

» Wert der Bestimmung der alkalischen Phosphatase (AP) und des AP/Albumin-Quotienten in der bronchoalveolären Lavage (BAL) für die Diagnostik interstitieller Lungenkrankheiten

Zusammenfassung: Tierexperimentelle Befunde legen nahe, dass die in der BAL nachweisbare AP zu einem wesentlichen Teil im Pneumozyten II produziert wird und dass eine Schädigung der Pneumozyten II mit einer Erhöhung der AP in der BAL verbunden ist. Ziel unserer Untersuchung war die Klärung der Frage, ob die Bestimmung der AP in der BAL bei der Diagnostik interstitieller Lungenkrankheiten hilfreich sein kann. Zum Nachweis eines eventuellen Übertritts der AP aus dem Plasmaraum in die BAL wurde das Albumin in der BAL gemessen und der AP/Albumin-Quotient errechnet. In die Auswertung gingen 85 Patienten mit folgenden Diagnosen ein: 34 Sarkoidosen (Stadium I/II/III 14/7/13), 14 idiopathische Lungenfibrosen (IPF), 7-mal Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie (BOOP), 6 exogen-allergische Alveolitiden (EAA), 24 Kontrollen (13 Nichtraucher, 11 Raucher). Wir sahen bei IPF und BOOP eine signifikante Erhöhung der AP in der BAL im Vergleich mit Kontrollen und Sarkoidose ($42,4 \pm 36,6$ bzw. $35,6 \pm 16$ vs. $15,8 \pm 12,7$ bzw. $15,0 \pm 9,8$ U/l). Das Albumin in der BAL war bei Sarkoidose im Vergleich mit den Kontrollen signifikant erhöht ($13,2 \pm 10$ vs. $5,7 \pm 4$ mg/dl), der AP/Albuminquotient erniedrigt ($1,3 \pm 0,9$ vs. $3,6 \pm 3,0$ U/10 mg). Das diskordante Verhalten von AP und Albumin bei verschiedenen Krankheiten spricht gegen eine plasmatische Beimischung als Ursache der AP in der BAL. Ohne Einfluss auf AP und Albumin in der BAL war bei der Sarkoidose das Stadium der Erkrankung und bei der Kontrollgruppe die Tatsache eines Nikotinkonsums. Schlussfolgerung: Bei Patienten mit chronischen interstitiellen Lungenkrankheiten zeigen sich in Abhängigkeit vom Krankheitsbild unterschiedliche Konzentrationen von AP und Albumin in der BAL. Insbesondere für die Diagnostik einer IPF (erhöhte AP, normaler AP/Albuminquotient) und einer Sarkoidose (normale AP, erniedrigter AP/Albuminquotient) könnte deren Bestimmung hilfreich sein.

Concentration of Alkaline Phosphatase (AP) and AP-albumine-ratio in Bronchoalveolar Lavage (BAL) as a Diagnostic Tool in Interstitial Lung Diseases: As a result of several studies with different animal models there is evidence that the concentration of AP in BAL is produced in the pneumocyte II and that an increase of AP in the BAL is a marker of tissue damage. By measuring AP in the BAL of patients with interstitial lung diseases we investigated its potential role as a diagnostic tool. To detect plasma leakage we also measured the concentration of albumine in the BAL. We studied 85 patients with fol-

J. Schildge¹, B. Klar², N. Weinstock³

¹ Medizin. Klinik Abt. Pneumologie, St. Vincentius-Krankenhäuser Karlsruhe (Chefarzt: Dr. J. Schildge)

² Institut für Mathematische Stochastik, Universität Karlsruhe (Leiter: Prof. Dr. N. Henze)

³ Institut für Laboratoriumsdiagnostik, St. Vincentius-Krankenhaus Karlsruhe (Leiter: Dr. N. Weinstock)

lowing diagnoses: Sarcoidosis in 34 patients (Stage 1/2/3 14/7/13), idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) in 14, bronchiolitis obliterans with organizing pneumonia (BOOP) in 7, hypersensitivity pneumonitis (HP) in 6. The control group consisted in 24 patients (13 nonsmokers, 11 smokers). In IPF and BOOP we observed significantly higher concentrations of AP than in controls and sarcoidosis (42.4 ± 36.6 and 35.6 ± 16 vs. 15.8 ± 12.7 and 15.0 ± 9.8 U/l, $p < 0.05$, ANOVA). Compared with controls in sarcoidosis higher concentrations of albumine (5.7 ± 4 vs. 13.2 ± 10 mg/dl, $p < 0.05$, ANOVA) and a lower AP/albumine-ratio (3.6 ± 3.0 vs. 1.3 ± 0.9 U/10 mg, $p < 0.05$, ANOVA) were seen. This result is an argument against plasma leakage as the source of AP in BAL. There were no differences in AP and albumine between the different stages of sarcoidosis and between smokers and nonsmokers in the control group. We conclude, that there are different concentrations of AP and albumine in BAL in different interstitial lung diseases. Compared with controls we observed higher concentrations of AP and an AP/albumine-ratio in the normal range in IPF, a normal concentration of AP and a lowered AP/albumine-ratio in sarcoidosis.

Einleitung

Die BAL ist eine Technik zur Entnahme sowohl von zellulären als auch von nichtzellulären Bestandteilen der epithelialen Oberfläche des unteren Respirationstraktes. Die Methode hat zum einen in der Forschung unsere Kenntnisse über die Pathogenese entzündlicher bronchopulmonaler Erkrankungen im Allgemeinen und interstitieller Lungenkrankheiten im Besonderen enorm erweitert, zum anderen liefert sie für die Klinik interstitieller und infektiöser Lungenerkrankungen wichtige Befunde hinsichtlich Krankheitsnachweis und Aktivitätsbestimmung [1–4]. Im Vordergrund stehen hierbei mikrobiologische und zytologische Befunde. Die Analyse nichtzellulärer Bestandteile der BAL hat bislang in die klinische Routinediagnostik keinen Eingang gefunden, obwohl auf europäischer Ebene methodische Empfehlungen publiziert sind [5].

