

Aus der Klinik für allgemeine Pädiatrie  
(Direktor: Professor Dr. Martin Schrappe)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

---

THERAPIE DES NEONATALEN ARDS  
MIT 1,2-DIOLEOYL-SN-GLYZERO-3-  
PHOSPHO-RAC-(1-GLYZEROL)  
NATRIUM-SALZ

Untersuchungen am neonatalen Schweinemodell

---

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

JULIA SCHEIERMANN

aus Wolodarskoje

Kiel 2012

1. Berichtersteller: Prof. Dr. Martin Krause.....

2. Berichtersteller: Prof. Dr. Markus Steinfath .....

Tag der mündlichen Prüfung: 12. März 2012 .....

Zum Druck genehmigt: 12. März 2012.....

Prüfer: Prof. Dr. Paul-Martin Holterhus.....

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>DIAGRAMMVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VII</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 ARDS.....	1
1.2 Surfactant.....	3
1.3 Entzündungsreaktion .....	4
1.3.1 Interleukin-6.....	5
1.3.2 Apoptose.....	5
1.3.3 Chitotriosidase.....	7
1.3.4 TGF- $\beta$ 1 .....	8
1.3.5 Amphiregulin .....	9
1.3.6 Sphingomyelinase und Ceramid.....	10
1.3.7 Phospholipase A2 (PLA2).....	11
1.3.8 1,2 - Dioleoyl-sn-glyzero-3-phospho-rac-(1-glycerol) Natrium-Salz (DOPG, Dioleoylphosphatidylglyzerol).....	13
1.4 Tiermodell.....	15
1.5 Arbeitshypothese .....	16
<b>2. METHODEN.....</b>	<b>18</b>
2.1 Präparation der Ferkel.....	18
2.2 Schädigungsprotokolle.....	21
2.2.1 Broncho–alveoläre Lavagen.....	21
2.2.2 Lungen-schädigende Beatmung .....	22
2.2.3 Instillation von LPS.....	22
2.3 Randomisierung der Versuchstiere.....	22
2.4 Beendigung des Versuchs und Abrüsten .....	23
2.5 Lungenfunktionsmessung .....	23

2.6	Blutgasanalyse .....	24
2.7	Maschinelle Beatmung .....	24
2.8	Hämodynamisches Monitoring.....	25
2.9	Durchflusszytometrie (FACS).....	26
	2.9.1 Versuchsaufbau .....	26
	2.9.2 Messung .....	28
	2.9.3 Auswertung .....	30
2.10	Quantitative Polymerasekettenreaktion .....	32
2.11	TUNEL .....	33
2.12	Surfactant – Oberflächenspannung.....	33
2.13	Statistik .....	34
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>35</b>
3.1	Versuchsgruppen .....	35
3.2	Vergleichbarkeit der Behandlungsguppen.....	35
3.3	Klinische Parameter .....	37
3.4	Organfunktionen .....	44
3.5	Laborbestimmungen .....	47
	3.5.1 Zelltypisierung in der BALF .....	47
	3.5.2 Entzündungsparameter .....	49
	3.5.3 Surfactant .....	55
	3.5.4 Apoptose.....	55
3.6	Bakterielle Besiedlung.....	56
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>58</b>
4.1	DOPG .....	58
4.2	Klinische Parameter .....	59
4.3	Laborergebnisse .....	60
4.4	Zelltypisierung in der BALF .....	63
4.5	Bakterielle Besiedlung.....	65
4.6	Tiermodell.....	65
4.7	Methodenkritik .....	67
	4.7.1 Surfactant .....	67

4.7.2 Versuchstiere .....	67
4.7.3 Dosierung .....	68
4.7.4 Organfunktion .....	68
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>69</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>71</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>79</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>80</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Auf- und Abbauweg des Ceramid.....	11
Abbildung 2: Reaktion der Phospholipase A2 am Phospholipid nach (Doenecke et al. 2005)12	
Abbildung 3: Überlappung der Fluoreszenzen nach (Sack et al. 2006).....	29
Abbildung 4: Analyse der Lichtsteuerung von Zellen .....	31
Abbildung 5: Punktwolkendarstellung von markierten Zellen .....	32

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Zeittafel des Tierversuchs .....	17
Tabelle 2: Kompatibilität der Versuchsgruppen vor den Lungenschädigungen .....	36
Tabelle 3: Klinische Parameter nach der ersten Lungenschädigung (Lungenlavage) .....	36
Tabelle 4: Darstellung von Elektrolyten und Organfunktionsparametern der Leber und Niere (Teil 1).....	45
Tabelle 5: Darstellung von Elektrolyten und Organfunktionsparametern der Leber und Niere (Teil 2).....	46
Tabelle 6: Bakterienbesiedlung der Lunge.....	57

## **Diagrammverzeichnis**

Diagramm 1: Ventilationseffizienzindex .....	38
Diagramm 2: Oxygenierungsindex .....	39
Diagramm 3: Extravaskulärer Lungenwasserindex .....	40
Diagramm 4: Spezifische Compliance des respiratorischen Systems.....	41
Diagramm 5: Resistance des respiratorischen Systems .....	42
Diagramm 6: Systemischer Gefäßwiderstandsindex.....	43
Diagramm 7: Herzindex .....	43
Diagramm 8: Zellzahl in der bronchoalveolären Lavage.....	47
Diagramm 9: Zelltypisierung .....	48
Diagramm 10: Genexpression von Interleukin-6 im Lungengewebe, .....	49
Diagramm 11: Genexpression von TGF- $\beta$ 1 im Lungengewebe .....	50
Diagramm 12: Genexpression von Amphiregulin im Lungengewebe,.....	50
Diagramm 13: Konzentration der Phospholipase A2 im Lungengewebe .....	51
Diagramm 14: Aktivität der Chitotriosidase in der bronchoalveolären Lavage .....	52
Diagramm 15: Aktivität der sSMase im Lungengewebe .....	53
Diagramm 16: Konzentration von Ceramid im Lungengewebe .....	54
Diagramm 17: Oberflächenspannung des Surfactant.....	55
Diagramm 18: Apoptose in den Alveolen.....	56

## Abkürzungsverzeichnis

%SPO <sub>2</sub>	Sauerstoffsättigung
1d12h	12. Stunde des ersten Versuchstages
ARDS	acute respiratory distress syndrome
ABE	aktuelle Base-Exzess
AD	arterieller systolischer und diastolischer Druck
AF	Atemfrequenz
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
Apaf1	apoptosis-activating-factor-1
Areg	Amphiregulin
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BCL	B-cell lymphoma
BGA	Blutgasanalysen
BiD	BH <sub>3</sub> interacting domain
BTPS	body temperature, pressure, saturated, BTPS-Bedingungen
CAD	caspase-activated DNase
CD	cluster of differentiation
Chit	Chitotriosidase
cIAPs	cellular inhibitor of apoptosis proteins
C <sub>rs</sub>	Compliance des respiratorischen Systems
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloride
dATP	desoxy-adenosin-triphosphate
DOPG	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) sidium salt, Dioleoylphosphatidylglycerol
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ENaC	epithelial sodium channel
EVLWI	extravaskulärer Lungenwasserindex
FACS	fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FADD	Fas-associated death domain
FSC	forward scatter

FiO <sub>2</sub>	Sauerstoffgehalt der Inspirationsluft
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSH	follicle-stimulating hormone
GEDI	globaler enddiastolischer Volumenindex
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HI	Herzindex aus Thermodilution
HR	heart rate, Herzfrequenz
ICAD	inhibitor of caspase-activated DNase
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IGF1	insulin-like-growth-factor 1
IGF1R	insulin-like-growth-factor 1 receptor
IgG	Immunglobulin G
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
IL-X	Interleukin-X
ITBI	intrathorakaler Blutvolumenindex
LH	luteinising hormone
LHRH	luteinising hormone releasing hormone
LPS	Lipopolysaccharide
LR	lower right, unterer rechter Quadrant
MAS	Mekoniumaspirationssyndrom
MAD	mitogen-activated protein kinases
NaCl	Natrium Chlorid
nARDS	neonatal acute respiratory distress syndrome
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	non-small cell lung cancer
OI	Oxygenierungsindex
PAF	platelet activated factor
PaO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PCHI	Pulskontur-Herzindex
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin-5
PEEP	positive end-expiratory pressure, positiver endexpiratorischer Druck

PF	Pulsfrequenz
PIP	positive inspiratory pressure, positiver inspiratorischer Druck
PLA2	Phospholipase A2
PLA2-II	Phospholipase A2 Typ II
PPAR- $\gamma$	peroxysome-proliferator-activated-receptor $\gamma$
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest
R <sub>rs</sub>	Resistance des respiratorischen Systems
SEM	standard error of the mean, Fehler des Mittelwertes
sPLA2	sekretorische Phospholipase A2
sPLA2-IIA	sekretorische Phospholipase A2 Typ IIA
SSC	sidewards scatter
sSMase	saure Sphingomyelinase
SVRI	systemischer vaskulärer Widerstandsindex
TACE	tumor necrosis factor alpha converting enzyme
TB	Körpertemperatur
tBiD	truncated BH <sub>3</sub> interacting domain
TGF- $\beta$ 1	transforming-growth-factor $\beta$ 1
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR1	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1
TRADD	TNFR-associated death domain
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick endlabeling
UL	upper left, unterer linker Quadrant
UR	upper right, oberer rechter Quadrant
VEI	Ventilationseffizienzindex
V <sub>T</sub>	Tidalvolumen
ZVK	zentraler Venenkatheter

### Gruppenbezeichnungen:

C	Kontroll-Gruppe
S	Surfactant-Gruppe
S+DOPG	Surfactant-Dioleoylphosphatidylglycerol-Gruppe

# 1. Einleitung

## 1.1 ARDS

Das akute hypoxämische Lungenversagen des Neugeborenen (neonatal acute respiratory distress syndrome, nARDS) ist durch eine überschießende Entzündungsreaktion des Lungenparenchyms und einen Mangel an Surfactant (surface active agent) gekennzeichnet.

Das nARDS kann durch viele verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Die häufigsten Erkrankungen, die zu einem nARDS führen, sind Mekoniumaspiration, intrapulmonale Blutungen, Infektionen wie Pneumonie und Sepsis sowie Schockzustände bei Asphyxie oder infolge einer intrapartalen Hämorrhagie bei vorzeitiger Plazentaablösung. Trotz moderner technologischer Möglichkeiten der intensiven Therapie und der Surfactantsubstitution bleibt die Sterblichkeit der neonatalen ARDS-Patienten hoch und beträgt ca. 30% (Marcdante et al. 2011 und Lotze et al. 1998).

ARDS kann in drei Phasen unterteilt werden. Die initiale exsudative Phase ist durch die Schädigung der alveolären Zellen gekennzeichnet, die in die proliferative Phase mündet. In dieser zweiten Phase findet man Zeichen von pulmonalem Ödem, interstitieller Infiltration von Myofibroblasten und Proliferation von Pneumozyten Typ II. In der dritten fibrotischen Phase sind die Einschränkungen der Elastizität des Gewebes (Compliance) und der Oxygenierung meist so ausgeprägt, dass es zum Absterben des Säuglings kommt.

Das akute Lungenversagen ist durch einen schwerwiegenden Funktionsverlust gekennzeichnet. Es resultiert aus einer Aktivierung und dem Zusammenspiel zahlreicher Entzündungszellen, welche verschiedene inflammatorische Mediatoren freisetzen (Bauer et al. 2000). Diffuse Infiltrationen im Röntgenbild der Lunge und arterielle Hypoxämie sind die Folgen, die auf pathologische Störungen der endothelialen und epithelialen Permeabilität sowie Zellinfiltration in den parenchymatösen und alveolären Räumen zurückzuführen sind (Martin et al. 2005). Das alveoläre Epithel reagiert auf Entzündung mit fibrotischen Prozessen. Die Lungenfibrose reduziert die Compliance und trägt zur Verschlechterung der Lungenfunktion bei.

Ebenso werden durch die schwere Entzündungsreaktion Eigenschaften und Metabolismus des endogenen Surfactant beeinflusst. Der endogene Surfactant-Pool wird durch einen vermehrten Abbau und eine verminderte Synthese im Krankheitsverlauf dezimiert. So haben Bohlin und Mitarbeiter mit isotop-markiertem Acetat – einem Baustein von Surfactant – zeigen können, dass bei reifen Neugeborenen mit schwerer Ausprägung des ARDS eine geringere Synthese im Vergleich zu denen mit leichtem Krankheitsverlauf oder der gesunden Kontrollgruppe besteht (Bohlin et al. 2003).

Aktuell wird das hypoxämische Lungenversagen im Wesentlichen durch die Substitution von Surfactant und die supportive Therapie mit maschineller Beatmung und dosierter Sauerstoffzufuhr behandelt. Ergänzend hierzu kommen auch eine antibiotische Therapie zur Prophylaxe sekundärer Infektionen, die Applikation von Stickstoffmonoxid (NO) zu den Beatmungsgasen, wie auch die inhalative und intravenöse Gabe von Prostaglandin I<sub>2</sub>-Analoga zur Anwendung.

In Deutschland werden zur Substitutionstherapie die bovinen Surfactantpräparate Alveofact® (SF-RI 1) und Survanta® (Beractant) sowie das porcine Curosurf® (Poractant alfa) verwendet. Diese Präparate werden durch Lavage oder Homogenisierung von Rinder- oder Schweinelungen hergestellt. Darüberhinaus gibt es noch synthetisch hergestellte Surfactantpräparate wie ALEC, Tursurf und Exosurf. Die natürlichen Surfactatpräparate besitzen allerdings bessere Eigenschaften in der Verbesserung des Gasaustausches, der Verteilung und der Adsorption (Speer und Halliday 1994).

Die intratracheale Gabe von natürlichen Surfactantpräparaten erhöhte in klinischen Studien die Überlebensrate der Patienten mit schwerem Lungenversagen. Die Oxygenierung und Beatmungssituation der Neugeborenen konnten so verbessert werden (Wirbelauer und Speer 2009). Für eine Behandlung des ARDS wird eine initiale Dosis von 100 mg/kg empfohlen (Speer und Halliday 1994).

Beim akuten Lungenversagen wird jedoch aufgrund der ausgeprägten pulmonalen Entzündungsreaktion die Wirksamkeit und Effektdauer der Therapie mit exogenem Surfactant eingeschränkt. Die positive klinische Wirkung erschöpft sich nach einigen Stunden, so dass wiederholte Gaben von Surfactantpräparaten in der Regel notwendig sind und ein anhaltender

Effekt ausbleibt. Die Substitutionstherapie mit exogen substituiertem Surfactant scheint bei multiplen Gaben (bis zu drei) effektiver zu sein als bei einer einzelnen Gabe (Halliday 2005).

## 1.2 Surfactant

Surfactant ist eine Lipid-Protein-Emulsion an der Grenzschicht zwischen Luft und Lungengewebe. Es wird von Pneumozyten Typ II, die nur 2% der alveolären Gesamtoberfläche bedecken, produziert und in den Alveolarraum freigesetzt. Physiologisch setzt sich Surfactant aus 90% Phospholipiden und 10% Apoproteinen (Surfactantproteine A bis D) zusammen. Den größten Anteil der Lipide stellen die Phosphatidylcholine und Phosphatidylglyzerole dar (Rooney 1985).

Surfactant verringert die epitheliale Oberflächenspannung und trägt somit zur Stabilisierung der Alveolen in der Expirationsphase bei. Das Phosphatidylglyzerol spielt eine wichtige Rolle bei der Verteilung des Surfactantfilms über die Gasaustauschfläche (sog. spreading factor). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass es immunregulatorische und antientzündliche Eigenschaften besitzt. Zum Beispiel hemmt es die Proliferation von Immunzellen wie Lymphozyten und reguliert ihre Zytokinfreisetzung (Wright 1997).

Bei der Entzündungsreaktion im Rahmen von nARDS kommt es zu einer Inaktivierung des Surfactant. Aufgrund des extensiven Untergangs der epithelialen Pneumozyten und der Freilegung der Basalmembran steigt die Permeabilität für Wasser und Plasmaproteine in die Alveolen, wobei auch die Aktivität von ENaC (epithelial sodium channel) und Na/K-ATPase Pumpe zusammenbricht. Einige Entzündungszellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten wandern aktiv via Chemotaxis in den alveolären Raum ein und verstärken die Entzündung durch zusätzliche Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Die entzündungsbedingten hyalinen Membranen tragen zur Verschlechterung des Gasaustauschs bei, weil die Diffusionsstrecke zwischen Luft und Blut zunimmt (Ainsworth 2005). Zum anderen kommt es zu einer Akkumulation von Surfactant inaktivierenden Stoffen wie beispielsweise Enzymen und großmolekularen Proteinen im Alveolarraum (Reinhardt 2007).

### 1.3 Entzündungsreaktion

Die Pathogenese des akuten Lungenversagens beruht auf einer schweren Entzündungsreaktion, an der viele Zellen und niedermolekulare Entzündungsmediatoren beteiligt sind (Martin 1999 und Krause et al. 2005).

Zu den wichtigsten Entzündungsmediatoren gehören die Interleukine (Interleukin-1 und -6), Interferone, Leukotriene, Prostaglandine und Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), die zur Schädigung des Epithels beitragen, indem sie die Epithelzellen für die durch Fas-Rezeptor induzierte Apoptose sensibilisieren (Nakamura et al. 2004). Neutrophile Granulozyten sezernieren Interleukin-1 und freie Sauerstoffradikale. Die Makrophagen, deren Anzahl bei nARDS im intraalveolären Raum stark ansteigt, setzen TNF und Interleukine (Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-23) frei, die zu einer Verstärkung der inflammatorischen Pathologie beitragen können (Mosser und Edwards 2008). Zusätzlich sind in der Entzündungskaskade auch Enzyme wie saure Sphingomyelinase (sSMase), Caspase 8 und die Phospholipase A2 (PLA2) beteiligt, deren Aktivität unter anderem in dieser Studie gemessen wurde.

Bei der akuten Entzündung kommt es zu epithelialen und vaskulären Läsionen. Daraus resultiert rasch eine gesteigerte endotheliale Permeabilität für plasmatische Proteine in den alveolären Raum und eine Verschlechterung des Gasaustauschs. Bakterientoxine und Überblähung der Lunge mit unphysiologischen Tidalvolumen oder Rekrutierungsmanövern können direkt Nekrosen des alveolären Epithels verursachen. Viel häufiger kommt es jedoch zur Apoptose – einem programmierten Zelltod – als Reaktion auf die akute Entzündung (Martin et al. 2005).

Durch die Schädigung des Epithels kommt es im Weiteren zu einer Aktivierung von profibrotischen Zytokinen wie TGF- $\beta$ 1 (transforming-growth-factor  $\beta$ 1) und Amphiregulin, die Entwicklung und Fortschreiten einer Lungenfibrose nach sich ziehen. Leider findet man wenig Informationen zum Langzeitverlauf der pädiatrischen Patienten nach ARDS (Kraemer et al. 1985). Bei erwachsenen Überlebenden des ARDS verbleiben oftmals chronische fibrotische Lungenveränderungen und eine reduzierte Lungenfunktion (Miwa et al. 2010). Drei Monate nach einem Krankenhausaufenthalt waren circa ein Drittel der Patienten immer

noch pulmonal beeinträchtigt. Diese Beeinträchtigungen verbesserten sich jedoch innerhalb des ersten Jahres zunehmend (Ong et al. 2005 und Herridge et al. 2003).

### **1.3.1 Interleukin-6**

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Zytokin der Frühphase einer Entzündungsreaktion und triggert weitere nachfolgende Entzündungsprozesse. Es wird von Endothelzellen, mononukleären Phagozyten, Fibroblasten und aktivierten T-Lymphozyten als Antwort auf Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) freigesetzt. IL-6 aktiviert die Synthese von Akute-Phase-Proteinen in Hepatozyten sowie die Immunglobulin A-Sekretion und den Anstieg der Körpertemperatur bei Infektionen (Cruse 2003). Seine wichtigste Funktion ist jedoch die Beteiligung bei der Reifung und Differenzierung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen und deren Synthese von Antikörpern. Eine Überproduktion von IL-6 in transgenen Mäusen führte zu einem erhöhten Risiko für Plasmozytom, wobei in IL-6-defizitären Mäusen kein Plasmozytom entstehen konnte (Mak und Saunders 2006). Außerdem ist IL-6 bei der Aktivierung von T-Lymphozyten (mit Co-Stimulation von IL-1), Makrophagen und anderen Körperzellen beteiligt. Der Signalweg wird über den IL-6-Rezeptor (IL-6R) vermittelt, der aus zwei Untereinheiten besteht: IL-6R $\alpha$  und gp 130. Dabei bindet IL-6R $\alpha$  das IL-6 und die nicht-Liganden-bindende Domäne gp130 aktiviert intrazellulär die Kinasen Jak1, Jak2 sowie Tyk2, die ihrerseits Genexpressionen im Zellkern induzieren können. Dieser Rezeptor wird auch von vielen anderen Immunzellen im Blut wie aktivierten B-Zellen und Monozyten sowie auf Hepatozyten exprimiert.

### **1.3.2 Apoptose**

Die Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose ein kontrollierter Prozess eines Zelluntergangs. Es werden der extrinsische und intrinsische Signalweg unterschieden.

Der extrinsische Weg der Apoptose wird durch spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche wie dem Fas-Rezeptor (Fas) und dem TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) ausgelöst. Wenn die entsprechenden Liganden an diese Rezeptoren binden, werden entweder die zytosplasmatischen Anteile der Adaptorproteine FADD (Fas-associating death domain) bei Aktivierung von Fas oder TRADD (TNFR-associated death domain) und FADD bei Aktivierung des TNFR1 beeinflusst. Diese rekrutieren Prokaspase-8 zur aktiven Kaspase-8,

die ihrerseits das Schlüsselenzym Kaspase-3 aktiviert. Kaspase-3 kann dann Kaspase-6, die die Spaltung der Struktur- und Membranproteine initiiert, und Kaspase-7, die die DNA-Reparaturprozesse blockiert, aktivieren. Darüberhinaus spaltet Kaspase-3 die ICAD (inhibitor of CAD) zu CAD (caspase-activated DNase), welche die Zerstörung der DNA einleitet.

Der intrinsische Apoptoseweg funktioniert unter Beteiligung von Mitochondrien. Durch diverse apoptotische Stimuli kann die Permeabilität der Mitochondrienmembran verändert werden, sodass Zytochrom C ins Zytoplasma entweichen kann. Zytochrom C zusammen mit dATP (desoxy-adenosin-triphosphate) und Apaf1 (apoptosis-activating-factor-1) kann Prokaspase-9 spalten und aktivieren. Die aktivierte Kaspase-9 kann dann mit diesen Komponenten den Enzymkomplex Apoptosom bilden, der Kaspase-3 aktiviert und den weiteren Prozess des bereits beschriebenen extrinsischen Signalweges in Gang setzt. Der intrinsische Weg kann auch durch die aktivierte Kaspase-8 angestoßen werden, indem diese das BiD (BH<sub>3</sub> interacting domain) spaltet. Ein Teil dieses Proteins bezeichnet als tBiD (truncated BiD) kann sich zusammen mit den proapoptotischen Proteinen Bax und Bak an die Mitochondrienmembran binden und diese destabilisieren (Mak und Saunders 2006).

In der Zelle existieren ebenso anti-apoptotische Faktoren, die normalerweise eine Balance zum programmierten Zelltod darstellen. So können durch die Aktivierung von TNFR1 und TNFR2 die antiapoptotischen cIAPs (cellular inhibitor of apoptosis proteins) induziert werden, die die Kaspase-8 hemmen. Proteine wie Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) und Bcl-x (B-cell lymphoma x) haben eine antiapoptotische Funktion, die die Freisetzung von Zytochrom C hemmt (Mak und Saunders 2006).

Weiterhin ist bekannt, dass Amphiregulin (Areg) bei Resistenz gegen Apoptose von Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms beteiligt ist. Es inhibiert die inaktivierende Acetylierung von Ku70, einem Bestandteil des heterodimeren, vielseitig regulatorischen Proteins Ku. Zellstress führt normalerweise zur Aktivierung von Ku70, das sich an Bax anlagert und seine proapoptotische Wirkung verhindert. Bax wirkt an der mitochondrialen Membran, verändert ihre Permeabilität und induziert den intrinsischen Signalweg der Apoptose (Busser et al. 2010 und Gullo et al. 2006).

### 1.3.3 Chitotriosidase

Chitotriosidase (Chit) gehört zu den Enzymen mit Chitinase-Aktivität und kann Chitin-Polymere spalten. Es ist bei der Abwehr von chitinhaltigen Pathogenen beteiligt und wird zum größten Teil in Makrophagen produziert. Das 50-kDa große Protein wird nach Synthese teilweise in Lysosomen prozessiert und ist danach als 39-kDa-Isoform aktiv. Man hat beobachtet, dass die Chitotriosidase bei einigen Erkrankungen wie bei lysosomalen Speicherkrankheiten, Thalassemie, akuter Malaria ausgelöst durch *Plasmodium falciparum*, Multipler Sklerose und Sarkoidose vermehrt exprimiert wird. Die Chitotriosidase wird im peripheren Blut von Makrophagen und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten als Antwort auf die Stimulation mit GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) und PAF (platelet activated factor) exprimiert. In vitro zeigte dieses Enzym hemmende Effekte gegen den Hefepilz *Candida albicans*, indem es deren Wachstum und die Ausbildung von Hyphen verminderte. Auch in vivo konnten diese Effekte beobachtet werden. Mäuse mit systemischer Candidose und Aspergillose, welche mit humaner Chitotriosidase behandelt wurden, zeigten eine signifikant erhöhte Überlebensrate im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen (van Eijk et al. 2005).

Die Chitotriosidase wird unter anderem auch in der Lunge von pulmonalen Epithelzellen exprimiert und ist primär für die Chitinase-Aktivität in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) verantwortlich (Seibold et al. 2008). In einer Zellkultur mit humanen Makrophagen konnten erhöhte Genexpression und Aktivität nach Stimulation mit  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  und LPS festgestellt werden. Dabei war in der LPS-stimulierten Kultur der höchste Anstieg zu verzeichnen. Interessanterweise fielen Expression und Aktivität der Chitotriosidase nach 24 Stunden Stimulation wieder unter die Werte der Kontrollgruppe (Malaguarnera et al. 2005).

Seibold und Mitarbeiter hatten eine niedrigere Chitotriosidase-Aktivität bei Patienten mit leichtem Asthma bronchiale gemessen als in der gesunden Kontrollgruppe. Dagegen waren die Werte bei habituellen Rauchern mit oder ohne COPD (chronisch obstruktive Lungenerkrankung) signifikant höher. Die Autoren vermuten, dass die erhöhten Werte bei Rauchern auf eine mögliche Pilzbelastung des Tabak hinweisen (Seibold et al. 2008).

