

(1985) Pferdeheilkunde 1, 155–158

Veränderungen der Surfactantphospholipid-zusammensetzung im Tracheobronchialsekret chronisch lungenkranker Pferde

W. Jahn und E. Deegen

Klinik für Pferde der Tierärztlichen Hochschule Hannover
Vorsteher: Prof. Dr. R. Zeller

Einleitung

Das Alveolarepithel der Lunge wird von einer oberflächenaktiven Substanz ausgekleidet, deren Anwesenheit unabdingbare Voraussetzung für eine ungestörte Lungenfunktion ist. Diese oberflächenaktive Substanz wird als Antiatelektasefaktor oder Surfactant bezeichnet. Surfactant ist ein Lipidproteinmisch, wobei dem Phospholipidanteil die entscheidende Funktion zugesprochen wird (Pattle, 1975). Das Surfactantmaterial ist in der Lage, die Oberflächenspannung auf der Innenauskleidung der Alveolen dynamisch zu senken (Bauer, 1980). Dadurch wird das Kollabieren der Alveolen während der Expiration verhindert (Pattle, 1975; Obladen, 1979; Robertson, 1980). Wenn das Surfactantmaterial von den für die Synthetisierung verantwortlichen Zellen, den Pneumozyten II, unvollständig ausgebildet wird, so können schwere funktionelle Störungen in der Lunge und schließlich auch schwerwiegende morphologische Schäden auftreten.

Am bekanntesten ist das Atemnotsyndrom des Neugeborenen (RDS = Respiratory Distress Syndrom), ein Krankheitszustand, der bei Unreife der Lunge bzw. Unreife der Surfactant-synthetisierenden-Zellen mit der Folge eines Surfactantmangels bei Mensch und Tier entstehen kann (Obladen, 1979; Rosedale et al., 1967). In der Humanmedizin stellt das Atemnotsyndrom des Neugeborenen die Hauptursache der Neugeborenensterblichkeit dar (Obladen, 1979).

Offensichtlich hat das Surfactantsystem aber neben der antiatelektatischen Wirkung noch weitere wichtige Funktionen. Am unspezifischen Abwehrsystem der Lunge sollen die Surfactantphospholipide durch zwei Mechanismen beteiligt sein (Robertson, 1980; Morgenroth et al., 1983), und zwar durch Ummantelung von Bakterien für die nachfolgende Phagozytose durch Makrophagen und durch den Transport von Partikeln. Nach Reifenrath (1980) übt das Surfactantmaterial nicht nur in den Alveolen, sondern auch in den kleinen und großen Atemwegen eine antiadhäsive Wirkung im Sinne einer Antiklebstofffunktion aus. In

Zusammenfassung

Bei 11 lungengesunden Pferden und 34 Pferden mit chronischen Bronchialerkrankungen unterschiedlicher Ausprägung wurden Phospholipide aus dem Tracheobronchialsekret bzw. aus trachealen Spülproben durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie analysiert. Der Dünnschichtchromatographie ging eine Lipidextraktion nach Folch voraus. Die prozentualen Anteile einzelner Phospholipide wurden photodensitometrisch bestimmt. Für folgende Phospholipide wurde die prozentuale Verteilung ermittelt:

Phosphatidylcholin = Lecithin (L)

Sphingomyelin (S)

Phosphatidylglycerol (PG)

Phosphatidylethanolamin (PE)

Phosphatidylinositol (PI)

Phosphatidylserin (PS)

Es stellte sich heraus, daß PG mit zunehmendem Krankheitsgrad signifikant abnimmt, während S, PI und PS mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung signifikant zunehmen.

Es wird angenommen, daß zwischen den Veränderungen im Surfactantmaterial und der gestörten Lungenfunktion bei Pferden mit chronischen Bronchialerkrankungen Zusammenhänge bestehen.