Die Messung der Konzentration der AP in der BAL könnte aus verschiedenen Gründen für die Diagnostik bronchopulmonaler Erkrankungen von Interesse sein: Prinzipiell ist die AP ein ubiquitäres Enzym, welches in absorptiv und sekretorisch aktiven Geweben in besonders hoher Konzentration vorkommt [6]. Über die genaue Funktion der AP ist wenig bekannt, der Transfer von Metaboliten und die Regulation von Stoffwechselabläufen werden vermutet [6]. Histochemische

Untersuchungen, Isoenzymanalysen, Konzentrationsanalysen und Tierversuche sprechen dafür, dass die AP-Konzentrationen, die in der BAL nachweisbar sind, lokal in der Lunge, am ehesten im Pneumozyten II, produziert werden und nicht von der Serum-AP abhängig sind [7–10]. Diese Annahme wird auch unterstützt durch Experimente, nach denen Granulozytendepletion und Komplementdepletion die Konzentration der AP in der BAL nicht beeinflussen [11–13]. Weiterhin konnte keine Korrelation zwischen Enzymaktivitäten in der BAL und dem Zellprofil der BAL belegt werden, so dass sich möglicherweise unterschiedliche Aussagen aus Enzymveränderungen und aus Zellveränderungen ableiten lassen [14].

Im Tierversuch führt die inhalative Belastungen mit Silikat, Asbest, Selen, Cadmium, Beryllium, SO₂, NO₂, O₂, Verbrennungsrauch und Industrieabgasen jeweils zu einer Erhöhung [15–26], Pneumozytenzerstörung durch Lungenbestrahlung oder Paraquatintoxikation dagegen zu einer erheblichen Abnahme der AP in der BAL [27,28]. Die wenigen Untersuchungen am Menschen ergeben eine erhöhte AP in der BAL bei Ölpneumonie [29], Tuberkulose [30], Rauchen im Vergleich zu Nichtrauchern [9] und bei fibrosierenden interstitiellen Erkrankungen [31], nicht aber bei Pneumonie [32], chronischer Bronchitis, Bronchiektasie und Asthma bronchiale [33].

Albumin in der BAL gilt als Marker für entzündliche Prozesse und für Plasma-Übertritt in den bronchoalveolären Raum [5,31]. Dem Quotienten AP/Albumin in der BAL wurde eine besondere Bedeutung für die Erkennung einer Lungenschädigung im Rahmen fibrosierender Lungenerkrankungen beigegeben, da er eine eventuelle Plasmabeimischung in die BAL berücksichtigt [31].

In der vorliegenden Arbeit gingen wir der Frage nach, ob die Bestimmung der Konzentration der AP, des Albumins und des AP/Albuminquotienten in der BAL zusätzlich zu den etablierten zellulären Befunden für die Diagnostik interstitieller Krankheitsbilder von Bedeutung sein könnte.

Methoden

Patienten

In die Auswertung aufgenommen wurden 61 Patienten, die zur Abklärung erstmals festgestellter interstitieller Lungenveränderungen mit Bronchoskopie, BAL und transbronchialer Lungenbiopsie (TBB) untersucht wurden. Keiner der Patienten stand bis zum Untersuchungszeitpunkt unter einer medikamentösen Behandlung mit Steroiden oder Immunsuppressiva. Eine aktive Erkrankung des Leber- oder Gallensystems und eine Erkrankung des Knochenstoffwechsels waren Ausschlusskriterien.

24 Patienten, die zur Abklärung eines chronischen Reizhustens in Verbindung mit einer fraglichen interstitiellen Zeichnungsvermehrung in der Thoraxübersichtsaufnahme bronchoskopiert wurden, bei denen sich aber klinisch, lungenfunktionell, in BAL und TBB keine Hinweise auf eine interstitielle Lungenerkrankung ergaben, dienten als Kontrolle. Diagnosen, demographische Daten, spirometrische Befunde und die quantifizierte Nikotinanamnese in Packyears von Patienten und Kontrollen gehen aus Tab.1 hervor. 34 Patienten hatten eine Sarkoidose. Die Diagnose wurde gestellt

aufgrund eines typischen Befundes in der Röntgenaufnahme des Thorax (14-mal Stad. I = isolierte Hiluslymphome, 7-mal Stad. II = Hiluslymphome mit Parenchyembefall, 13-mal Stad. III = Parenchyembefall ohne Hiluslymphome) und dem histologischen Nachweis epitheloidzelliger, nichtverkäsender Granulome in der Bronchialschleimhaut und/oder der TBB bei 31 Patienten. 3-mal wurde zur histologischen Diagnosesicherung eine Mediastinoskopie erforderlich.

14 Patienten hatten eine idiopathische Lungenfibrose (IPF). Diagnosesichernd waren klinische Befunde (Trommelschlegelfinger, auskultatorisch Knisterrasseln), Computertomographie des Thorax (lungenmantelbetontes netz-wabiges interstitielles Muster) und histologische Befunde (8-mal TBB, 6-mal offene Lungenbiopsie). 11-mal ergab sich eine usual interstitial pneumonia (UIP), 3-mal eine desquamative interstitial pneumonia (DIP).

6 Patienten hatten eine exogen-allergische Alveolitis (EAA). Die Diagnose wurde gestellt bei Bestehen einer entsprechenden anamnestisch angegebenen inhalativen Exposition mit korrespondierendem serologischen Präzipitinnachweis (4-mal auf Vogelantigen, 2-mal auf Aspergillus), daneben dem BAL-Befund einer lymphozytischen Alveolitis mit im Vergleich zu Normwerten nach Costabel [1], erniedrigtem CD4/CD8-Quotienten und/oder dem histologischen Bild einer muralen, granulomatösen Alveolitis in der TBB.

7 Patienten boten eine Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie (BOOP). Die Diagnose wurde angenommen, wenn radiologisch flächenhafte periphere Infiltrate nachweisbar waren, histologisch in der TBB das Bild von Granulationsgewebe und Mesenchymknospen innerhalb von terminalen Bronchiolen und Alveolarräumen und in der BAL eine Lymphozytose mit erniedrigtem CD4/CD8-Quotienten vorherrschten.