Bargagli und Mitarbeiter untersuchten die Chitotriosidase-Aktivität bei interstitiellen Lungen-erkrankungen. Im Serum und in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit war die Aktivität bei Patienten mit Sarkoidose signifikant höher als bei denen mit ideopatischer Lungenfibrose, systemischer Sklerose und der Kontrollgruppe. Die Werte waren bei der aktiven Form der Sarkoidose im Vergleich zur chronischen Form signifikant höher und korrelierten mit dem Schweregrad der Erkrankung (Bargagli et al. 2007 und Bargagli et al. 2008).

Labadaridis hat 2005 über die Chitotriosidase-Aktivität bei Neugeborenen mit Pilz- und bakteriellen Infektionen berichtet. Bei sieben von acht Neugeborenen mit Pilzinfektion (*Candida albicans*) wurden erhöhte Werte von Chitotriosidase im Plasma und Urin gemessen. Auch bei grampositiven und gramnegativen bakteriellen Infektionen waren die Werte im Plasma bei drei und im Urin bei zwölf von insgesamt fünfzehn Patienten erhöht (Labadaridis et al. 2005).

### **1.3.4 TGF- $\beta$ 1**

TGF- $\beta$  (transforming-growth-factor  $\beta$ ) ist in drei Isoformen TGF- $\beta$ 1, 2, 3 anzutreffen und bei Säugetieren an einer Vielzahl von Zellfunktionen beteiligt. Dazu zählen vor allem die Proliferation und Differenzierung von Zellen in der fetalen Entwicklung sowie die Immunregulation, wofür es hauptsächlich produziert wird. Es wird von hämatopoetischen Zellen sowie Makrophagen freigesetzt und besitzt immunsuppressive und antiinflammatorische Eigenschaften. Es vermindert die Aktivierung von Makrophagen, die Proliferation von aktivierten T-Zellen und die Immunglobulin-G-Synthese der B-Zellen. Darüberhinaus scheint es die Synthese von IL-1, IL-2, IL-6 und TNF zu verringern (Mak und Saunders 2006).

Man hat auch feststellen können, dass TGF- $\beta$ 1 eines der wichtigsten Zytokine in der Pathogenese der Entzündung und Lungenfibrose ist. Es ist bei der Wundheilung beteiligt und induziert die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die Kollagen ins Gewebe freisetzen. Lee hat 2004 in einer Studie am transgenen Mausmodell für TGF- $\beta$ 1 induzierte Lungenfibrose einen Zusammenhang zwischen der epithelialen Apoptose und Fibrose festgestellt. Dabei war 48 Stunden nach der Induktion von TGF- $\beta$ 1 eine Zunahme von Apoptose in den epithelialen Lungenzellen festzustellen, die sich mit erhöhten Werten für die proapoptotischen Kaspasen-3, 7, 8 und 11 manifestierte. Ebenso konnte in den Lungen ein alveolärer Umbau und zunehmender Gehalt von Kollagen beobachtet werden (Lee et al.

2004). Arribillaga konnte 2011 in vivo an Mäusen, deren Lungenepithel durch Bleomycin geschädigt wurde, zeigen, dass eine TGF- $\beta$ 1-Inhibition eine signifikante Reduktion der Lungenfibrose zwei Tage und drei Wochen nach der Schädigung zur Folge hatte. Dabei wurde eine Verminderung der mRNA-Expression von Kollagen Typ I und Fibronectin festgestellt (Arribillaga et al. 2011). Ebenso konnte in einem ähnlichen Bleomycin-Modell an Mäusen, die defizient für den TGF- $\beta$ -Rezeptor 2 waren, eine Reduktion der Lungenfibrose drei Wochen nach Lungenschädigung beobachtet werden. Dies äußerte sich in einer verminderten Anzahl der Fibroblasten im Lungengewebe der Tiere (Degryse et al. 2011).

### 1.3.5 Amphiregulin

Amphiregulin (Areg) besteht aus 84 Aminosäuren und wird aus dem 252 Aminosäuren großen Vorläuferprotein TACE (tumor-necrosis factor-alpha converting enzyme) abgespalten. Es gehört zur EGF-Familie (epidermal growth factor) und wird in vielen Organen einschließlich der Lunge gebildet. Areg bindet an den EGF-Rezeptor (EGFR), der stark auf epithelialen Zellen exprimiert wird und so den MEK/ERK1 und PI3K/AKT-Signalweg aktiviert. Amphiregulin ist bei verschiedenen Prozessen in der Zelle beteiligt wie zum Beispiel bei der Differenzierung, Metabolismus, Migration und Überleben der Zellen. Es kann die Freisetzung der Entzündungsmediatoren Interleukin-8 und NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) sowie die Zell-Proliferation von Fibroblasten induzieren (Cruse 2003). Eine Inhibition von EGFR durch Gefitinib und Erlotinim bewirkte eine signifikante histologische Reduktion der Lungenfibrose im transgenen Mausmodell. Diese Lungenfibrose wurde ausgelöst durch eine spezifische pulmonale Synthese von TGF- $\alpha$ , einem weiteren EGF-Rezeptor-Liganden im Körper (Hardie et al. 2008). Eine erhöhte EGF-Rezeptor-Aktivität in pulmonalen Epithelzellen wurde in einem Mausmodell für chronisches Asthma bronchiale festgestellt (Le Cras et al. 2011). Interessanterweise bildete sich die peribronchiale und perivaskuläre Fibrosierung der Lunge nach Beendigung der EGF-Rezeptor-Stimulation zurück (Hardie et al. 2007). Eine Überblähung der Lunge und die Gabe von LPS initiierte eine erhöhte Genexpression des Areg in den Epithelzellen der Lunge (Dolinay et al. 2006)

Es wurde darüber hinaus ein protektiver Effekt des Areg gegen Apoptose bei Fas-induzierter Leberschädigung beobachtet, wodurch vermehrt antiapoptotische Bcl-Proteine exprimiert und sog. „survival pathways“ aktiviert wurden (Berasain et al. 2005). Einige maligne Zelllinien

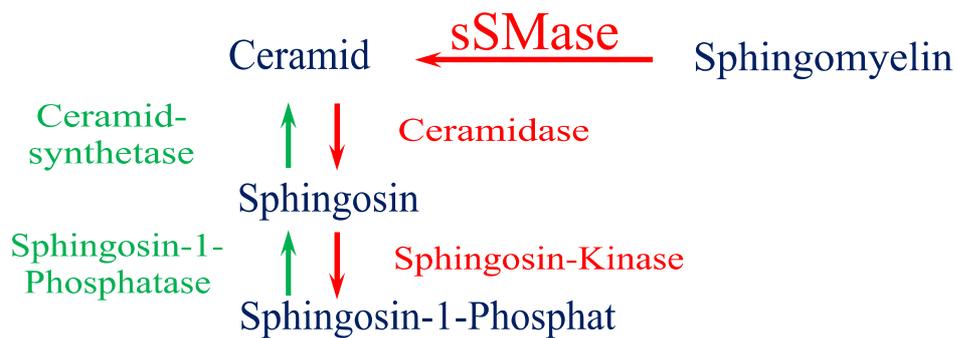
machen sich die antiapoptotische Wirkung des Areg und EGFR zunutze, indem sie diese Rezeptoren auf der Zelloberfläche übermäßig stark exprimieren und durch Areg autokrin aktivieren können. Das Ergebnis sind vermehrtes Wachstum sowie die Migration und Invasivität des Tumors. Der Mechanismus konnte vor allem beim nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC, non-small cell lung cancer), aber auch bei Karzinomen der Leber und Brust beobachtet werden (Busser et al. 2009 und Busser et al. 2010).

Hurbin und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Areg ebenso den Insulin-like-growth-factor-1-Rezeptor (IGF1-R) binden und durch die Aktivierung von Proteinkinase C protektiv gegen Apoptose in einigen humanen Tumorzellen wirken kann. Dabei induziert IGF1-R seinerseits durch die Aktivierung von einigen Metalloproteasen die Sekretion von Areg und Insulin-like-growth-factor-1 (IGF1), einem weiteren IGF1-Liganden, wodurch ein kontinuierlicher antiapoptotischer Effekt aufrechterhalten wird (Hurbin et al. 2003 und Hurbin et al. 2005).

### **1.3.6 Sphingomyelinase und Ceramid**

Je nach pH-Optimum werden verschiedene Sphingomyelinasen aktiviert. Die für dieses Projekt wichtige saure Sphingomyelinase (sSMase) ist vorwiegend an Endosomen und Lysosomen zu finden. Die saure SMase erzeugt das proapoptotische Sphingolipid Ceramid (Zeidan und Hannun 2010).

Ceramide zählen zur Untergruppe der Sphingolipide und sind im Tier- und Pflanzenreich zum Beispiel in Zellmembranen weit verbreitet. Sie bestehen aus Sphingosin und Fettsäuren, unter anderem Linolsäure, die zu den essentiellen Fettsäuren gehört. Die Entstehung erfolgt entweder durch de novo Synthese (durch die Aktivität der Ceramidsynthetase Abbildung 1) oder durch Abspaltung des Phosphocholins vom Sphingomyelin durch die Sphingomyelinase (Mathias et al. 1998).



**Abbildung 1: Auf- und Abbauweg des Ceramid**

Intrazellulär fungiert Ceramid als second messenger wie zum Beispiel bei Zellwachstum und Differenzierung, Stressabwehr und programmiertem Zelltod, indem es die Genexpression verändert und seinerseits unterschiedliche Signaltransduktionswege aktiviert (Okazaki et al. 1990 und Doenecke et al. 2005). In der Zelle aktiviert es die MAD-Caspasen (mitogen-activated protein kinases), Proteasen und Kaspasen, die sowohl bei den apoptotischen als auch den inflammatorischen Reaktionen beteiligt sein können.

Die Aktivität der sSMase kann unter anderem durch Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Heinrich et al. 2004), Fas/CD95 (Herr et al. 1997), PAF (Göggel et al. 2004) und LPS (Haimovitz-Friedman et al. 1997) gesteigert werden. Kaspase-8 ist ebenfalls an der Aktivierungskaskade von diesem Enzym beteiligt (Edelmann et al. 2011).

### 1.3.7 Phospholipase A2 (PLA2)

Phospholipase A2 ist ein Enzym, das zum Abbau von Surfactant beiträgt. Dabei werden intrazelluläre und sekretorische Phospholipasen A2 und weitere Untergruppen unterschieden. Sie spalten Esterverbindungen an der sn-2-Position der Phospholipide wie zum Beispiel Phosphatidylglyzerol (Abbildung 2). Bei dieser Reaktion werden freie Fettsäuren gebildet, die als Vorläufermoleküle für Eicosanoide dienen und im Weiteren zu Entzündungsmediatoren wie Prostaglandinen, Prostacyclinen und Tromboxanen (Cyclooxygenase-Weg) sowie Leukotrienen und Hydroxylfettsäuren (Lipoxygenase-Weg) umgesetzt werden. Auch PAF (platelet activating factor) wird ebenso mit Hilfe der Phospholipase A2 gebildet (Doenecke et al. 2005).

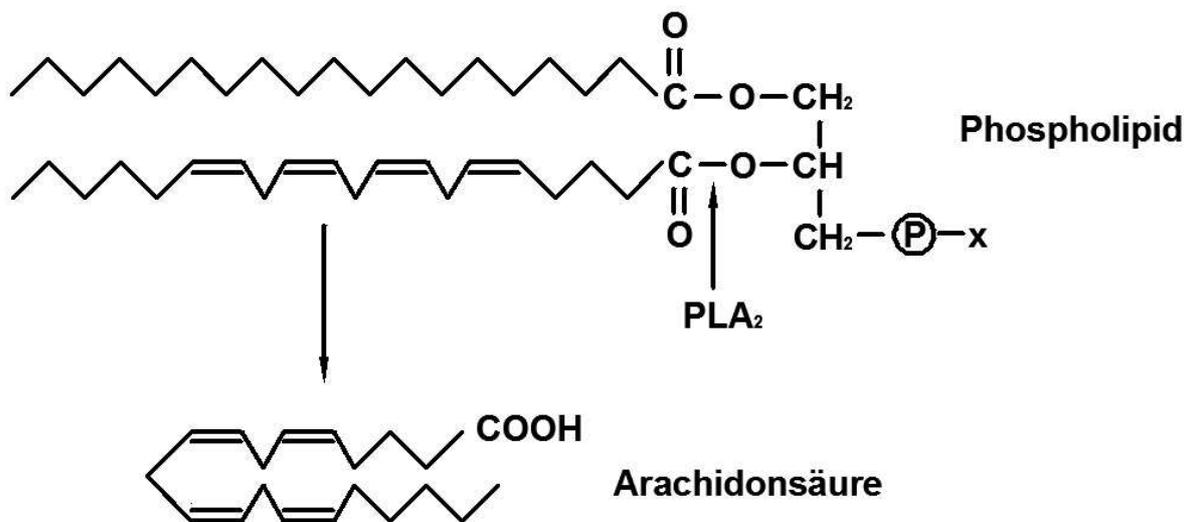


Abbildung 2: Reaktion der Phospholipase A2 am Phospholipid nach (Doenecke et al. 2005)

So spielt das Enzym Phospholipase A2 eine wichtige Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen. Als besonders wichtig ist die Kalzium abhängige sekretorische Phospholipase A2 (sPLA2) in der Pathophysiologie der Erkrankungen des Respirationstraktes klassifiziert worden. Bereits 1990 beschrieb Durham spezifische degenerative Veränderungen des Lungengewebes nach intratrachealer Instillation der PLA2 bei Meerschweinchen. Dabei konnten er und seine Mitarbeiter bereits 10 Minuten nach PLA2-Gabe ein perivaskuläres und alveoläres Ödem, Akkumulation von Neutrophilen, Leukozyten, proteinreiches Material und eine Freilegung der Basalmembran in den Alveolen beobachten (Durham und Selig 1990).

Elderson und Kollegen konnten zeigen, dass mit einer intratrachealen Instillation von 40.000 Einheiten von PLA2 pro Kilogramm Körpergewicht ein ARDS bei ausgewachsenen Ratten ausgelöst werden kann. Die Tiere zeigten eine erhöhte Gesamtmortalität sowie die histologischen Charakteristika dieses Krankheitsbildes wie Lungenödem, Zellmigration ins Lungengewebe und alveoläre Wanddefekte, die 48 Stunden nach der Enzym-Instillation am stärksten ausgeprägt waren. Diese Auffälligkeiten gingen erst nach 240 Stunden im Versuchsverlauf wieder zurück (Edelson et al. 1991).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivität der sekretorischen Phospholipase A2 mit dem Schweregrad des ARDS ansteigt. Eine selektive Inhibition der sPLA2 vor und eine

Stunde nach einem durch Ölsäure induzierten Lungenversagen in einer Studie von Slonim und Mitarbeitern an Kaninchen scheint die Ausprägung der Schädigung zu mildern. Jedoch bewirkte eine spätere Gabe der sPLA2-Inhibitoren keine Verbesserung der klinischen Parameter. Es gibt anscheinend ein therapeutisches Fenster für eine Behandlung des ARDS mit sPLA2-Inhibition (Slonim und Dalton 2001). Auch das in dieser Studie verwendete Surfactantpräparat Curosurf® hatte in Zellkulturen alveolärer Makrophagen eine inhibierende Wirkung auf die Aktivität und mRNA-Expression der sekretorischen Phospholipase A2 (Hidi et al. 1997).

Interessanterweise ist eine Aktivität der Phospholipase A2 auch im Mekonium – dem ersten durch Neugeborenen abgesetzten Stuhl – nachzuweisen. Durch Zugabe von Mekonium zum Surfactant konnte ein signifikanter Abbau der Surfactant-Komponente beobachtet werden, der sich in einem Anstieg der Oberflächenspannung äußerte. So kann die Aspiration des mekoniumhaltigen Fruchtwassers zum Mekoniumaspirationsyndrom (MAS) bei Neugeborenen führen und der endogene Surfactantpool direkt durch die Phospholipase A2 reduziert werden (Schrama et al. 2001 und De Luca et al. 2011).

Die sekretorische Phospholipase A2 Typ IIA (sPLA2-IIA), die meist untersuchte Untergruppe der sekretorischen PLA2, wird auch in der Lunge vorwiegend von aktivierten Makrophagen freigesetzt. sPLA2-IIA wurde auch in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten festgestellt und korrelierte mit dem Schweregrad der Erkrankung (Kitsioui et al. 2009). So stimulierten beispielsweise TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B und Lipopolysaccharide über den peroxisome-proliferator-activated-receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) die Synthese der sPLA2-IIA (Arbibe et al. 1997 und Alaoui-El-Azher et al. 2002). Wu und Mitarbeiter konnten 2003 zeigen, dass Phospholipide des Surfactant – besonders Dioleoylphosphatidylglyzerol (DOPG) – die Endotoxin-induzierte Expression von saurer Phospholipase Typ II durch eine Verringerung der NF- $\kappa$ B-Aktivität in Makrophagen hemmen kann (Wu et al. 2003).

### **1.3.8 1,2 - Dioleoyl-sn-glyzero-3-phospho-rac-(1-glycerol) Natrium-Salz (DOPG, Dioleoylphosphatidylglyzerol)**

DOPG gehört zu den natürlich vorkommenden Phospholipiden und ubiquitär Zellmembran bildenden Lipiden in der Tier- und Pflanzenwelt. Glycerol bildet bei diesem Molekül das Rückgrat, wobei die Positionen eins und zwei die Hydroxylgruppen mit Fettsäuren verestert

sind und den hydrophilen Anteil darstellen. An der Kopfgruppe ist die Hydroxylgruppe über einen Phosphatrest mit einem weiteren Glycerinmolekül verbunden und stellt den hydrophilen Anteil des gesamten Moleküls dar. Die Phosphatgruppe trägt eine negative Ladung, sodass DOPG insgesamt einfach negativ geladen ist.

Als ein Bestandteil von Surfactant beeinflusst DOPG auch wesentlich dessen biophysikalischen Eigenschaften (Hawgood und Poulain 2001).

Die molekularen Eigenschaften des DOPG erlauben eine gute Zellpenetration des Moleküls. Es konnte gezeigt werden, dass radioaktiv markiertes DOPG nach 20 Stunden fast vollständig (60-80%) in einer Zellkultur von Makrophagen aufgenommen wurde. Dabei ist die Inkorporation von DOPG in Gegenwart von Surfactantproteinen höher als in deren Abwesenheit. In der gleichen Zellkultur konnte auch gezeigt werden, dass DOPG als einzige Surfactantkomponente signifikant die Sekretion von TNF- $\alpha$  und die Expression von sPLA2-IIA in den alveolären Makrophagen reduzieren konnte (Berger et al. 1999). Ebenso konnte bei Inkubation der alveolären Makrophagen von Mehrschweinchen mit Endotoxin für eine Stunde nach zwanzig Stunden eine signifikante Reduktion der Expression der sPLA2-IIA und TNF- $\alpha$  beobachtet werden (Wu et al. 2003). Außerdem hemmt es die Produktion von PAF, einem in Makrophagen produzierten Entzündungsfaktor, der die Degranulation von neutrophilen Granulozyten und die Kontraktion von glatten Muskelzellen auslösen kann (Lekka et al. 1993).

## 1.4 Tiermodell

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde eine randomisierte, kontrollierte, prospektive Studie am Tiermodell durchgeführt, in der 27 Ferkel über einen Zeitraum von 72 Stunden sediert und maschinell beatmet wurden. Es wurde ein neues translationales Modell zur Erforschung des nARDS entwickelt, bei dem durch einen dreifachen Lungenschaden jeweils im Abstand von 24 Stunden eine möglichst Klinik-ähnliche Situation des Neugeborenen im hypoxämischen Lungenversagen imitiert wurde (Matute-Bello et al. 2008).

Die Schädigung wurde herbeigeführt durch:

1. repetitive Lungenlavagen mit physiologischer Kochsalzlösung (30 ml/kg), wobei endogenes Surfactant weitgehend aus dem Alveolarraum entfernt und ein akutes Lungenversagen erzeugt wird,
2. Lungen-schädigende Beatmung zuerst mittels PEEP (positive end-expiratory pressure) von 0 mbar Beatmung und anschließend durch Verdopplung des Atemzugvolumens zur Induktion eines Beatmungs-induzierten Lungenschadens,
3. Instillation von LPS zur Verstärkung der pulmonalen Inflammation.

Die Ferkel wurden in drei verschiedene Gruppen randomisiert und erhielten intratracheal über den Beatmungstubus zwei Stunden nach einer Schädigung entweder Surfactant (S) allein, Surfactant mit DOPG (S+DOPG) oder in der Kontrollgruppe (C) lediglich einen Luftbolus. Während des Versuchs wurden Gasaustausch, Lungenfunktion, Blutgase und andere klinische Parameter wiederholt kontrolliert und gemessen (Tabelle 1). Post mortem wurde das Lungengewebe und die BALF untersucht. Es wurden sSMase, TGF- $\beta$ 1, die Apoptoserate, Phospholipase A2, IL-6, Chitotriosidase und Ceramid gemessen. Darüberhinaus wurde die Oberflächenspannung des gewonnenen Surfactants und die Expression von Oberflächenantigenen CD 14 (cluster of differentiation) und CD 18 der Zellen aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit untersucht.

## 1.5 Arbeitshypothese

Die Einführung der Surfactantsubstitution bei reifen Neugeborenen mit ARDS hat in den vergangenen Jahren nicht die gewünschte Verbesserung der Überlebensrate der Kinder bewirkt. Das exogen zugeführte Surfactant verbesserte nur kurzfristig die klinische Situation, da es durch die Entzündung wieder inaktiviert wurde.

Das Ziel dieser Studie war daher die Wirkung von DOPG als Zusatz zu dem kommerziellen Surfactantpräparat Curosurf® im klinischen Einsatz beim nARDS im Ferkelmodell zu testen. Dabei ging es um die Überprüfung der Hypothesen, ob DOPG – wie in Zellkulturen teilweise gezeigt

- den Abbau von Surfactant vermindert
- den Gasaustausch in der Lunge verbessert
- das pulmonale Ödem reduziert
- und die fehlregulierte Entzündungskaskade beim nARDS durchbrechen kann.

DOPG als natürliche Surfactant-Komponente wurde benutzt, da in den oben beschriebenen Studien keine unmittelbaren Nebenwirkungen beschrieben wurden und daher für den Einsatz im fragilen Stoffwechsel eines Neugeborenen geeignet sein könnte.

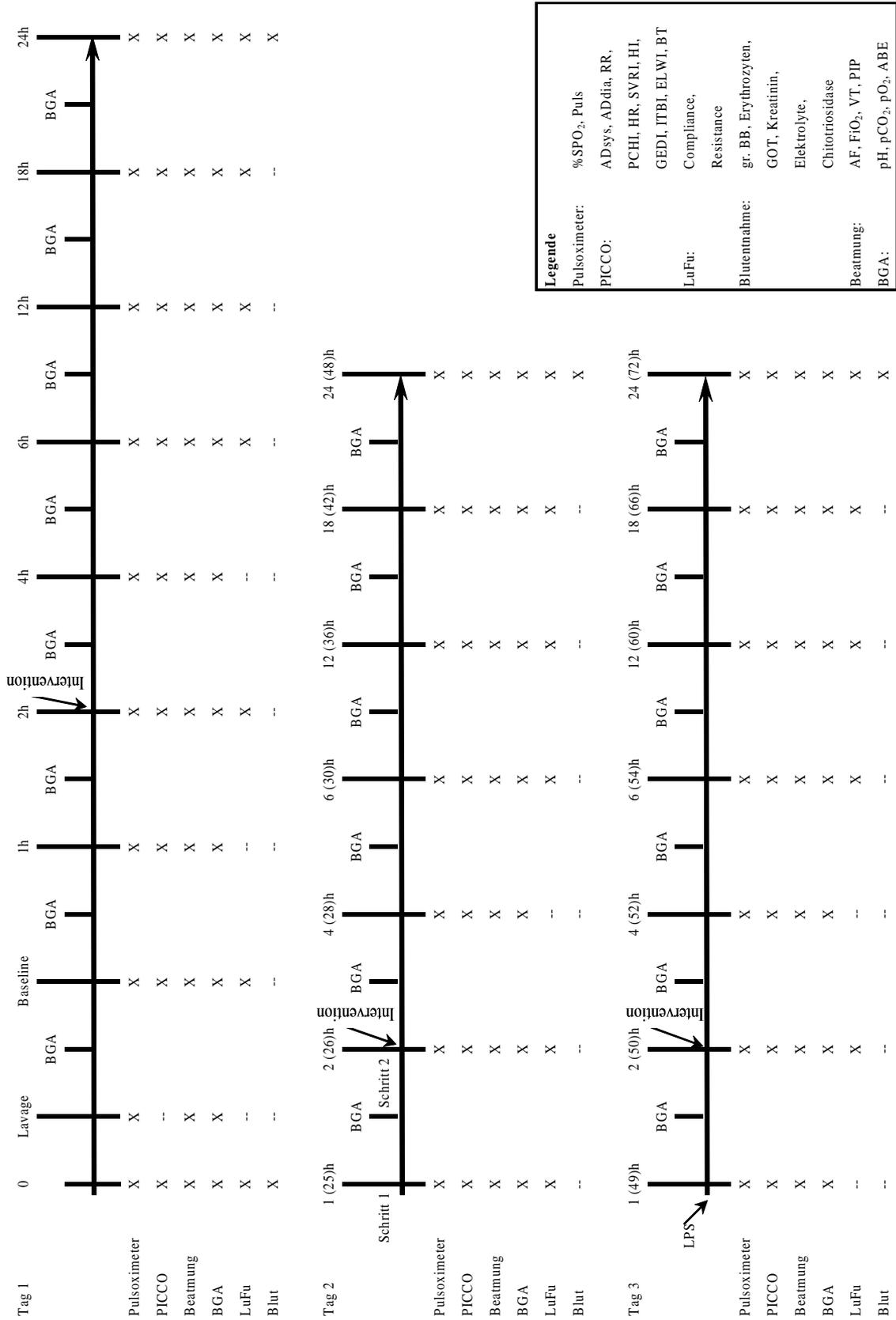


Tabelle 1: Zeittafel des Tierversuchs

## 2. Methoden

### 2.1 Präparation der Ferkel

Zu Beginn jeder Versuchswoche wurden 4 Ferkel im Alter von 3-6 Tagen und einem durchschnittlichen Gewicht von 2,5 kg aus der universitären Schweinezuchtanlage (Achterwehr) in einem Kleintiertransportkorb ohne Sedierung zum Versuchslabor des Universitätsklinikums der CAU gebracht. Nach dem Transport wurde den Tieren eine Ruhepause unter einer Wärmelampe gewährt.

Das Labor mit den 4 intensivmedizinischen Versuchsplätzen und dem Material für die Probengewinnung wurde jeweils in der Woche zuvor vorbereitet. Eine Kalibrierung des Lungenfunktionsmeßplatzes, der Oxydigs (Dräger, Lübeck), der Neonatalen Volumen Monitore (NVM-1, Heinen & Löwenstein, Bad Ems) sowie eine Testung der Beatmungsgeräte Babylog 1 (Dräger, Lübeck) fand unmittelbar vor dem Versuch statt.