Surfactant phospholipid components in the tracheobronchial mucus of COPD horses

34 horses with respiratory disorders and 11 healthy horses were examined clinically and by bronchoscopy. The tracheobronchial aspirates and lavage fluids were examined in order to compare the surfactant phospholipid composition of healthy and diseased horses.

Lipid extraction was carried out according to Folch et al. (1957), followed by two-dimensional thin-layer chromatography to separate the phospholipids. Quantification of the individual phospholipids was performed by photodensitometry.

Six different phospholipids were present in each horse.

Phosphatidylcholin = Lecithin (L)

Sphingomyelin (S)

Phosphatidylglycerol (PG)

Phosphatidylethanolamine (PE)

Phosphatidylinositol (PI)

Phosphatidylserine (PS)

The highest portion of these phospholipids was assessed for lecithin followed by phosphatidylglycerol.

The composition of certain phospholipids differed in correlation to the degree of the respiratory disorder.

Horses without respiratory symptoms have had the highest PG level, this level decreased with the increasing degree of COPD.

S, PI and PS increased significantly with the degree of COPD. In healthy horses L/S ratio as well as PG/PI and PG/PS ratios differed significantly from those in horses affected by COPD. The present findings suggest that the pulmonary surfactant system of horses suffering from COPD is deficient in comparison to healthy controls.

Gegenwart von Surfactant werde das Bronchialsekret nicht nur in eine transportfähige Form gebracht, sondern auch die Gleitfähigkeit des Sekrets bleibe erhalten. Diese die tracheobronchiale Clearance fördernde Funktion des Surfactantmaterials wird auch von Morgenroth et al. (1983) beschrieben. Die Autoren fanden elektronenoptisch zwischen der physiologischen Sol- und Gelphase des Tracheobronchialschleimfilmes Surfactantmaterial in Tröpfchenform.

Inzwischen wurde aus der Humanmedizin bekannt, daß Verschlechterungen der mukoziliären Clearance, wie sie bei chronischer Bronchitis auftreten, auch mit Störungen

im Surfactantmaterial einhergehen (Hallman et al., 1982; Catena et al., 1983).

Es ist anzunehmen, daß auch bei Pferden mit chronisch obstruktiver Bronchitis Surfactantstörungen auftreten und möglicherweise eine pathogenetische Rolle spielen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Surfactantmuster von lungengesunden Pferden und solchen mit chronisch obstruktiver Bronchitis zu ermitteln.

Material und Methodik

Patientengut

Das Phospholipidmuster im Tracheobronchialsekret und der Trachealspülflüssigkeit wurde bei 45 Pferden unterschiedlicher Rasse und unterschiedlichen Alters untersucht. 34 dieser Pferde waren respiratorisch krank. Die restlichen 11 Pferde waren respiratorisch gesund. Es erfolgte eine Einteilung der Pferde nach dem Schweregrad der Erkrankung in 3 Gruppen, wie sie bei Klein (1984) beschrieben wird. Kriterien für die Klassifizierung waren die klinische und tracheobronchoskopische Untersuchung sowie die Analyse des arteriellen Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruckes (P_aO_2 und P_aCO_2).

Die Gruppen wurden wie folgt eingeteilt:

- Gruppe 1: 11 Pferde ohne respiratorische Symptomatik,
 Gruppe 2: 19 Pferde mit einer latenten chronischen Bronchialerkrankung,
 Gruppe 3: 15 Pferde mit einer apparenten chronischen Bronchialerkrankung.

Die Pferde der Gruppe 2 waren häufig auskultatorisch ohne besonderen Befund, zeigten aber perkutorisch eine überlaute Lungenschallzone. Die tracheobronchoskopischen Veränderungen waren gering. Die arterielle Blutgasanalyse zeigte meist normale Werte. Die Pferde zeigten keine oder eine geringgradige Leistungsminderung und hatten keinen Hinweis auf eine Ruhedyspnoe.

Die Pferde der Gruppe 3 wiesen deutliche klinische, endoskopische und blutgasanalytische Krankheitsbefunde sowie auch eine Leistungsminderung auf (Jahn, 1984).

Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials

Der Tracheobronchialschleim wurde jeweils am stehenden und unsedierten Pferd via Endoskop abgesaugt. Anschließend wurden 0,5 ml von jeder Probe mit 9,5 ml physiologischer NaCl-Lösung vermischt und im Stomacher (Schoenhardt u. Ringelmann, 1981) mechanisch homogenisiert. Bei Pferden ohne pathologische Vermehrung des Tracheobronchialsekrets wurden mit Hilfe des Bronchoskops 50 ml physiologische NaCl-Lösung im kranialen Teil der Trachea instilliert und vor der Bifurkation der Trachea wieder abgesaugt. Diese Proben wurden ebenfalls im Stomacher homogenisiert. Durch die darauffolgende Zentrifugation wurden in beiden Proben die zelligen Bestandteile separiert und der Überstand zur Untersuchung verwendet. Es folgten, wie bei Jahn (1984) beschrieben, die Phospholipidextraktion nach Folch, mehrere Einengungsschritte mittels eines Rotationsverdampfers, Azetonfällung und schließlich die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie. Die Auswertung der Substanzflecken auf den

Dünnschichtchromatographieplatten wurde mit einem Photodensitometer durchgeführt.

Ergebnisse

Der im Tracheobronchialsekret (TBS) bzw. in der Trachealspülflüssigkeit von Pferden vorhandene Gesamtphospholipidgehalt setzt sich aus mehreren verschiedenen Komponenten zusammen. In der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt 7 Phospholipide identifiziert werden:

- Phosphatidylcholin = Lezithin (L)
 Sphingomyelin (S)
 Phosphatidylglyzerol (PG)
 Phosphatidylethanolamin (PE)
 Phosphatidylinositol (PI)
 Phosphatidylserin (PS)
 Phosphatidsäure (PA)

Phosphatidsäure ließ sich nur in Spuren bei 13 Pferden, verteilt auf alle Pferdegruppen, nachweisen und blieb bei der Berechnung der Prozentanteile der einzelnen Phospholipide unberücksichtigt. In Tabelle 1 sind die Anteile der 6 Phospholipidfraktionen am Gesamtphospholipidgehalt in Prozent, bezogen auf die 3 Diagnosegruppen, dargestellt.

Tab. 1: Anteile der sechs Phospholipidfraktionen am Gesamtphospholipidgehalt in Prozent; Einteilung der Pferde in 3 Diagnosegruppen

Pferdegruppe	Gruppe 1 respira- torisch gesund	Gruppe 2 latent chronisch krank	Gruppe 3 apparent chronisch krank	
Phospholipidfraktion	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	Signifikanz
L %	66,70 ± 7,31	68,91 ± 9,89	62,71 ± 10,63	n. s.
S %	1,61 ± 0,34	2,12 ± 1,05	3,22 ± 1,76	1:3 u. 2:3 **
PG %	18,33 ± 6,09	13,51 ± 5,74	11,57 ± 5,66	1:3 *
PE %	5,45 ± 1,93	5,01 ± 2,91	7,03 ± 3,90	n. s.
PI %	6,00 ± 2,86	7,06 ± 3,03	9,69 ± 3,54	1:3 *
PS %	1,91 ± 1,26	3,39 ± 2,85	5,78 ± 3,28	1:3 u. 2:3 **

n. s. \triangleq nicht signifikant

* \triangleq $p < 0,05$

** \triangleq $p < 0,01$

Die statistische Berechnung erfolgte mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse, die ARC SIN \sqrt{x} transformiert wurde, da es sich bei den Werten um Prozentangaben handelte.