Bronchoskopie und BAL

Die Voruntersuchungen für die Bronchoskopie bestanden in Spirometrie und Blutgasanalyse, einem aktuellen Thorax-Röntgenbild in 2 Ebenen, einer Blutbild- und Gerinnungsanalyse und einem EKG. Die Bronchoskopie wurde mit einem flexiblen Bronchoskop (Olympus) in Video- oder Fiberglas-technik unter pulsoximetrischer Überwachung und Sauerstoffapplikation über Nasensonde durchgeführt. Nach intravenöser Prämedikation mit 5–7,5 mg Midazolam wurde das Bronchoskop unter lokaler Anästhesie mit maximal 20 ml 2%iger Xylocainlösung inhalativ und über den Instrumentierkanal transoral eingeführt. Zur BAL wurde die Bronchoskopspitze in einem Subsegmentbronchus in wedge-Position gebracht und über einen im Instrumentierkanal liegenden Kunststoffkatheter 100 ml isotonische, sterile, körperwarmer Kochsalzlösung in Portionen zu 20 ml über eine Einmalspritze instilliert und sofort in die Spritze reaspiriert. Die Menge des Rückgewinns wurde festgehalten. Ort der Lavage waren bei generalisierten Veränderungen der Mittellappen, sonst der Bronchus des infiltratragenden Segmentes.

BAL-Zellanalytik

Nach Entnahme von 5 ml zur mikrobiologischen Analytik wurde die BAL durch Filtration über Gaze (Topper 8, Fa. Johnson & Johnson, Norderstedt) von groben Partikeln befreit

und in einem sterilen Kunststoffgefäß gepoolt. Die Gesamtzellzahl wurde an einem Zellanalysegerät (K 800 Fa. Sysmex, Norderstedt) durchflusszytometrisch bestimmt. Zellpräparate wurden durch Zentrifugation (Cytospin 2, Fa. Shandon, Frankfurt a.M.) angefertigt. Die prozentuale Verteilung der Zellgruppen wurde durch mikroskopische Auszählung von 500 Zellen eines nach Pappenheim gefärbten Präparates ermittelt. Bei einem Lymphozytenanteil von über 15% wurde die prozentuale Verteilung der Lymphozytenoberflächeneigenschaften CD3 (T-Zellen), CD4 (T-Helfer-Zellen), CD8 (T-Suppressor-Zellen) bestimmt und der CD4/CD8-Quotient errechnet. Die entsprechende Zellmarkierung erfolgte mit Reagenzien und nach Vorschrift der Fa. Dako, Hamburg. Als Sekundärantikörper diente der Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Antikörper der gleichen Firma.

BAL-Bestimmung nichtzellulärer Bestandteile

Der Albumingehalt in der BAL wurde über ein käufliches Testverfahren immunologisch durch Einsatz von Kaninchenantiserum (Fa. Dade Behring, Marburg) und anschließender vollautomatischer Messung am Nephelometer BN 100 (Fa. Dade Behring, Marburg) bestimmt.

Die AP in der BAL wurde mittels eines kommerziellen Testkits an einem Merck-Mega[®]-Autoanalyser (Fa. Merck/Toshiba, Darmstadt) bestimmt und beruht auf der kolorimetrischen Analyse von p-Nitrophenol, welches in Abhängigkeit von der Konzentration der AP aus p-Nitrophenolphosphat freigesetzt wird. Die Methode wurde auf Linearität und Präzision im Entscheidungsbereich evaluiert. Die untere Detektionsgrenze des Testverfahrens beträgt 2 U/l (Vertrauensbereich 95%). Zwar ist die Messmethodik zur Untersuchung von Serum oder Heparinplasma gedacht, doch sind bei Einsatz der BAL Beeinflussungen durch die in der Testvorschrift mitgeteilten möglichen Störfaktoren nicht anzunehmen (Citrat, Fluorid, Oxalat, Detergenzien, Glycin, EDTA, Monoethanolamin, Theophyllin, hohe Konzentrationen von Phosphat und Chlorid). Sämtliche Standards und Kontrollen wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Dade Behring (Marburg) und Keul (Steinfurt) bezogen.

Statistische Methoden

Die gründliche Analyse der verschiedenen Merkmale in den einzelnen Diagnosegruppen auf Normalverteilung (NV), die von vielen Verfahren gefordert wird (q-q-Plots, Histogramme, Shapiro-Wilk-Test), ergibt folgendes Bild:

Einer NV entsprechen IVC, FEV1, IVC%_{soll} FEV1%_{soll} und – mit leichten Abweichungen – Rückgewinn.

Nach Logarithmustransformation approximativ normal verteilt sind die BAL-Merkmale Zellzahl, relative Anteile an Makrophagen, Lymphozyten, T-Lymphozyten, CD4-Zellen, CD8-Zellen, der CD4/CD8-Quotient, AP, Albumin sowie AP/Albumin-Quotient.

Die Merkmale packyears, relative Anteile an neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie an Mastzellen weichen stark von einer NV ab, wobei häufig der Wert 0 auftritt, was eine Logarithmustransformation ausschließt. Auch das Merkmal Alter zeigt deutliche Abweichungen von einer NV.

Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der Zwei-Stichprobent-Test verwendet. Als nichtparametrischer Test wurde der Wilcoxon-Rangsummentest (mit Bindungskorrektur) verwendet. Vergleiche zwischen mehreren Gruppen wurden mit Hilfe der einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA) sowie dem Kruskal-Wallis-Test mittels χ^2 -Approximation durchgeführt.

Simultane Konfidenzintervalle unter NV-Annahme wurden nach Tuckey berechnet. Nichtparametrische simultane Konfidenzintervalle wurden nach Conover bestimmt. Multiple Vergleiche zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen erfolgten nach Dunnett.

Bei allen Merkmalen, die stark von einer NV abweichen, und bei relativen Größen sind Resultate statistischer Tests, die normalverteilte Daten voraussetzen, nur eingeschränkt aussagekräftig. Aus diesen Gründen sind in den Tabellen auch die Resultate entsprechender nichtparametrischer Verfahren aufgeführt.

Bei allen Testverfahren wurde 0,05 als Signifikanzniveau gewählt.