Zum Versuchsbeginn wurden die Tiere mit der intramuskulären Gabe von 0,025 mg/kg Atropin, 15 mg/kg Ketanest und 1,5 mg/kg Midazolam anästhesiert. Die Ferkel wurden auf die beheizten Versuchsplätze gelagert und ein peripherer Venenweg in eine Ohrvene gelegt. In wenigen Fällen musste auf eine oberflächige Bauchvene (V. mammaria) ausgewichen werden. Zeitgleich begann die kontinuierliche perkutane Kontrolle der Sauerstoffsättigung und Pulsfrequenz mittels Pulsoxymetrie. Sobald der venöse Zugang sicher befestigt war, wurde die Analgosedierung mit zusätzlicher Muskelrelaxierung – bestehend aus 250 mg Ketanest (Ampulle 25 mg/ml), 20 mg Norcuron (gelöst in 4 ml 0,9% iger NaCl-Lösung) und 25 mg Midazolam (Ampulle 5 mg/ml) sowie 31 ml einer 10% Glukoselösung – in einer 50 ml Spritze mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/kg/h fortgeführt. Das entspricht einer Dosierung von 5 mg/kg/h Ketanest, 0,4 mg/kg/h Norcuron und 0,5 mg/kg/h Midazolam.

Im nächsten Schritt erfolgte nach einer Präoxygenierung mit 100% Sauerstoff die orotracheale Intubation mit einem 3,5 I.D.mm Doppellumen-Tubus. Bei Abfall der Sauerstoffsättigung wurde mit einer Unterbrechung der Intubation und Beutel-Masken-Beatmung mit 100% Sauerstoff entgegengewirkt. Die Gabe von ca. 10 mg Propofol erleichterte die Intubation, indem Abwehrreflexe reduziert wurden. Bei 2 von 27 Tieren

musste der Tubus aufgrund der anatomischen Verhältnisse über ein Tracheostoma in der Trachea platziert werden. Unter kontinuierlicher Beatmung der Ferkel mit einem Beutel wurde eine 10 Charrière Magensonde gelegt. Die Ferkel wurden an die Beatmungsgeräte zur maschinellen Beatmung angeschlossen und das gemessene Zugvolumen sowie die Atemfrequenz kontrolliert. Die Atemfrequenz betrug laut Protokoll zu Beginn des Versuchs 25/min, das Zugvolumen sollte durch Regulierung des PIP (peak inspiratory pressure) während des gesamten Versuchs bei 7 ml/kg gehalten werden. Zusätzlich wurden die Frequenz und der Beatmungsdruck durch den Barolog (Dräger, Lübeck), sowie das Zugvolumen, Minutenvolumen und die Frequenz durch den Neonatalen Volumen Monitor überwacht. Die Überprüfung des tatsächlichen  $\text{FiO}_2$  der Beatmungsluft erfolgte durch das Gerät Oxydig.

Vor Beginn des Präparierens wurden zusätzlich zur Analgesie noch 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Fentanyl als Bolus über den peripheren Venenweg gegeben. Unter sterilen Bedingungen erfolgten eine mediane Inzision der Haut unterhalb des Kehlkopfes und Spreizen der Muskulatur, um eine Ligatur um die Trachea mittels eines breiten chirurgischen Bandes zu setzen und somit einer Leckage des Tubus bei der Messung von Lungenfunktionsparametern vorzubeugen. Im gleichen operativen Schritt wurden die Halsgefäße einer Seite freipräpariert und ein venöser Katheter mittels der Seldinger-Technik in die Vena jugularis interna gelegt. Hatte der Katheter die richtige Lage im Gefäß, wurde er an der Haut festgenäht. Die Fäden, welche zur Unterbindung des Blutflusses um das Gefäß geschlungen waren, wurden um den Katheter im Gefäß zugeknotet und dienten als weitere Befestigung. Farbloses Octenisept<sup>®</sup> wurde in die Wunde getupft, um eine Infektion zu verhindern. Die Wunde wurde mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Dieser zentralvenöse Zugang wurde nach Abschluss der Präparation an das PiCCO-System angeschlossen und durch einen kontinuierlichen Fluss (2 ml/h) aus einer NaCl-Heparin-Spülung (5000 IE Heparin/100ml 0,9%-NaCl-Lösung) offen gehalten.

Im Präparationsgebiet der Leiste wurde mit gleicher Vorgehensweise durch offenes Freipräparieren ein arterieller Katheter in die Arteria femoralis gelegt. Dieser Katheter diente sowohl für die Messung der hämodynamischen Parameter durch das PiCCO-System als auch der Entnahme von arteriellem Blut zur Bestimmung der Blutgaswerte. Ein Verschluss des Katheters wurde durch eine NaCl-Heparin-Infusion mit 2 ml/h (5000 IE Heparin/100ml 0,9%-NaCl-Lösung) verhindert.

Nach Abschluss der Instrumentierung wurde mit der Protokollierung der Blutgas-, Lungenfunktions- und Hämodynamik-Parameter der noch gesunden Tiere nach Vorgabe des Protokolls begonnen (Tabelle 1). Das Versuchsprotokoll umfasste wichtige Parameter wie die Atemfrequenz (AF), den Sauerstoffgehalt in der Inspirationsluft ( $\text{FiO}_2$ ), das Tidalvolumen ( $V_T$ ) sowie den positiven inspiratorischen Druck (PIP), um die Beatmung zu überwachen und gegebenenfalls auf Veränderung der Blutgaswerte reagieren zu können. Von den BGA-Werten wurden der pH,  $\text{pCO}_2$ ,  $\text{pO}_2$  sowie die Werte des aktuellen Base-Exzess (ABE) notiert. Auch der Zeitpunkt der Lungenfunktionsmessung wurde im Protokoll festgehalten. Um eine Übersicht über das Sättigungsniveau und die Herz-Kreislauf-Funktion zu haben, waren Sauerstoffsättigung ( $\%SPO_2$ ) und Pulsfrequenz (PF) sowie alle Werte des hämodynamischen Monitorings wichtig. Zusätzlich wurden Zeit und Menge der Urinausscheidung, Fütterung, Antibiotikagabe, Blutentnahmen und die Infusionsgeschwindigkeit der Dauermedikation protokolliert. Während des gesamten Versuchs wurden die genannten klinischen Parameter zu festgelegten Zeitpunkten bestimmt, um kontinuierlich eine gute Übersicht über den Gesundheitszustand des Ferkels zu bekommen.

Die Blutentnahmen erfolgten zur Bestimmung des großen Blutbildes, von Elektrolyten (Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid), Kreatinin, AST, Retikulozyten und zur manuellen Differenzierung der Blutzellen. Darüber hinaus wurde das Serum für spätere Labormessungen eingefroren.

Das Antibiotikum Unazid<sup>®</sup> 50 mg/kg (Ampicillin, Sulbactam) wurde zur 6. und 18. Stunde jedes einzelnen Versuchstages intravenös über den ZVK gegeben, um prophylaktisch Beatmungs- und Katheter-assoziierten Infektionen vorzubeugen.

Ein Vermerk über das Urinvolumen und die Nahrungsmenge diente der Kontrolle der Nierenfunktion und des Wasserhaushaltes. Die Ernährung erfolgte mit 25 ml/kg Körpergewicht Ferkelmilch (Panto<sup>®</sup>, Hamburger Leistungsfutter GmbH, Hamburg, Deutschland) alle 4 Stunden über die Magensonde. Das entspricht einer täglichen Zufuhr von 150 ml/kg Wasser und 129 kcal/kg Energie.

Um die Körpertemperatur der Ferkel konstant bei 38-39°C zu halten, wurden Wärmematten mit Servo-Control und bei Bedarf eine Rotlichtlampe verwendet.

Falls die BGA-Werte eine Anpassung der Beatmung verlangten (PIP, AF, FiO<sub>2</sub>), wurden die entsprechenden Parameter noch geändert, um anschließend mit dem 1.Schädigungsprotokoll, den wiederholten Kochsalzlavagen, fortzufahren.

## **2.2 Schädigungsprotokolle**

Während des Versuchs durchliefen die Tiere drei Schädigungsprotokolle im Abstand von jeweils 24 Stunden (Tabelle 1).

### **2.2.1 Broncho–alveoläre Lavagen**

Das erste Schädigungsprotokoll bestand aus wiederholten broncho-alveolären Lavagen mit körperwarmer 0,9%-NaCl-Lösung von 37-39°C durch den Tubus bei kurzfristiger Unterbrechung der maschinellen Beatmung. Die Lavagen wurden in verschiedenen Körperpositionen (Rechtslage, Linkslage, Rückenlage, Bauchlage) durchgeführt und nach einer Anpassung der Atemfrequenz auf 35/min alle 3-5 min wiederholt. Die Flüssigkeitsmenge pro Lavage betrug 30 ml/kg Körpergewicht. Von jeder Lavage wurde das ausgewaschene Surfactant gesammelt und die zurückgewonnene Flüssigkeitsmenge zur Feststellung der prozentualen Verlustmenge festgehalten. Von der ersten Lavageflüssigkeit wurde außerdem die Zellzahl pro Mikroliter bestimmt, eine kleine Flüssigkeitsmenge entnommen um mögliche prävalente Atemwegserreger vor Beatmungsbeginn in der Mikrobiologie bestimmen zu lassen und eine FACS-Analyse auf CD14- und CD18- positive (CD14<sup>+</sup>, CD18<sup>+</sup>) Zellen durchzuführen.

Wenn der arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO<sub>2</sub>) bei der Voraussetzung FiO<sub>2</sub> von 0,5 unter 50 mmHg sank (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> < 100 mmHg), wurden die Lavagen für 20 Minuten unterbrochen. Lag der PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>-Quotient nach der Wartezeit weiterhin unter 100 mmHg, kam es zur Beendigung des ersten Schädigungsprotokolls. Bei erhöhter Oxygenierung von PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> > 120 mmHg wurden ein bis zwei weitere Lavagen durchgeführt und erneut die Blutgaswerte bestimmt. Wenn der Quotient danach <120 mmHg betrug, wurden weitere 20 Minuten abgewartet. Dann erfolgte die Baseline-Messung laut Protokoll.

### **2.2.2 Lungen-schädigende Beatmung**

Die zweite Schädigung der Tierlungen fand 24 Stunden nach den Baseline-Messungen statt. Sie setzte sich aus zwei Schritten zusammen:

Schritt 1: In den ersten 60 Minuten wurden die Tiere mit einem PEEP von 0 mbar und normalem Tidalvolumen von 7 ml/kg ventiliert.

Schritt 2: In den folgenden 60 Minuten wurde bei wiederhergestelltem PEEP von 6 mbar ein verdoppeltes Tidalvolumen von 15 ml/kg angewandt, wobei ein maximaler PIP von 35 mbar zur Vermeidung eines Pneumothorax nicht überschritten wurde. Außerdem wurde die Atemfrequenz halbiert.

Falls der erste Schritt mit einer starken Hypoxämie (Sauerstoffsättigung von weniger als 75% bei  $FiO_2$  von 1,0) einherging, wurde ausschließlich der zweite Schritt der schädlichen Beatmung, dann für 120 Minuten, durchgeführt und der erste Schritt dafür ausgelassen. Die Messungen der klinischen Parameter erfolgten zwischen den einzelnen Schädigungsschritten und anschließend laut Protokoll.

### **2.2.3 Instillation von LPS**

Das dritte Schädigungsprotokoll wurde 48 Stunden nach den Baseline-Messungen durchgeführt. Es bestand aus einer intratrachealen Instillation von 2,5 mg Lipopolysaccharide des Serotyps E.coli 0127:B8 über den zweiten Tubusschenkel bei ununterbrochener Beatmung. Das LPS war in 2 ml 0,9%-NaCl-Lösung gelöst. Es folgten wieder die Messreihen mit BGA, Lungenfunktions- und Hämodynamik-Parameter laut Protokoll.

## **2.3 Randomisierung der Versuchstiere**

Erst nach Durchführung der Baseline-Messungen erfolgte eine Randomisierung der Versuchstiere nach folgendem Schema:

1. C: Kontrolle Luft (2,5 ml/kg)
2. S: Surfactant Curosurf<sup>®</sup> (50 mg/kg)
3. S+DOPG: Surfactant Curosurf<sup>®</sup> (50 mg/kg) + DOPG (20 mg)

Die Kontrollgruppe bekam lediglich einen Luftbolus von 2,5 ml/kg unter einer Atemfrequenz von 35/min appliziert. Das Surfactant, in der zweiten Interventionsgruppe mit dem Substituenten DOPG, wurde über 2 Minuten bei ununterbrochener Beatmung zwei Stunden nach den Baseline-Messungen intratracheal über den zweiten Tubusschenkel gegeben und die Atemfrequenz anschließend wieder auf 25/min zurückgestellt. Der Substituent DOPG war in 1 ml 0,9%-NaCl-Lösung gelöst und wurde zur Surfactantemulsion hinzugefügt, die unabhängig vom individuellen Körpergewicht der Tiere für ein Ferkel von 2,5 Kilogramm Gewicht berechnet wurde (Anmerkung: Eine Curosurf<sup>®</sup>-Ampulle enthält 240 mg Surfactant in 3 ml).

## **2.4 Beendigung des Versuchs und Abrüsten**

Nach der letzten Messung aller Parameter in der 72. Stunde nach Baseline-Messung und einer Intensivierung der Sedierung mit 1-2 Milliliter 2%-Propofol und Fentanyl (10 µg/kg) wurden die Tiere mit einer einmolaren KCl-Lösung getötet. Es folgte eine Überprüfung des eingetretenen Todes anhand des verwendeten intensivmedizinischen Equipments zur Überwachung des Herzkreislaufsystems und einer manuellen Kontrolle des Pulses.

Anschließend wurde der Thorax durch einen Schnitt durch das Sternum und entlang des Rippenbogens eröffnet und das Herz-Lungen-Paket herausgelöst. Die linke Lungenhälfte wurde post mortem einer Lavage unterzogen. Wie bei der initialen Lavage wurde auch hier die Zellanzahl pro Mikroliter bestimmt und eine Zelldifferenzierung nach Segmentierten, Lymphozyten und Monozyten durchgeführt. Eine kleine Flüssigkeitsmenge wurde zum Ausschluss einer manifesten Infektion unter maschineller Beatmung trotz Antibiotikaphylaxe an die Mikrobiologie geschickt. Das gewonnene Surfactant wurde gesammelt und eingefroren. Von der gewonnenen Lavageflüssigkeit wurde erneut eine FACS-Analyse durchgeführt.

## **2.5 Lungenfunktionsmessung**

Die Messungen der spezifischen Compliance des respiratorischen Systems ( $C_{rs}$ ) und Resistance ( $R_{rs}$ ) wurden mit Hilfe eines Lungenfunktionsmessgerätes durchgeführt. Dieses Gerät besteht im Wesentlichen aus einem Differentialdrucktransducer, der über einen AD-Wandler mit einem Rechner in Verbindung steht. Alle betrachteten Lungenfunktions-

parameter wie Tidalvolumen ( $V_T$ ), dynamische Compliance ( $C_{rs}$ ) und Resistance ( $R_{rs}$ ) wurden berechnet, indem das Flowsignal mit dem Differentialdrucktransducer (Fleisch Größe 00, Lausanne, Schweiz) am Endotrachealtubuskonnektor erfasst und über einen einzelnen Atemzug integriert wurde (single breath- least mean square Technik). Bei allen gemessenen Größen fand eine Umrechnung auf BTPS-Bedingungen (body temperature, pressure, saturated) statt.

Die Signale für Flow und Druck wurden für die Berechnung der Lungenfunktionsparameter mit einer Frequenz von 200 Hz aufgezeichnet, digitalisiert und auf einem PC für weitere Analysen gespeichert. Für die Lungenfunktionsmessungen wurde eine Software verwendet, die von Prof. Ants Silberberg, PhD, Chalmers Universität (Göteborg / Schweden), entwickelt worden war.

## **2.6 Blutgasanalyse**

Für die Durchführung der Blutgasanalyse wurde 0,1 ml arterielles Blut aus der A. femoralis entnommen. Anschließend wurde das Blut in das Blutgasanalysegerät (ABL5, Radiometer) geleitet. Anhand der dort gemessenen Parameter erfolgte dann die Anpassung der Beatmung.

## **2.7 Maschinelle Beatmung**

Bei der maschinellen Beatmung kam es zur Anwendung von continuous-flow, zeitgesteuerten, drucklimitierenden Beatmungsgeräten (Babylog 1, Dräger, Lübeck). Die gewählten Beatmungsparameter (Flow 8 l/min, Inspirationszeit 0,5 sec, PEEP 6 mbar, PIP, und  $FiO_2$  0,5) wurden aus der klinischen Situation eines menschlichen Neugeborenen mit Lungenversagen hergeleitet.

Im Zuge des zunehmenden Surfactantmangels durch wiederholte Lavagen musste der PIP Schritt für Schritt erhöht werden, um bei abnehmender  $C_{rs}$  das  $V_T$  konstant bei 7 ml/kg zu halten und so einer alveolären Hypoventilation vorzubeugen.

Folgende Anpassungen sollten in regelmäßigen Abständen durchgeführt werden:

Atemfrequenz:

- + 5/min, wenn PaCO<sub>2</sub> > 50 mmHg;
- + 10/min, wenn PaCO<sub>2</sub> > 60 mmHg;
- -5/min, wenn PaCO<sub>2</sub> < 35mmHg;
- -10/min, wenn PaCO<sub>2</sub> < 30 mmHg.

FiO<sub>2</sub>:

- + 0,2, wenn PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> < 50mmHg;
- - 0,1, wenn PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> > 150mmHg

Die maschinelle Beatmung wurde über einen Zeitraum von 72 Stunden unter den Konditionen eines wasserdampfgesättigten, körperwarmen Inspirationsgases durchgeführt. Bei Bedarf wurden tracheale Absaugmanöver durchgeführt.

## 2.8 Hämodynamisches Monitoring

In unserem Labor wurde das PiCCO-System (Pulsion Medical Systems, München) verwendet, um verschiedene hämodynamische und pulmonale Parameter zu bestimmen. Nach Eingabe der erforderlichen Parameter für das jeweilige Tier fand ein Nullabgleich statt. Die zu applizierende Menge an Kältebolus für die Bestimmung der Thermodilution betrug 2 ml NaCl 0,9%-Lösung von 4°C, die gleichmäßig und schnell über den venösen Katheter injiziert wurde. Nach der Passage der kalten Flüssigkeit durch die Lungenstrombahn, das Herz und die Aorta wurden durch eine Thermoelektrode im arteriellen Katheter die Temperaturveränderungen registriert, um daraus die hämodynamischen Parameter abzuleiten. Auf dem Bildschirm zeichnete sich die Thermodilutionskurve ab. Mittels Stewart-Hamilton-Gleichung berechnete das Gerät nun aus der Fläche unter der Thermodilutionskurve das Herzzeitvolumen. Vorlast und Lungenwasser wurden aus der mittleren Durchgangszeit und Abfallzeit der Thermodilutionskurve ermittelt. Während der Thermodilution kam es gleichzeitig zu einer Analyse der Pulskontur und Kalibrierung des Pulskonturalgorithmus, wodurch im Anschluss eine kontinuierliche Erfassung jedes einzelnen Schlagvolumens erfolgen konnte. Daraus ließ sich wiederum das HZV mittels folgender Gleichung bestimmen:

$$\text{Herzzeitvolumen} = \text{Schlagvolumen} * \text{Herzfrequenz}$$

Der Messvorgang der Thermodilution wurde zwei Mal wiederholt und der Mittelwert protokolliert.

Es wurde folgende Parameter bestimmt und fortlaufend in unserem Protokoll notiert:

- AD: arterieller systolischer und diastolischer Blutdruck (mmHg)
- PCHI: Pulskontur-Herzindex (l/min/m<sup>2</sup>)
- HR: Herzfrequenz (1/min)
- SVRI: systemischer vaskulärer Widerstandindex (dyn sec m<sup>2</sup>cm<sup>-5</sup>)
- HI: Herzindex aus Thermodilution (l/min/m<sup>2</sup>)
- GEDI: globaler enddiastolischer Volumenindex (ml/m<sup>2</sup>)
- ITBI: intrathorakaler Blutvolumenindex (ml/m<sup>2</sup>)
- ELWI: extravaskulärer Lungenwasserindex (ml/kg)
- TB: Körpertemperatur (°C)

Die beurteilten Parameter dienen somit der Überwachung der Herz-Kreislaufsituation und des Flüssigkeitshaushalts. Das Ziel dieser invasiven Diagnostik war es das Herzkreislaufsystem besser zu überwachen und pulmonal induzierte Veränderungen der Zirkulation erfassen zu können.

## **2.9 Durchflusszytometrie (FACS)**

### **2.9.1 Versuchsaufbau**

In unserem Versuch wurden die initialen und die post mortem gewonnenen Zellen aus der broncho-alveolären Lavage mittels FACS (fluorescence activated cell sorting) analysiert (FACScan, Becton Dickinson). Für die Versuchsauswertung waren vor allem die CD14+ Monozyten und die  $\beta$ 2-Integrin-positiven Zellen von großer Bedeutung, die durch ihre Antigenexpression phänotypisiert werden konnten.

Die Färbung der Lavageflüssigkeit geschah nach mehrmaligem Waschen der Zellen in Eppendorf-Röhrchen mit einem sogenannten Waschpuffer PBS (1% bovines Serumalbumine, 0,1% Natriumazid). Die Röhrchen wurden mit einem Milliliter Waschpuffer aufgefüllt, die Zellen mit dem 300-fachen der Erdanziehungskraft bei Raumtemperatur sedimentiert, der

Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Eine Resuspension der Zellpellets geschah anschließend.

Zusätzlich wurden vor der Färbung die FC-Rezeptoren, die vorwiegend auf Monozyten, Granulozyten und anderen Immunzellen zur Erkennung von opsonierten Bakterien vorhanden sind, durch das blocking reagent abgesättigt. Dadurch kann die Interaktion der FC-Rezeptoren mit den Antikörpern, die auch einen FC-Anteil besitzen, verhindert und damit eine unspezifische Markierung vermieden werden.

Danach wurden die Zellen 30 Minuten mit den monoklonalen Antikörpern bei 4°C unter Lichtabschluss inkubiert: zu je 5 oder 10 µl des jeweiligen Antikörpers wurden 50 µl Zellsuspension gegeben und gut vermischt.

Bei einer Rotfärbung der nativen Lavage-Flüssigkeit mussten zuerst die Erythrozyten in einem Zwischenschritt unter Verwendung einer Lyselösung (BD Biosciences®) aufgelöst werden.

Anschließend wurden die Proben unter Zugabe von 1 ml Waschpuffer einem Waschvorgang unterzogen und das Zellpellet danach in 100 µl 1% Paraformaldehyd für eine spätere Messung oder in 100 µl Waschpuffer für eine sofortige Messung im Durchflusszytometer resuspendiert. Die gelösten Zellen wurden bis zur Messung bei 4°C aufbewahrt.

Es gab vier Proberöhrchen pro Lavage mit folgenden Antikörpern:

1. IgG 2a FITC + IgG 1 PE-Cy5
2. CD 14 FITC
3. CD 18 PE-Cy5
4. CD 14 FITC + CD 18 PE-Cy5

1: Diese Probe diente als Isotypkontrolle für die beiden anderen Antikörper und sollte keine Markierung der Zellen bewirken.

2: Das CD14-Antigen wird vor allem auf Monozyten stark exprimiert. Es wird außerdem auch auf neutrophilen Granulozyten exprimiert. CD14-Antikörper (LS-C57417 CD14 (FITC),

livespan biosciences) wurden durch den fluoreszierenden Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Beckman Coulter) markiert.

3: Das CD18-Antigen wird vor allem auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert. Es wird in geringerem Umfang auch auf Makrophagen, Zellen der myelomonozytären Zelllinie sowie auf T- und B-Lymphozyten angetroffen. Dieses Integrin hat eine fundamentale Bedeutung bei der Pathogenese von Entzündungsprozessen. Es gehört zur Familie der Adhäsionsproteine (Untergruppe  $\beta_2$ -Integrine) und ermöglicht eine feste Bindung der Zellen an das kapilläre Endothel und ihre Transmigration ins entzündete Gewebe (Siegenthaler und Blum 2006). Der CD18-Antikörper (PE-Cy<sup>TM</sup>5 mouse anti-human CD18) war an die Kombination aus den Fluoreszenzfarbstoffen PE (Phycoerythrin) und Cy5 (Cyanin-5) gebunden.

4: In unseren Proben wurden die beiden Antikörper zusammengegeben, um den Anteil der doppelt positiven Zellen zu bestimmen.

### 2.9.2 Messung

Am letzten Tag einer Versuchswoche wurden alle Proben nacheinander im Durchflusszytometer gemessen.

Für die Messung wurden die Proben einzeln um die Messkapillare eingespannt. Durch den im Röhrchen erzeugten Überdruck wurde die Zellsuspension in die Messkapillare befördert. Anschließend wurde der Zellsuspension zusätzliche Trägerflüssigkeit hinzugefügt und stark beschleunigt. Diese Beschleunigung bewirkte eine hydraulische Fokussierung, bei der die Zellen nacheinander aufgereiht den Laserstrahl in der Messkammer passieren konnten. Beim Durchtritt der einzelnen Zelle wurde der Strahl des Lasers durch ihre Eigenschaften wie zum Beispiel Größe, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile in seiner Richtung verändert.

Es werden zwei Arten von Streulicht unterschieden. Das Vorwärtsstreulicht (FCS = forward scatter) ist das Maß für die Streuung des Lichtes im flachen Winkel und wird durch die Größe der Zellen beeinflusst. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = sideways scatter) gibt die Streuung des

Lichtes im rechten Winkel zum Laserstrahl an und wird durch die Granularität der Zelle bedingt.

Zusätzlich zur Lichtstreuung wurde die Immunfluoreszenzmessung von FITC und PE-Cy5 durchgeführt. Ein eingebauter Argon-Laser mit der Wellenlänge von 488 nm regte die durch die Antikörper an die Zelloberfläche gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe an. Die verwendeten Farbstoffe lassen sich zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge von 488 nm anregen, verfügen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren. Die Emission ist proportional zur Menge der gebundenen Antikörper. FITC emittiert ungefähr die Wellenlänge von 525 nm, und PE-Cy5 ungefähr 670 nm. Die Emissionen wurden durch vorgeschaltete Bandpassfilter von 20 nm (zur besseren optischen Trennung der Emissionsspektren) mit Photodetektoren im 90 Grad Winkel registriert. Eine Überlappung der Fluoreszenzen in Messbereichen für FITC und PE-CY5 war vorhanden. Bandmaßfilter von 20 nm erlauben keine vollständige Trennung der Emissionsbereiche von FITC und PE-Cy5, so dass die Überlappung der Fluoreszenzen mit der Kompensation korrigiert werden muss (Abbildung 3).