Es fällt auf, daß L bei allen Pferden die bei weitem stärkste Fraktion ist. PG stellt mit 11 bis 18 Prozent nach Lezithin den zweitgrößten Anteil an den Gesamtphospholipiden. Die obengenannte Einteilung der Pferde nach dem Krankheitsgrad ergab für die 3 Gruppen Unterschiede in der prozentualen Zusammensetzung der Phospholipidkomponenten (s. auch Abb. 1). Das Lezithin zeigt zwischen den 3 Gruppen meßbare, jedoch nichtsignifikante Unterschiede. Die 4 Phospholipide PG, PI, PS und S weisen dagegen deutliche Unterschiede zwischen den 3 Gruppen auf. Die Werte von PG sinken mit der Zunahme des Krankheitsgrades. Sie fallen von 18,33 % bei den gesunden über 13,51 % in Gruppe 2 auf 11,57 % in der Gruppe 3 der appa-

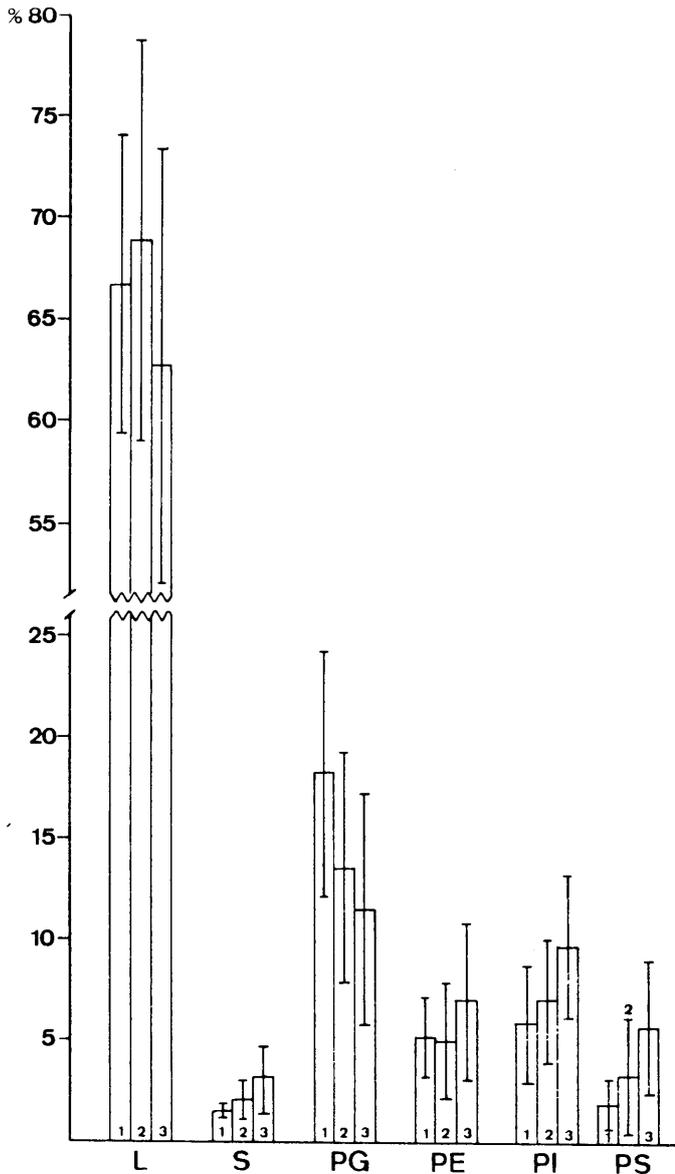


Abb. 1: Anteile der sechs berechneten Fraktionen am Gesamtphospholipidgehalt bei Einteilung der Pferde in drei Diagnosegruppen.
 1: respiratorisch gesund
 2: latente chronische Bronchialerkrankung
 3: apparente chronische Bronchialerkrankung

n. s. \triangleq nicht signifikant
 * \triangleq $p < 0,05$
 ** \triangleq $p < 0,01$