Ergebnisse

Der statistische Vergleich von Rauchern mit Nichtrauchern innerhalb der Kontrollgruppe sowie der Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsstadien innerhalb der Sarkoidosegruppe erbrachte nur wenig Unterschiede: Patienten mit Sarkoidose zeigten im Stadium III eine stärker eingeschränkte Lungenfunktion (Tab. 1) und einen höheren Mastzellenanteil in der BAL (Tab. 2). Zur statistischen Auswertung wurden deshalb Raucher und Nichtraucher einerseits sowie sämtliche Patienten mit Sarkoidose andererseits zu jeweils einer Gruppe zusammengefasst.

Demographische Daten, Lungenfunktion

Die Merkmale Alter, Nikotinanamnese und IVC% zeigten Unterschiede in Abhängigkeit von der Diagnose. In der simultanen Analyse ergab sich, dass Patienten mit Sarkoidose jünger waren als die Patienten mit anderen Diagnosen und in der Kontrollgruppe. Patienten mit Sarkoidose rauchten weniger als Patienten in der Kontrollgruppe.

Zelluläre Bestandteile in der BAL

Unterschiede zwischen den Diagnosen ergaben sich für die Merkmale Rückgewinn, Zellzahl, relative Anteile an Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen.

In der simultanen Analyse war der Rückgewinn bei BOOP geringer als bei Sarkoidose und IPF und die Zellzahl höher bei IPF als bei EAA.

Hinsichtlich der Differenzialzytologie der BAL war bei sämtlichen untersuchten Krankheitsgruppen der relative Anteil an Makrophagen geringer und der relative Anteil von Lymphozyten höher als bei der Kontrollgruppe. Bei IPF war außerdem der Anteil an Neutrophilen höher als bei Sarkoidosen und Kontrollen. Bei BOOP fand sich der Anteil an Eosinophilen und Mastzellen höher als bei allen anderen Gruppen.

Tab. 1 Demographische Daten, Lungenfunktion. Angabe in Mittelwerten. SD = Standardabweichung. + = $p < 0,05$ Vergleich Sarkoidosen Stadien 1, 2, 3 (Kruskal-Wallis-Test)

Diagnose	Kontrolle Nicht-raucher	Kontrolle Raucher	Kontrolle insgesamt	Sarkoidose Stadium I	Sarkoidose Stadium 2	Sarkoidose Stadium 3	Sarkoidose insgesamt	IPF	EAA	BOOP	ANOVA p	Kruskal-Wallis-Test p
n	13	11	24	14	7	13	34	14	6	7	-	-
weibl./männl.	7/6	5/6	12/12	5/9	3/4	8/5	16/18	9/5	3/3	5/2	-	0,69 (χ^2 -Test)
Alter (Jahre)	57,4 SD 10,9	52,5 SD 13,4	55,1 SD 12,1	40,9 SD 13,0	44,0 SD 13,9	46,7 SD 13,3	43,8 SD 13,1	60,3 SD 15,6	65,5 SD 14,4	62,9 SD 8,2	<0,001	<0,001
packyears	0	48,6 SD 33,4	22,3 SD 33,1	4,3 SD 10,9	1,7 SD 4,1	7,9 SD 16,7	5,2 SD 12,5	5 SD 10,2	13,3 SD 16,3	14,3 SD 12,4	0,034	0,048
IVC %soll	93,5 SD 19,7	84,9 SD 19,3	89,9 SD 19,5	93,0 SD 14,9	84,3 SD 9,8	78,6 SD 11,4	85,7+ SD 14,0	73,1 SD 20,6	67,4 SD 32,3	88,1 SD 24,9	0,042	0,039
FEV1 %soll	95,2 SD 21,9	83,9 SD 19,7	90,6 SD 21,4	93,7 SD 13,9	85,7 SD 12,0	75,9 SD 12,8	85,2+ SD 15,1	77,7 SD 22,7	74,6 SD 28,7	87,6 SD 27,9	0,34	0,38

Tab. 2 BAL-Befunde. Zelluläre Bestandteile. Angabe in Mittelwerten. SD = Standardabweichung. n. u. = nicht untersucht. + = $p < 0,05$ Vergleich Sarkoidosen Stadien I, II, III (Kruskal-Wallis-Test) bzw. Raucher - Nichtraucher (Wilcoxon-Test). * = $p < 0,05$ Vergleich Diagnosegruppen mit Kontrollen (Dunnett-Test)