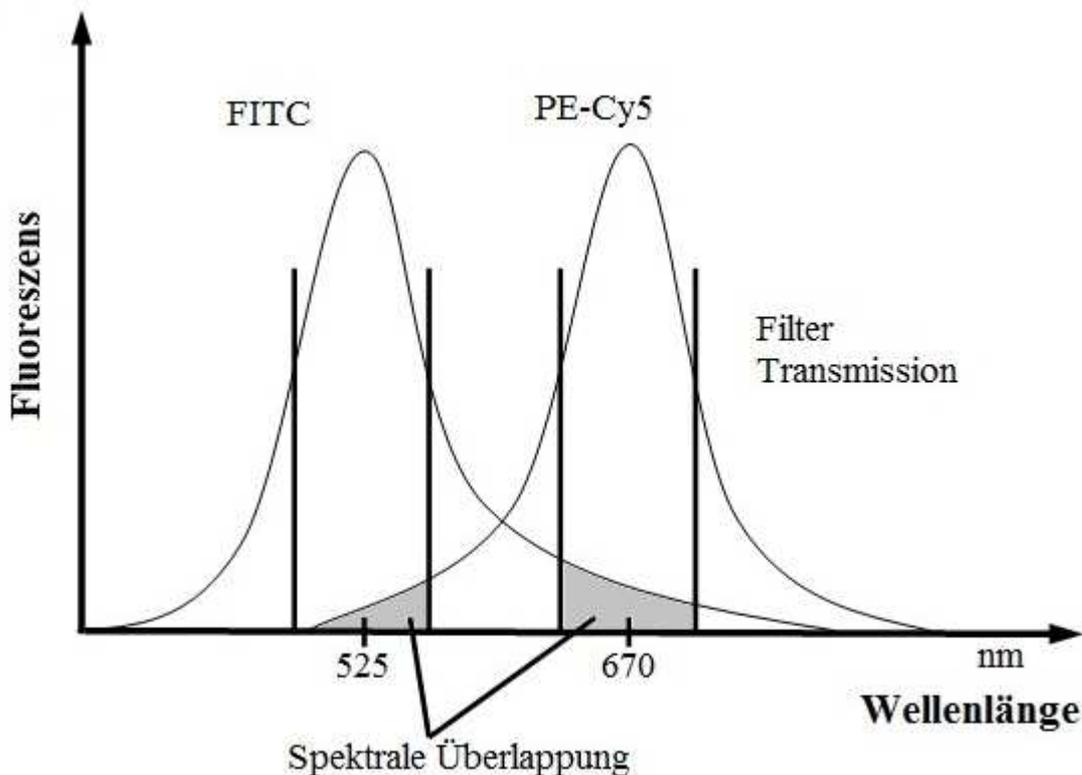


Abbildung 3: Überlappung der Fluoreszenzen nach (Sack et al. 2006)

Diese Emissionen wurden in elektrische Impulse umgewandelt, verstärkt und anschließend unter einer file-Nummer gespeichert. Bei der Lichtbrechung war eine lineare, und bei monoklonalen Antikörpern eine logarithmische Verstärkung notwendig.

### 2.9.3 Auswertung

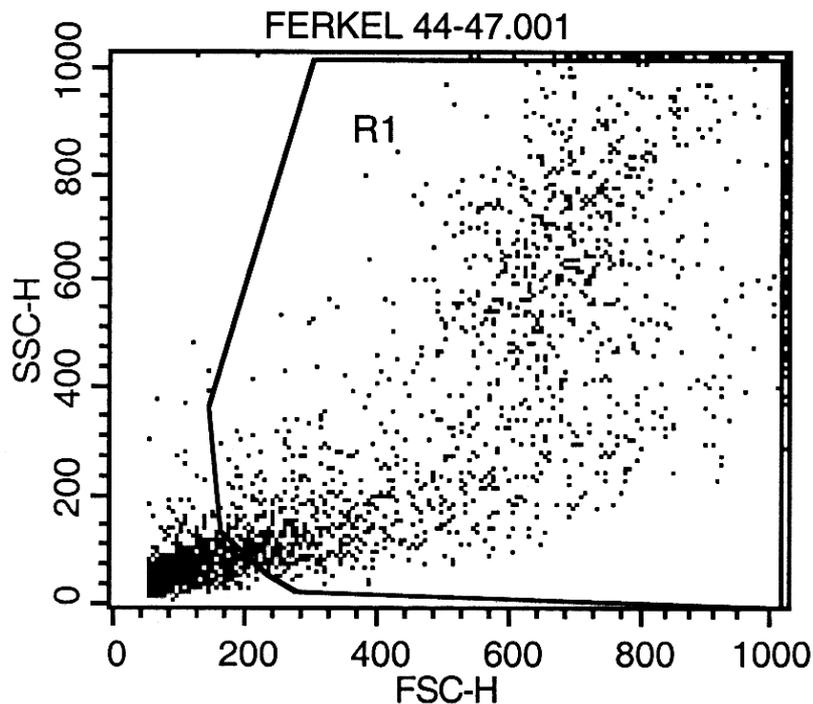
Die Auswertung wurde mit Hilfe des Computerprogramms Cellquest pro<sup>®</sup> vorgenommen und erfolgte für jede Lavagemessung gleichermaßen nach einem voreingestellten Protokoll. Dieses Protokoll beinhaltete gewählte technische Messeinstellungen wie den Schwellenwert, Kompensation und Detektorensensibilitäten.

Der Schwellenwert („threshold“) ist die Grenze, bei deren Überschreitung das Abspeichern der Daten aktiviert wurde. Dadurch konnten die Artefakte durch nicht lysierte Erythrozyten und andere kleine Bestandteile minimiert werden. Die Kompensation der Daten korrigierte die Überlappung der Fluoreszenzen (Abbildung 3)

Bei der Auswertung wurden insgesamt 4 Parameter berücksichtigt:

- Größe
- Granularität
- die Fluoreszenz FITC
- die Fluoreszenz PE-Cy5

Die Parameter Größe und Granularität wurden in einem Streudiagramm dargestellt, wobei die Größe auf der Y-Achse und die Granularität auf der x-Achse aufgetragen wurde. In dieser Darstellung konnte ein Gate R1 mit der „Region of interest“ (RIO)-Technik zur Eingrenzung der wesentlichen Zellen vorgenommen werden, so dass sehr kleine Zellen und tote Zellbestandteile in der unteren linken Ecke aus der Messung ausgeschlossen wurden (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Analyse der Lichtsteuerung von Zellen**

Das damit verknüpfte Streudiagramm der Zweiparameterdarstellung von FITC- und PE-Cy5-Fluoreszenzen stellte folglich nur die Ereignisse aus dem vordefinierten Gate dar. Die Fluoreszenz der dadurch abgegrenzten Zellen konnte zur Unterscheidung der positiv markierten von der nicht markierten Zellen verwendet werden.

In einer Punktwolkendarstellung (Dot-Plot) wurden auf den beiden Achsen jeweils die Messungen der Fluoreszenzintensitäten aufgetragen. Als ein Punkt (dot) wurde jede gemessene Zelle im Schnittpunkt entsprechend ihrer Fluoreszenzintensität aufgetragen. Somit konnten verschiedene Zellpopulationen, die entweder für jeweils einen oder beide Oberflächenmarker ein Signal zeigten, beurteilt werden. Der Farbstoff Fluorescein-isothiocyanat (FITC) wurde als FL1 (gelb) auf der vertikalen Achse und Phycoerythrin-Cyanin-5 (PE-Cy5) als FL3 (rot) auf der horizontalen Achse dargestellt.

Ein Beispieldiagramm einer Messung aus der Ferkelgruppe 44-47 ist nachfolgend abgebildet. Dabei gibt die Quadrantenaufteilung die unterschiedliche Populationenaufteilung wider (Abbildung 5). Der gelb markierter Bereich zeigt die FITC-markierten Zellen (LR = lower right), im roten Bereich befinden sich PE-Cy5 positiven Zellen (UL = upper left) und im orangenen Quadranten (UR = upper right) befinden sich die doppelt positive Population von

Monozyten und Granulozyten. In der Tabelle werden die zugehörigen prozentualen Anteile der Populationen angegeben.

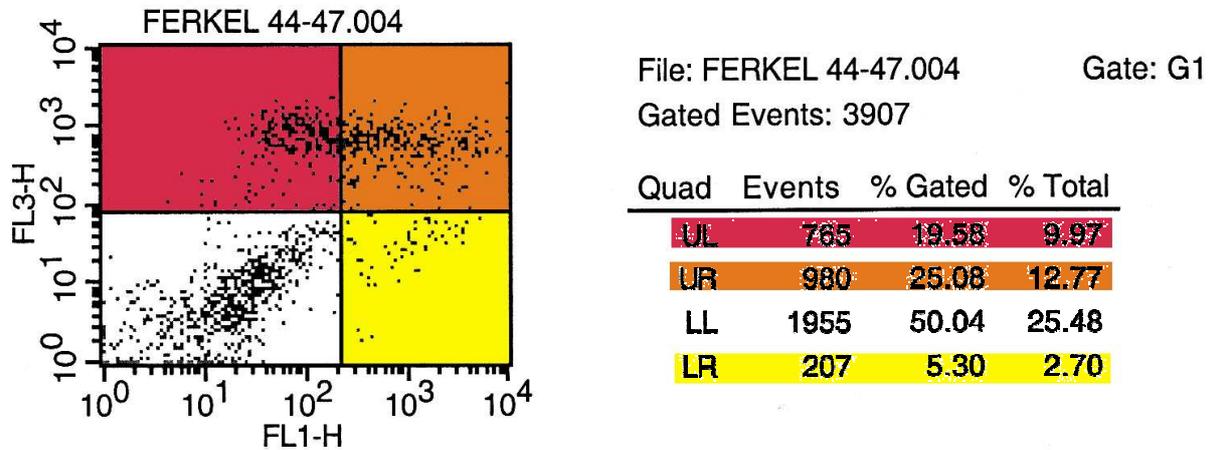


Abbildung 5: Punktwolkendarstellung von markierten Zellen

## 2.10 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Mit der quantitativen Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaktion) wurde die Synthese der Nukleinsäuren der Proteine Amphiregulin, TGF- $\beta$ 1 und Interleukin-6 bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mit dem NucleoSpin RNA II Kit (Machery Nagel Dürer, Deutschland) und 30 mg Lungengewebe in pulverisierter Form.

Die RNA-Isolierung konnte aus 30 mg Lungengewebspulver mit dem NucleoSpin RNA II Kit (Machery Nagel, Düren) automatisch durch den QIA Würfelroboter (Qiagen, Hilden) erfolgen. Das NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Fisher, Waltham, USA) wurde für die RNA-Quantifizierung und Qualitätskontrolle verwendet. 675 ng RNA und 1  $\mu$ l Oligo(dT)<sub>15</sub> Primer (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l, Invitrogen, Karlsruhe) wurden zu 12  $\mu$ l Wasser hinzugefügt. Nach 10 min Inkubation bei 65°C auf einem UNO II Thermocycler (Biometra, Göttingen) wurden zusätzlich fünf Mal 4  $\mu$ l Puffer, 2  $\mu$ l dNTP (10 mM), 1  $\mu$ l RNasin (40 U/ $\mu$ l) und 1  $\mu$ l M-MLV RT (H-) (200 U/ $\mu$ l; alle Substanzen von Promega, Mannheim) hinzugefügt. Im Anschluss erfolgten 2 Inkubationszeiträume von je 90 min bei 40°C und 5 min bei 95°C auf dem UNO II Thermocycler.

Quantitative Echtzeit-PCR: 1  $\mu$ l cDNA wurde als Schablone mit einem 312,5 nM Vorwärtsprimer (Eurofins, Ebersberg), 312,5 nM Rückwärtsprimer (248 nM für Il-6) und

SYBR-Green I Mastermix (Roche Diagnostics, Mannheim) laut Herstellerangaben in einem LightCycler480 (Roche) inkubiert. Cp (crossing point) Werte wurden mittels Maximum-Likelihood-Methode erhoben. Die erweiterte relative Quantifizierung erfolgte ebenfalls mit Hilfe der LightCycler 480 Software 1.5 SP3 (Roche) und wurde anschließend durch die Standardkurven der „Roche Applied Science E-Methode“ korrigiert (Tellmann 2006). Als Referenz wurden die erhobenen Werte dem korrespondierenden Gen von  $\beta$ 2-Mikroglobulin (B2m) gegenübergestellt und auf den Mittelwert der C-Gruppe normiert. Zur Qualitätskontrolle der mitgelaufenen Negativkontrollen wurden die Profile einer Schmelzkurve mit Hilfe der LightCycler 480 Software ausgewertet und eine Produkttrennung auf Agarosegelen durchgeführt.

## 2.11 TUNEL

Die TUNEL-Methode (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling) wurde verwendet um die alveoläre Apoptose semiquantitativ mit einem Kit zu bestimmen (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland). Da der Vorgang der Apoptose unter einem konventionellen Lichtmikroskop nicht beurteilbar ist und erst bei der Fragmentierung der Zelle sichtbar wird, wurden hier die DNA-Bruchstücke in Zellen markiert um die apoptotischen Zellen zu identifizieren. Das zunächst in Paraffin fixierte Lungengewebe wurde unter Flüssigkeitszugabe vom Paraffin befreit und in Zitratpuffer gekocht. Um eine Interaktion mit Proteinen zu vermeiden, wurden die Proben in TrixonX und 3% bovinem Serum Albumin eingeweicht. Dann wurden die Proben eine Stunde mit dem TUNEL-Reagenz bei 37°C in einer Feuchtkammer und danach dreißig Minuten mit Convert-Peroxidase inkubiert. Die Farbreaktion wurde schließlich mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloride (DAB) hervorgerufen. Dann wurden unter dem Lichtmikroskop im Lungenparenchym drei bis sechs Alveolen mit ungestörtem respiratorischen Epithel ausgewertet und so die Anzahl der apoptotischen Zellen pro 200 gezählten Zellen bestimmt.

## 2.12 Surfactant – Oberflächenspannung

Die Lungenlavageflüssigkeit wurde jeweils am Anfang und am Ende des Versuches gesammelt. Durch Zentrifugieren bei 4°C mit 2500 Umdrehungen pro Minute konnte das Surfactant von der Flüssigkeit und Zelldetritus getrennt werden. Dann wurde es gewogen und

auf 10 mg/ml standardisiert und in einzelne Eppendorf-Röhrchen abgefüllt. Es wurden 0,5 ml Surfactant-Lösung in eine Wilhelmy-Waage (E.Biegler, Mauerbach, Australia) mit warmer Kochsalz-Lösung gegeben und die Oberflächenspannung bei maximaler ( $64 \text{ cm}^2$ ) und minimaler ( $12,8 \text{ cm}^2$ ) Oberfläche bestimmt (Krause et al. 2000). Die Oberflächenspannung des Surfactantfilms gibt Hinweise auf die Qualität des Surfactant in der Lunge, so dass die Qualitätsänderung zwischen den Zeitpunkten Baseline und 72 Stunden nach Versuchsbeginn mittels Substitution bestimmt werden konnte.

### 2.13 Statistik

Die erhobenen Daten wurden mittels Varianzanalyse ausgewertet.

Dabei wurden bei der einfaktoriellen Varianzanalyse (one-factorial analysis of variance, ANOVA) die Daten verwendet, welche in allen drei Gruppen zum selben Zeitpunkt erhoben wurden. Die wichtigsten davon waren: die Messwerte der Baseline nach der ersten Lungenschädigung, Anzahl der Zellen und weitere parametrische Daten aus den Laboruntersuchungen. Die Vergleiche zwischen zwei Gruppen erfolgten mit Hilfe eines Dunnett-post-Tests.

Eine Varianzanalyse mit Messwiederholung (two-factorial analysis of variance, two-way ANOVA) erfolgte für die festgelegten Zeitintervalle 1d12h - 1d24h, 2d12h - 2d24h und 3d12h - 3d24h unter Verwendung der beiden unabhängigen Variablen Zeit (Z) und Behandlungsart (B). Darüberhinaus wurden die beiden Variablen auf gegenseitige Abhängigkeit überprüft.

Zur Ergebnisanalyse der Durchflusszytometrie wurde ein Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Vergleichsmessungen von zwei Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-Test durchgeführt.

Alle Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) angegeben. Der Fehler der 1. Art wurde mit  $\alpha = 5\%$  festgelegt, so dass Unterschiede bei  $p < 0,05$  als signifikant bezeichnet wurden. Die Werte wurden auf zwei Stellen hinter dem Komma gerundet angegeben.

Die Analysen wurden mit GraphPad Prism 5.0 für Windows (GraphPad Software, San Diego, USA) ausgewertet und dargestellt.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Versuchsgruppen**

Die Versuche wurden an 27 Tieren durchgeführt, welche nach Randomisierung in 3 Studiengruppen zu je 9 Ferkeln (Kontroll-, Surfactant und Interventionsgruppe) unterteilt wurden. In die statistische Analyse wurden nur Ferkel eingeschlossen, die die komplette Versuchszeitzeit absolvierten und keine wesentlichen klinischen Krankheitszeichen aufwiesen.

In der Kontrollgruppe erreichte ein Tier das Versuchsende nicht. Es zeigte über fünf Stunden vor seinem Tod (52. Stunde) eine globale respiratorische Insuffizienz, Azidose und Hypotonie.

In der Surfactant-Gruppe wurden zwei Tiere ausgeschlossen. Ein Tier erlitt nach LPS-Injektion (48. Stunde) einen Kreislaufstillstand im Rahmen einer akuten Hypoxämie. Das zweite Tier bot initial einen pathologischen Auskultationsbefund mit ubiquitären Rasselgeräuschen und im Verlauf ansteigende Werte für Kreatinin und Kalzium im Serum. Es starb am zweiten Tag an Kreislaufversagen (36 Stunden), nachdem es zunächst eine tachykarde gefolgt von einer bradykarden Phase gezeigt hatte.

In der Interventionsgruppe S+DOPG mussten zwei Tiere aus der Auswertung ausgeschlossen werden. Ein Ferkel zeigte am zweiten Versuchstag anhaltende Diarrhoe, verbunden mit vermehrtem Sedierungsbedarf, niedrigem HI und initialer metabolischer Azidose (30 Stunden). Ein weiteres Ferkel wurde ebenfalls wegen Diarrhoe und Oligurie im Laufe des Versuchs ausgeschlossen.

#### **3.2 Vergleichbarkeit der Behandlungsgruppen**

Die Ferkel wurden in Gruppen von jeweils zwei Tieren nach der ersten Lungenschädigung mit wiederholten Lungenlavagen einer der Behandlungsgruppen per Los zugeordnet. Signifikante Unterschiede in Gewicht, Alter,  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ , Peak (inspiratorischer Spitzendruck), Anzahl der benötigten Lungenlavagen und dem prozentualen Anteil des Verlustes der

Lavageflüssigkeit in den Atemwegen ergaben sich zu Beginn der Studie zwischen den einzelnen Gruppen nicht (Tabelle 2).

	<b>C (n=8)</b>	<b>S (n=7)</b>	<b>S+DOPG (n=7)</b>	<b>p</b>
Alter (d)	4.5±0.2	4.4±0.5	4.2±0.2	.90
Gewicht (kg)	2.5±0.1	2.7±0.1	2.3±0.1	.06
Weibliche Tiere (n)	2	1	1	-
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (mm Hg)	342±33	448±40	394±33	.13
Peak (cm H <sub>2</sub> O)	14.0±0.7	12.5±0.7	12.7±0.5	.26
Lavagen (n)	13.7±0.9	16.4±1.2	15.1±1.8	.39
Flüssigkeitsverlust bei Lavagen (%)	10.9±0.8	9.6±1.1	10.3±1.0	.65

**Tabelle 2: Kompatibilität der Versuchsgruppen vor den Lungenschädigungen**

**Peak = Inspiratorischer Spitzendruck. Mittelwerte ± SEM. Einfaktorielle Varianzanalyse**

Ebenso ergaben sich nach Abschluss der ersten Lungenschädigung mit wiederholten Lavagen über den Trachealtubus keine signifikanten Unterschiede für den Oxygenierungsindex OI, den Ventilationseffizienzindex VEI, den extravaskulären Lungenwasserindex EVLWI, die spezifische Compliance C<sub>rs</sub>, den Atemwegwiderstand R<sub>rs</sub>, den Herzindex CI und den systemischen Gefäßwiderstandsindex SVRI (Tabelle 3).

	<b>C (n=8)</b>	<b>S (n=7)</b>	<b>S+DOPG (n=7)</b>	<b>p</b>
OI (MAP x %O <sub>2</sub> / PaO <sub>2</sub> )	10.4±1.3	9.7±0.8	2.1±1.8	.50
VEI (3800/(Peak-PEEP) x f x PaCO <sub>2</sub> )	0.14±0.01	0.15±0.01	0.12±0.01	.31
EVLWI (mL/kg)	30.5±4.4	32.7±4.8	34.1±3.3	.83
C <sub>rs</sub> (mL/cm H <sub>2</sub> O/kg)	0.33±0.05	0.35±0.05	0.31±0.03	.89
R <sub>rs</sub> (cm H <sub>2</sub> O/mL/s)	86±7	87±11	85±6	.98
CI (L/min/m <sup>2</sup> )	3.6±0.2	3.6±0.2	3.5±0.1	.95
SVRI (dyn*s*cm <sup>-5</sup> /m <sup>2</sup> )	1613±123	1548±104	1630±58	.84

**Tabelle 3: Klinische Parameter nach der ersten Lungenschädigung (Lungenlavage)**

**Mittelwerte ± SEM. Einfaktorielle Varianzanalyse**

Erst im weiteren Verlauf des Versuchs veränderten sich diese Parameter zwischen den Gruppen.

### **3.3 Klinische Parameter**

Zum besseren Vergleich der mittelfristigen (nicht: kurzfristigen) Medikamentenwirkungen nach einer initialen Gabe von Surfactant und wiederholt im Verlauf von 72 Stunden wurden die klinischen Parameter in drei Zeitintervallen von jeweils 12 Stunden (1d12h - 1d24h; 2d12h - 2d24h; 3d12h - 3d24h) zwischen den drei Versuchsgruppen mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung berechnet. Das Analyseintervall war so gewählt, dass nach der Intervention 12 Stunden und nach der intratrachealen Medikamenteninstillation bereits 10 Stunden vergangen waren, so dass der mittelfristige Surfactant-Effekt untersucht werden konnte. Die drei Messintervalle wurden zunächst einzeln zwischen den Gruppen verglichen und anschließend zusammengefasst als 36-Stunden-Messintervall analysiert. Die einzelnen klinischen Parameter stellten sich wie folgt dar:

VEI (Ventilationseffizienzindex):

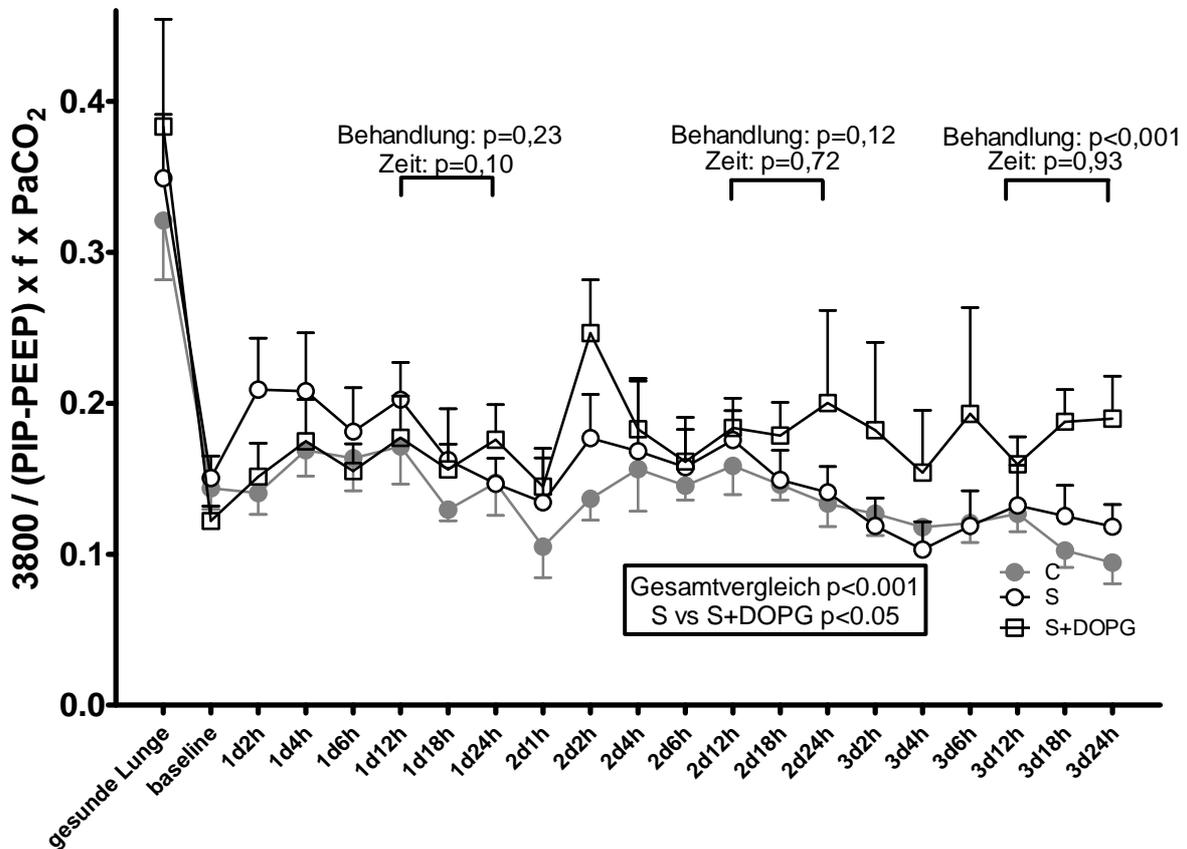


Diagramm 1: Ventilationseffizienzindex

Der Index unterschied sich in den ersten zwei Zeitperioden (1d12h - 1d24h und 2d12h - 2d24h) nicht signifikant zwischen den Gruppen. Im letzten Intervall 3d12h - 3d24h und zusammenfassend über alle Messintervalle war der Ventilationseffizienzindex in der S+DOPG-Gruppe gegenüber der Surfactant-Gruppe signifikant verbessert ( $p < 0,001$ ). Die Variable Zeit war zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Diagramm 1).

