recovery of added standard from a test solution. Crossreactivity with collagen and serum proteins could be excluded. The sensitivity of the method allowed the detection of 0,5 μ g SP-A/l BAL.

SP-A was also detected in rat BAL by immunoblot technique after electrophoretical separation of proteins. SP-A was observed in several lanes at 28 kDa, 32-36 kDa and 60 kDa. The amounts of SP-A could be estimated and untypical lanes could be revealed by the strenth of staining.

The polyclonal serum was also used for histochemical representation of SP-A in lung sections. According to the known places of synthesis and degradation, type-II-pneumocytes and macrophages, but not type-I-pneumocytes were stained.

Finaly both systems were tested in two toxicological inhalation studies with rats, in order to get evidence about diagnostical sensitivity in comparison with analytes, that are measured in BAL at Fh-ITA until now. In the first study groups of rats were treated with various concentrations of an isocyanat aerosole (MDI) for different time. In the second study groups of rats were instilled intratrachelly with soat and after that partly treated with ozon in the breathing air. In both studies a dose-dependent increase of SP-A was evident. The results were exemplary confirmed by Western blot with some lavagefluid of the MDI-study. Quantitative chances in contents of SP-A were more distinctly than those in the usual determined analytes (total protein, LDH, β -glucuro-nidase) in BAL.

The present investigation shows, that the quantitative ELISA for determination of SP-A indicates toxic induced alterations in the lung earlier and more sensitive than other procedures.