Diagnose	Kontrolle Nicht-raucher	Kontrolle Raucher	Kontrolle insgesamt	Sarkoidose Stadium I	Sarkoidose Stadium II	Sarkoidose Stadium III	Sarkoidose insgesamt	IPF	EAA	BOOP	ANOVA p	Kruskal-Wallis-Test p
n	13	11	24	14	7	13	34	14	6	7	-	-
Rückgewinn (ml)	53,9 SD 12,6	52,7 SD 11,3	53,4 SD 11,8	58,1 SD 8,8	63,6 SD 8,3	59,8 SD 13,8	59,9 SD 10,8	63 SD 8,6	62,2 SD 14	45 SD 12,9	0,0024	0,0086
Zellen $\times 10^6$ in BAL	9,6 SD 6,2	16,0 SD 10,1	12,5+ SD 8,7	11,4 SD 6,2	20,9 SD 13,1	14,3 SD 14,7	14,5 SD 11,7	20,9 SD 13,1	6,2 SD 1,4	12,1 SD 7,5	0,024	0,0098
Makrophagen in %	91,0 SD 8,8	95,2 SD 1,7	92,9 SD 6,8	69,6 SD 22,6	65,7 SD 17,6	71,8 SD 22,7	69,6* SD 21,2	61,7* SD 30,5	57,2* SD 14,2	38* SD 25,6	<0,001	<0,001
Lymphozyten in %	6,2 SD 7,3	3,6 SD 2,0	5,0 SD 5,6	28,6 SD 21,7	32,3 SD 17,8	25,5 SD 22,8	28,2* SD 20,9	27,6* SD 29,9	38,8* SD 15,4	48,2* SD 31	<0,001	<0,001
CD3-Zellen in %	n. u.	n. u.	n. u.	91,8 SD 7,5	93,6 SD 3,8	96,3 SD 2,4	93,6 SD 5,7	93 SD 6,3	92,8 SD 10,1	96,2 SD 2,9	0,85	0,79
CD4-Zellen in %	n. u.	n. u.	n. u.	75,9 SD 17,0	84,2 SD 9,4	77,8 SD 8,4	78,6* SD 13,1	54,2 SD 19,6	40 SD 13,1	39,4 SD 20,7	<0,001	<0,001
CD8-Zellen in %	n. u.	n. u.	n. u.	15,1 SD 14,4	10,0 SD 8,6	17,0 SD 9,0	14,4* SD 11,5	35,2 SD 20,8	56,2 SD 12,6	57 SD 19,1	<0,001	<0,001
CD4/CD8 Quotient	n. u.	n. u.	n. u.	17,2 SD 19,0	17,0 SD 16,7	6,4 SD 4,2	13,9* SD 15,5	2,1 SD 1,4	0,8 SD 0,4	0,9 SD 0,8	<0,001	<0,001
Neutrophile in %	1,8 SD 2,4	0,6 SD 0,4	1,2 SD 1,9	0,6 SD 0,9	0,9 SD 0,9	1,4 SD 1,3	1,0 SD 1,1	6,7* SD 11,1	1,2 SD 0,6	4,6 SD 4,6	0,0035	<0,001
Eosinophile in %	1,2 SD 3,4	0,6 SD 0,7	0,9 SD 2,5	0,5 SD 1,1	1,1 SD 1,1	0,8 SD 1,3	0,7 SD 1,2	3,6 SD 5,8	0,37 SD 0,7	7,1* SD 6,9	<0,001	<0,001
Mastzellen in %	0,1 SD 0,2	0,1 SD 0,1	0,1 SD 0,2	0,07 SD 0,1	0,06 SD 0,1	0,6 SD 0,7	0,3+ SD 0,5	0,4 SD 0,7	0,8 SD 1,1	1,9* SD 1,6	<0,001	<0,001

Für die einzelnen Diagnosen ergeben sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe folgende Unterschiede: Sarkoidose und EAA zeigen eine Vermehrung des Lymphozytenanteils, IPF eine Erhöhung des Lymphozyten- und Neutrophilenanteils und BOOP eine Erhöhung von Lymphozyten, Eosinophilen und Mastzellen.

Die Analyse der Oberflächeneigenschaften, die unter Ausschluss der Kontrollgruppe erfolgte, ergab Unterschiede zwischen den einzelnen Diagnosen in den Merkmalen CD4-

Zellen, CD8-Zellen, CD4/CD8-Quotient. Im Einzelnen war bei Sarkoidosen der Anteil an CD4-Zellen größer, an CD8-Zellen kleiner und der CD4/CD8-Quotient höher als bei IPF, BOOP und EAA.

Nichtzelluläre Bestandteile in der BAL

Unterschiede in Abhängigkeit von der Diagnose fanden sich für die Merkmale AP in der BAL ($p < 0,001$), Albumin in der BAL ($p < 0,001$) und AP-Albumin-Quotient ($p < 0,001$). Die AP

Tab. 3 BAL-Befunde. Nichtzelluläre Bestandteile. Angabe in Mittelwerten. SD = Standardabweichung. * = $p < 0,05$ Vergleich Diagnosegruppen mit Kontrollen (Dunnnett-Test)

Diagnose	Kontrolle Nicht-raucher	Kontrolle Raucher	Kontrolle insgesamt	Sarkoidose Stadium I	Sarkoidose Stadium II	Sarkoidose Stadium III	Sarkoidose insgesamt	IPF	EAA	BOOP	ANOVA p	Kruskal-Wallis-Test p
n	13	11	24	14	7	13	34	14	6	7	-	-
AP in U/l	13,2 SD 8,7	18,7 SD 16,2	15,8 SD 12,7	13,8 SD 9,8	14,1 SD 6,8	16,7 SD 11,4	15,0 SD 9,8	42,4* SD 36,6	17,2 SD 12,0	35,6* SD 16,0	<0,001	<0,001
Albumin in mg/dl	6,6 SD 4,6	4,7 SD 3,1	5,7 SD 4,0	11,6 SD 6,4	14,7 SD 14,5	14,0 SD 10,8	13,2* SD 10,0	14,6* SD 19,2	14,9 SD 19,8	18,6* SD 15,2	<0,001	<0,001
Quotient AP/Albumin	2,7 SD 2,3	4,5 SD 3,4	3,6 SD 3,0	1,1 SD 0,8	1,7 SD 1,3	1,3 SD 0,8	1,3* SD 0,9	4,5 SD 3,0	2,2 SD 2,2	2,6 SD 1,6	<0,001	<0,001

in der BAL war bei Patienten mit IPF und BOOP höher als bei Kontrollen, Sarkoidosen und EAA. Der statistische Simultanvergleich bestätigte höhere Konzentrationen der AP sowohl bei IPF als auch bei BOOP im Vergleich mit Sarkoidosen und der Kontrollgruppe ($p < 0,05$) (Abb. 1).

Im Einzelnen fanden sich nur bei 2 der 24 Kontrollen (8,3%) AP-Werte über 30 U/l, dagegen bei 10 der 14 Patienten mit IPF (71,4%) und bei 5 der 7 Patienten mit BOOP (71,4%). Die entsprechenden Zahlen betragen dagegen bei Sarkoidose 4 von 34 (11,8%) und bei EAA 1 von 6 (11,8%). Die Aussage, dass eine AP über 30 U/l einen Normalbefund ausschließt, hat eine Spezifität von 90% (20/22) und eine Sensitivität von 33% (20/61). Der Albumingehalt der BAL war bei sämtlichen intersti-

tiellen Lungenkrankheiten höher als bei den Kontrollen; im statistischen Simultanvergleich bestätigte sich der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und Sarkoidose ($p < 0,05$) (Abb. 2).