OI (Oxygenierungsindex):

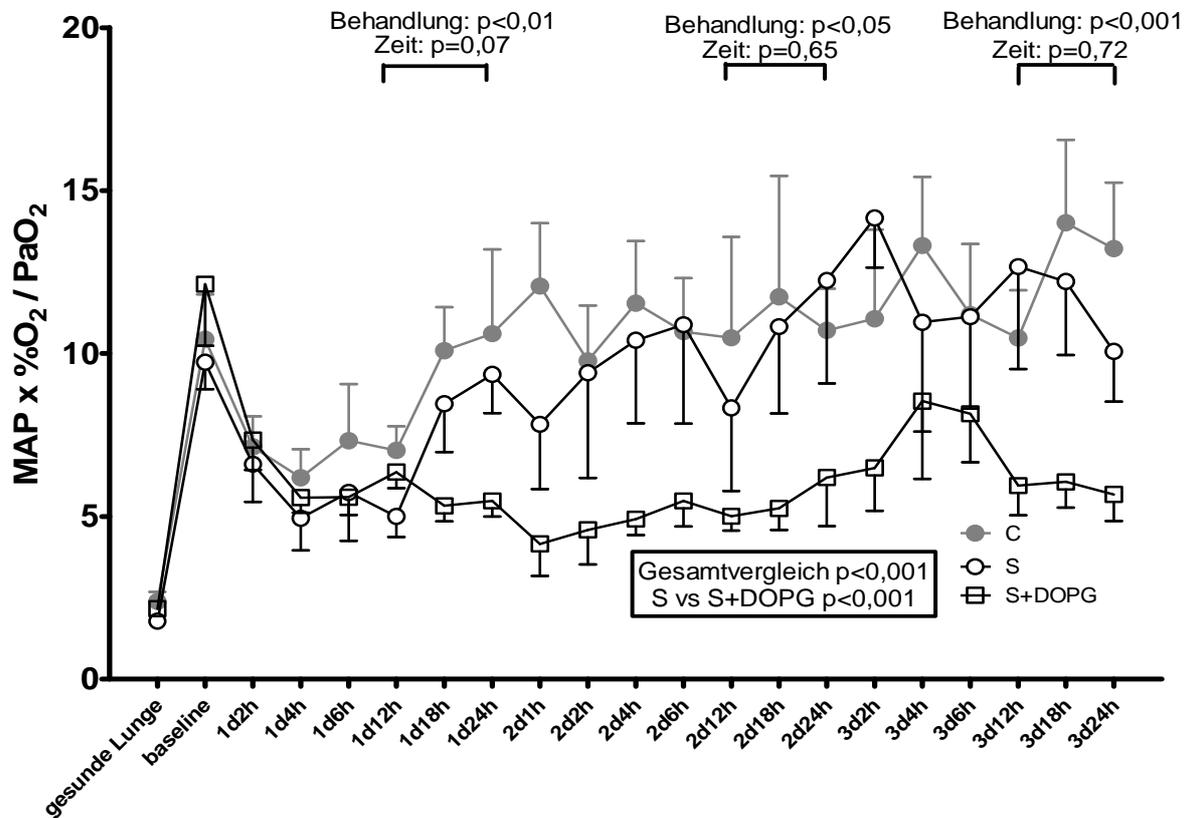


Diagramm 2: Oxygenierungsindex

Der Oxygenierungsindex der S+DOPG-Gruppe war in den ersten beiden Messintervallen (1d12h - 1d24h und 2d12h - 2d24h) signifikant niedriger ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ) und im letzten Intervall 3d12h - 3d24h und zusammenfassend über alle Messintervalle im Vergleich zur Surfactant-Gruppe hochgradig signifikant vermindert ( $p < 0,001$ ) (Diagramm 2).

EVLWI (Extravaskulärer Lungenwasserindex):

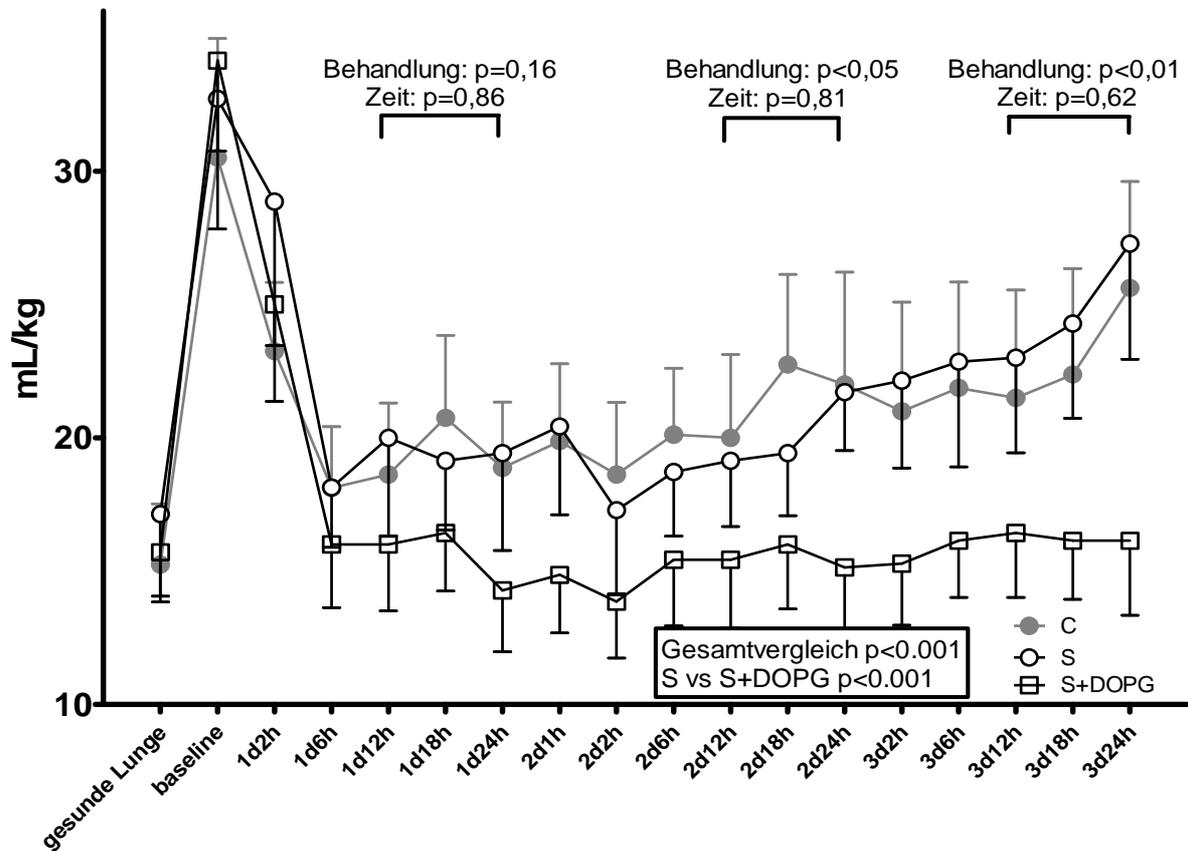


Diagramm 3: Extravaskulärer Lungenwasserindex

In der S+DOPG-Gruppe zeigte sich eine zunehmende signifikante Abnahme des extravaskulären Lungenwassers in den letzten beiden Zeitintervallen (2d12h – 2d24h, 3d12h – 3d24h) mit  $p < 0,05$  und  $p < 0,01$ . Im Vergleich aller Messungen der drei Zeitintervalle zeigte sich eine Signifikanz von  $p < 0,001$  (Diagramm 3).

$C_{rs}$  (dynamische (spezifische) Compliance des respiratorischen Systems):

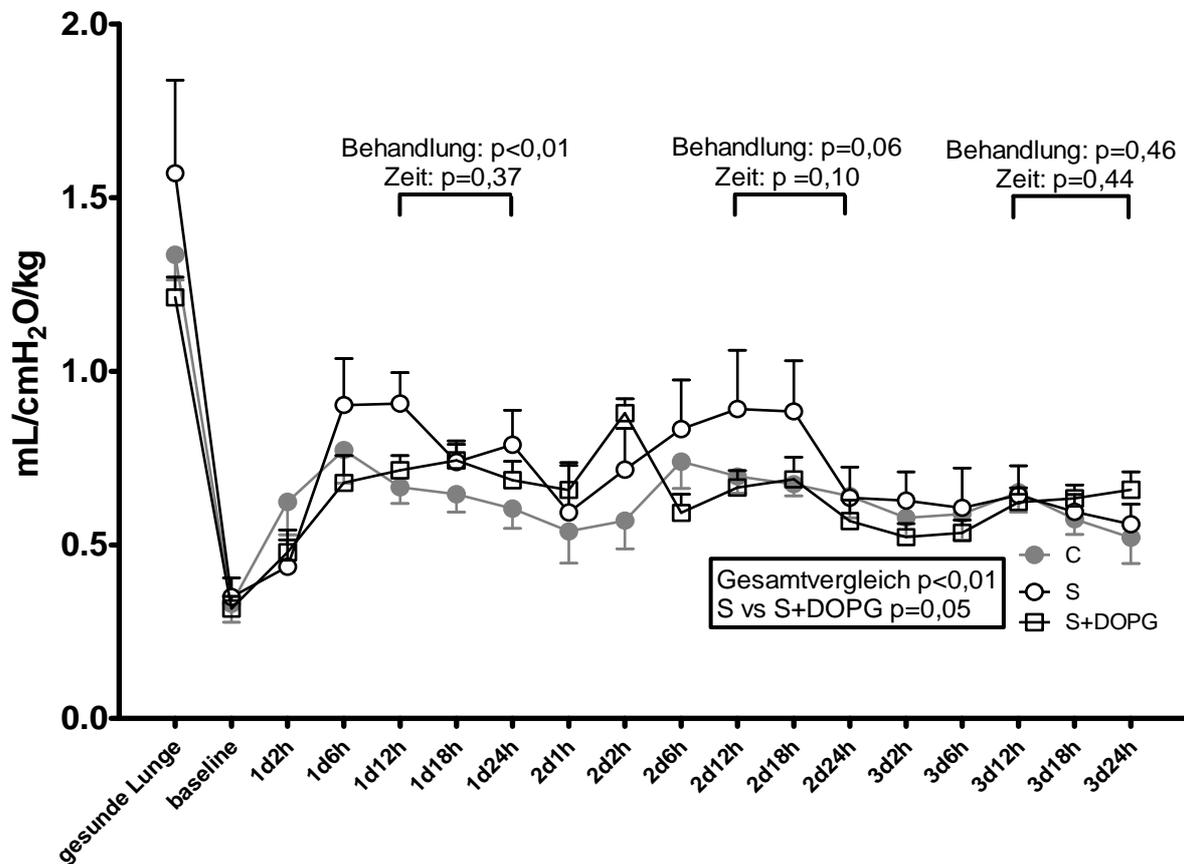


Diagramm 4: Spezifische Compliance des respiratorischen Systems

Bezüglich der Compliance in der S+DOPG-Gruppe war nur im ersten Zeitintervall (1d12h - 1d24h,  $p < 0,01$ ) und in der Gesamtauswertung der drei Messintervalle ( $p < 0,01$ ) eine signifikante Erhöhung gegenüber den anderen Gruppen zu erkennen. Im direkten Vergleich von S+DOPG versus S-Gruppe war  $C_{rs}$  noch grenzwertig signifikant ( $p = 0,05$ ) unterschiedlich (Diagramm 4).

$R_{rs}$  (Resistance des respiratorischen Systems):

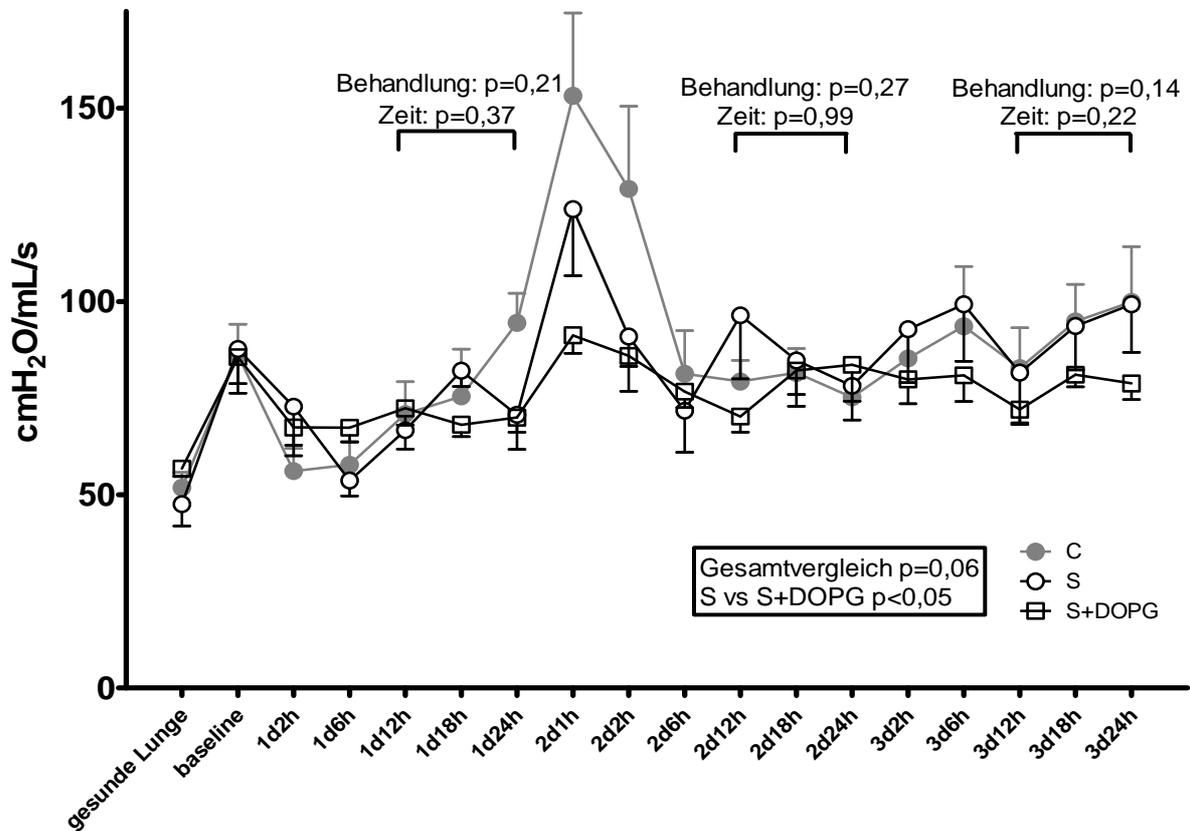


Diagramm 5: Resistance des respiratorischen Systems

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Resistance der Atemwege weder während der einzelnen Zeitabstände noch in der Gesamtauswertung. Lediglich der spezifische Atemwegswiderstand der S+DOPG-Gruppe war signifikant niedriger im Vergleich zur Surfactant-Gruppe ( $p < 0,05$ ) (Diagramm 5).

SVRI (Systemischer Gefäßwiderstandsindex) und CI (Herzindex):

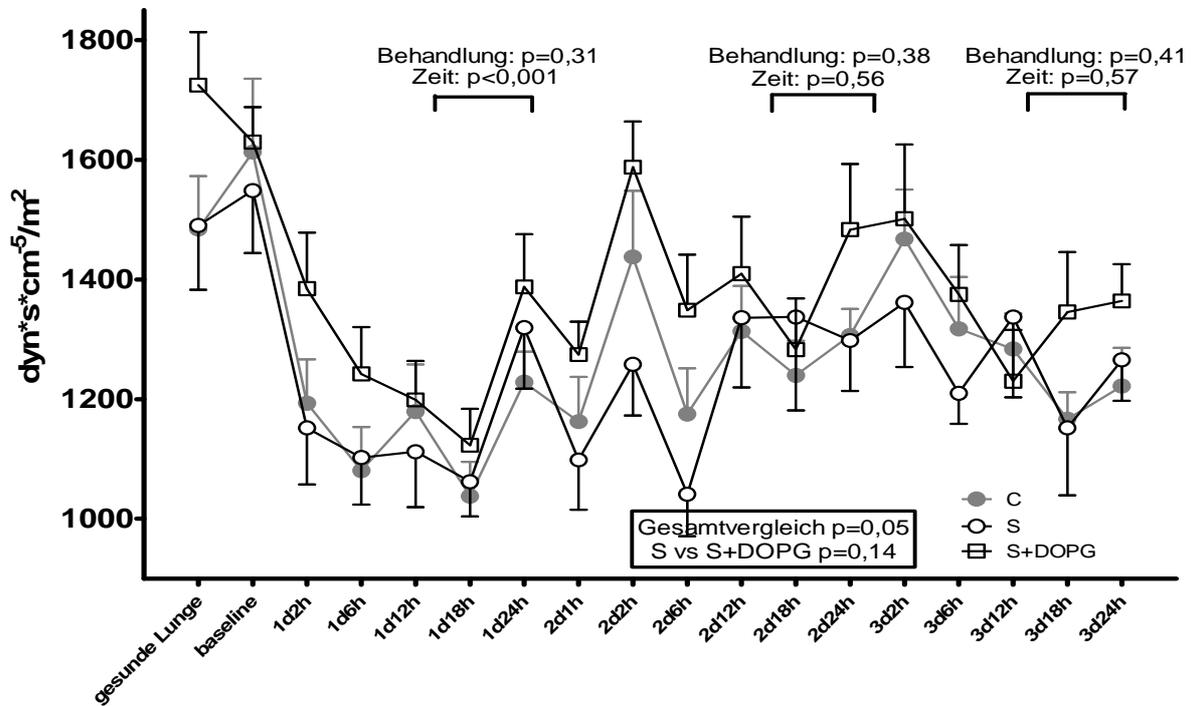


Diagramm 6: Systemischer Gefäßwiderstandsindex

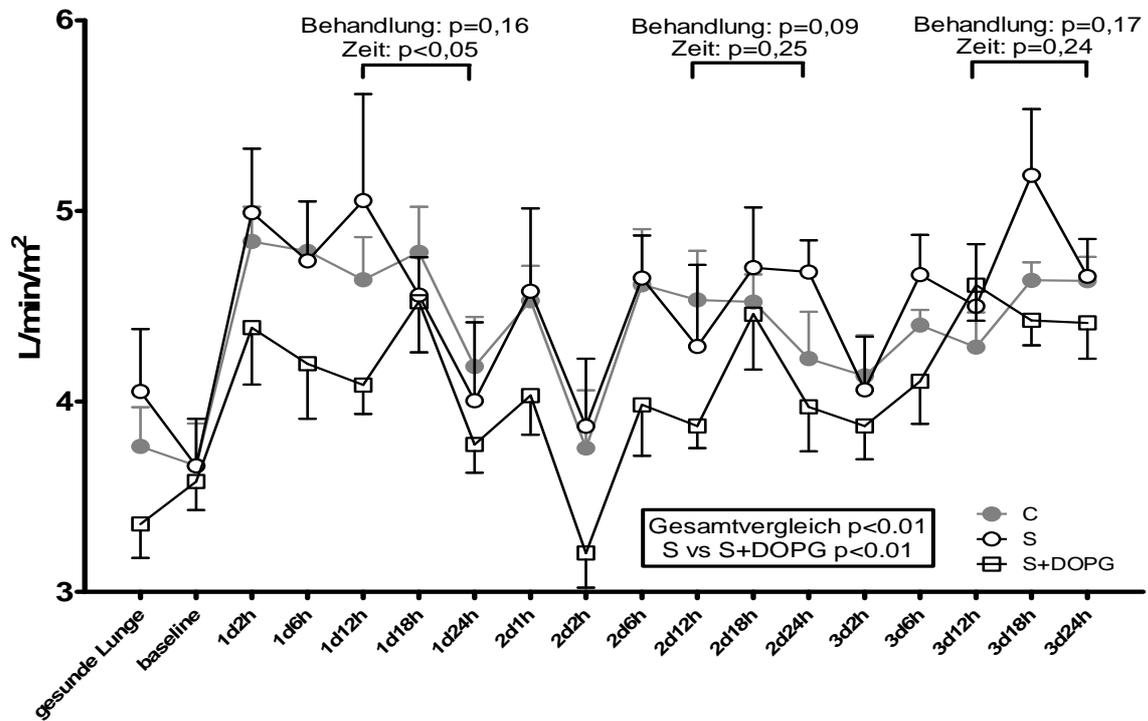


Diagramm 7: Herzindex

Die Tiere der S+DOPG-Gruppe waren mit einem höheren SVRI und niedrigeren CI in den Versuch gestartet. Die Unterschiede nivellierten sich und waren in den betrachteten Zeiträume (1d12h - 1d24h, 2d12h - 2d24h, 3d12h - 3d24h) zwischen den Gruppen im Verlauf nicht mehr signifikant verschieden (Diagramm 6 und 7).

### **3.4 Organfunktionen**

Auffällig war eine signifikante Erhöhung des Kreatinin bei den Tieren der S+DOPG-Gruppe ( $p < 0,05$ ) bei Messungen 48 und 72 Stunden nach Versuchsbeginn im Vergleich zu C- und S-Gruppen. Die Urinausscheidung und Gewichtszunahme während des Versuchs waren jedoch zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich.

Bei der 24 Stunden-Messung war die Kaliumkonzentration im Blut bei der S+DOPG-Gruppe im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen signifikant erhöht, zeigte jedoch weiter keinen Unterschied im Verlauf. Die übrigen Elektrolyte wie Natrium, Kalzium, Chlorid und die Transaminasen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 4).

	<b>C (n=8)</b>	<b>S (n=7)</b>	<b>S+DOPG (n=7)</b>	<b>p</b>
<b>Natrium (mmol/L)</b>				
gesunde Lunge	140±0.5	143±1.2	142±0.7	0.06
24 Std.	140±0.9	138±0.9	139±0.8	0.64
48 Std.	140±0.7	140±0.4	140±0.8	0.98
72 Std.	141±0.4	141±0.8	142±0.8	0.79

<b>Kalium (mmol/L)</b>				
gesunde Lunge	3.2±0.2	3.0±0.3	3.4±0.2	0.48
24 Std.	4.5±0.1	4.9±0.2	5.1±0.1	<0.05
48 Std.	4.3±0.1	4.6±0.1	4.6±0.1	0.09
72 Std.	4.0±0.1	4.0±0.1	4.3±0.1	0.20

<b>Chlorid (mmol/L)</b>				
gesunde Lunge	106±0.7	107±0.6	107±0.8	0.66
24 Std.	105±1.0	104±1.1	105±1.1	0.90
48 Std.	102±1.1	102±0.8	102±0.7	0.91
72 Std.	101±0.7	99±0.9	101±0.7	0.16

<b>Kalzium (mmol/L)</b>				
gesunde Lunge	2.5±0.04	2.6±0.04	2.6±0.03	0.17
24 Std.	2.5±0.04	2.5±0.05	2.6±0.03	0.20
48 Std.	2.6±0.03	2.6±0.03	2.6±0.08	0.60
72 Std.	2.7±0.03	2.6±0.03	2.7±0.04	0.08

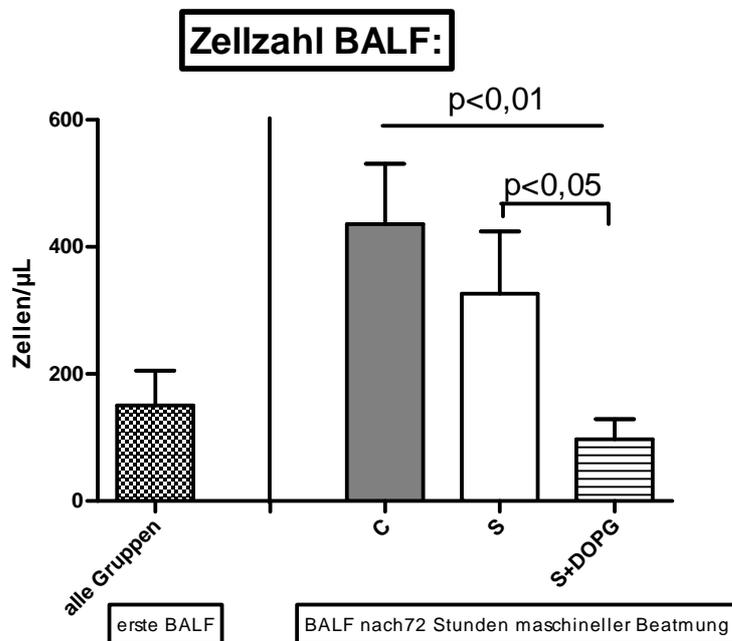
**Tabelle 4: Darstellung von Elektrolyten und Organfunktionsparametern der Leber und Niere (Teil 1)**

	<b>C (n=8)</b>	<b>S (n=7)</b>	<b>S+DOPG (n=7)</b>	<b>p</b>
<b>SGOT (U/L)</b>				
gesunde Lunge	27±1	33±2	29±1	0.11
24 Std.	38±6	53±17	47±9	0.63
48 Std.	33±6	58±24	41±12	0.53
72 Std.	22±4	26±9	20±5	0.83
<b>Kreatinin (µmol/L)</b>				
gesunde Lunge	45±1	50±3	51±2	0.18
24 Std.	49±2	50±3	57±4	0.30
48 Std.	45±1	49±2	59±4	<0.05
72 Std.	40±1	41±2	49±2	<0.05
<b>Urinausscheidung</b>				
(mL/kg/h)	5.7±0.4	4.8±0.5	5.2±0.5	0.43
<b>Gewichtszunahme</b>				
(kg/kg/72 h)	0.32±0.01	0.31±0.01	0.37±0.04	0.51

Tabelle 5: Darstellung von Elektrolyten und Organfunktionsparametern der Leber und Niere (Teil 2)

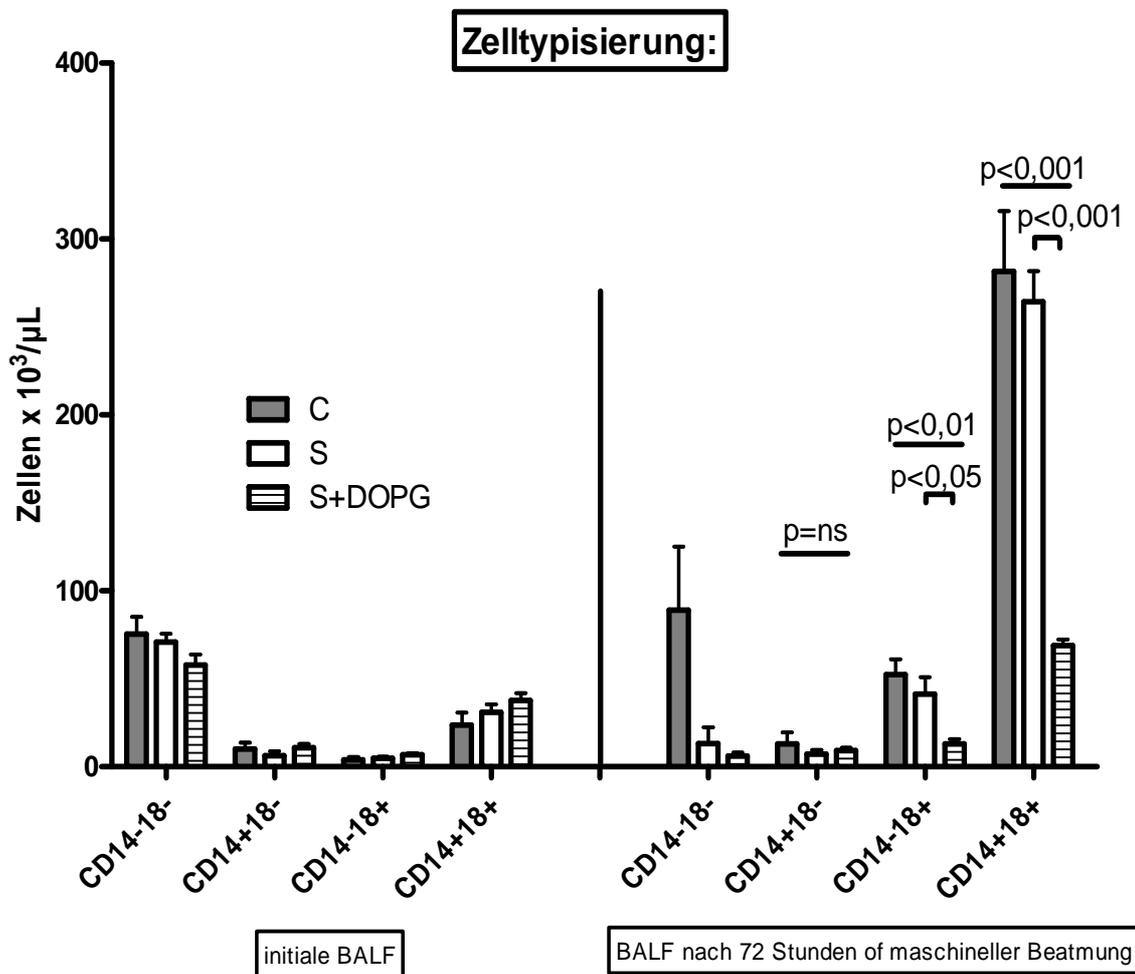
### 3.5 Laborbestimmungen

#### 3.5.1 Zelltypisierung in der BALF



**Diagramm 8: Zellzahl in der bronchoalveolären Lavage**

Die dreifache Lungenschädigung im Versuch hatte einen Anstieg der gesamten Zellzahl in der bronchoalveolären Lavage nach 72 Stunden maschineller Beatmung in der Kontroll- und Surfactant-Gruppe zur Folge. Die Zellzahlen der S+DOPG-Gruppe waren dagegen nach 72 Stunden signifikant niedriger ( $97 \pm 33,58$  Zellen/ $\mu$ l) im Vergleich zu der Kontroll- ( $435,71 \pm 102,63$  Zellen/ $\mu$ l) und Surfactant-Gruppe ( $326 \pm 109,69$  Zellen/ $\mu$ l) mit  $p < 0,01$  (Diagramm 8).