Phospholipid-Quotient	respiratorisch gesund	respiratorisch krank	Signifikanz
L/S	31,7	20,3	*
L/PG	15,7	25,4	*
L/PS	30,8	20,5	*
S/PI	23,5	22,8	n. s.
S/PS	28,3	21,3	n. s.
PG/PI	32,4	20,0	**
PG/PS	33,5	19,6	**
PI/PS	26,9	21,7	n. s.

n. s. \triangleq nicht signifikant
 * \triangleq $p < 0,05$
 ** \triangleq $p < 0,01$

Tab. 2: Rangmittelwerte von acht Phospholipid-Quotienten und ihre Unterschiede zwischen respiratorisch gesunden und kranken Pferden.

rent chronisch kranken Pferde ($p < 0,05$). Das PI und das PS wie auch S zeigen eine mit dem Schweregrad der Erkrankung ansteigende Tendenz. Die Signifikanz liegt für PI bei $p < 0,05$ und für PS und S bei $p < 0,01$. PE läßt keine großen Schwankungen zwischen den Gruppen erkennen. Anhand der prozentualen Anteile der einzelnen Fraktionen wurden zusätzlich Verhältnisse gebildet. Aus der Perinatalogie sind das L/S- und das PI/PS-Verhältnis bekannt (Gluck et al., 1973; Kulovich et al., 1979; Obladen, 1979; Lorenz, 1982).

Über diese beiden Quotienten hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit noch 6 weitere Quotienten gebildet. Um den statistischen Vergleich dieser Verhältnisse zwischen den Gruppen zu ermöglichen, wurden die Quotienten in Ränge transformiert und der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Hierfür war es erforderlich, die Pferde in nur 2 Gruppen (Gruppe 1 respiratorisch gesund; Gruppe 2 respiratorisch krank) zu unterteilen. Die Vergleiche der Quotienten zwischen den beiden Gruppen sind in Abbildung 2 und Tabelle 2 dargestellt. Zwischen respiratorisch gesund und respiratorisch krank ergeben sich für 3 Phospholipidquotienten, nämlich für L/S, L/PG und L/PS, schwachsignifikante Unterschiede. Deutlich größer sind die Unterschiede aber beim PG/PI- und beim PG/PS-Verhältnis. Für diese beiden Phospholipidquotienten ließen sich die gesunden von den kranken Pferden mit einer deutlich geringeren Irrtumswahrscheinlichkeit trennen (s. Tab. 2).

Diskussion

Die Entnahme des Sekrets mittels Bronchoskop (Fischer, 1980) stellt eine einfache und ungefährliche Art der Sekretgewinnung dar, die anderen Methoden, z. B. der transtrachealen Aspiration (Schatzmann et al., 1972), vorzuziehen ist.

Die aufwendigere zweidimensionale Dünnschichtchromatographie wurde der eindimensionalen Methode vorgezo-

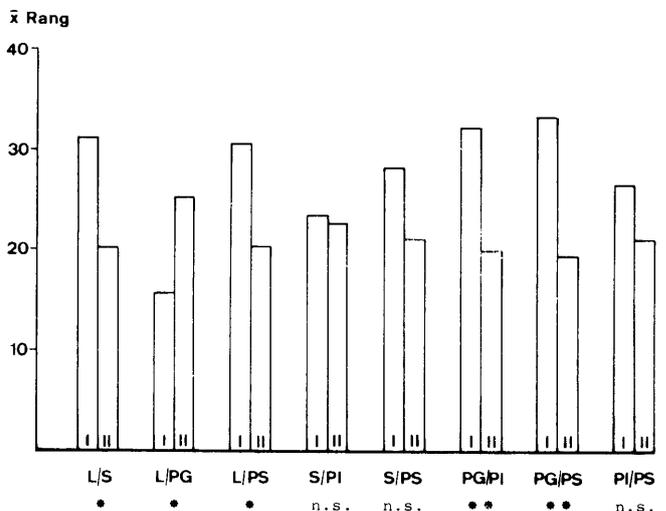


Abb. 2: Rangmittelwerte von acht Phospholipidquotienten und ihre Unterschiede zwischen respiratorisch gesunden und kranken Pferden. I: respiratorisch gesund II: respiratorisch krank

gen, da bislang noch keine Angaben über die Zusammensetzung des Surfactant im Tracheobronchialsekret des Pferdes vorlag und mit der eindimensionalen Dünnschichtchromatographie keine befriedigende Trennung aller vorhandenen Komponenten erreicht werden konnte.