Der AP-Albuminquotient war bei Sarkoidose und EAA niedriger als bei IPF und Kontrollen. In der simultanen Analyse bestätigten sich die Unterschiede zwischen Sarkoidose einerseits und Kontrollen sowie IPF andererseits ($p < 0,05$) (Abb. 3).

Für die einzelnen Diagnosen ergibt sich im Vergleich mit der Kontrolle folgendes Bild: IPF und BOOP zeigen eine Erhöhung der AP und des Albumins in der BAL. Der AP/Albuminquotient ist nicht verändert.

Bei der Sarkoidose ist die AP in der BAL – unabhängig vom Stadium – nicht erhöht. Das Albumin ist erhöht, der AP/Albuminquotient erniedrigt.

Bei EAA ist die AP in der BAL nicht erhöht. Albumin und AP/Albuminquotient sind von der Kontrolle nicht verschieden.

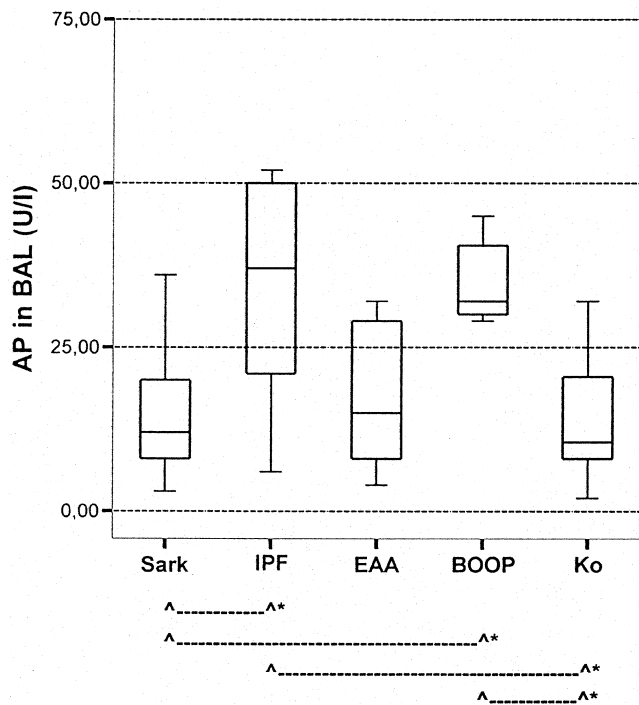


Abb. 1 AP in der BAL. Box-Plots (Medianwerte, Interquartilenbereiche, Extremwerte ohne Ausreißer). Signifikante Unterschiede mit ^-^* markiert ($p < 0,05$, Tuckey-Test). Sark = Sarkoidose, IPF = Idiopathische Lungenfibrose, EAA = exogen-allergische Alveolitis, BOOP = Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie, Ko. = Kontrollgruppe.

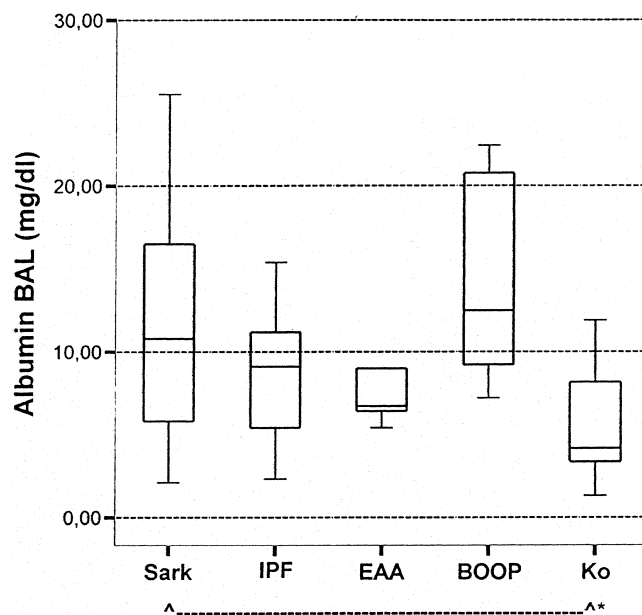


Abb. 2 Albumin in der BAL. Erläuterungen s. Abb. 1.

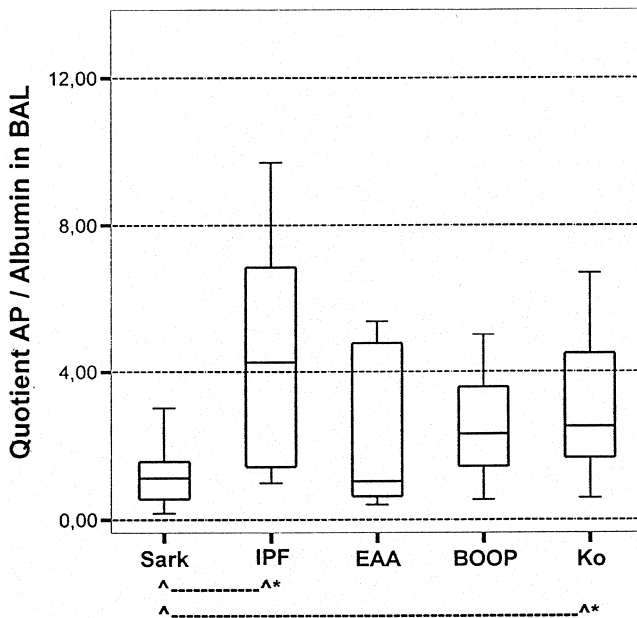


Abb. 3 AP/Albumin-Quotient in der BAL. Erläuterungen s. Abb. 1.

Diskussion

Die Resultate unserer Untersuchung sprechen in Übereinstimmung mit den eingangs zitierten Studien dafür, dass der Ursprung der in der BAL nachweisbaren AP nicht im Übertritt aus dem Blutplasma zu sehen ist. So war bei Sarkoidose der Albumingehalt der BAL, ein Parameter für Plasmaübertritt, im Vergleich mit der Kontrollgruppe erhöht, nicht jedoch die Konzentration der AP in der BAL.