**Diagramm 9: Zelltypisierung**

ns = nicht signifikant

Ein leichter Anstieg des Anteils der CD14<sup>+</sup>18<sup>-</sup>- und CD14<sup>+</sup>18<sup>+</sup>- Zellen war am Ende des Versuches in allen drei Gruppen im Vergleich zur initialen BALF zu verzeichnen. Für die CD14<sup>+</sup>18<sup>-</sup>- Zellen konnte zwischen den drei Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = ns$ ). Im direkten Vergleich der S+DOPG- und S-Gruppe mittels Mann-Whitney-Test sind die CD14<sup>+</sup>18<sup>+</sup>-Zellen in der S+DOPG-Gruppe ( $19,03 \pm 7,04$  Zellen $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) signifikant niedriger als in der S-Gruppe ( $41,21 \pm 10,91$  Zellen $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) mit  $p < 0,05$ . Ebenso war die Anzahl der CD14<sup>+</sup>18<sup>+</sup>-Zellen in der S+DOPG-Gruppe ( $68,83 \pm 3,71$  Zellen $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) im Vergleich zur S-Gruppe ( $264,33 \pm 19,49$  Zellen $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) mit  $p < 0,001$  verringert (Diagramm 9).

### 3.5.2 Entzündungsparameter

Die BALF der drei Gruppen wurden bezüglich der Mediatoren Chitotriosidase und Phospholipase A2 untersucht. Interleukin-6, sSMase und Ceramid wurden im Lungengewebe gemessen.

Die Genexpression von Interleukin-6, TGF- $\beta$ 1 und Amphiregulin zeigten hoch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. In der S+DOPG-Gruppe ( $0,0035 \pm 0,00$ ) war die Genexpression des Interleukin-6 fast 600-mal niedriger im Vergleich zur Surfactant-Gruppe ( $2,04 \pm 0,77$ ) mit  $p < 0,05$  (Diagramm 10). Die Genexpression von TGF- $\beta$ 1 war in der S+DOPG-Gruppe (S+DOPG:  $0,02 \pm 0,00$ ; S:  $0,97 \pm 0,28$ ;  $p < 0,05$ ) fast 50-mal und die von Amphiregulin (S+DOPG:  $0,10 \pm 0,09$ ; S:  $1,56 \pm 2,14$ ;  $p < 0,05$ ) 15-mal niedriger im Vergleich zur S-Gruppe (Diagramme 11 und 12).

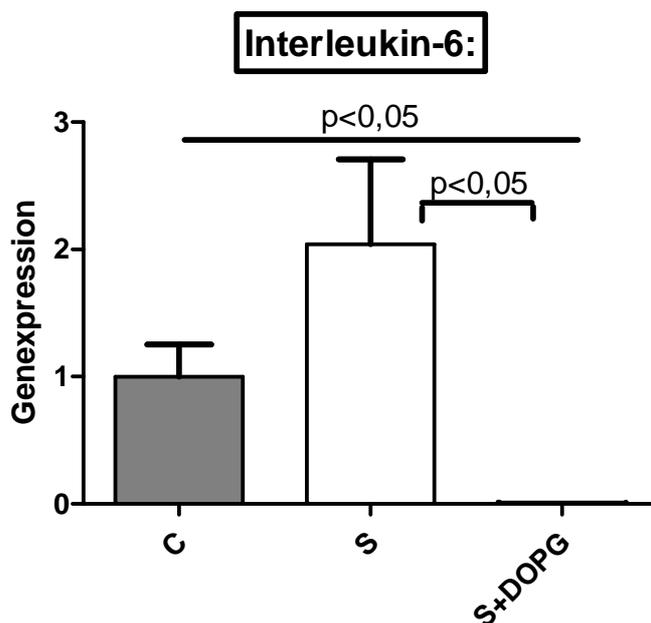


Diagramm 10: Genexpression von Interleukin-6 im Lungengewebe,

Dargestellt ist eine x-fache Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe

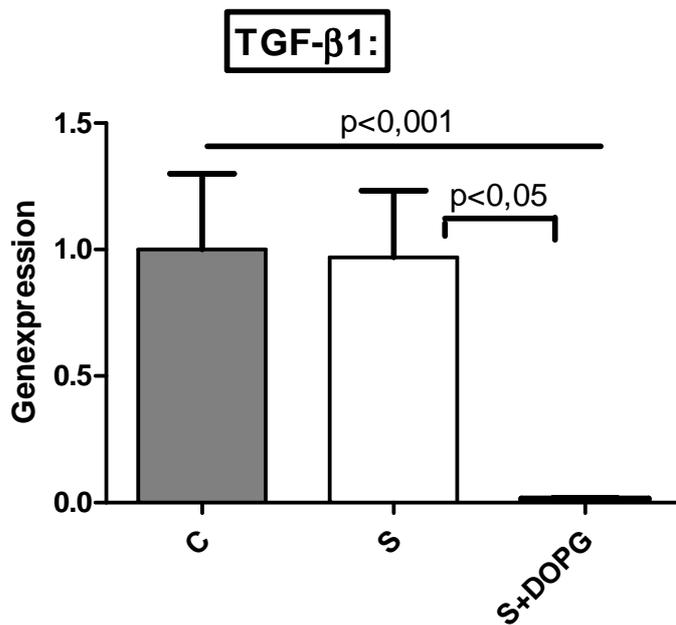


Diagramm 11: Genexpression von TGF- $\beta$ 1 im Lungengewebe

Dargestellt ist eine x-fache Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe

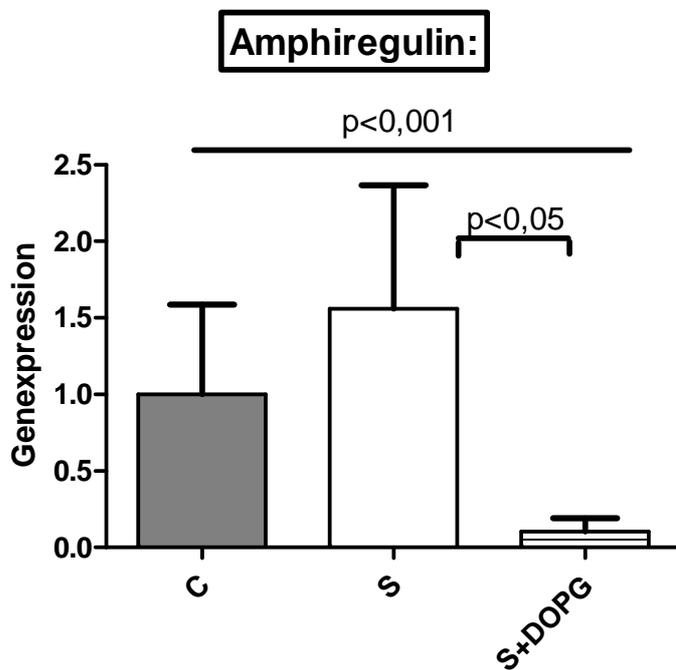


Diagramm 12: Genexpression von Amphiregulin im Lungengewebe,

Dargestellt ist eine x-fache Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die Konzentration der Phospholipase A2 in der BALF war in der S+DOPG-Gruppe ( $0,14 \pm 0,03$  pg/ml) signifikant niedriger im Vergleich zur Surfactant- ( $0,21 \pm 0,04$  pg/ml) und Kontrollgruppe ( $0,35 \pm 0,22$  pg/ml) mit  $p < 0,05$  (Diagramm 13).

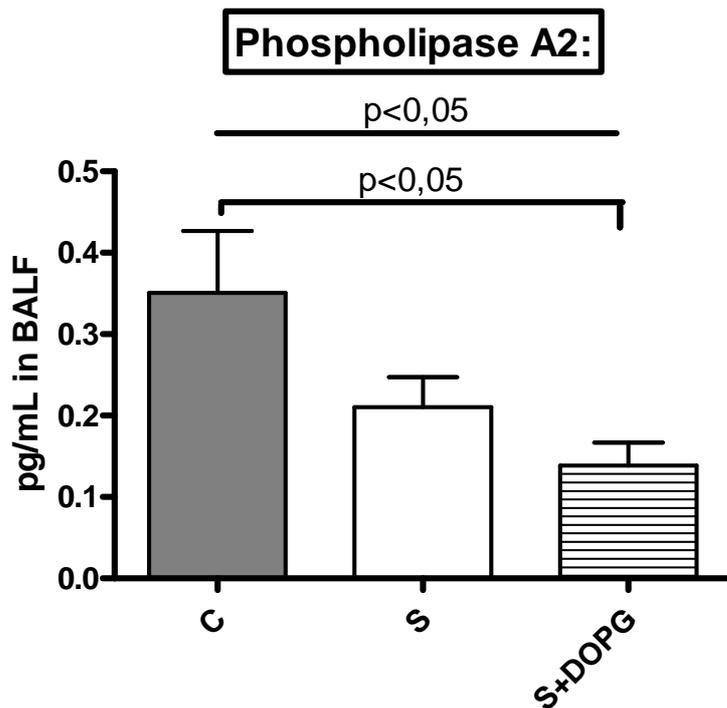


Diagramm 13: Konzentration der Phospholipase A2 im Lungengewebe

Die Chitotriosidase-Aktivität aller drei Gruppen war in der BALF nach 72 Stunden nicht signifikant unterschiedlich (S+DOPG:  $26,08 \pm 6,84$  nMol/ml/h; S:  $21,20 \pm 4,99$  nMol/ml/h; C:  $21,25 \pm 5,23$  nMol/ml/h) (Diagramm 14).

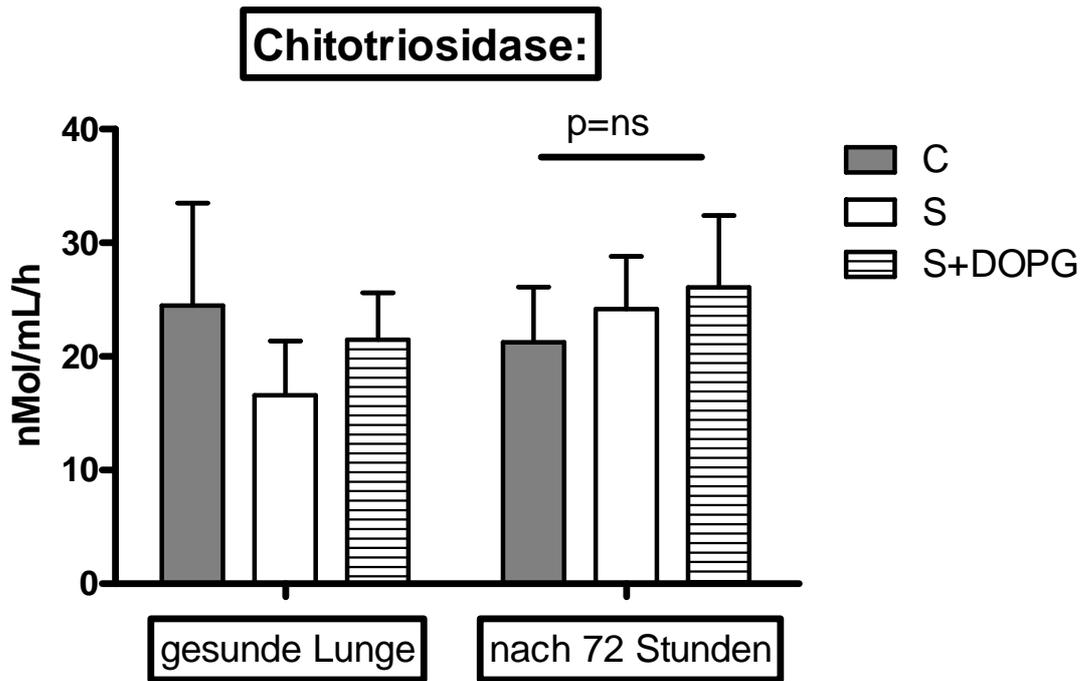


Diagramm 14: Aktivität der Chitotriosidase in der bronchoalveolären Lavage

Die sSMase-Aktivität war bei den beiden Gruppen mit Surfactant-Komponente (S+DOPG:  $2000,50 \pm 119,65$  pmol/mg/h; S:  $1977,36 \pm 73,46$  pmol/mg/h;) gegenüber der Kontrollgruppe (C:  $2647,64 \pm 116,86$  pmol/mg/h) im Lungengewebe signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ). Der Unterschied zwischen der S- und S+DOPG-Gruppe war jedoch nicht signifikant (Diagramm 15)

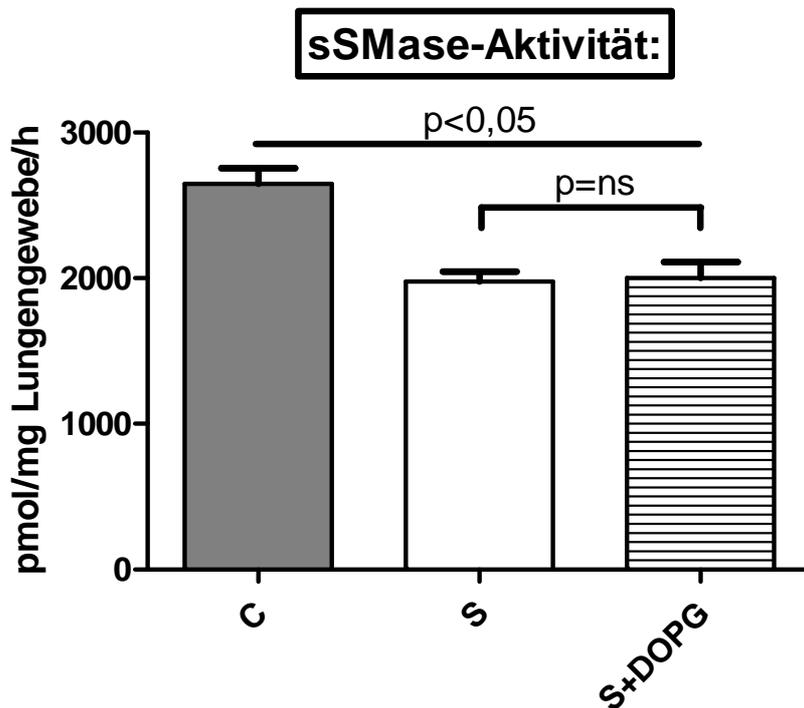


Diagramm 15: Aktivität der sSMase im Lungengewebe

ns = nicht signifikanter Unterschied

Die Gruppenunterschiede der Ceramid-Konzentration zwischen den S+DOPG- ( $2010,70 \pm 216,60$  pmol C16+C18/mg), S- ( $2114,42 \pm 121,15$  pmol C16+C18/mg) und Kontroll-Gruppe ( $2415,12 \pm 168,46$  pmol C16+C18/mg) im Lungengewebe waren nicht signifikant (Diagramm 16).

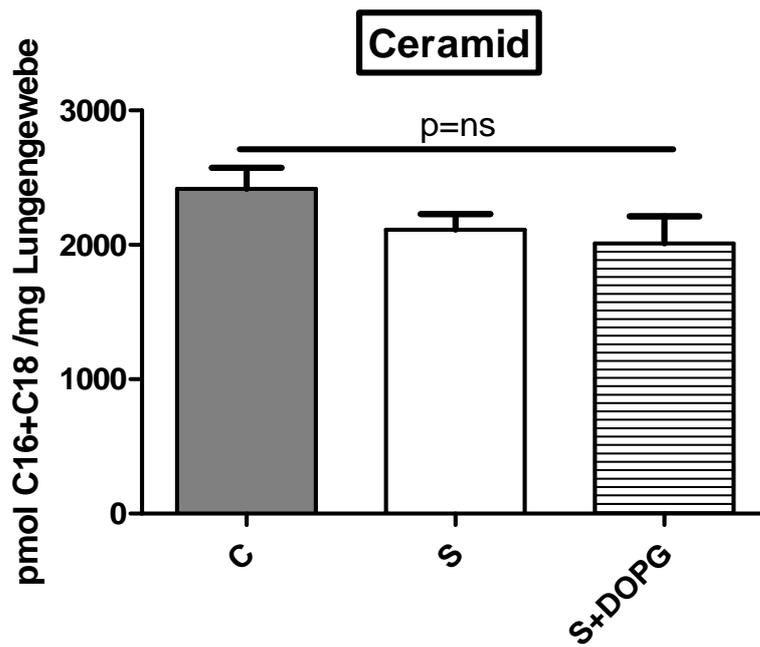


Diagramm 16: Konzentration von Ceramid im Lungengewebe

ns = nicht signifikanter Unterschied

### 3.5.3 Surfactant

Die Oberflächenspannung des Surfactants in der letzten BALF nach 72 Stunden maschineller Beatmung für die S+DOPG-Gruppe ( $27,29 \pm 3,11$  mN/m) unterschied sich nicht signifikant von der Surfactant- ( $32,23 \pm 7,62$  mN/m) und der Kontrollgruppe ( $41,41 \pm 7,34$  mN/m). Die Surfactantkonzentration wurde vor der Messung auf 10 mg/ml standardisiert (Diagramm 17).

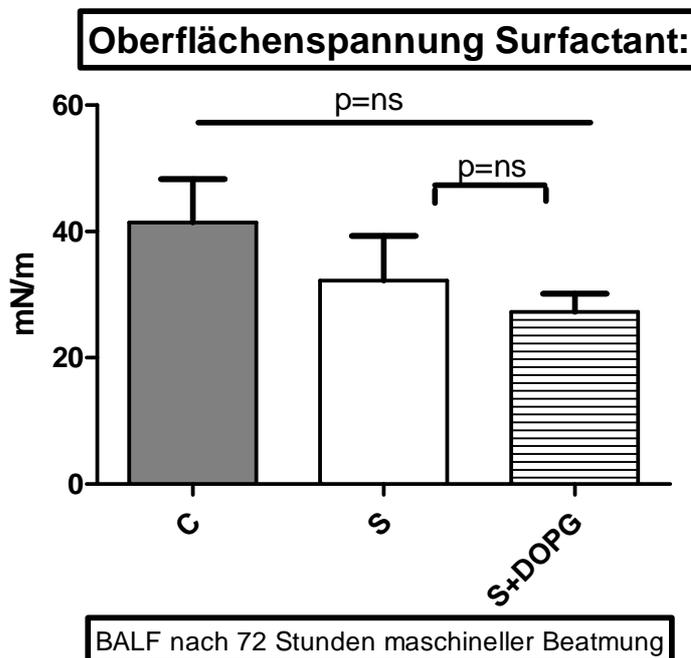


Diagramm 17: Oberflächenspannung des Surfactant

ns = nicht signifikanter Unterschied

### 3.5.4 Apoptose

Weiterhin wurde die Apoptoserate in den Alveolen mit der TUNEL-Technik untersucht. Der Medianwert der alveolären Apoptose war in der S+DOPG-Gruppe (14 apoptotische Zellen) im Vergleich zur S-Gruppe (25 apoptotische Zellen) je 200 epithelialen Alveolarzellen mit  $p < 0,05$  signifikant verringert (Diagramm 18).

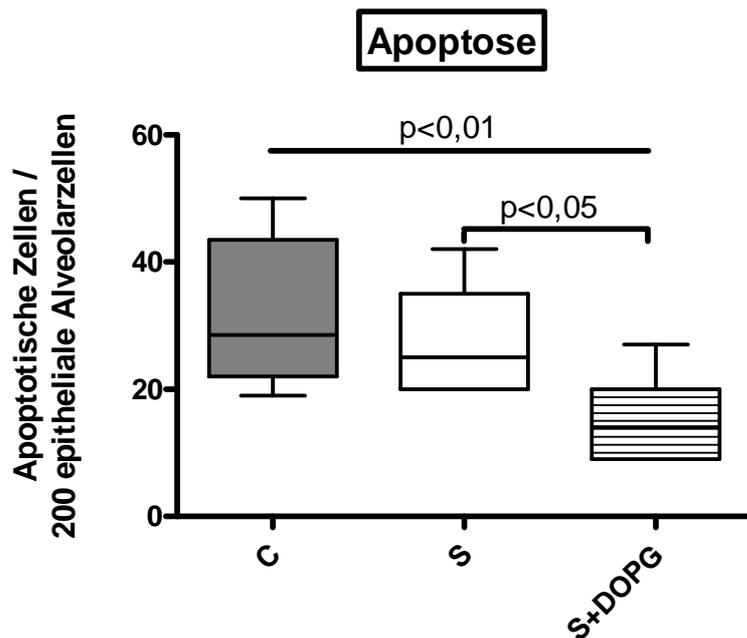


Diagramm 18: Apoptose in den Alveolen

### 3.6 Bakterielle Besiedlung

Bereits bei der ersten diagnostischen Lungenlavage ließ sich bei der Mehrzahl der Tiere eine bakterielle Kolonisation der Atemwege nachweisen. Das Wachstum der Bakterien wurde mit einem Score von

- + vereinzelt nach Anreicherung
- ++ spärlich
- +++ moderat
- ++++ schwer

quantifiziert. In den Kulturen der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von der initialen Lavage war das Wachstum vereinzelt (nach Anreicherung) bis spärlich von Bakterienstämmen aus den Gruppen der Streptokokken, Enterokokken, Staphylokokkus aureus, diverser Staphylokokken, E.coli, Enterobakter, Sporen und anderer Bakterien wie Haemophilus spec. und Gemella morbillorum vorzufinden.

Im Rahmen des Versuchs mit maschineller Beatmung erhielten die Tiere zwei Stunden nach der ersten Intervention und anschließend im Abstand von 12 Stunden eine antibiotische

Prophylaxe mit Ampicillin/Sulbactam 50 mg/kg Körpergewicht zur Prävention von bakterieller Besiedlung der geschädigten Lungen sowie Prophylaxe einer beatmungsassoziierten Pneumonie. In den Kulturen der BALF der post mortem extrahierten Lungen konnte ein spärliches Wachstum von *E. coli* bei vier Tieren in der Kontrollgruppe, bei zwei Tieren in der Surfactant-Gruppe und bei fünf Tieren in der S+DOPG-Gruppe nachgewiesen werden. Ebenso gab es in der Kontrollgruppe ein Versuchstier mit einer schweren Besiedlung mit *Proteus mirabilis* (+++++) und in der S+DOPG-Gruppe ein Ferkel mit mäßigem Wachstum der Lactobacillen (*Leucostionoc spec* (+++)) (Tabelle.5).

Gruppen:		Kontrolle		Surfactant		DOPG	
Stunden im Versuchsverlauf		0h	72h	0h	72h	0h	72h
Bakterien positiv		6 / 8	6 / 8	6 / 7	4 / 7	4 / 7	5 / 7
Bakterienspezies	Streptokokken	3x+	-	1x+	-	1x+	-
	Enterokokken	1x+	-	1x+	-	1x++	-
	<i>E. coli</i>	1x+	4x++	-	1x++, 1x++	1x+	2x+, 3x++
	diverse Staphylokokken	3x+	-	1x+	1x++	1x+, 1x++	-
	<i>Staph. aureus</i>	1x+, 1x++	-	1x+	-	1x++	-
	Enterobacter	-	-	-	2x+	1x++	-
	Sporen	-	-	3x+	1x+	-	-
	andere*	-	5x++, 1x+++++	-	2x+	-	1x++, 1x+++

Tabelle 6: Bakterienbesiedlung der Lunge

Beispiel: 5x++ = fünf Tiere, die ein spärliches Bakterienwachstum aufwiesen

- \* C-Gruppe: *Proteus mirabilis* 1x++, 1x+++++, *Leucostionoc spec.* 2x++, *Pendiococcus pentosaceus* 2x++;  
 S-Gruppe: *Pendiococcus pentosaceus* 1x+, *Sphingomonas paucimobilis* 1x+;  
 S+DOPG-Gruppe: *Pendiococcus pentosaceus* 1x++, *Leucostionoc spec.* 1x+++

## 4. Diskussion

Zu Versuchsbeginn hatten alle Tiere ähnliche äußere Umweltbedingungen und klinische Parameter vorzuweisen, so dass von einer gleichen Ausgangssituation ausgegangen werden kann.

Im Verlauf des Versuches stellten sich allerdings wesentliche Unterschiede zwischen den Gruppen ein. Einige klinische Parameter zeigten signifikante Unterschiede der S+DOPG-Gruppe im Vergleich zur Surfactant- bzw. Kontrollgruppe. Zusammengefasst konnten folgende Verbesserungen der klinischen Parameter Gasaustausch, Lungenödem und Lungenmechanik beobachtet werden.