Die Ergebnisse machen deutlich, daß das Surfactantmaterial bei lungengesunden Pferden anders zusammengesetzt ist als bei solchen mit chronischen Bronchialerkrankungen. Auch läßt sich ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und den Veränderungen der einzelnen Surfactantanteile erkennen. So sinkt der Anteil von PG mit zunehmendem Krankheitsgrad, während PI, PS und S sich umgekehrt verhalten. Durch die Bildung von Quotienten konnten die Tendenzen teilweise noch deutlicher sichtbar gemacht werden. Das PG/PI- und das PG/PS-Verhältnis erbringen die stärksten Unterschiede zwischen lungengesunden und lungenkranken Pferden. Die Veränderungen im Surfactant von Pferden mit Bronchialerkrankungen sind gut vergleichbar mit den meisten bisher bekannten pathologischen Veränderungen des Surfactant anderer Spezies. So ist der LS-Quotient beim Atemnotsyndrom des Kalbes und des neugeborenen Kindes ebenso erniedrigt (Gluck et al., 1971; Hallman u. Gluck, 1976; Hallman et al., 1977; Jahn, 1982; Lorenz, 1982). PG ist beim Auftreten des Atemnotsyndroms beim Menschen kaum nachzuweisen. Mit der Besserung der Atemnot ist jedoch ein Anstieg des PG zu beobachten (Hallman et al., 1977; Obladen, 1979). Beim Atemnotsyndrom des Erwachsenen kommt es wie beim chronisch lungenkranken Pferd

zu einer Zunahme von S und PS (Hallman et al., 1982). Auch beim Menschen mit chronischen Bronchialerkrankungen sinkt der PG-Gehalt, während S und PS steigen (Hallman et al., 1982; Catena et al., 1983).

Die eigenen Untersuchungen sprechen ebenso wie die Untersuchungen beim Menschen dafür, daß bei chronischen Bronchialerkrankungen Störungen im Ablauf der Surfactantbildung auftreten, die an der Lunge weitreichende funktionelle Folgen haben, z. B. Störungen bei der Diffusion der Atemgase, beim Sekrettransport und bei der Phagozytose. Mögliche Ursachen für Veränderungen im Surfactantsystem bei obstruktiven Bronchialerkrankungen werden für den Menschen von Morgenroth et al. (1983) angegeben. Morgenroth et al. (1983) zeigten, daß sich bei längerer obstruktiv bedingter alveolärer Hypoventilation eine morphologische Umgestaltung des Alveolarepithels einstellt. Es kommt nicht nur zu einer Zunahme der Zahl surfactantproduzierender Pneumozyten II, sondern diese bilden auch vermehrt Surfactant, welches offensichtlich unreif in das Alveolarlumen abgegeben wird.

Wenn diese morphologischen Veränderungen auch beim Pferd mit chronischer Bronchitis auftreten, wofür vorläufige Untersuchungsergebnisse sprechen (Drommer, 1985), so ergeben sich auch bestimmte therapeutische Konsequenzen. Einerseits muß die Verbesserung der alveolären Ventilation durch eine Beseitigung der Obstruktion in den kleinen Atemwegen erreicht werden. Andererseits könnte man sich vorstellen, daß ein von außen zugeführter Surfactantersatz eine Verbesserung der Lungenfunktion bewirkt.

Literatur

- Bauer, E. (1980): Zur Biochemie des endobronchialen Fluidsystems, in: H. Rensch (Hrsg.): Mukustransport. Distri Verlag, München, S. 17-30.
- Catena, E., Marcatili, S., Marzo, C., Matin, A., u. Roghiani, E. (1983): The components of alveolar surfactant of the human lung in normal and pathological states. in: Cosmi, E. V., u. Scarpelli, E. M. (Hrsg.): Pulmonary Surfactant System, Proc. of the Int. Sympos. on the surfactant System of Lung. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York. 33-38.
- Drommer, W. (1985): Persönliche Mitteilung.
- Gluck, L., Kulovich, M. V., Borer, R. C., Brenner, P. H., Anderson, G. G., u. Spellacy, W. H. (1971): Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. Am. J. Obstet. Gynecol. 109, 440-445.
- Gluck, L., u. Kulovich, M. (1973): Lecithin/Sphingomyelin ratios in amniotic fluid in normal and abnormal pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 115, 539-546.
- Hallman, M., u. Gluck, L. (1976): Phosphatidylglycerol in lung surfactant. III. Possible modification of surfactant function. J. Lipid Res. 17, 257-262.
- Hallman, M., Feldman, B. H., Kirkpatrick, E., u. Gluck, L. (1977): Absence of phosphatidylglycerol (PG) in respiratory distress syndrome in the newborn. Study of the minor surfactant phospholipids in newborns. Pediatr. Res. 11, 714-720.
- Hallman, M., Spragg, R., Harrell, J. H., Moser, K. M., u. Gluck, L. (1982): Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. J. Clin. Invest. 70, 673-683.
- Jahn, D. (1982): Untersuchungen über die Ursachen des Atemnotsyndroms frühgeborener Kälber mit besonderer Berücksichtigung des Surfactantsystems. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- Jahn, W. (1984): Surfactant-Phospholipide im Tracheobronchialsekret von gesunden und chronisch lungenkranken Pferden. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- Klein, H.-J. (1984): Der Histamininhalationsprovokationstest zur Bestimmung der unspezifischen Reagibilität der Atemwege beim Pferd. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- Kulovich, M. V., Hallman, M. B., u. Gluck, L. (1979): The lung profile. I. Normal pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 135, 57-63.
- Lorenz, U. (1982): Antepartale Lungenreifebestimmung durch Fruchtwasseranalyse. Springer Verlag Berlin, Heidelberg.
- Morgenroth, K., Herzog, H., u. Opferkuch, W. (1983): Pneumonie. Pharmazeutische Verlagsgesellschaft, München.
- Obladen, M. (1979): Tracheale Phospholipid-Zusammensetzung und Atemnot-Syndrom des Neugeborenen. Fortschr. Med. 97, 403-408.
- Pattle, R. E. (1975): The lung surfactant: An introduction. J. Reprod. Fert. 23, 645-650.
- Reifenrath, R. (1980): Funktionelle Überlegungen zu Sekreteigenschaften der kleinen Atemwege, in: Rensch, H. (Hrsg.): Mukustransport. Distri Verlag, München, S. 41-53.
- Robertson, B. (1980): Interaction of pulmonary surfactant and alveolar macrophages in the non-specific defense system of the lung. Eur. J. Respir. Dis. 61, Suppl. 108, 16-18.
- Rosdale, P. D., Pattle, R. E., u. Mahaffey, L. W. (1967): Respiratory distress in a newborn foal with failure to form lung lining film. Nature 215, 1498-1499.
- Schonard, G., u. Ringelmann, R. (1981): Bakteriologische Diagnostik bei Bronchitis und Pneumonie - Teil 2: Ergebnisse quantitativer Sputumuntersuchungen unter Berücksichtigung von Leukozyten, Eiweiß, Erythrozyten und Bakterien. Immun. Infekt. 9, 121-130.

Prof. Dr. E. Deegen
Klinik für Pferde
Tierärztliche Hochschule
Bischofsholer Damm 15
3000 Hannover 1

Auszug aus der Dissertation: Jahn, W., Hannover (1984).