Ein weiteres wesentliches Ergebnis besteht darin, dass bei den untersuchten interstitiellen Lungenerkrankungen Unterschiede in der Höhe der AP in der BAL nachweisbar waren. Trotz teilweise kleiner Fallzahlen war eine Erhöhung der AP sowohl für IPF als auch für BOOP im Vergleich mit Kontrollen und Sarkoidose statistisch belegbar. Sarkoidose und EAA wiesen in unserer Serie keine Unterschiede zu den Kontrollen auf.

Unsere Ergebnisse weisen in weiten Teilen Übereinstimmungen mit der Untersuchung von Capelli 1997 [31] auf. Auch er fand bei seiner Analyse der BAL von Patienten mit Sarkoidose, IPF und Silikose im Vergleich mit Kontrollen eine Erhöhung der AP bei IPF und eine normale AP bei Sarkoidose Stadium I. Ebenso war bei Sarkoidose Stadium I der Albumingehalt der BAL erhöht, schließlich fand auch er den AP/Albuminquotient bei Sarkoidose Stadium I erniedrigt, bei IPF erhöht.

Die wesentlichen Unterschiede zu der zitierten Arbeit bestehen darin, dass Capelli bei Patienten mit Sarkoidosen der Stadien II und III Erhöhungen der AP und beim Stadium III einen normalen Albumingehalt in der BAL nachweisen konnte. Zwar zeigen auch unsere Zahlen einen Trend zu einer höheren AP bei zunehmenden Erkrankungsstadien. Dieser Trend war aber statistisch nicht belegbar. Weiterhin lässt sich aus unseren Daten im Gegensatz zu den Befunden von Capelli kein Zusammenhang zwischen einer zunehmenden Fibrosie-

rung des Lungengewebes und einem erhöhten AP/Albuminquotienten in der BAL ableiten. Allerdings umfasste unsere Sarkoidosegruppe keine Patienten mit fortgeschrittener narbiger Lungengewebsdestruktion. Des Weiteren schränkt die geringe Anzahl von Patienten in den Einzelgruppen die Aussagekraft unserer Untersuchung ein.

Zigarettenrauchen führte in unserer Untersuchung, anders als bei Kallioniemi [9], zu keiner statistisch belegbaren Erhöhung der AP in der BAL.

Eine entsprechende Gegenüberstellung unserer Ergebnisse bei BOOP und EAA ist nicht möglich, da vergleichbare Daten bislang nicht publiziert wurden.

Ausgehend von der durch eine Vielzahl von Tierversuchen gestützten Annahme, dass die Konzentration der AP in der BAL aus einer Schädigung des Pneumozyten II resultiert, legen unsere Ergebnisse unterschiedliche Schädigungsmuster bei verschiedenen interstitiellen Lungenerkrankungen nahe. So scheint der Pneumozyt II bei IPF und BOOP einer intensiveren Schädigung ausgesetzt als bei Sarkoidose, EAA und dem Inhalationsrauchen.

Die etablierte Diagnostik der zellulären Bestandteile der BAL zeigte in unserer Serie keine wesentlichen Abweichungen von den bekannten Resultaten anderer Arbeitsgruppen [1]. Die Differenzialzytologie zeigte im Vergleich mit der Kontrollgruppe bei sämtlichen untersuchten interstitiellen Erkrankungen eine Erhöhung des Lymphozytenanteils. Bei IPF fand sich zudem ein erhöhter Neutrophilenanteil, bei BOOP eine Erhöhung der Eosinophilen und der Mastzellen. Allerdings war die Differenzialzytologie zur Diagnosesicherung einer interstitiellen Erkrankung nicht ausreichend. Durch zusätzliche Bestimmung der Oberflächeneigenschaften der Lymphozyten ließ sich innerhalb der Gruppe der interstitiellen Lungenerkrankungen die Sarkoidose durch die Dominanz der CD4-Zellen am besten charakterisieren. Die übrigen untersuchten interstitiellen Lungenerkrankungen ließen sich durch die zellulären Befunde weniger gut identifizieren, so dass weitere BAL-Merkmale, welche von der Sarkoidose verschiedene Erkrankungen belegen können, wünschenswert wären. Eine Bewertung der klinischen Bedeutung der Bestimmung humoraler BAL-Parameter kann aufgrund unserer Untersuchung bei kleiner Fallzahl und teilweise hohen Standardabweichungen nur mit Zurückhaltung erfolgen und bedarf der Bestätigung durch weitere, größere Studien. Allerdings könnte die Untersuchung der BAL auf AP und Albumin zusätzlich zu den zellulären Befunden Hinweise auf die Art der interstitiellen Lungenerkrankung geben. So spricht eine über 30 U/l erhöhte AP in der BAL gegen einen Normalbefund und eine Sarkoidose und kann einen Hinweis auf eine IPF geben. Eine normale AP bei gleichzeitig erniedrigtem AP/Albuminquotienten kann auf eine Sarkoidose hindeuten.

Literatur

- 1 Costabel U. Atlas der bronchoalveolären Lavage. Stuttgart, New York: Thieme, 1994
- 2 Klech H, Hutter C. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage: Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1990; 3: 937–974
- 3 British Thoracic Society, Standards of Care Committee. The diagnosis, assessment and treatment of diffuse parenchymal lung disease in adults. British Thoracic Society recommendations. *Thorax* 1999; 54 S1: S1–S24
- 4 ATS guidelines. Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. Up to date 1999; 7: 3: 781–800
- 5 Haslam P, Baugham R. Guidelines for measurement of acellular components and recommendations for standardization of bronchoalveolar lavage. *Eur Respir Rev* 1999; 9: 66
- 6 Drent M, Cobben N, Henderson R, Schmitz M, van Dieijen-Visser M. Measurement of markers of cell damage or death in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir Rev* 1999; 9: 66: 141–144
- 7 Bhalla D, Gupta S, Reinhart P. Alteration of epithelial integrity, alkaline phosphatase activity, and fibronectin expression in lungs of rats exposed to ozone. *J Toxicol Environ Health* 1999; 57: 329–343
- 8 Capelli A, Cerutti C, Lusuardi M, Donner C. Identification of human pulmonary alkaline phosphatase isoenzymes. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1448–1452
- 9 Kallioniemi O, Nieminen M, Lehtinen J, Veneskoski T, Koivula T. Increased serum placental-like alkaline phosphatase activity in smokers originates from the lungs. *Eur J Respir Dis* 1987; 71: 170–176
- 10 Henderson R, Scott G, Waide J. Source of alkaline phosphatase activity in epithelial lining fluid of normal and injured F344 rat lungs. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 134: 170–174
- 11 Henderson R, Harkema J, Hotchkiss J, Boehme D. Effect of blood leukocyte depletion on the inflammatory response of the lungs to quartz. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 109: 127–136
- 12 Gavett S, Carakostas M, Belcher L, Warheit D. Effect of circulating neutrophil depletion on lung injury induced by inhaled silica particles. *J Leukoc Biol* 1992; 51: 455–461
- 13 Warheit D, Carakostas M, Bamberger J, Hartsky M. Complement facilitates macrophage phagocytosis of inhaled iron particles but has little effect in mediating silica-induced lung inflammatory and clearance responses. *Environ Res* 1991; 56: 186–203
- 14 Cobben N, Drent M, Jacobs J, Schmitz M, Mulder P, Henderson R, Wouters E, v. Dieijen-Visser M. Relationship between enzymatic markers of pulmonary cell damage and cellular profile: a study in bronchoalveolar lavage fluid. *Exp Lung Res* 1999; 25: 99–111
- 15 Warheit D, Hartsky M. Initiating the risk assessment process for inhaled particulate materials: development of short term inhalation bioassays. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 1997; 7: 313–325
- 16 Dethloff L, Gladen B, Gilmore L, Hook G. Quantitation of cellular and extracellular constituents of the pulmonary lining in rats by using bronchoalveolar lavage. Effects of silica-induced pulmonary inflammation. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 899–907
- 17 Mossmann B, Janssen Y, Marsh J, Sesko A, Shatos M, Doherty J, Adler K, Hemenway D, Mickey R. Development and characterization of a rapid-onset rodent inhalation model of asbestosis for disease prevention. *Toxicol Pathol* 1991; 19: 412–418
- 18 Begin R, Masse S, Rola-Pleszczynski M, Boctor M, Drapeau G. Asbestos exposure dose-bronchoalveolar milieu response in asbestos workers and the sheep model: evidences of a threshold for chrysotile-induced fibrosis. *Drug Chem Toxicol* 1987; 10: 87–107
- 19 Lemaire E, Nadeau D, Begin R. Significant increases of cyclic AMP and alkaline phosphatase in bronchoalveolar lavage fluids of sheep exposed to asbestos. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1981; 33: 567–570
- 20 Bell R, Solimann M, Nonavinakere V, Hammerbeck D, Early J. Selenium and cadmium induced pulmonary functional impairment and cytotoxicity. *Toxicol Lett* 1997; 90 (2–3): 107–114
- 21 Sendelbach L, Witschi H. Bronchoalveolar lavage in rats and mice following beryllium sulfate inhalation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987; 90 (2): 322–329
- 22 Maier K, Beck-Speier I, Dayal N, Dirscherl P, Griese M, Heilmann P, Hinze H, Josten M, Karg E, Kreyling W, Lenz A, Leuschel L, Meyer B, Miaskowski U, Reitmeier P, Ruprecht L, Schumann G, Ziesenis A, Heyder J. Health effects of sulfur-related environmental air pollution II. Cellular and molecular parameters of injury. *Inhal Toxicol* 1999; 11: 361–389
- 23 Meulenbelt J, van Bree L, Dormans J, Sangster B. No beneficial effect of n-acetylcystein treatment on bronchoalveolar lavage fluid variables in acute nitrogen dioxide intoxicated rats. *Hum Exp Toxicol* 1994; 13: 472–477
- 24 Van Klaveren R, Dinsdale D, Pype J, Demedts M, Nemery B. N-acetylcysteine does not protect against type II cell injury after prolonged exposure to hyperoxia in rats. *Am J Physiol* 1997; 273: 548–555
- 25 Xie E, Yang Z, Li A. Determination of placental alkaline phosphatase for detecting the damages of alveolar type I cells caused by bay smoke inhalation. *Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chih* 1996; 12 (6): 427–430
- 26 Kovacicova Z, Ginter E. Effect of ascorbic acid supplementation during the inhalation exposure of guinea-pigs to industrial dust on bronchoalveolar lavage and pulmonary enzymes. *J Appl Toxicol* 1995; 15: 321–324
- 27 Salovsky P, Shopova V. Early biological effects of whole body irradiation on rat lungs. *Radiat Environ Biophys* 1992; 31: 331–341
- 28 Boudreau J, Nadeau D. Lung hydrolases in paraquat poisoning: early response of alkaline phosphatase. *J Toxicol Environ Health* 1987; 22: 329–340
- 29 Drent M, Cobben N, Henderson R, Jacobs J, Wouters E, v. Dieijen-Visser M. BAL fluid LDH activity and LDH isoenzyme pattern in lipoid pneumonia caused by an intravenous injection of lamp oil. *Eur Respir J* 1996; 9: 2416–2418
- 30 Gupta N, Garg U, Dhand R, Kaur A, Ganguly N. Enzyme levels in bronchoalveolar fluid and serum of active pulmonary tuberculosis patients. *Enzyme* 1989; 41: 108–111
- 31 Capelli A, Lusuardi M, Cerutti C, Donner C. Lung alkaline phosphatase as a marker of fibrosis in chronic interstitial disorders. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 249–253
- 32 Cobben N, Jacobs J, v. Dieijen-Visser M, Mulder P, Wouters E, Drent M. Diagnostic value of BAL fluid cellular profile and enzymes in infectious pulmonary disorders. *Eur Respir J* 1999; 14: 496–502
- 33 Plusa T, Wasek Z. Immunobiological evaluation of bronchoalveolar lavage (BAL) in atopic bronchial asthma, chronic bronchitis and bronchiectasis. *Allergol Immunopathol* 1987; 15: 209–213

Dr. med. J. Schildge

St. Vincentius-Krankenhäuser Karlsruhe
Medizinische Klinik – Abteilung Pneumologie
Süüendstraße 32
76137 Karlsruhe