- Der Oxygenierungsindex war in der S+DOPG Gruppe signifikant verbessert.
- Der Ventilationseffizienzindex war im dritten Zeitintervall und bei den zusammengefassten Zeitintervallen in der S+DOPG-Gruppe signifikant verbessert.
- Der extravaskuläre Lungenwasserindex war in der S+DOPG-Gruppe in Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant niedriger.
- Die spezifische Compliance war in der S+DOPG-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant höher.
- Genexpressionen von Amphiregulin, TGF- $\beta$ 1 und Interleukin-6 waren in der S+DOPG-Gruppe signifikant niedriger.
- Die Konzentration der Phospholipase A2 war signifikant niedriger.
- Die alveoläre Apoptoserate war in der S+DOPG-Gruppe signifikant niedriger.
- Die Zellzahl in der bronchoalveolären Flüssigkeit der S+DOPG-Gruppe war nach 72 Stunden geringer als in den anderen Gruppen.

### 4.1 DOPG

Diioleoylphosphatidylglyzerol ist ein ubiquitär vorkommendes anionisches Lipid der Zellmembran und ein natürlicher Bestandteil des Surfactant (Hawgood und Poulain 2001). Es ist gut zellgängig und hemmt in der Zellkultur von alveolären Makrophagen die Genexpression von Phospholipase A2 Typ IIA und TNF- $\alpha$  (Wu et al. 2003).

DOPG wurde nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft noch nicht in einer Tierstudie verwendet. Es sind lediglich einige Ergebnisse aus Zellkulturstudien mit pulmonalen Makrophagen bekannt. Die meisten der in dieser Studie beobachteten Effekte sind daher als neu in einem translationalen Modell zu bewerten.

## **4.2 Klinische Parameter**

Der Ventilationseffizienzindex verbesserte sich erst am dritten Tag im Zeitintervall (3d12h - 3d24h), nachdem die dritte und letzte Gabe von Surfactant und DOPG erfolgt war. Dies stimmt mit der Zusammenfassung von Halliday überein, die besagt, dass mehrere (bis zu drei) Surfactantgaben effektiver das Überleben bei Frühgeborenen mit ARDS sichern können als Einzelgaben (Halliday 2005). Über alle Zeitintervalle zusammen gesehen ergibt sich ebenso eine signifikante Verbesserung der Ventilation der S+DOPG-Gruppe im Vergleich zur Surfactant-Gruppe.

Bei der Betrachtung des Oxygenierungsindex war dieser in der S+DOPG-Gruppe im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen ( $p < 0,001$ ) als auch im direktem Vergleich mit der Surfactant-Gruppe ( $p < 0,001$ ) signifikant niedriger. Wie Trachsel und Mitarbeiter 2005 gezeigt haben, korreliert ein hoher OI mit einer erhöhten Mortalität ohne Extubation sowie auch längerer Beatmungsdauer bei Kindern mit akutem Lungenversagen (Trachsel et al. 2005). Seeley und Mitarbeiter konnten feststellen, dass erwachsene Patienten mit akutem Lungenversagen, die bereits am ersten Tag einen signifikant erhöhten OI aufwiesen, nicht überlebt haben. Eine Verringerung der Compliance wurde ebenso als eine Variable beschrieben, die mit Tod der Patienten mit akutem Lungenversagen bei mechanischer Ventilation zwischen dem ersten und sechsten Tag assoziiert wird (Seeley et al. 2011). In diesem Versuch war die spezifische Compliance der S+DOPG-Gruppe im Vergleich zu der Surfactant-Gruppe signifikant besser. Somit sind eine Verbesserung der Oxygenierung und der spezifischen Compliance wichtige klinische Parameter bei der Beurteilung der Wirkung von S+DOPG.

Ein erhöhter extravaskulärer Lungenwasserindex entspricht einer Zunahme der kapillaren Permeabilität bei schwerer Inflammation der Lunge. Er setzt sich zusammen aus interstitiellem, intraalveolärem und intrazellulärem Gewebewasser in allen perfundierten

Lungenarealen und stellt ein Maß über die außerhalb der Lungenkapillaren gelegene eingelagerte Flüssigkeit dar. Ein erhöhter EVLW-Index korreliert mit einer erhöhten Letalität und längerer Beatmungsdauer bei pädiatrischen Intensivpatienten mit akutem Lungenversagen (Lubrano et al. 2011). Das Extravaskuläre Lungenwasser in der S+DOPG-Gruppe war hier signifikant niedriger, was als prognostisch günstiger Faktor zu bewerten ist.

### 4.3 Laborergebnisse

Um die Ausprägung der Entzündungsreaktion in den drei Versuchsgruppen einschätzen und miteinander vergleichen zu können, wurden in dieser Studie einige wichtige Entzündungsmediatoren in der bronchoalveolären Flüssigkeit und im Lungengewebe bestimmt. Außerdem wurde mittels einer TUNEL-Untersuchung die alveoläre Apoptoserate gemessen. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die Genexpression von Interleukin-6, Amphiregulin, TGF- $\beta$ 1 und Phospholipase A2 in der S+DOPG-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant verringert waren.

Interleukin-6 ist ein universeller Mediator in der Frühphase einer Entzündungsreaktion. Er wird unter anderem von aktivierten Makrophagen produziert und triggert eine Vielzahl von Entzündungsprozessen, wie zum Beispiel die Synthese von Akute-Phase-Proteinen in der Leber, die Differenzierung von B- und T-Lymphozyten und die Sekretion von Antikörpern (Mosser und Edwards 2008). Es konnte in unserer Studie gezeigt werden, dass die Genexpression von Interleukin-6 speziell im Lungengewebe bei der S+DOPG-Gruppe im Vergleich zur Surfactant-Gruppe geringer war. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass DOPG eine antientzündliche Wirkung besitzt.

Ebenso war die Genexpression der epithelialen Wachstumsfaktoren Amphiregulin und TGF- $\beta$ 1 im Lungengewebe signifikant verringert. Beide Proteine werden im Zusammenhang mit fibrotischen Lungenveränderungen beschrieben.

Das Glykoprotein Amphiregulin wird in Epithelzellen der Lunge exprimiert. Es stimuliert die Fibroblasten (Cruse 2003) und induziert über die Bindung an den EGF-Rezeptor deren Zellproliferation. Dolinay konnte 2006 zeigen, dass eine Überblähung des Lungengewebes und eine LPS-Stimulation der perfundierten Lungen von Mäusen einen signifikanten Anstieg der Genexpression von Amphiregulin bewirkte (Dolinay et al. 2006). Außerdem

wurde eine antiapoptotische Wirkung des Amphiregulins festgestellt (Berasain et al. 2005 und Busser et al. 2009).

TGF- $\beta$ 1 ist ebenfalls an der Pathogenese der Lungenfibrose beteiligt. Es triggert die Proliferation von mesenchymalen Zellen und die Fibrose im entzündeten Gewebe (Fahy et al. 2003). Degryse und Arribillaga konnten in neuesten Studien zeigen, dass eine Inhibition der Signalkaskade des TGF- $\beta$ 1 bei Mäusen, deren Lungenepithel mit Bleomycin geschädigt worden war, eine signifikante Reduktion der Lungenfibrose bewirken konnte (Degryse et al. 2011 und Arribillaga et al. 2011). Ebenso wurden einige antiinflammatorische Eigenschaften des TGF- $\beta$ 1 beobachtet. Es vermindert die Aktivierung von Makrophagen und die Freisetzung von Zytokinen (Mak und Saunders 2006).

Amphiregulin und TGF- $\beta$ 1 können somit als Marker für das Ausmaß der fibrosierenden Prozesse in der Lunge angesehen werden. Ihre niedrige Expression in der S+DOPG-Gruppe dieser Studie kann als ein positives Ergebnis für eine Verringerung der profibrotischen Stimulation in der Lunge interpretiert werden. Dabei wurden möglicherweise – wenn auch durch unsere Ergebnisse nicht nachweisbar – die antiapoptotischen und antiinflammatorischen Effekte vermindert.

Wir konnten feststellen, dass in der S+DOPG-Gruppe die Konzentration der Phospholipase A2 im Vergleich zur Surfactant- und Kontroll-Gruppe signifikant niedriger war. Somit wurden die von Berger beschriebenen Befunde auch in diesem Versuch bestätigt, welche zeigten, dass DOPG die Expression der Phospholipase A2 Typ II, einem Subtyp der Phospholipase A2 und damit auch Teil unserer Messung, im Lysat der alveolären Makrophagen von Mehrschweinchen verringert (Berger et al. 1999).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, können einige Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B sowie Lipopolysaccharide (LPS) die Synthese von Phospholipase A2 hochregulieren. In unserer Studie war infolge der Instillation von LPS die Phospholipase A2 in der Kontrollgruppe und Surfactant-Gruppe höher als in der S+DOPG-Gruppe. Der Grund könnte in einer verminderten Sekretion und Expression von TNF- $\alpha$  in alveolären Makrophagen der S+DOPG-Gruppe liegen, die ebenfalls von Berger und Wu beschrieben wurde (Berger et al. 1999 und Wu et al. 2003).

Unsere Messungen zeigten jedoch keine signifikanten Veränderungen in der Ceramid-Konzentration und sSMase-Aktivität im Lungengewebe nach Behandlung mit S+DOPG. Das Dioleoylphosphatidylglyzerol scheint also seine antiapoptischen Wirkungen durch die Hemmung der Phospholipase A2 und nicht durch Ceramid und sSMase auszuüben.

Ähnlich verhielt sich auch die Chitotriosidase-Aktivität. Sie zeigte in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen nach 72 Stunden, was möglicherweise ein zu kurzes Zeitintervall für entsprechende Veränderungen ist. Surfactant und DOPG beeinflussen offensichtlich dieses Enzym nicht.

Bezüglich der Auswirkungen von LPS auf die Chitotriosidase-Aktivität und -Genexpression, wurde beschrieben, dass diese durch LPS hochreguliert werden kann (Malaguarnera et al. 2005). In unserem Versuch wurden jedoch nur minimale Veränderungen in jeder Gruppe zwischen der initialen Aktivität und der Aktivität am Ende des Versuchs festgestellt. Da die Chitotriosidase hauptsächlich bei Pilzinfektionen und von chronisch aktivierten Makrophagen produziert wird, könnte man schlussfolgern, dass eine Kontamination mit Pilzen in diesem Tierversuch nicht vorhanden (siehe auch mikrobiologische Befunde) oder die Versuchsdauer nicht lang genug war, um chronisch aktivierte Makrophagen hervorzubringen.

Die Apoptoserate gibt das Ausmaß der Schädigung der alveolären Zellen in diesem Tiermodell an. Sie war in der Kontroll- und Surfactant-Gruppe hoch und in der Interventionsgruppe mit S+DOPG signifikant verringert. Die Reduktion der Apoptose durch DOPG ist ein bisher nicht beschriebenes Phänomen. Die Apoptose kann bekanntermaßen auf zwei verschiedenen molekularen Wegen aktiviert werden. In diesem Tiermodell wurde vermutlich hauptsächlich der extrinsische Signalweg, der durch TNF-Rezeptor vermittelt wird, beeinflusst. Wir fanden eine 100fache Reduktion der Interleukin-6-Genexpression, die normalerweise durch Interleukin-1 und TNF in Entzündungsreaktionen hochreguliert wird. Somit ist es möglich, dass auch TNF in diesem Fall durch DOPG herunter reguliert wurde – wie bereits durch Berger 1999 beschrieben – und die alveoläre Apoptose nicht in vollem Maße triggern konnte. Die Apoptoserate war nach der Behandlung mit S+DOPG um ca. 50% niedriger als in der Kontrollgruppe. Die alveoläre Apoptose kann auch für die langfristige Prognose nach ARDS entscheidend sein. Lee hatte einen Zusammenhang zwischen der Apoptose der pulmonalen Epithelzellen und Lungenfibrose in einem transgenen Mausmodell

festgestellt. Dabei war ein fibrotischer Umbau des Lungenparenchyms die Folge von durch TGF- $\beta$ 1 ausgelöster Apoptose (Lee et al. 2004). Die verminderte Apoptoserate in den Alveolen, aber auch eine Reduktion von TGF- $\beta$ 1 und Amphiregulin lassen vermuten, dass durch die Behandlung mit DOPG eine Reduktion der langfristigen Komplikationen einer Lungenfibrose erreicht werden kann.

Die Oberflächenspannung des Surfactantfilms war bei den drei Versuchsgruppen ähnlich. Das bedeutet, dass die Surfactantqualität in der S+DOPG-Gruppe nicht besser oder schlechter als in den Vergleichsgruppen war. Da die Surfactant haltigen BALF-Proben allerdings auf eine einheitliche Surfactantkonzentration von 10 mg/mL standardisiert wurden, kann auf diese Weise ein möglicher Unterschied zwischen den Gruppen ohne Berücksichtigung der Unterschiede im Surfactantpool nicht ausgeschlossen werden.

#### **4.4 Zelltypisierung in der BALF**

Eine BALF wurde am Anfang und am Ende des Versuchs durchgeführt und die Zellzahl sowie die Zelltypisierung bestimmt.

Die Zellzahl in der BALF der S+DOPG-Gruppe war nach 72 Stunden maschineller Beatmung signifikant niedriger als die Zellzahlen der Surfactant- und Kontrollgruppe.

Zusätzlich wurde eine Typisierung der Oberflächenantigene CD 14<sup>+</sup> und CD 18<sup>+</sup> der BALF-Zellen durchgeführt. Der prozentuale Anteil der CD 14-positiven Zellen zeigte keinen Unterschied zu den anderen beiden Versuchsgruppen. Die CD 18<sup>+</sup> und doppelpositiven Zellen waren in der S+DOPG-Gruppe signifikant niedriger im Vergleich zur Surfactant-Gruppe.

Das CD14<sup>+</sup>-Antigen wird vor allem auf Monozyten und Makrophagen exprimiert, wogegen es auf Granulozyten deutlich seltener zu finden ist. CD14<sup>+</sup> ist ein Erkennungsrezeptor für LPS, von welchem es eine lösliche und eine membranständige Form gibt. Bei bakteriellen und nicht bakteriellen Pneumonien ist das lösliche CD14<sup>+</sup> in der BALF und im Serum erhöht. Auch bei pädiatrischen Patienten mit Pneumonie fanden sich erhöhte Werte von membranständigem CD14<sup>+</sup> auf Makrophagen der BALF und Monozyten im peripheren Blut,

wobei Patienten mit zystischer Fibrose, Asthma sowie gesunde Kontrollkinder ohne pulmonale Beeinträchtigungen keine erhöhten Werte aufwiesen (Marcos et al. 2010).

Das CD18<sup>+</sup>-Antigen wird auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert und ist in geringerem Umfang auch auf Makrophagen sowie T- und B-Lymphozyten anzutreffen. CD18<sup>+</sup> als  $\beta_2$ -Integrin hat eine fundamentale Bedeutung bei der Diapedese der Entzündungszellen aus dem kapillaren Endothel und ihre Transmigration ins entzündete Gewebe (Siegenthaler und Blum 2006).

Das Exprimieren dieser Oberflächenantigene auf den Zellen der BALF in unserem Versuch könnte eine Reaktion auf LPS (CD14<sup>+</sup>) und die Einwanderung der Makrophagen und Monozyten via Chemotaxis (CD18<sup>+</sup>) ins entzündete Lungengewebe sein. Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigen, dass in der S+DOPG-Gruppe insgesamt weniger Zellen im Alveolarraum vorhanden waren und der Anteil der CD18<sup>+</sup> verringert war. DOPG scheint also einen supprimierenden Effekt auf die Aktivierung und Migration der Monozyten und Makrophagen zu haben. Das ist ein Effekt, der in der Literatur noch nicht beschrieben wurde.

Monozyten und Makrophagen haben eine wichtige Rolle bei Entstehung und Entwicklung der pulmonalen Erkrankungen einschließlich der Lungenfibrose. Makrophagen können durch T<sub>H</sub>1-Zellen, natürliche Killerzellen, Antigen-präsentierende Zellen und mit Hilfe der Entzündungsmediatoren TNF und IFN- $\gamma$ , aber auch durch die Beseitigung von Zellresten bei Gewebsnekrosen aktiviert werden. Dabei sind Rezeptoren wie TLR (toll-like receptor) und Interleukin-1-Rezeptor beteiligt. Nach der klassischen Aktivierung setzen die Makrophagen IL-1, IL-6 und IL-23 frei. Die Verminderung der Anzahl der Monozyten und Makrophagen hat auch einen weiteren positiven Effekt auf die langfristige Entwicklung des ARDS zur Lungenfibrose. Mosser hat eine Makrophagen-Population beschrieben, sogenannte Wundheilungs-Makrophagen, die durch Stimulation von Interleukin-4 und Interleukin-13 aus Monozyten entstehen können. Diese setzen zwar viel weniger proinflammatorische Zytokine frei, sind aber an der Bildung von extrazellulärer Matrix beteiligt. Nach einer Hemmung dieser Makrophagen-Population konnte eine Reduktion der Fibrosierung der Lungen beobachtet werden. Diese alternativ aktivierten Makrophagen können Chitinase-Enzyme wie zum Beispiel Chitotriosidase freisetzen (Mosser und Edwards 2008). Gerade die mit LPS stimulierte Zellkultur von humanen Makrophagen hatte die höchste Chitotriosidase-

Expression zu verzeichnen (Malaguarnera et al. 2005 und Bargagli et al. 2008). Die Aktivität der Chitotriosidase in unserem Versuch war jedoch in der S+DOPG-Gruppe nicht signifikant verringert. Dies könnte auf eine mangelnde Beeinflussung der Wundheilungs-Makrophagen durch DOPG in den Lungen hinweisen.

#### **4.5 Bakterielle Besiedlung**

In der Kultur der ersten BALF fanden sich leichte bis spärliche Ansammlungen von Bakterienstämmen aus den Gruppen der Streptokokken, Enterokokken, Staphylokokkus aureus, Staphylokokken, E.coli, Enterobakter, Sporen und andere Bakterien wie Haemophilus spec. und Gamella morbillorum. Eine bakterielle Kolonisation der Atemwege bei Schweinen ist typisch, da diese in engem Kontakt mit dem Boden leben und Bodenkeime somit regelmäßig aspiriert werden.

In der letzten BALF bestand die bakterielle Besiedlung der Lungen nach der maschinellen Beatmung im Wesentlichen aus E.coli und in Einzelfällen auch aus anderen Bakterien wie Proteus mirabilis und Lactobacillen. Wir konnten feststellen, dass nur in zwei Fällen Bakterien gewachsen waren, was dann in stärkerer Ausprägung geschah: 1x Proteus mirabilis (++++) in C-Gruppe, 1x Leucostonoc spec. (++++) in S+DOPG-Gruppe. Insgesamt konnten jedoch durch die antibiotische Prophylaxe typische Beatmungs-assoziierte Infektionen der Atemwege mit Streptokokken, Enterokokken und Staphylokokken verhindert werden. Weiterhin gehen wir davon aus, dass durch eine bakterielle Besiedlung der Lungen der Versuchstiere eine zusätzliche Immunreaktion ausgelöst wurde.

#### **4.6 Tiermodell**

Das Modell des neonatalen akuten Lungenversagens (nARDS) sollte eine möglichst Klinik-ähnliche Situation maschinell beatmeter Neugeborener mit hypoxämischem Lungenversagen widerspiegeln. Weit verbreitet ist die Induktion von ARDS durch repetitive Lungenlavagen mit physiologischer Kochsalzlösung – zuerst beschrieben von Lachmann (Lachmann et al. 1980) – die einen Surfactantmangel verursachen und eine erhebliche transpulmonale Migration von Entzündungszellen auslösen.

Bei akutem Lungenversagen durch Inflammation – mit Ausnahme des Atemnotsyndroms bei Frühgeborenen – liegt der Schwerpunkt in einer Surfactantdysfunktion resultierend aus der Schädigung des Epithels und des Endothels, was klinisch einem nicht hydrostatischen Lungenödem entspricht. Weitere Lungen-schädigende Bedingungen waren außerdem die maschinelle Beatmung sowie die bakterielle Besiedlung der Lunge. Somit ist das ARDS in unserem Modell als eine multifaktorielle Schädigung der Lunge einzuordnen und entspricht der Situation beatmungspflichtiger Neugeborener.

Das Beatmungsmanagement der an ARDS erkrankten Patienten beeinflusst das klinische Ergebnis. Es konnte von Brower gezeigt werden, dass mit vermindertem Beatmungsvolumen von 6 ml/kg Körpergewicht (Plateaudruck bis 30 cm H<sub>2</sub>O) im Vergleich zu 12 ml/kg Körpergewicht (Plateaudruck bis 50 cm H<sub>2</sub>O) die Letalität um 22% verringert und die Beatmungsdauer reduziert werden konnte (Brower et al. 2000). Auch konnte Petrucci in einer Metaanalyse zeigen, dass eine Beatmung mit 7 ml/kg Körpergewicht im Vergleich zu 10 bis 15 ml/kg Körpergewicht die Mortalität bei ARDS-Patienten signifikant senken konnte (Petrucci und Iacovelli 2007). Aus diesem Grund wurden in diesem Tiermodell moderate Beatmungsvolumina von 7 ml/kg Körpergewicht und ein PEEP von 6 mbar gewählt. In der Gruppe mit protektiver Beatmung konnten auch bei Mäusen niedrigere Interleukin-6-spiegel gemessen werden, was vermuten lässt, dass hohe Tidalvolumina systemische Entzündungsreaktionen verstärken (Cannizzaro et al. 2011).

Ausnahmsweise kann es in der klinischen Situation allerdings notwendig sein Patienten mit hohen Tidalvolumina zu beatmen, um zum Beispiel die Oxygenierung bei hochgradig kollabierter Lunge zu verbessern. Auch in diesem Tiermodell findet sich eine Episode der Lungenüberblähung von einer Stunde im Rahmen des zweiten Schädigungsprotokolls mit hohen Tidalvolumen (14 ml/kg Körpergewicht) wieder.

Außerdem wurden die Ferkel für eine Stunde mit einem PEEP von 0 mbar und normalem Tidalvolumen beatmet. Hierbei wurde die alveoläre Stabilität getestet. PEEP stabilisiert die Alveolen und verhindert ihr Zusammenfallen in der Expirationsphase, was zu einer Verbesserung des Gasaustausches und der arteriellen Oxygenierung beiträgt. Eine Beatmung ohne PEEP kann zu einer vermehrten Bildung von Atelektasen und einer Abnahme der spezifischen Compliance der Lunge führen, weil die gesunden Lungenabschnitte relativ

überbläht werden. Das sog. „Atelekttrauma“ kann ebenso zur Expression von pro-inflammatorischen Mediatoren führen (LaFollette et al. 2007).

## **4.7 Methodenkritik**

### **4.7.1 Surfactant**

In dieser Studie wurde die Funktion der Surfactant-Proteine nicht berücksichtigt. In Curosurf® sind bedingt durch das Herstellungsverfahren nur die hydrophoben Surfactantproteine B und C enthalten, die ihrerseits die Eigenschaften des Surfactant beeinflussen. Die Surfactant-Proteine B und C können – wie von Brockman und Koautoren vermutet – mit dem DOPG interagieren und zu einer höheren Oberflächendichte der Phospholipid-Monolayer führen (Brockman et al. 2003 und Biswas et al. 2005 und Shanmukh et al. 2005). Die in dieser Studie gemessenen Effekte von DOPG könnten auch zum Teil durch seine Interaktion mit den endogen vorhandenen Surfactantproteinen zustande kommen. Die hydrophilen Surfactantproteine A und D sind bei der Erkennung von bakteriellen Membranen beteiligt (Chiba et al. 2006). Es wurde auch beschrieben, dass SP-A über die NF- $\kappa$ B- und TNF- $\alpha$ -Hemmung die Expression von sPLA2-IIA reduzieren kann. Diese Beobachtungen konnten ebenso auch bei DOPG gemacht werden (Rintala und Nevalainen 1993 und Wu et al. 2003). Es ist zu vermuten, dass sich aus dem Zusammenspiel von Surfactantproteinen und DOPG Synergieeffekte und antiinflammatorische Wirkungsverstärkungen ergeben.

### **4.7.2 Versuchstiere**

In dieser Studie war die Mehrzahl der Versuchstiere männlich. In der Kontrollgruppe waren zwei, in den Surfactant- und S+DOPG-Gruppe jeweils nur ein weibliches Tier eingeschlossen. Diese Anzahl ist auf den ersten Blick eingeschränkt repräsentativ für das Patientenkollektiv der Neugeborenen mit ARDS.

In einigen Studien wurde bei erwachsenen Patienten ein positiver Effekt von Östrogenen auf die Entzündungsreaktion und das Überleben bei Hämorrhagie und Sepsis festgestellt (Knofler et al. 2002 und Diodato et al. 2001). Bei neugeborenen Ferkeln – wie bei Menschen auch – sind jedoch in diesem Alter nur geringe Mengen von körpereigenen Geschlechtshormonen im Kreislauf zu erwarten, weil noch keine pulsatile Freisetzung von LHRH (luteinising hormone

releasing hormone) stattfindet und über LH (luteinising hormone) und FSH (follicle-stimulating hormone) die Gonaden stimulieren kann. Somit ist davon auszugehen, dass das Geschlecht der Tiere in diesem Alter keine größeren Auswirkungen auf die Versuchsergebnisse hat, wenn auch eine gleichmäßige Geschlechtsverteilung für diese translationale Studie angestrebt war.

#### **4.7.3 Dosierung**

Wir verwendeten DOPG in einer Dosierung von 7,5 mg pro Ferkel mit einem Körpergewicht von ungefähr 2,5 Kilogramm, also 3 mg/kg Körpergewicht. Berger und Wu hatte die Makrophagen mit einer endgültigen Konzentration von 20 µg pro Milliliter Zellmedium inkubieren lassen und einen maximalen Effekt auf die Hemmung der PLA2-II nach 20 Stunden beobachten können (Berger et al. 1999 und Wu et al. 2003). Das in die Lunge instillierte DOPG verteilt sich auf eine mehrere Quadratmeter große Oberfläche, so dass die endgültige Konzentration des in Surfactant gelösten DOPG in der alveolären Flüssigkeit kaum abschätzbar ist.

#### **4.7.4 Organfunktion**

Der Anstieg des Kreatinin bei den 48- und 72- Stunden Messungen in der S+DOPG-Gruppe ohne Auftreten einer Oligurie sowie ohne Zunahme des extravaskulären Lungenwasserindex kann auf eine Umverteilung des Körperwassers in andere Kompartimente aus dem Blutplasma hinweisen. Ein toxischer Effekt ist jedoch unwahrscheinlich, da der Kreatininwert in der letzten Messung wieder abgenommen und die Tiere im Versuchsverlauf keine Oli- oder Anurie entwickelt hatten.

## **5. Zusammenfassung und Ausblick**

Das Projekt am neugeborenen Schweinmodell geht der Frage der bestmöglichen Therapie von akutem hypoxämischen Lungenversagen bei Neugeborenen nach.

Das als nARDS (neonatal acute respiratory distress syndrome) bekannte Krankheitsbild ist eine komplexe Funktionsstörung des Gasaustausches und der Lungenmechanik als Folge einer schweren pulmonalen Inflammation, die eine hohe Sterblichkeit aufweist. Die Entzündung ist durch eine immunologische Reaktion gekennzeichnet, bei der u.a. das körpereigene Surfactant der Lunge durch Immunzellen und durch Plasmaproteine abgebaut wird.

Die Therapie des nARDS besteht zum aktuellen Zeitpunkt im Wesentlichen aus einer exogenen Substitution von Surfactant bei unterstützender maschineller Beatmung. Hinzu kommen ergänzende Antibiotikagaben zur Prävention der sekundären Infektionen, NO-Applikation zu den Beatmungsgasen und die Gabe von Prostaglandin I<sub>2</sub>-Analoga.

In diesem Versuch wurde bei maschinell beatmeten neugeborenen Ferkeln durch wiederholte Lungenlavagen mit physiologischer Kochsalzlösung über den Endotrachealtubus ein akutes Lungenversagen induziert. Im Verlauf einer Versuchsreihe von 72 Stunden wurde in Abständen von jeweils 24 Stunden die Lungen der Tiere zusätzlich mit zwei Phasen Lungen-schädigender Beatmung (PEEP von 0 mbar; Atemzugvolumen 15 ml/kg KG) sowie endotrachealer Instillation von Lipopolysacchariden geschädigt. Zwei Stunden nach jeder dieser Schädigungen erfolgte die therapeutische Intervention, wobei drei verschiedene Gruppen nach Randomisierung gebildet wurden. Eine Gruppe wurde mit exogen endotracheal substituiertem Surfactant behandelt, die Interventionsgruppe bekam zur Surfactant-Emulsion zusätzlich das 1,2-Dioleoyl-sn-glyzero-3-phospho-rac-(1-glyzerol) Natrium-Salz (DOPG) zugesetzt und der Kontrollgruppe wurde lediglich ein Luftbolus verabreicht.

Im Verlauf des Versuches wurde der klinische Zustand der Tiere durch Messung der Parameter für Gasaustausch, Kreislauf und Lungenmechanik in zeitlichen Abständen anhand des Versuchsprotokolls dokumentiert.

Die Anreicherung des Surfactant mit DOPG diene dem Ziel einer Verlängerung der Wirkung des exogen substituierten Surfactant. DOPG ist ein natürlicher Bestandteil des Surfactantfilms, der auch im Metabolismus anderer Zellen vorkommt.

In der Behandlungsgruppe mit S+DOPG stellten wir einige signifikante Verbesserungen der Parameter sowohl für den Gasaustausch, das Lungenödem, die Lungenmechanik als auch für die Ausprägung der Entzündungsreaktion fest. Die Oxygenierung, Ventilation, der extravaskuläre Lungenwasserindex und die spezifische Compliance des respiratorischen Systems waren signifikant verbessert. Außerdem waren die Genexpression von Amphiregulin, TGF- $\beta$ 1 und Interleukin-6 sowie die Konzentration von Phospholipase A2 signifikant verringert. Auch die Zellzahl in der bronchoalveolären Lavage und die Apoptoserate in den Lungenalveolen in der mit S+DOPG behandelten Gruppe waren signifikant geringer als in den anderen beiden Gruppen.

Diese Ergebnisse sind klinisch relevant und können möglicherweise auf eine therapeutische Option in der Behandlung des akuten Lungenversages bei Neugeborenen mit S+DOPG hinweisen. Die antientzündlichen Eigenschaften des DOPG und die Verminderung des Surfactant-Abbaus in der Substitutionstherapie könnten zur Verbesserung der Beatmungstherapie bei Neugeborenen mit ARDS beitragen. Jedoch ist eine Erprobung in weiteren Studien nötig, um die hier beschriebenen positiven Effekte zu verifizieren und bestätigen zu können.

## Literaturverzeichnis

Ainsworth, S. B. (2005): Pathophysiology of neonatal respiratory distress syndrome: implications for early treatment strategies. Treat Respir Med, 4, 423-437

Alaoui-El-Azher, M., Wu, Y., Havet, N., Israel, A., Lilienbaum, A., Touqui, L. (2002): Arachidonic acid differentially affects basal and lipopolysaccharide-induced sPLA(2)-IIA expression in alveolar macrophages through NF-kappaB and PPAR-gamma-dependent pathways. Mol Pharmacol, 61, 786-794

Arbibe, L., Vial, D., Rosinski-Chupin, I., Havet, N., Huerre, M., Vargaftig, B. B., Touqui, L. (1997): Endotoxin induces expression of type II phospholipase A2 in macrophages during acute lung injury in guinea pigs: involvement of TNF-alpha in lipopolysaccharide-induced type II phospholipase A2 synthesis. J Immunol, 159, 391-400

Arribillaga, L., Dotor, J., Basagoiti, M., Riezu-Boj, J. I., Borrás-Cuesta, F., Lasarte, J. J., Sarobe, P., Cornet, M. E., Feijoo, E. (2011): Therapeutic effect of a peptide inhibitor of TGF-beta on pulmonary fibrosis. Cytokine, 53, 327-333

Bargagli, E., Maggiorelli, C., Rottoli, P. (2008): Human chitotriosidase: a potential new marker of sarcoidosis severity. Respiration, 76, 234-238

Bargagli, E., Margollicci, M., Luddi, A., Nikiforakis, N., Perari, M. G., Grosso, S., Perrone, A., Rottoli, P. (2007): Chitotriosidase activity in patients with interstitial lung diseases. Respir Med, 101, 2176-2181

Bauer, T. T., Monton, C., Torres, A., Cabello, H., Fillela, X., Maldonado, A., Nicolas, J. M., Zavala, E. (2000): Comparison of systemic cytokine levels in patients with acute respiratory distress syndrome, severe pneumonia, and controls. Thorax, 55, 46-52

Berasain, C., Garcia-Trevijano, E. R., Castillo, J., Erroba, E., Santamaria, M., Lee, D. C., Prieto, J., Avila, M. A. (2005): Novel role for amphiregulin in protection from liver injury. J Biol Chem, 280, 19012-19020

Berger, A., Havet, N., Vial, D., Arbibe, L., Dumarey, C., Watson, M. L., Touqui, L. (1999): Dioleoylphosphatidylglycerol inhibits the expression of type II phospholipase A2 in macrophages. Am J Respir Crit Care Med, 159, 613-618

Biswas, N., Shanmukh, S., Waring, A. J., Walther, F., Wang, Z., Chang, Y., Notter, R. H., Dluhy, R. A. (2005): Structure and properties of phospholipid-peptide monolayers containing monomeric SP-B(1-25) I. Phases and morphology by epifluorescence microscopy. Biophys Chem, 113, 223-232

Bohlin, K., Merchak, A., Spence, K., Patterson, B. W., Hamvas, A. (2003): Endogenous surfactant metabolism in newborn infants with and without respiratory failure. Pediatr Res, 54, 185-191

Brockman, J. M., Wang, Z., Notter, R. H., Dluhy, R. A. (2003): Effect of hydrophobic surfactant proteins SP-B and SP-C on binary phospholipid monolayers: II. Infrared external reflectance-absorption spectroscopy. Biophys J, 84, 326-340

Brower, R. G., Matthay, M. A., Morris, A., Schoenfeld, D., Thompson, B. T., Wheeler, A., Wiedemann, H. P., Arroliga, A. C., Fisher, C. J., Komara, J. J., Perez-Trepichio, P., Parsons, P. E., Wolkin, R., Welsh, C., Fulkerson, W. J., MacIntyre, N., Mallatratt, L., Sebastian, M., McConnell, R., Wilcox, C., Govert, J., Thompson, D., Clemmer, T., Davis, R., Orme, J., Weaver, L., Grissom, C., Eskelson, M., Young, M., Gooder, V., McBride, K., Lawton, C., d'Hulst, J., Peerless, J. R., Smith, C., Brownlee, J., Pluss, W., Kallet, R., Luce, J. M., Gottlieb, J., Elmer, M., Girod, A., Park, P., Daniel, B., Gropper, M., Abraham, E., Piedalue, F., Glodowski, J., Lockrem, J., McIntyre, R., Reid, K., Stevens, C., Kalous, D., Silverman, H. J., Shanholtz, C., Corral, W., Toews, G. B., Arnoldi, D., Bartlett, R. H., Dechert, R., Watts, C., Lanken, P. N., Anderson, H., Finkel, B., Hanson, C. W., Barton, R., Mone, M., Hudson, L. D., Lee, C., Carter, G., Maier, R. V., Steinberg, K. P., Bernard, G., Stroud, M., Swindell, B., Stone, L., Collins, L., Mogan, S., Ancukiewicz, M., Hayden, D., Molay, F., Ringwood, N., Wenzlow, G., Kazeroonian, A. S., Gail, D. B., Bosken, C. H., Randall, P., Waclawiw, M., Spragg, R. G., Boyett, J., Kelley, J., Leeper, K., Secundy, M. G., Slutsky, A., Hyers, T. M., Emerson, S. S., Garcia, J. G. N., Marini, J. J., Pingleton, S. K., Shasby, M. D., Sibbald, W. J., Netwo, A. R. D. S. (2000): Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. New England Journal of Medicine, 342, 1301-1308

Busser, B., Coll, J. L., Hurbin, A. (2009): The increasing role of amphiregulin in non-small cell lung cancer. Pathol Biol (Paris), 57, 511-512

Busser, B., Sancey, L., Josserand, V., Niang, C., Favrot, M. C., Coll, J. L., Hurbin, A. (2010): Amphiregulin promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in non-small-cell lung cancers. Mol Ther, 18, 528-535

Cannizzaro, V., Hantos, Z., Sly, P. D., Zosky, G. R. (2011): Linking lung function and inflammatory responses in ventilator-induced lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 300, L112-120

Chiba, H., Piboonpocanun, S., Mitsuzawa, H., Kuronuma, K., Murphy, R. C., Voelker, D. R. (2006): Pulmonary surfactant proteins and lipids as modulators of inflammation and innate immunity. Respirology, 11 Suppl, S2-6

Cruse, J. M. (2003): Illustrated Dictionary of Immunology, 2<sup>nd</sup> edition, CRC Press, New York, 688, 347

De Luca, D., Minucci, A., Tripodi, D., Piastra, M., Pietrini, D., Zuppi, C., Conti, G., Carnielli, V. P., Capoluongo, E. (2011): Role of distinct phospholipases A2 and their modulators in meconium aspiration syndrome in human neonates. Intensive Care Med, 37, 1158-1165

Degryse, A. L., Tanjore, H., Xu, X. C., Polosukhin, V. V., Jones, B. R., Boomersshine, C. S., Ortiz, C., Sherrill, T. P., McMahon, F. B., Gleaves, L. A., Blackwell, T. S., Lawson, W. E.

(2011): TGF  $\beta$  signaling in lung epithelium regulates bleomycin-induced alveolar injury and fibroblast recruitment. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 300, L887-897

Diodato, M. D., Knoferl, M. W., Schwacha, M. G., Bland, K. I., Chaudry, I. H. (2001): Gender differences in the inflammatory response and survival following haemorrhage and subsequent sepsis. Cytokine, 14, 162-169

Doenecke, D., Koolman, J., Fuchs, G., Gerok, W. (2005): Karlsons Biochemie und Pathobiochemie, 15<sup>th</sup> edition, Georg Thieme Verlag, New York, 803, 566-568

Dolinay, T., Kaminski, N., Felgendreher, M., Kim, H. P., Reynolds, P., Watkins, S. C., Karp, D., Uhlig, S., Choi, A. M. (2006): Gene expression profiling of target genes in ventilator-induced lung injury. Physiol Genomics, 26, 68-75

Durham, S. K., Selig, W. M. (1990): Phospholipase A2-induced pathophysiologic changes in the guinea pig lung. Am J Pathol, 136, 1283-1291

Edelmann, B., Bertsch, U., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Perrotta, C., Jakob, M., Adam-Klages, S., Kabelitz, D., Schutze, S. (2011): Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptosomes. EMBO J, 30, 379-394

Edelson, J. D., Vadas, P., Villar, J., Mullen, J. B., Pruzanski, W. (1991): Acute lung injury induced by phospholipase A2. Structural and functional changes. Am Rev Respir Dis, 143, 1102-1109

Fahy, R. J., Lichtenberger, F., McKeegan, C. B., Nuovo, G. J., Marsh, C. B., Wewers, M. D. (2003): The acute respiratory distress syndrome: a role for transforming growth factor-beta 1. Am J Respir Cell Mol Biol, 28, 499-503

Göggel, R., Winoto-Morbach, S., Vielhaber, G., Imai, Y., Lindner, K., Brade, L., Brade, H., Ehlers, S., Slutsky, A. S., Schutze, S., Gulbins, E., Uhlig, S. (2004): PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide. Nat Med, 10, 155-160

Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., Bayoumy, S., Garzotto, M., McLoughlin, M., Gallily, R., Edwards, C. K., Schuchman, E. H., Fuks, Z., Kolesnick, R. (1997): Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. J Exp Med, 186, 1831-1841

Halliday, H. L. (2005): History of surfactant from 1980. Biol Neonate, 87, 317-322

Hardie, W. D., Davidson, C., Ikegami, M., Leikauf, G. D., Le Cras, T. D., Prestridge, A., Whitsett, J. A., Korfhagen, T. R. (2008): EGF receptor tyrosine kinase inhibitors diminish transforming growth factor-alpha-induced pulmonary fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 294, L1217-1225

Hardie, W. D., Korfhagen, T. R., Sartor, M. A., Prestridge, A., Medvedovic, M., Le Cras, T. D., Ikegami, M., Wesselkamper, S. C., Davidson, C., Dietsch, M., Nichols, W., Whitsett, J.

- A., Leikauf, G. D. (2007): Genomic profile of matrix and vasculature remodeling in TGF- $\alpha$  induced pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol, 37, 309-321
- Hawgood, S., Poulain, F. R. (2001): The pulmonary collectins and surfactant metabolism. Annu Rev Physiol, 63, 495-519
- Heinrich, M., Neumeyer, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A., Schutze, S. (2004): Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. Cell Death Differ, 11, 550-563
- Herr, I., Wilhelm, D., Bohler, T., Angel, P., Debatin, K. M. (1997): Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. EMBO J, 16, 6200-6208
- Herridge, M. S., Cheung, A. M., Tansey, C. M., Matte-Martyn, A., Diaz-Granados, N., Al-Saidi, F., Cooper, A. B., Guest, C. B., Mazer, C. D., Mehta, S., Stewart, T. E., Barr, A., Cook, D., Slutsky, A. S. (2003): One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med, 348, 683-693
- Hidi, R., Vial, D., Havet, N., Berger, A., Vargaftig, B. B., Touqui, L. (1997): Inhibition by pulmonary surfactant Curosurf of secretory phospholipase A2 expression in guinea-pig alveolar macrophages. Biochem Pharmacol, 54, 1055-1058
- Hurbin, A., Coll, J. L., Dubrez-Daloz, L., Mari, B., Auberger, P., Brambilla, C., Favrot, M. C. (2005): Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells. J Biol Chem, 280, 19757-19767
- Hurbin, A., Dubrez, L., Coll, J. L., Favrot, M. C. (2003): Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. Ann N Y Acad Sci, 1010, 354-357
- Kitsioulis, E., Nakos, G., Lekka, M. E. (2009): Phospholipase A2 subclasses in acute respiratory distress syndrome. Biochim Biophys Acta, 1792, 941-953
- Knoferl, M. W., Angele, M. K., Diodato, M. D., Schwacha, M. G., Ayala, A., Cioffi, W. G., Bland, K. I., Chaudry, I. H. (2002): Female sex hormones regulate macrophage function after trauma-hemorrhage and prevent increased death rate from subsequent sepsis. Ann Surg, 235, 105-112
- Kraemer, R., Fanconi, S., Meister, B., Pfenninger, J. (1985): [Residual lung function changes following adult respiratory distress syndrome (ARDS) in children]. Schweiz Med Wochenschr, 115, 96-99
- Krause, M. F., Orłowska-Volk, M., Hendrik, E. R., Gommers, D., Lachmann, B. (2000): A new simple method of staining exogenous surfactant in experimental research. Eur Respir J, 15, 949-954

- Krause, M. F., Wiemann, T., Reisner, A., Orłowska-Volk, M., Kohler, H., Ankermann, T. (2005): Surfactant reduces extravascular lung water and invasion of polymorphonuclear leukocytes into the lung in a piglet model of airway lavage. *Pulm Pharmacol Ther*, 18, 129-139
- Labadaridis, I., Dimitriou, E., Theodorakis, M., Kafalidis, G., Velegraki, A., Michelakakis, H. (2005): Chitotriosidase in neonates with fungal and bacterial infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 90, F531-532
- Lachmann, B., Robertson, B., Vogel, J. (1980): In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand*, 24, 231-236
- LaFollette, R., Hojnowski, K., Norton, J., DiRocco, J., Carney, D., Nieman, G. (2007): Using pressure-volume curves to set proper PEEP in acute lung injury. *Nurs Crit Care*, 12, 231-241
- Le Cras, T. D., Acciani, T. H., Mushaben, E. M., Kramer, E. L., Pastura, P. A., Hardie, W. D., Korfhagen, T. R., Sivaprasad, U., Ericksen, M., Gibson, A. M., Holtzman, M. J., Whitsett, J. A., Hershey, G. K. (2011): Epithelial EGF receptor signaling mediates airway hyperreactivity and remodeling in a mouse model of chronic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 300, L414-421
- Lee, C. G., Cho, S. J., Kang, M. J., Chapoval, S. P., Lee, P. J., Noble, P. W., Yehualaeshet, T., Lu, B., Flavell, R. A., Milbrandt, J., Homer, R. J., Elias, J. A. (2004): Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1-induced pulmonary fibrosis. *J Exp Med*, 200, 377-389
- Lekka, M., Tokumura, A., Tsuji, H., Hanahan, D. J. (1993): Isolation of a phospholipid inhibitor of platelet activating factor-induced activity from perfused rat liver: identification as phosphatidylglycerol. *Arch Biochem Biophys*, 302, 380-384
- Lotze, A., Mitchell, B. R., Bulas, D. I., Zola, E. M., Shalwitz, R. A., Gunkel, J. H. (1998): Multicenter study of surfactant (beractant) use in the treatment of term infants with severe respiratory failure. Survanta in Term Infants Study Group. *J Pediatr*, 132, 40-47
- Lubrano, R., Cecchetti, C., Elli, M., Tomasello, C., Guido, G., Di Nardo, M., Masciangelo, R., Pasotti, E., Barbieri, M. A., Bellelli, E., Pirozzi, N. (2011): Prognostic value of extravascular lung water index in critically ill children with acute respiratory failure. *Intensive Care Med*, 37, 124-131
- Mak, T. W., Saunders, M. E. (2006): *The Immune Response Basic and Clinical Principles*, 1<sup>st</sup> edition, Elsevier Academic Press, Philadelphia, 1216, 481
- Malaguarnera, L., Musumeci, M., Di Rosa, M., Scuto, A., Musumeci, S. (2005): Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages. *J Clin Lab Anal*, 19, 128-132

- Marcidante, K. J., Kliegman, R. M., Jenson, H. R., Behrman, R. E. (2011): Nelson Essentials of Pediatrics, 6<sup>th</sup> edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, 832, 145-146
- Marcos, V., Latzin, P., Hector, A., Sonanini, S., Hoffmann, F., Lacher, M., Koller, B., Bufler, P., Nicolai, T., Hartl, D., Griese, M. (2010): Expression, regulation and clinical significance of soluble and membrane CD14 receptors in pediatric inflammatory lung diseases. Respir Res, 11, 32
- Martin, T. R. (1999): Lung cytokines and ARDS: Roger S. Mitchell Lecture. Chest, 116, 2S-8S
- Martin, T. R., Hagimoto, N., Nakamura, M., Matute-Bello, G. (2005): Apoptosis and epithelial injury in the lungs. Proc Am Thorac Soc, 2, 214-220
- Mathias, S., Pena, L. A., Kolesnick, R. N. (1998): Signal transduction of stress via ceramide. Biochem J, 335 ( Pt 3), 465-480
- Matute-Bello, G., Frevert, C. W., Martin, T. R. (2008): Animal models of acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 295, L379-399
- Miwa, C., Koyama, S., Watanabe, Y., Tsubochi, H., Endo, S., Nokubi, M., Kawabata, Y. (2010): Pathological findings and pulmonary dysfunction after acute respiratory distress syndrome for 5 years. Intern Med, 49, 1599-1604
- Mosser, D. M., Edwards, J. P. (2008): Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol, 8, 958-969
- Nakamura, M., Matute-Bello, G., Liles, W. C., Hayashi, S., Kajikawa, O., Lin, S. M., Frevert, C. W., Martin, T. R. (2004): Differential response of human lung epithelial cells to fas-induced apoptosis. Am J Pathol, 164, 1949-1958
- Okazaki, T., Bielawska, A., Bell, R. M., Hannun, Y. A. (1990): Role of ceramide as a lipid mediator of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. J Biol Chem, 265, 15823-15831
- Ong, K. C., Ng, A. W., Lee, L. S., Kaw, G., Kwek, S. K., Leow, M. K., Earnest, A. (2005): 1-year pulmonary function and health status in survivors of severe acute respiratory syndrome. Chest, 128, 1393-1400
- Petrucci, N., Iacovelli, W. (2007): Lung protective ventilation strategy for the acute respiratory distress syndrome. Cochrane Database Syst Rev, CD003844
- Reinhardt, D. (2007): Therapie und Behandlung im Kindes- und Jugendalter, 8<sup>th</sup> edition, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2146, 16-20
- Rintala, E. M., Nevalainen, T. J. (1993): Group II phospholipase A2 in sera of febrile patients with microbiologically or clinically documented infections. Clin Infect Dis, 17, 864-870

Rooney, S. A. (1985): The surfactant system and lung phospholipid biochemistry. Am Rev Respir Dis, 131, 439-460

Sack, U., Tárnok, A., Rothe, G. (2006): Zelluläre Diagnostik Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie, Karger, New York, 1111, 34

Schrama, A. J., de Beaufort, A. J., Sukul, Y. R., Jansen, S. M., Poorthuis, B. J., Berger, H. M. (2001): Phospholipase A2 is present in meconium and inhibits the activity of pulmonary surfactant: an in vitro study. Acta Paediatr, 90, 412-416

Seeley, E. J., McAuley, D. F., Eisner, M., Miletin, M., Zhuo, H., Matthay, M., A.Kallet, R. H. (2011): Decreased respiratory system compliance on the sixth day of mechanical ventilation is a predictor of death in patients with established acute lung injury. Respir Res, 12, 52

Seibold, M. A., Donnelly, S., Solon, M., Innes, A., Woodruff, P. G., Boot, R. G., Burchard, E. G., Fahy, J. V. (2008): Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and smoking habit. J Allergy Clin Immunol, 122, 944-950 e943

Shanmukh, S., Biswas, N., Waring, A. J., Walther, F. J., Wang, Z., Chang, Y., Notter, R. H., Dluhy, R. A. (2005): Structure and properties of phospholipid-peptide monolayers containing monomeric SP-B(1-25) II. Peptide conformation by infrared spectroscopy. Biophys Chem, 113, 233-244

Siegenthaler, W., Blum, H. E. (2009): Klinische Pathophysiologie, 9<sup>th</sup> edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1185, 491

Slonim, A. D., Dalton, H. J. (2001): Therapeutic use of a group IIA phospholipase A2 inhibitor in acute respiratory distress syndrome: time is of the essence. Crit Care Med, 29, 902-903

Speer, C. P., Halliday, H. L. (1994): Surfactant therapie in the newborn. Current Paediatrics, 4-9

Tellmann, G. (2006): The E-method: a highly accurate technique for gene-expression analysis. Nat.Meth, 3, published online 21 June 2006 (DOI:10.1038/NMETH894)

Trachsel, D., McCrindle, B. W., Nakagawa, S., Bohn, D. (2005): Oxygenation index predicts outcome in children with acute hypoxemic respiratory failure. Am J Respir Crit Care Med, 172, 206-211

van Eijk, M., van Roomen, C. P., Renkema, G. H., Bussink, A. P., Andrews, L., Blommaart, E. F., Sugar, A., Verhoeven, A. J., Boot, R. G., Aerts, J. M. (2005): Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. Int Immunol, 17, 1505-1512

Wirbelauer, J., Speer, C. P. (2009): The role of surfactant treatment in preterm infants and term newborns with acute respiratory distress syndrome. J Perinatol, 29 Suppl 2, S18-22

Wright, J. R. (1997): Immunomodulatory functions of surfactant. Physiol Rev, 77, 931-962

Wu, Y. Z., Medjane, S., Chabot, S., Kubrusly, F. S., Raw, I., Chignard, M., Touqui, L. (2003): Surfactant protein-A and phosphatidylglycerol suppress type IIA phospholipase A2 synthesis via nuclear factor-kappaB. Am J Respir Crit Care Med, 168, 692-699

Zeidan, Y. H., Hannun, Y. A. (2010): The acid sphingomyelinase/ceramide pathway: biomedical significance and mechanisms of regulation. Curr Mol Med, 10, 454-466

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Krause für die Vergabe dieses interessanten Dissertationsthemas und für die hervorragende zielgerichtete Betreuung während der Versuche und bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich herzlich bei Dr. Stefanie Preuß und meinen Mitdotorandinnen Friede Dayhlove Omam und Sabrina Stadelmann für die gute konstruktive Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre während dieses Projekts.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. S. Adam-Klages und PD Dr. rer. nat. D. Wesch und ihren Teams für die Unterstützung und Hilfestellung im Laboratorium des Institutes für Immunologie, UK S-H Campus Kiel.

Danken möchte ich außerdem Dr. Torge Rieper, Nikola Ann Fösel und Günter-Rudolf Klaws für ihre Unterstützung, wertvolle fachliche Anregungen und konstruktive Kritik während des Schreibprozesses.

Ich bedanke mich vom ganzen Herzen bei meinen Eltern, meiner Schwester Olga Scheiermann und meinem Freund Frank Dietrich, die mir ihre menschliche und fachliche Unterstützung und viel Geduld in dieser Zeit entgegengebracht haben.

## Lebenslauf

**Name:** Julia Scheiermann  
**Geboren am:** 13. Juli 1984  
**Geburtsort:** Wolodarskoje  
**Staatsangehörigkeit:** Deutsch  
**Familienstand:** ledig

### SCHULBILDUNG

**07/ 2005** Erwerb der allgemeinen Hochschulreife  
**07/1999 – 07/2005** Gymnasium Kronwerk, Rendsburg  
**01/1998 -07/1999** Bertolt-Brecht-Realschule, Büdelsdorf  
**10/1996 – 01/1998** Klaus-Groth-Hauptschule, Büdelsdorf  
**09/1990 – 07/1996** Mittlere Schule Nr. 119, Kokschetau

### STUDIUM

**10/2005 – 10/2011** Humanmedizin: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
**08/2009 - 08/2010** Durchführung dieser Studie unter der Leitung von Prof. Dr. Martin Krause, Klinik für allgemeine Pädiatrie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel