

**Der Einfluss eines positiven  
endexpiratorischen Beatmungsdruckes auf  
die Wirkung rekombinanter und  
natürlicher Surfactantpräparate bei  
beatmeten frühgeborenen Kaninchen**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Vorgelegt von Hanfstingl, Tilo  
aus Frankfurt am Main**

**Gießen 2010**

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
Abteilung Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie  
Leiter: Prof. Dr. med. Klaus-Peter Zimmer  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen**

**Gutachter: PD Dr. Dr. med. I. Reiss**

**Gutachter: Prof. Dr. med. A. Günther**

**Tag der Disputation: 10.11.2010**

# Inhalt

<b>I.</b>	<b>Abbildungs- und Grafikverzeichnis.....</b>	<b>5</b>
<b>II.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>III.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>11</b>
1.1	Das Surfactantsystem der Lunge	11
1.2	Das Atemnotsyndrom des Frühgeborenen	13
1.3	Beatmungsstrategien im Rahmen des neonatalen Atemnotsyndroms	16
<b>2.</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>20</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
3.1	Tierversuche	22
3.1.1	Narkose des Muttertieres.....	22
3.1.2	Sectio.....	23
3.1.3	Präparation der Feten .....	23
3.1.4	Beatmung der Feten .....	25
3.1.5	Entnahme der fetalen Lungen.....	25
3.2	Probenaufarbeitung	26
3.2.1	Lungenhistologie.....	26
3.2.2	Semiquantitative RNA-Analyse .....	27
3.2.3	Real-time-PCR .....	28
3.2.4	Quantifizierung von SP aus Lungenhomogenat .....	33
3.2.5	Statistische Datenanalyse .....	34
3.3	Material	35
3.3.1	Chemikalien .....	35
3.3.2	Enzyme und Kits .....	36
3.3.3	Geräte .....	37
3.3.4	Arbeitsmaterial.....	38
3.3.5	Primer.....	41
3.3.6	Sonden.....	41
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>

4.1	Effekt eines natürlichen und eines rekombinanten SF-Präparates auf die endogene Surfactantproduktion unter Beatmung mit verschiedenen PEEP-Niveaus	42
4.2	Effekt eines natürlichen und eines rekombinanten SF-Präparates auf die Lungenstruktur unter Beatmung mit verschiedenen PEEP-Niveaus	44
4.3	Effekt eines natürlichen und eines rekombinanten SF-Präparates auf die Lungenfunktion unter Beatmung mit verschiedenen PEEP-Niveaus	45
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>48</b>
5.1	Effekt eines natürlichen und eines rekombinanten SF-Präparates auf die endogene Surfactantproduktion unter Beatmung mit verschiedenen PEEP-Niveaus	48
5.2	Effekt eines natürlichen und eines rekombinanten SF-Präparates auf die Lungenstruktur unter Beatmung mit verschiedenen PEEP-Niveaus	53
5.3	Effekt eines natürlichen und eines rekombinanten SF-Präparates auf die Lungenfunktion unter Beatmung mit verschiedenen PEEP-Niveaus	54
<b>6.</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>57</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>58</b>
<b>8.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>59</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>60</b>
<b>10.</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>83</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>84</b>

## I. ABBILDUNGS- UND GRAFIKVERZEICHNIS

- Abb. 1 Vereinfachte schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Lungendehnbarkeit und funktioneller Residualkapazität [abgewandelt nach 147]
- Abb. 2: Dynamische Compliance in den verschiedenen Versuchsgruppen nach Beatmung für 30 min
- Abb. 3:  $\Delta P$  in den verschiedenen Versuchsgruppen nach Beatmung für 30 min
- Abb. 4: SP-C mRNA Expression aller Surfactant-Behandlungsgruppen, oberer Lungenlappen
- Abb. 5: SP-C mRNA Expression aller Surfactant-Behandlungsgruppen, unterer Lungenlappen
- Abb. 6: SF-Funktion und Struktur; Lamellarkörperchen [9]
- Abb. 7: Schematische Darstellung des SF-Metabolismus [129]
- 
- Grafik 1: Randomisierung der Kaninchenfeten

## II. TABELLENVERZEICHNIS

Gruppe	n (Kaninchen)
nicht beatmet	3
Kochsalz (ZEEP)	7
Kochsalz (PEEP 0,3)	6
nat SF (ZEEP)	6
nat SF (PEEP 0,3)	11
rSP-C SF (ZEEP)	7
rSP-C SF (PEEP 0,3)	14
gesamt	54

**Tab. 1**

Randomisierung der Kaninchenfeten

- nat SF = natürliches bovines SF-Präparat:  
Alveofact, Boehringer, Ingelheim; 100 mg/kg KG intratracheal
- rSP-C = rekombinantes SF-Präparat:  
Venticute, Altana, Bad Homburg; 100 mg/kg KG intratracheal
- Kochsalz = NaCl 0,9 % Lösung
- PEEP angegeben in kPa; ZEEP = Zero PEEP = 0 kPa

Gruppe	n (Kaninchen)	AZV (ml/kg KG)	C <sub>dyn</sub> (ml/kg KG)	ΔP (PIP-PEEP)
Kochsalz (ZEEP)	7	4,57 ± 3,00	1,55 ± 1,11	3,04 ± 0,21
Kochsalz (PEEP 0,3)	6	7,53 ± 2,05	2,41 ± 1,40	2,46 ± 0,44
nat SF (ZEEP)	6	8,00 ± 0,35	4,24 ± 0,80	1,95 ± 0,36 **
nat SF (PEEP 0,3)	11	7,29 ± 2,02	4,86 ± 1,96 **	1,49 ± 0,75 **/§/†
rSP-C SF (ZEEP)	7	5,49 ± 2,63	2,58 ± 1,75	2,44 ± 0,56
rSP-C SF (PEEP 0,3)	14	8,18 ± 1,16 *	4,45 ± 0,93 **	1,65 ± 0,53 **

**Tab. 2**

Lungenfunktionsvariablen nach 30 min Beatmung

arithmetisches Mittel ± Standardabweichung

- p < 0,02; \*\* p < 0,001 vs. Kochsalz ZEEP
- § p < 0,001 vs. Kochsalz PEEP 0,3
- † p < 0,001 vs. rSP-C PEEP 0,3
- Kochsalz = NaCl 0,9 % Lösung
- PEEP angegeben in kPa; ZEEP = Zero PEEP = 0 kPa

Gruppe	n (Kaninchen)	SP-B/apikal	SP-B/basal	SP-C/apikal	SP-C/basal
Kontrolle (unbeatmet)	3	1,53 ± 0,51	0,92 ± 0,40	1,29 ± 0,29	0,76 ± 0,19
Kochsalz (ZEEP)	3	2,28 ± 0,81	0,95 ± 0,36	1,57 ± 0,39	0,66 ± 0,19
Kochsalz (PEEP 0,3)	2	2,45 ± 1,29	1,54 ± 1,07	2,10 ± 0,34	1,21 ± 0,36
nat SF (ZEEP)	3	2,66 ± 0,88	1,06 ± 0,22	1,51 ± 0,35	0,61 ± 0,08
nat SF (PEEP 0,3)	6	1,58 ± 0,74	0,87 ± 0,45	1,81 ± 0,58	0,97 ± 0,32
rSP-C SF (ZEEP)	2	2,17 ± 0,88	1,07 ± 0,34	1,48 ± 0,29	0,74 ± 0,06
rSP-C SF (PEEP 0,3)	7	2,67 ± 1,72	1,22 ± 0,65	1,79 ± 0,65	0,85 ± 0,24

**Tab. 3**

mRNA Expression von pulmonalem Surfactant Protein

PEEP-beatmete Versuchstiere (0,3 kPa; n=15) im Vergleich zu ZEEP-beatmeten Tieren (n=8)

- arithmetischer Mittelwert ± Standardabweichung,  $2^{\Delta\Delta Ct}$ , normalisiert auf das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Actin
- Kochsalz = NaCl 0,9 % Lösung
- PEEP angegeben in kPa; ZEEP = Zero PEEP = 0 kPa



### III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AF	Atemfrequenz
ANOVA	Analysis of Variance between Groups
AZV	Atemzugvolumen
BSA	bovines Serumalbumin
bidest.	zweifach destilliert
cDNA	copy-DNA
C	Compliance
C <sub>dyn</sub>	dynamische Compliance
CPAP	Continuous Positive Airway Pressure
$\Delta P$	PIP - PEEP
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FRC	funktionelle Residualkapazität
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie
h	Stunde(n)
INSURE	INTubate SURfactant Extubate
IPPV	Intermittend Positive Pressure Ventilation
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kPa	Kilopascal
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
min	Minute(n)
mRNA	messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
nCPAP	binasaler CPAP
NO	Stickstoffmonoxyd

NTC	Non Template Control
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEEP	Positive End-Expiratory Pressure, gemessen in kPa
PIP	Positive Inspiratory Pressure
RDS	Respiratory Distress Syndrome
RNA	Ribonucleinsäure
rSP	rekombinantes surfactantassoziertes Protein
RT	reverse Transkription
rtPCR	real-time PCR
s.	siehe
sec	Sekunde(n)
SF	Surfactant
SP	surfactantassozierte Proteine
SP-A	surfactantassoziertes Protein A
SP-B	surfactantassoziertes Protein B
SP-C	surfactantassoziertes Protein C
SP-D	surfactantassoziertes Protein D
Tab.	Tabelle
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
VALI	Ventilator-associated Lung Injury
vgl.	vergleiche
vs.	versus
ZEEP	ZEEP = Zero PEEP = 0 kPa

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Das Surfactantsystem der Lunge

Die Surface active agents (SURFace ACTIVE AgeNT wurde zum Kunstwort Surf-act-a-nt verkürzt (SF)) reduzieren in der Lunge die Oberflächenspannung der Alveolen. Sie erleichtern somit die Ausdehnung der Lunge in der Inspiration und verhindern den Kollaps der Alveolen vor allem in der Endexpiration. Die Existenz des Surfactant wurde erstmals 1929 von von Neergaard postuliert [4]. Klaus et al. konnten 1961 seine spannungsreduzierende Funktion und hier insbesondere die des Phospholipidanteils nachweisen [5]. SF wird von Typ-II-Pneumozyten und in kleinerer Menge von Clara-Zellen gebildet und in das Lumen der Alveolen sezerniert [1]. Der SF-Film unterliegt einem gut regulierten Gleichgewicht aus Neuproduktion und Recycling, das als „balancierte Clearance“, bzw. „SF-Homöostase“ bezeichnet wird [22; 23; 24; 25; 26; 27; 28].

In den Jahren nach der Entdeckung des SF-Systems wurde die wichtige Rolle der surfactantassoziierten Proteine (SP) bei der Verminderung der Oberflächenspannung erkannt [6]. Hierbei reduzieren vor allem die hydrophoben SP-B und -C die Oberflächenspannung an der Luft-Wasser-Interphase der Alveole auf ein Zehntel des Wertes, der sich für eine wässrige Oberfläche ergeben würde. SP-B ist, zusammen mit dem hydrophilen SP-A, essentieller Faktor bei der Ausbildung des tubulären Myelins [6; 47; 48]. Es assoziiert nach der Freisetzung aus den Lamellar-Körperchen und Sekretion in das alveoläre Lumen mit dem Phospholipidfilm der Alveolen. Hier reguliert es, in Interaktion mit SP-A, die Adsorption von oberflächenaktiven Peptiden während der Inspiration [34; 35], sowie, in Interaktion mit SP-C, die selektive Extraktion von nicht-oberflächenaktiven Lipiden aus dem SF-Film in der Expiration [36; 37; 38; 39; 40]. SP-B ist darüber hinaus beteiligt bei der Wiederaufnahme von SF durch Typ-II-Pneumozyten und bei der Verbindung und Fusion von Membranen. Es schützt den SF-Film vor der Deaktivierung durch Serum-Proteine [30; 41; 42; 43; 44; 45; 46]. SP-B ist für die postnatale Anpassung der Lunge von vitaler Bedeutung [50].

SP-C hat zusammen mit SP-B regulierende Funktion in der Surfactanthomöostase (s. o.). Ebenso wie für SP-B konnte auch für SP-C eine protektive Potenz gegenüber der SF-inaktivierenden Wirkung von Serum-Proteinen gezeigt werden [51]. Weitere Studien lassen den Schluss zu, dass SP-C über eine Interaktion mit CD-14-Rezeptoren von Alveolar- und

Peritonealmakrophagen die Lipopolysaccharid-induzierte Produktion von TNF- $\alpha$ , sowie von NO hemmen und somit einen direkten Effekt auf die Inflammationskaskade haben kann [98].

Die Bedeutung der SP lässt sich an den schweren akuten und chronischen Lungenerkrankungen von Neu- und Frühgeborenen ablesen, die aus Mutationen oder Deletionen in den SF-Genen resultieren [130].

Die Bedeutung von SP-B für die postnatale Anpassung der Lunge zeigt sich z. B. an den Konsequenzen des absoluten SP-B Mangels: Durch eine Mutation im SP-B-Gen wird bei der kongenitalen alveolaren Proteinose das aberrante SP-B-Gen zwar transkribiert, die entstehende mRNA ist jedoch so instabil, dass sie zu bis zu 92 % vor der effektiven Translation abgebaut wird [50]. Da die intrazelluläre Prozessierung von Pro-SP-C zu SP-C ein SP-B-abhängiger Prozess ist, manifestiert sich der totale SP-B Mangel zusätzlich mit einer verringerten Konzentration von maturem SP-C, sowie in einer Anhäufung von aberranten Pro-SP-C-Formen im Alveolarraum [52; 53; 117; 118].

Die klinische Folge ist eine auch durch Zugabe von exogenem SF heute noch nicht therapierbare respiratorische Erkrankung, deren radiologischer Befund dem des Atemnotsyndrom des Frühgeborenen, dem „Respiratory Distress Syndrome“ (RDS) ähnelt.

Nogee et al. konnten zeigen, dass eine „splice-site-Mutation“ im SP-C-Gen zu chronisch interstitieller Lungenerkrankung führt [53], was einen Zusammenhang zwischen SP-C-Defizienz und eher chronischen als akuten Lungenerkrankungen nahe legt. Beim Menschen führen Aberrationen im SP-C-Gen, wie im Mausmodell, zu interstitieller Lungenerkrankung, bzw. zur Produktion eines abnormen SP-C [52]. Dabei entsprechen die histologischen Befunde beim Menschen mit interstitieller Fibrose denen im Mausmodell: Verlust von alveolärer Oberfläche, vermehrte Rundzellinfiltrate und vaskuläres Remodeling [52; 150; 151].

## 1.2 Das Atemnotsyndrom des Frühgeborenen

Das Atemnotsyndrom des Frühgeborenen ist eine Erkrankung der strukturell und biochemisch unreifen Lunge, die auf dem Boden eines primären SF-Mangels auftritt. Jedoch auch beim Reifgeborenen kann es im Rahmen einer sekundären Inaktivierung von SF, z. B. auf dem Boden einer konnatalen Pneumonie oder i. R. einer Mekoniumaspiration, zu einer schweren respiratorischen Erkrankung kommen, die dem klinischen Bild eines neonatalen RDS ähnelt. Der SF-Mangel im Rahmen des RDS führt zu verschlechterter pulmonaler Compliance und konsekutiv erhöhter Atemarbeit. Die klinischen Folgen sind oft direkt postpartal zu erkennen: Nasenflügeln, Tachypnoe, Einziehungen der Interkostal- und der supraklavikulären Räume, sowie Zyanose. Das Neugeborene muss zur Expansion der „versteiften“ Lunge eine erhöhte Atemarbeit leisten. Es erzeugt mit dem noch labilen, knorpeligen Thorax große negative intrathorakale Kräfte, die die o. g. Einziehungen hervorrufen. Es kommt zur respiratorischen Insuffizienz. Um einen Gegendruck zur Kollapsneigung der Lunge aufzubauen, und eine ausreichende funktionelle Residualkapazität aufrecht zu erhalten, hält das Neugeborene die Stimmbänder im Expirium enggestellt [56]. Weil auf diese Weise vom Organismus selbst ein positiver endexpiratorischer Druck aufrecht erhalten wird, spricht man von „Auto-PEEP“. Bei der Inspektion des Neugeborenen treten hierbei expiratorisches „Stöhnen“ oder das sog. „Knorksen“ auf. Radiologisch können feingranulär-retikuläre Zeichnungen der Lunge mit oder ohne Aerobronchogramm imponieren, bis hin zur komplett atelektatischen „weißen Lunge“.

In der praktischen Therapie des RDS gilt die transbronchiale Applikation von natürlichen Surfactantpräparaten seit den 90er Jahren als Goldstandard. Sie ermöglicht eine signifikante Verbesserung des Gasaustausches und der Lungenfunktion und kann die Begleitrisiken einer Respiratortherapie (Pneumothorax, beatmungsinduzierte Infektionen, hohe Sauerstoff-Beimischung zur Inspirationsluft etc.) verringern. Sie erlaubt eine weniger invasive Beatmung (z. B. Reduktion von Beatmungsdruck und inspiratorischer Sauerstofffraktion ( $F_{iO_2}$ )) oder kann eine invasive Beatmung über die Applikation hinaus sogar vermeiden [131]. Seit der Einführung der SF-Therapie konnten Mortalität und Morbidität der Patienten mit RDS deutlich gesenkt werden [72; 73; 74].

Es gibt verschiedene Applikationsstrategien für exogenes SF. Am gängigsten ist die Bolus-Applikation durch den Endotrachealtubus. Dies ist möglich durch das Diskonnektieren des Tubus vom Respirator unter Inkaufnahme einer Unterbrechung der Ventilation und unter Verlust des PEEP. Hierunter kann es zu einer kritischen Verschlechterung der Oxygenierung kommen und es entstehen zusätzliche Scherkräfte bis zur erneuten Etablierung eines

ausreichenden PEEP. Darum erscheint die Applikation durch spezielle Tubus-Konnektoren ohne Diskonnektion vom Beatmungssystem (d. h. auch ohne Verlust des PEEP) sinnvoll [136; 137; 138]. Die rasche Applikation als Bolus wurde mit einer hohen Inzidenz von Hirnblutungen trotz SF-Therapie in Verbindung gebracht, womöglich hervorgerufen durch eine akut verbesserte cerebrale Perfusion und Oxygenierung [139; 140]. Hieraus leitete sich die Forderung nach einer Applikation mit verzögertem Wirkungseintritt durch endotracheale SF-Infusion ab. Ein spezieller Tubus-Konnektor mit Seitenloch oder Tuben mit einem bis zur Tubus-Spitze ziehenden Medikamentenkanal zur kontinuierlichen endotrachealen Verabreichung von SF bieten diese Möglichkeit. Im Tierexperiment wurde im Vergleich zur Bolus-Applikation durch die langsamere Surfactant-Infusion ein Wirksamkeitsverlust infolge einer inhomogeneren Verteilung beobachtet [141]. Unkontrollierte klinische Untersuchungen mit kürzerer Infusionszeit (Gabe innerhalb einer Minute) deuten eine der Bolusgabe klinisch ähnliche Wirksamkeit an [138]. Mit der Argumentation einer besseren Platzierung des Präparats an der alveolaren Grenzfläche, sowie einer homogeneren Verteilung und der Vermeidung einer raschen Änderung der Lungenfunktion und –durchblutung, wurde die Verneblung und inhalative Verabreichung von exogenem SF versucht. Wegen ungelöster technischer Probleme bei der Verneblung auf die benötigte Partikelgröße und der Applikationstechnik ist die Effektivität dieser Systeme bisher ungenügend [143; 144]. Weitere experimentelle Verfahren sind die Inhalation unter CPAP-Beatmung, die nasopharyngeale Applikation mittels Katheter unter Maskenbeatmung oder die Surfactantlavage. Für diese Verfahren gibt es bisher keine Quelle, die Vorteile gegenüber den etablierten Verfahren zeigt. Kontrollierte Studien prüften eine Strategie, bei der Frühgeborene kurzfristig zur SF-Applikation intubiert und danach rasch wieder extubiert und mit nasalem CPAP versorgt wurden (INSURE = INTubate SURfactant Extubate). Bisherige Ergebnisse deuten eine Senkung der Anzahl beatmungspflichtiger Kinder im Verlauf an [131; 145]. Standard bleibt bis dato die Bolusgabe durch den Endotrachealtubus. Die frühe Extubation und nichtinvasive Beatmung mit CPAP erscheint plausibel, muss aber noch in klinischen Studien Überlegenheit zeigen [146].

Für die evidenzbasierte klinische Routine in der Therapie des RDS liefern die „European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome“ Leitlinien [152]:

Die einmalige antenatale Steroidgabe, sowie die medikamentöse Verzögerung des Geburtsvorganges, um die Steroidwirkung möglichst optimal zu gewährleisten, haben eine signifikant günstige Auswirkung auf die Säuglingsmortalität. Einigkeit herrscht auch darüber,

dass eine Respiratortherapie, in Hinblick auf eine mögliche beatmungsinduzierte Lungenschädigung (ventilator-associated lung injury, VALI), wann immer möglich vermieden werden sollte und stattdessen nichtinvasive Beatmungsformen bevorzugt werden sollten (s. u.). Überlebenswichtige Therapiegrößen sind das Erzielen einer normalen Körpertemperatur, eine gute Flüssigkeitshomöostase, adäquate Ernährung, Aufrechterhaltung eines physiologischen Blutdruckes, sowie das Management des Ductus arteriosus.

Die günstige Auswirkung der SF-Therapie auf die Mortalität und das Risiko für das Auftreten eines Pneumothorax ist schon bei hohem Risiko für ein RDS erwiesen, bevor die Krankheit überhaupt manifest ist. Natürliche Surfactantpräparate werden aufgrund ihrer in Metaanalysen überlegenen Wirkung auf die Mortalität und das Pneumothorax-Risiko derzeit empfohlen.

Über die „ideale“ Zusammensetzung eines SF-Therapeutikums für das RDS gibt es aber bis heute keinen Konsens [75; 76; 77; 152]. Verschiedene organische SF-Extrakte (SF-Präparate der zweiten Generation) mit den durch Lavage oder aus Homogenat boviner und porciner Lunge gewonnenen SP-B und -C, sind seit den 90er Jahren Bestandteil klinischer Routine. Vielversprechende Ergebnisse liefern aber neue synthetische Präparate.

Lucinactant (Surfaxin) z. B. ist eine Phospholipidmischung mit Zusatz von Sinapultide, einem auch KL<sub>4</sub> genannten Peptid, das mit einer alternierenden Sequenz von hydrophoben und basischen Aminosäuren das periodische Muster von hydrophilen und hydrophoben Anteilen des N-terminalen Teils des SP-B nachahmen soll. Moya et al. zeigten in einer Datenanalyse aus dem SELECT- (Safety and Effectiveness of Lucinactant Versus Exosurf in a Clinical Trial) und STAR- (Surfaxin Therapy Against Respiratory Distress Syndrome) Kollektiv, dass die Behandlung mit Lucinactant bei Frühgeborenen mit Risiko für das Entstehen eines RDS eine mindestens gleich hohe Ein-Jahres-Überlebensrate gewährleistet, wie die Therapie mit einem tierischen Surfactant (Beractant bzw. Poractant alfa) [153].

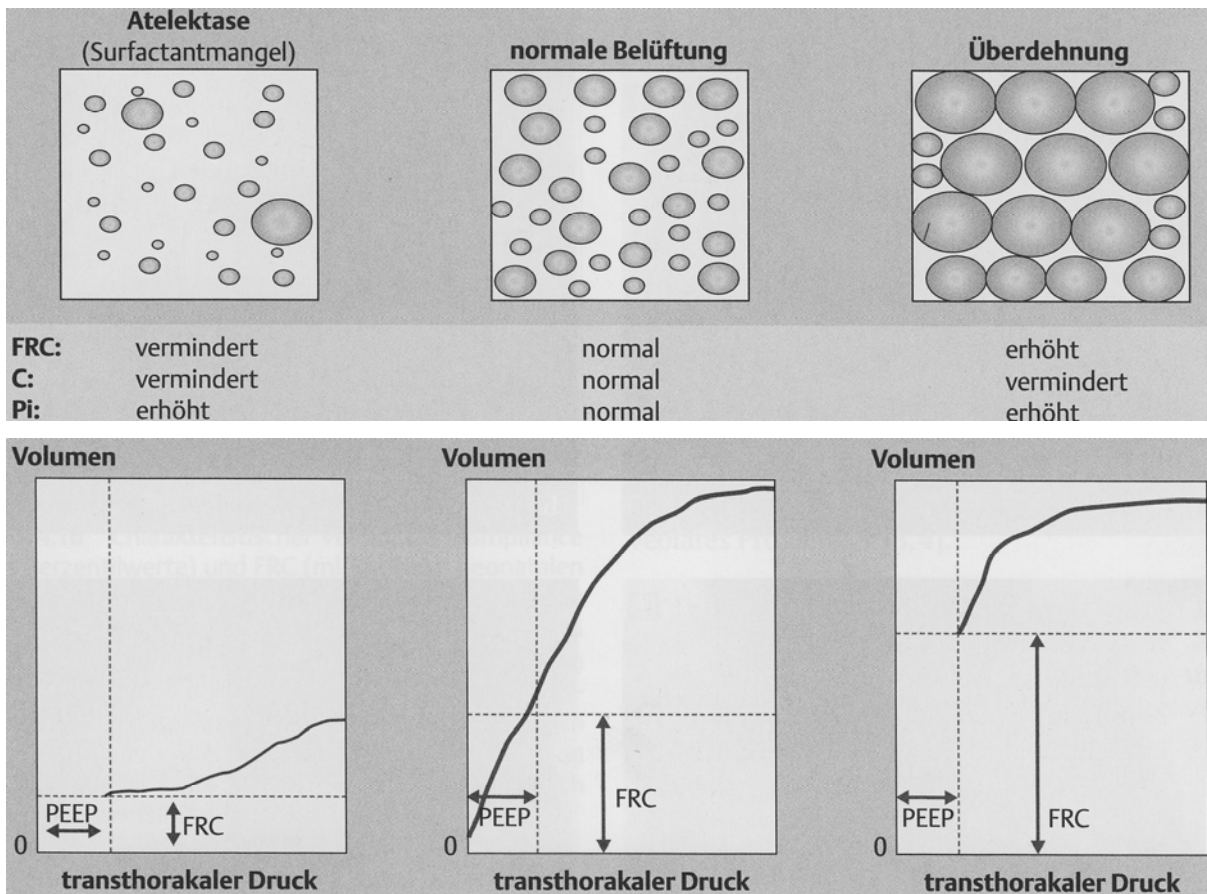
Daneben werden Phospholipidmischungen mit Zusatz von rekombinanten SP erprobt. Klinische Phase-III-Studien mit dem Surfactantpräparat Venticute, das auch Gegenstand dieser Arbeit ist, zeigten eine Verbesserung der Oxygenierung von adulten Patienten mit Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS) unter Therapie mit dieser Substanz und lieferten damit einen vielversprechenden Ansatz [154].

### 1.3 Beatmungsstrategien im Rahmen des neonatalen Atemnotsyndroms

Trotz aller Bemühungen, die physiologischen Eigenschaften der Lunge Frühgeborener zu verbessern, ist häufig eine invasive (mit endotrachealer Intubation) oder nichtinvasive (mit nCPAP) Beatmungstherapie bei Frühgeborenen unumgänglich. Verschiedene an die jeweilige Erkrankungssituation angepasste Beatmungsverfahren stehen zur Verfügung und wurden in klinischen und experimentellen Studien erprobt [106; 107; 132; 133]. Ziel des Atemungs-Managements bei RDS ist die Aufrechterhaltung einer adäquaten Ventilation und Oxygenation unter Minimierung des Risikos eines VALI [127]. Beim VALI werden durch maschinelle Beatmung pulmonale Entzündungsreaktionen entweder induziert oder verstärkt. Neben Barotrauma, Volutrauma und der Toxizität einer hohen inspiratorischen Sauerstofffraktion werden auch durch beatmungsinduzierte Scherkräfte Endzündungsprozesse hervorgerufen. Die konsekutive Freisetzung von Entzündungsmediatoren in die systemische Zirkulation kann ein Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) hervorrufen, wodurch die Entzündungssituation der Lunge weiter aggraviert wird.

Die besondere Herausforderung bei der Beatmung von Frühgeborenen mit RDS erklärt sich aus der Pathophysiologie: Bei SF-Mangel bleibt die Oberflächenspannung an der Grenzfläche zwischen Luftphase und Flüssigkeitsphase (Alveolarwand) hoch und bewirkt das Auftreten von Atelektasen. Das Neugeborene mit RDS muss nun bei jeder Inspiration den Eröffnungsdruck für die atelektatischen Lungenbereiche durch Thoraxexkursion aufbringen (s. o.). Dies führt zur Erschöpfung der Atemmuskulatur, wenn keine Atemunterstützung erfolgt.





**Abb. 1**

Vereinfachte schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Lungendehnbarkeit und funktioneller Residualkapazität

- FRC = Funktionelle Residualkapazität = expiratorisches Reservevolumen (Gasvolumen, das nach normaler Ausatmung noch abgeatmet werden kann) + Residualvolumen (Gasvolumen, das nach maximaler Expiration noch in der Lunge verbleibt)
- C = Compliance = Dehnbarkeit  
( $\Delta V/\Delta P$  = Volumenänderung pro appliziertem Füllungsdruck)
- P<sub>i</sub> = Inspirationsdruck

In der oberen Boxenreihe sind, stark vereinfacht, drei unterschiedliche Lungenparenchym-Beispiele in der Atemruhelage dargestellt. Die Blasen stellen Alveolen im Lungengewebe dar, die in Größe und Anzahl zwischen den Boxen differieren. Die mittlere Box veranschaulicht eine normale, reife Lunge mit vielen Alveolen, die gleichmäßig verteilt und nahezu gleich groß sind. Der Freiraum zwischen den Alveolen gibt Raum für Volumenzuwachs in der Inspiration. Im entsprechenden Druck-Volumen-Diagramm unter dieser Box ist veranschaulicht, dass aus der Atemruhelage heraus (oberhalb der FRC) mit geringem Druckanstieg ein steiler Volumenanstieg erreicht werden kann. Der lineare Anteil dieser S-

förmigen Kurve ist der optimale Arbeitsbereich des Thorax-Lungen-Systems. In den Situationen „Atelektase“ und „Überdehnung“ ist die Dehnbarkeit der Lunge wesentlich schlechter. Pro ausgeübtem Druckunterschied ( $\Delta P$ ) ist die resultierende Volumenänderung ( $\Delta V$ ) wesentlich geringer. Bei der atelektatischen Lunge des RDS mit wenigen und unterschiedlich gut belüfteten Alveolen ist der Grund für den hohen aufzuwendenden Beatmungsdruck die Kraft, die ausgeübt werden muss, um die atelektatischen Alveolen zu eröffnen (Eröffnungsdruck). Aufgrund der wenigen offenen, bzw. schlecht vorgedehnten Alveolen ist die FRC gering.

Die rechte Box stellt eine überblähte Lunge dar. Wenige, große Alveolen mit geringem Raum zur Ausdehnung erfordern zur Volumenerhöhung eine große Druckerhöhung. Die Druck-Volumen-Kurve befindet sich schon vor der Inspiration im abgeflachten Bereich des S-förmigen Verlaufs. Die Compliance ist niedrig. Diese Situation kann nach Surfactant-Applikation eintreten, wenn sich die Oberflächenspannung der Alveolen plötzlich verringert, die Beatmungsparameter aber nicht entsprechend angepasst werden.

Durch Applikation eines entsprechenden endexpiratorischen Druckes (PEEP) auf die atelektatische Lunge beim RDS, kann die Atemlage des Lungen-Thorax-Systems in ihren optimalen Arbeitsbereich in der Mitte der S-förmigen Kurve gehoben werden [147]. Dadurch wird zum einen die Atemarbeit erleichtert. Zum anderen verursacht die Wiedereröffnung der endexpiratorisch kollabierten Alveolen bei jeder neuen Inspiration Scherstress, der Gewebszerstörung mit den o. g. Folgen hervorruft. Dieses bei jedem Atemzug wiederkehrende Trauma kann unter Beatmung mit PEEP vermindert und so auch die Surfactant-Homöostase stabilisiert werden [148]. Die Anwendung eines adäquaten PEEP in Kombination mit niedrigen Tidalvolumina unter strikter Begrenzung des Beatmungsspitzendruckes sind mit einer verbesserten Prognose assoziiert [134; 142].

Die Surfactantdistribution über Endotrachealtubus und anschließende Intubationsbeatmung mit PEEP sind darum klinischer Standard (s. o.). Experimentell konnte für die Therapie mit exogenem SF gezeigt werden, dass die Beibehaltung von PEEP unter der SF-Instillation zu einer Verbesserung der SF-Distribution und einer Steigerung der Beatmungseffizienz führt [123]. Aktuelle klinische Studien erforschen die Beatmung mit binasalem CPAP (nCPAP) nach früher Extubation post SF-Applikation [131]. Diskutiert wird weiterhin die frühe nCPAP-Beatmung zur Vermeidung von Intubation und SF-Gabe [135]. Nachteile jeder Überdruckbeatmung liegen in einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines Pneumothorax, einer Steigerung der rechtsventrikulären Nachlast und einer Einschränkung der cerebralen Hämodynamik [125; 126; 127]. Als weitere Haupt-Risikofaktoren der Lungenschädigung

unter Respiratortherapie gelten die alveoläre Überdehnung durch zu hohe Beatmungsvolumina und/oder -drücke und der zyklische Alveolarkollaps durch unzureichenden endexpiratorischen Druck (Derecruitment). Lungenprotektive Ventilationsstrategien versuchen, diese Faktoren durch Anwendung kleiner Tidalvolumina und hoher PEEP-Niveaus zu minimieren und so das Beatmungstrauma (VALI) so gering wie möglich zu halten.

Neben den geschilderten Strategien gibt es weitere Ansätze in der Beatmungsmedizin, wie die Hochfrequenz-Beatmung (high-frequency oscillatory ventilation (HFOV); high-frequency jet ventilation), Inhalation von Stickstoffmonoxyd, permissive Hyperkapnie etc. Diese sollen hier nicht behandelt werden.

## 2. FRAGESTELLUNG

Wie oben erwähnt, sind SF-Präparate der zweiten Generation, gewonnen aus Homogenat tierischer Lunge oder aus Lungenlavage, Standard in der klinischen Routine der RDS-Therapie. Diese konnten sich gegenüber den zunächst entwickelten proteinfreien Phospholipidgemischen durchsetzen. Ihre Überlegenheit in Bezug auf reduzierte Mortalität und das seltenere Auftreten von Pneumothoraces unter Beatmung ist in experimentellen und klinischen Studien gut belegt [76; 119; 120]. „Natürliche“ Surfactants haben aufgrund ihres Herstellungsprozesses und ihrer Herkunft aber einige Nachteile. So werden sowohl die Phospholipide als auch die SP bei der Produktion verunreinigt und in ihrer Struktur beeinflusst. Durch ihre natürliche Herkunft schwanken die Konzentrationen der Inhaltsstoffe und damit auch die Wirksamkeit der Präparate zwischen den verschiedenen Chargen desselben Präparats. Die produzierbare Menge ist durch das Angebot an geeignetem tierischem Material limitiert. Darüber hinaus können tierische Eiweiße als Allergene wirken. Entsprechend resistente Krankheitserreger (z. B. Prionen) könnten den Produktionsprozess überdauern, in das fertige Surfactantpräparat gelangen, und bei Anwendung des Präparats potentiell Infektionen auslösen. Daneben zeigen sich natürliche Präparate wenig resistent gegenüber der Inaktivierung durch (Serum-)Proteine und sind in ihrer Herstellung kostenintensiv [149]. Darum ist die Produktion von synthetischen SF-Präparaten mit vollsynthetischem oder rekombinantem Proteinanteil Gegenstand laufender Untersuchungen. Randomisierte klinische Multicenter-Studien zeigen Therapieerfolge mit synthetischen SP-B-Analoga in der Therapie des RDS bei Frühgeborenen. So reduzierte eine Prophylaxe mit Lucinactant (Surfaxin<sup>®</sup>, synthetisch, Phospholipidmischung + KL4) bei Frühgeborenen mit hohem Risiko für ein RDS vs. einer Gabe von Colfosceril Palmitat (Exosurf<sup>®</sup>, synthetisch, Dipalmitoylphosphatidylcholin) die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines manifesten RDS, sowie die RDS-assoziierte Mortalitätsrate und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) [122]. Lucinactant zeigte vs. Poractant Alfa (Curosurf<sup>®</sup>, porciner Lungenextrakt mit SP-B und SP-C) in der prophylaktischen Therapie des RDS die gleiche Effektivität und Sicherheit wie das tierische Präparat (z. B. Mortalität, Pneumothorax, Hirnblutung) [121].

Mit SF-Präparaten mit rekombinantem SP-C (rSP-C) konnte in aktuellen tierexperimentellen Studien an frühgeborenen Kaninchen eine Verbesserung der Lungenfunktion erzielt werden, vergleichbar mit den Ergebnissen der etablierten natürlichen SF-Präparate [101; 103]. Im Tiermodell des Surfactantmangels durch Lungenlavage oder bei Mekoniumaspiration,

konnten mit rSP-C versetzte Phospholipidmischungen v. a. wegen ihrer Resistenz gegenüber der Inaktivierung erfolgreich eingesetzt werden [104; 105].

Wie oben beschrieben können Beatmungsverfahren mit positiven endexpiratorischen Drücken in der Therapie des RDS die Lungenfunktion verbessern und sind lungenprotektiv (Reduktion der pulmonalen Scherkräfte, Verbesserung der SF-Homöostase, selteneres Auftreten von BPD [155]). Im tierexperimentellen Ansatz konnte gezeigt werden, dass die Beatmung mit PEEP großen Einfluss auf den Effekt exogen applizierten Surfactants hat. Obgleich die Beatmung mit PEEP also große Vorteile bietet und Bestandteil der klinischen Routine der Therapie des RDS ist, hat sie dennoch Nebenwirkungen, wie rechtsventrikuläre Belastung mit konsekutiv reduziertem Herzminutenvolumen. Insbesondere zu hohe PEEP-Drücke können so das Risiko zerebraler hämodynamischer Beeinträchtigung erhöhen [125; 126; 127]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung eines klinisch gängigen Surfactantpräparats der zweiten Generation („natürliches“, bovines SF, Alveofact) mit einem Präparat der dritten Generation (Phospholipidmischung mit rSP-C, Venticute) bei verschiedenen PEEP-Niveaus (PEEP 0 kPa vs. PEEP 0,3 kPa) unter folgender Fragestellung verglichen:

1. Welchen Einfluss hat ein natürliches/synthetisches SF-Präparat, bzw. die Beatmung mit oder ohne PEEP auf die endogene SF-Synthese? Dabei soll sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die Expression von SP-B und SP-C untersucht werden.
2. Es soll weiterhin untersucht werden, welchen Einfluss diese SF-Präparation, bzw. die Beatmung mit und ohne PEEP auf histologische Veränderungen der Lunge hat. Dabei soll die Anzahl der eröffneten, bzw. belüfteten Alveolen, sowie die Dicke der Alveolarsepten gemessen werden.
3. In wiefern spiegelt sich der Einfluss der SF-Präparation, bzw. der Einfluss des Beatmungsmodus auf die endogene SF-Synthese und Lungenhistologie in den Lungenfunktionsparametern unter der Beatmung der Kaninchenfetten wider?

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Tierversuche

Die Tierversuche wurden in der Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. Dr. med. Irwin Reiss am Zentrum für Kinderheilkunde und am Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH durchgeführt und waren Teil eines anderen Promotionsprojektes. Im Einzelnen sollen zunächst die Methodik der Tierversuche und die Materialgewinnung zur weiteren molekularbiologischen Aufarbeitung und Ergebnisevaluation erläutert werden.

Die Versuchsreihe erhielt die Zustimmung des Ethikkomitees des Bundeslandes Hessen und entsprach den Richtlinien der „Care and Use of Laboratory Animals“ der „National Institutes of Health“.

##### 3.1.1 Narkose des Muttertieres

Zwölf New Zealand White Rabbits (Bauer, Neuenstein-Lohe) wurden am 27. Gestationstag (physiologische Gestationszeit 30 Tage) durch Kaiserschnitt entbunden. Das Muttertier wurde in Rückenlage auf einer Thermolux Wärmematte fixiert. Es erhielt einen peripheren Zugang an einer Ohrvene (22 G 1“ (0,9 x 25 mm) Vasocan Braunüle). Anschließend wurden die Operationsgebiete über Larynx und unterem Abdomen rasiert (Favorita II GT Schergerät), sowie mit Braunoderm-Lösung desinfiziert.

Das Muttertier wurde mit Rompun (Xylazinhydrochlorid) 20 mg/kg KG und Ketavet (Ketaminhydrochlorid) 10 mg/kg KG narkotisiert. Anschließend wurde über der Trachea eine Lokalanästhesie mit 10 ml Xylocain i. c. appliziert. Die Haut wurde nun mit Schere und chirurgischer Pinzette abpräpariert und die Trachea unter Schonung der Gefäße mit anatomischer Pinzette und Präparierschere dargestellt. Im Anschluss erfolgten die ventrale Inzision der Trachea mit einer Präparierschere und die Einführung eines Tubus, sowie die Fixierung mit Hilfe vorbereiteter Ligaturen. Anschließend wurde eine weitere Vasocan Braunüle in das unpunktierte Ohr eingebracht und eine Infusion mit NaCl 0,9 % Lsg. über Perfusor mit 24 ml/h angelegt. Nun erfolgte die Präparation der Arteria carotis zur Etablierung einer invasiven arteriellen Blutdruckmessung. In die Arterie wurde eine 20 G 1¼“ (1,1 x 33 mm) Vasocan Braunüle eingeführt und mit chirurgischer Ligatur fixiert, sowie die Braunüle nun an die arterielle Blutdruckmessung angeschlossen.

Die Beatmung erfolgte mit einem Babylog 8000 plus Beatmungsgerät. Es wurden folgende Beatmungsparameter eingestellt:

- inspiratorische Sauerstofffraktion (FiO<sub>2</sub>): 30 %
- Atemfrequenz (AF): 40/min
- Atemzeitvolumen: 320 ml/min kg KG
- Atemzugvolumen (AZV): 8 ml/kg KG
- PEEP: 0,1 kPa

### 3.1.2 Sectio

Das rasierte und desinfizierte Abdomen des Muttertieres wurde mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt und die Haut über der Linea alba mit einem Skalpell inzidiert. Anschließend erfolgten die Durchtrennung der Muskelfaszien und des Peritoneums, sowie die Luxation des Uterus aus der Bauchhöhle und die palpatorische Feststellung der Anzahl der Feten. Nach Inzision des Uterus mit einer Schere konnte der erste Fetus aus dem Uterus herausgehoben werden. Mit einer Präparierschere wurden nun die Eihäute durchtrennt und anschließend die Nabelschnur mit einer Gefäßklemme abgeklemmt. Es erfolgte Ligierung proximal und distal der Klemme mit chirurgischer Ligatur und die Durchtrennung der Nabelschnur.

Auf einer halbierten Mullkomresse (10 x 13 cm), die mit 38 °C warmer 0,9 %iger NaCl-Lsg. getränkt war, um ein Verkleben zu verhindern, wurde der Fetus zur Waage transportiert.

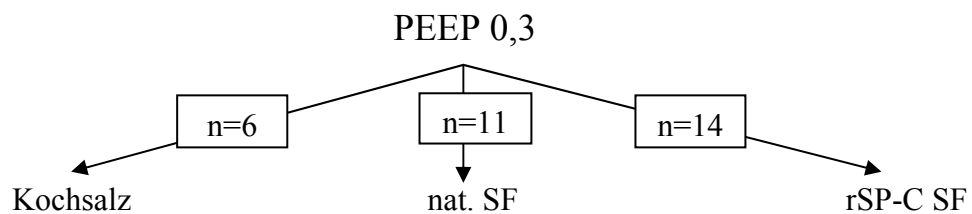
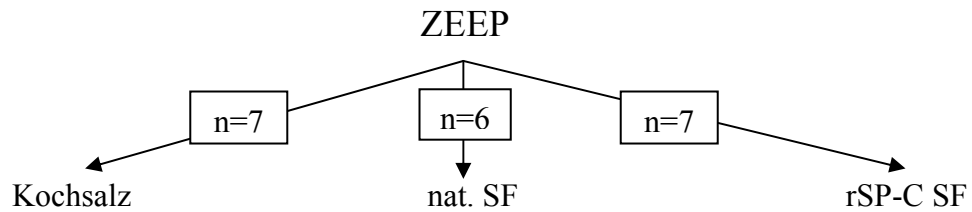
Die verbleibenden Feten wurden bis zur Entnahme des nächsten in das Abdomen der Mutter zurückverlagert und mit Bauchhaut, körperwarmen, feuchten Kompressen und einem Lochtuch abgedeckt.

### 3.1.3 Präparation der Feten

Auf einer Waage (Mettler PJ 800) wurde das Gewicht jedes Fetus ermittelt. Das durchschnittliche Geburtsgewicht der Feten betrug 27,4 g ± 3,6 g (Mittelwert ± Standardabweichung). Anschließend erhielt der Fetus Rompun (Xylazinhydrochlorid) 20 mg/kg KG und Ketavet (Ketaminhydrochlorid) 10 mg/kg KG zur Aufrechterhaltung der Narkose. Am narkotisierten Fetus wurde nun die Trachea mit Präparierschere und Pinzette freigelegt: Nach dem Hautschnitt über der Trachea erfolgte die Entfernung des Thymus und die Freilegung der Trachea. Nach der Hinterwanderung der Trachea mit einer Ligatur wurde die Trachea inzidiert und ein Endotrachealtubus eingeführt, sowie dieser mit o. g. Ligatur befestigt.

Über das Lumen des Tubus wurde mit Hilfe einer Hamiltonspritze 100 µl/kg KG intrapulmonale Flüssigkeit abgezogen und in einem sterilen Behältnis asserviert.

Anschließend wurden die Tiere in die einzelnen Studiengruppen randomisiert:



### Grafik 1

Randomisierung der Kaninchenfeten

- Kochsalz = NaCl 0,9 % Lsg.
- nat. SF = natürliches bovines SF-Präparat: Alveofact, Boehringer, Ingelheim  
100 mg/kg KG intratracheal
- rSP-C = rekombinantes SF-Präparat: Venticute, Altana, Bad Homburg;  
100 mg/kg KG intratracheal
- ZEEP = zero PEEP = PEEP 0 kPa
- PEEP 0,3 = PEEP 0,3 kPa

Darüber hinaus wurden als Kontrollgruppe drei Tiere weder beatmet noch mit einer SF-Präparation behandelt. Sie wurden nach Sectio mit einer letalen Dosis Ketavet euthanasiert.



### 3.1.4 Beatmung der Feten

Die Feten wurden nach Tracheotomie und SF- bzw. NaCl-Applikation als endotrachealen Bolus einzeln in ein Ventilationsplethysmographie-System mit mikroprozessorkontrollierten Magnetventilen für In- und Expiration überführt (Boehringer-Ingelheim, Biberach). Die Temperatur in den Boxen betrug 37 °C, Luftfeuchte 100 %. FiO<sub>2</sub> 100 %. Ein konstanter inspiratorischer Gasfluss wurde über einen vor dem Inspirationsventil angebrachten Luftregulator angepasst.

Beatmungsmodus: Intermittend Positive Pressure Ventilation (IPPV), drucklimitiert

- AZV: 7-8 ml/kg KG
- AF: 30/min
- Drucklimit: initial max. 3,5 kPa, unter Beatmung 3,0 kPa
- Positive Inspiratory Pressure (PIP): variabel
- Inspiration : Expiration 1 : 2
- PEEP: je nach Versuchsgruppe 0 oder 0,3 kPa

Die Beatmung erfolgte für 30 Minuten (min) nach SF-Applikation, analog zu dem von Davis et al. publizierten Beatmungsregime [113]. Während der Ventilation wurden im Abstand von 5 min folgende Parameter zur Auswertung erfasst:

- dynamische Compliance (C<sub>dyn</sub>) pro Atemzug:  $C_{dyn} = AZV (\Delta P \text{ kgKG})^{-1}$
- AZV
- $\Delta P = PIP - PEEP$

### 3.1.5 Entnahme der fetalen Lungen

Nach Beendigung der Beatmung wurde der Fetus aus der Beatmungsbox entnommen und mit einer letalen Dosis Ketavet euthanasiert. Es folgte die Entfernung beider Lungen nach dem folgenden Schema:

Öffnung des Abdomens durch einen Querschnitt mit einer Präparierschere und einer anatomischen Pinzette. Nach der stumpfen Öffnung des Diaphragmas mit zwei anatomischen Pinzetten unter Schonung der Lunge wurde der Thorax entlang des Sternums und des Rippenbogens mit Hilfe von anatomischer Pinzette und Präparierschere eröffnet. Die Thoraxwände wurden auf der Unterlage fixiert. Anschließend erfolgte die Entnahme der einzelnen Lungenlappen der rechten Lunge (rechts oben, rechts mitte, rechts unten, rechts infrakardial). Hierbei galt als Einschlusskriterium das Nicht-Vorhandensein eines

Pneumothorax. Die anschließende Konservierung des Lungengewebes erfolgte in zwei Gruppen. Für die anschließende Lungenhistologie wurde das Gewebe sofort in Paraffin eingebettet. Für die molekulare Analyse erfolgte Kryokonservierung bei -80 °C.

## 3.2 Probenaufarbeitung

### 3.2.1 Lungenhistologie

Die oben beschriebenen Lungenpräparate wurden zur histologischen Auswertung mit Hämatoxylin–Eosin gefärbt (Schichtdicke 0,5 µm). Die histologische Auswertung erfolgte geblindet durch den Pathologen Dr. med. Michael Ebsen (Leiter des Instituts für Pathologie des Städtischen Krankenhauses Kiel) bei 400-facher Vergrößerung.

Die Beurteilung der Lungenhistologie erfolgte unter Verwendung eines von Lotze et al. [91] beschriebenen histologischen Scoring-Systems, das die Ausprägungen verschiedener pathologischer Merkmale summiert:

- Atelektase
- Emphysem
- alveoläre und interstitielle Inflammation
- alveoläre und interstitielle Hämorrhagie
- alveoläres und interstitielles Ödem
- Nekrosebildung

Die Ausprägung dieser Merkmale wurde unter 400-facher Vergrößerung bestimmt und auf einer 5-Punkte-Skala beschrieben. 0 Punkte entsprachen dem Bild einer Lunge ohne pathologische Veränderungen, 4 Punkte der maximalen Ausprägung der jeweiligen Variablen. Die Anzahl der Alveoli und terminalen Luftwege wurde in fünf repräsentativen Ausschnitten bestimmt. Die Alveolarsepten-Dicke wurde nach Photodokumentation des Gewebes mit der Software Axiovision 3.0 für AxioCam MRc (Zeiss, Wetzlar) gemessen. Die Septen wurden an ihrem geringsten Durchmesser gemessen und der Mittelwert aus zehn Messungen ermittelt. Nicht orthograd getroffene Septen wurden von der Messung ausgeschlossen.

### 3.2.2 Semiquantitative RNA-Analyse

#### 3.2.2.1 RNA-Extraktion

Zur Isolation wurde eine modifizierte Guanidin-Thiozyanat-Phenol-Chloroform-Methode nach Chomczynski et al. [92] angewendet.

Die zuvor bei -80 °C gelagerten Lungen wurden unter stetiger Zugabe von flüssigem Stickstoff (-196 °C) mit einem Pistill mechanisch homogenisiert. Die Zellen des gewonnenen Homogenats wurden mit einer Lösung aus 1000 µl Phenol und Guanidin-Isothiocyanat lysiert (Trizol, Gibco). Die Extraktion der RNA erfolgte nach Zugabe von Chloroform zur Fällung im Verhältnis 1:10 und anschließender Inkubation auf Eis für 5 min. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Abzentrifugation des gefällten Materials für 15 min (12.000 U/min, 4 °C). Während der Zentrifugation bildete sich eine obere wässrige, farblose und eine untere organische, rötliche Phase. Die RNA-haltige obere Phase wurde entnommen. Dieser wurde entsprechend der Probenmenge die gleiche Menge an Isopropanol hinzugegeben. Durch eine weitere Inkubationszeit von 15 min auf Eis und anschließender Zentrifugation für 12 min (12.000 U/min, 4 °C) wurde eine vollständige Ausfällung der RNA erreicht. Das entstandene Pellet wurde nun mit 70 %igem Ethanol (500 µl) und einem weiteren Zentrifugationsschritt von 8 min (7.500 U/min, 4 °C) gewaschen. Nach diesem Schritt wurde das Ethanol mit einer Pipette abgezogen und das Pellet 15 min bei Raumluft getrocknet. Das trockene RNA-Pellet wurde nun in 50 µl Hochleistungsflüssigkeitschromatografie(HPLC)-gereinigtem Wasser gelöst und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

#### 3.2.2.2 Photometrische Quantifizierung der RNA-Menge

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde spektralphotometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm Lichtwellenlänge bestimmt, da Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum besitzen. Der Quotient der Extinktionen bei 260 nm (DNA/RNA) und 280 nm (Proteine) gibt einen indirekten Hinweis auf den Reinheitsgrad der DNA [93]. Der Referenzbereich liegt zwischen 1,6 und 1,8. Niedrigere Quotienten weisen auf eine starke Verunreinigung der Probe hin.

#### 3.2.2.3 Reverse Transkription (RT)

Um eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit mRNA durchzuführen, müssen die bei der RNA-Extraktion gewonnenen RNA-Fragmente enzymatisch in komplementäre DNA-Stränge

(copy-DNA = cDNA) transkribiert werden. Dies geschieht mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in Random-Priming-Technik unter Zugabe einer Hexanukleotidmischung.

RT-Reaktionsansatz:

1. Primermix

- 5 µl random primer (200 ng/µl)
- 5 µl dNTPs (10 mM)

2. Enzymmix

- 20 µl 5-fach konzentrierter Puffer
- 10 µl DTT (0,1 M)
- 5 µl RNase OUT (40 U/µl)
- 5 µl Superscript II (200 U/µl)

0,5 µg der zuvor extrahierten RNA (s. o.) wurden mit Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 50 µl ergänzt. Diese Mischung wurde zusammen mit dem Primermix, um intra- und intermolekulare Sekundärstrukturen des Primers zu vermeiden, 5 min bei 65 °C inkubiert und im Anschluss für 1 min auf 4 °C abgekühlt. Danach wurde der Enzymmix hinzugegeben und der RT-Ansatz in den Thermocycler überführt.

Folgendes Cyclyer-Protokoll wurde gewählt:

- 25 °C 10 min
- 42 °C 50 min
- 70 °C 15 min

Im Anschluss an die RT-Reaktion wurde das Reaktionsprodukt auf 4 °C abgekühlt, in kleinere Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C eingefroren.

### 3.2.3 Real-time-PCR

Die real-time-PCR (rt-PCR) ist ein PCR-Verfahren, bei dem während der PCR die Menge der entstandenen Produkte mittels Laser-Technik in Echtzeit gemessen wird.

Mit der TaqMan real-time-PCR-Methode wurde die mRNA Expression von SP-B, SP-C, sowie der Housekeeping-Gene 18S, und  $\beta$ -Actin untersucht. Zu den Nukleotidsequenzen von Primern und Sonden vgl. Materialliste.

### 3.2.3.1 Prinzip der relativen Quantifizierung mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Die rt-PCR nutzt die 5' Exonuklease Aktivität der Taq-Polymerase und vereint Amplifikation und PCR-Produktnachweis simultan in einem Reaktionsgefäß. Sie ist sensitiver, präziser und effizienter als die kompetitive PCR. Bei der rt-PCR wird die Mengenveränderung des Amplifikats durch die Erfassung der Fluoreszenzlichtemission im Reaktionsansatz, welche in Abhängigkeit von der Produktmenge erzeugt wird, in Echtzeit ermittelt. Durch die Messung wird der Amplifikationsvorgang nicht gestört [85; 87].

Neben den genspezifischen Primern werden in der rt-PCR spezielle fluorogene Hydrolysesonden eingesetzt, die aus einer für den zu amplifizierenden Abschnitt (z. B. ein Gen) spezifischen Oligonukleotidsequenz bestehen. Die Sonde ist am 5' Ende mit einem fluoreszenten Farbstoff (Fluoreszinderivat), dem sog. Reporter, und am 3' Ende mit einem weiteren Farbstoff, dem sog. Quencher (Rhodaminderivat), markiert.

Die intakte Sonde wird durch die spezifische Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt. Durch die räumliche Nähe des Reporter-Farbstoffs zum Quencher-Farbstoff innerhalb der Sonde wird die Energie der beiden Farbstoffe strahlungsfrei zwischen den Molekülen übertragen (Fluoreszenz-Energietransfer = FET) [86].

Im Rahmen der PCR hybridisiert die Sonde zunächst mit den Primern am Matrizenstrang. Während der Verlängerung des komplementären Strangs (Extensionsphase) trifft die Taq-Polymerase auf die hybridisierte Sonde und beginnt diese vom Matrizenstrang zu verdrängen. Durch diesen Vorgang kommt es zur Ausbildung einer Y-förmigen Sekundärstruktur, die die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase aktiviert. Diese beginnt, die Sonde Nukleotid für Nukleotid vom Strang zu hydrolysieren. Dabei wird der Reporter aus der räumlichen intramolekularen Nähe zum Quencher befreit, der FET unterbrochen und die charakteristische Fluoreszenzenergie emittiert [85; 87; 88]. Freie nicht hybridisierte Sonden werden somit nicht hydrolysiert.

Aufgrund der Akkumulation der PCR-Produkte steigt die spezifische Fluoreszenzenergie des Reporters während erfolgreicher PCR proportional zur Menge der anfallenden Genprodukte an. Die emittierte Fluoreszenzenergie wird ermittelt und zur späteren Analyse der Daten gespeichert.

Für das Reporter-Signal während einer rt-PCR in der exponentiellen Phase der Reaktion gilt:

$$R_C = K \cdot N_0 \cdot (1 + E)^C$$

mit

$R_C$  = Reporter-Signal eines Amplikons am Ende des C-ten Zyklus

$K$  = Konstante für das Reportersignal

$N_0$  = Anzahl der Kopien eines Amplikons zu Beginn der PCR

$E$  = Effizienz der PCR des Amplikons

Die Konstante  $K$  für die Fluoreszenzintensität eines Reporterfarbstoffes wird von vielen Faktoren beeinflusst: Sie ist unterschiedlich für verschiedene Farbstoffe, ändert sich während der Lagerung des Farbstoffs und wird schließlich auch durch die Konfigurationen verschiedener rt-PCR-Geräte bzw. desselben Geräts zu verschiedenen Zeitpunkten beeinflusst. Daraus folgt, dass  $K$  nur für diejenigen Reaktionen konstant ist, die auf demselben Plate mit demselben Mastermix zeitgleich durchgeführt werden.

Zur Umsetzung dieser Lichtemissionswerte in quantitative Aussagen, bezogen auf die Anzahl der Startkopien des untersuchten Gens, muss zunächst ein Vergleichsparameter für die Proben ermittelt werden. Dieser Parameter ist die Anzahl der PCR-Zyklen, die ein Amplikon benötigt, um eine vorher festgelegte Grenze, den sog. Threshold, zu überschreiten. Weiterhin muss ein mathematischer Glättungsfaktor, die Baseline, festgelegt werden. Dieser Faktor minimiert Störsignale, die vor allem in den Anfangszyklen auftreten und die Baseline-Floureszenz überdecken. In dieser Studie wurde der Startpunkt der Baseline als 3. Zyklus der Amplifikation festgelegt. Als Stoppunkt wurde der letzte Zyklus gewählt, an dem noch kein Anstieg der Kurven zu sehen war.

Der Vergleichsparameter ist derjenige PCR-Zyklus, während dessen der Graph, der die Fluoreszenz des beobachteten Gens beschreibt, den Threshold (bei festgelegter Baseline) überschreitet. Dieser Punkt heißt vereinbarungsgemäß  $C_T$ -Wert (von threshold cycle =  $C_T$ ), wird als Dezimalbruch angegeben und hat keine Einheit. Sind Baseline und Threshold festgelegt, lassen sich nun  $C_T$ -Werte von Proben miteinander vergleichen, für die Baseline und Threshold konstant sind, also für Proben, die gemeinsam auf einer Reaktionsplatte mit demselben Mastermix amplifiziert wurden.

Mit dem Prinzip der relativen Quantifizierung mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode wird die Expression einer Zielsequenz zu einer zweiten, nicht verwandten Gensequenz, dem sogenannten Housekeeping-Gen in Beziehung gesetzt. Als Housekeeping-Gen wird ein durch seine

konstante Expression in einem bestimmten Organ gekennzeichnetes Gen gewählt. Diese Methode bietet den Vorteil über eine absolute Quantifizierung eines Standards eine Aussage über das Verhältnis der Konzentrationen von Zielgen zu Housekeeping-Gen im Reaktionsansatz treffen zu können. Um diese Methode anwenden zu können, müssen die Housekeeping-Gene in allen Proben konstant exprimiert sein und für jede Probe amplifiziert werden. In der vorliegenden Studie wurden als Housekeeping-Gene beta-Actin ( $\beta$ -Act) und 18S ausgewählt, da sie in allen Zellen ausreichend und konstant exprimiert werden. Die Ziel- und Housekeeping-Gene wurden in Vorversuchen etabliert.

Da Zielgen und Housekeeping-Gen mit verschiedenen Primer- und Sondenmixes amplifiziert werden, unterscheiden sich folglich die Konstanten  $K$  für Housekeeping-Gen und Zielgen ( $K_Z \neq K_H$ ) und es werden verschiedene Thresholds festgelegt ( $T_Z \neq T_H$ ). Um einen diese beiden PCR-Ansätze verbindenden Bezugspunkt einzuführen, wird für jeden Mastermix, d. h. für jedes Gen auf jedem neuen Plate, eine Kalibrator-cDNA eingeführt, die stets aus demselben DNA-Pool entnommen wird. Die Kalibratorprobe wurde zuvor auf die gleiche Weise wie die Probe (s. o.) aus dem Material mehrerer zufällig ausgewählter Lungen von Versuchstieren der Vorversuche gewonnen. Sie wurde in Vorversuchen etabliert und enthielt alle untersuchten Gene in gleicher Expression wie im Probenmaterial. Sie wurde neben den zu untersuchenden Proben für jedes Gen, d. h. für jeden Mastermix auf jedem Plate in getrennter Reaktion als 3fach-Wert in die PCR eingebracht. Das Verhältnis der im Kalibrator exprimierten cDNA-Menge der Startkopienzahl von Ziel- zu Housekeeping-Gen wird mathematisch gleich eins gesetzt. Unter der Voraussetzung konstant gleicher PCR-Effizienzen von Ziel- und Housekeeping-Gen in allen durchgeführten PCR-Ansätzen, kann nun das Verhältnis der Startkopienzahlen von Ziel- und Housekeeping-Gen in den Proben zueinander berechnet werden.

Um die mathematischen Anforderungen der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode zu erfüllen, die eine PCR-Effizienz für Zielgen und Kalibrator von idealerweise 100 % fordert, wurden von den Ziel- und Housekeeping-Genen PCR-Standardkurven bestimmt, indem jeweils eine Verdünnungsreihe (sieben Verdünnungsstufen mit einer Verdünnung von jeweils 1:10) angefertigt wurde. Als cDNA diente der Kalibrator.

Unter der Voraussetzung, dass die PCR-Effizienzen für Ziel-Gene und Housekeeping-Gene 100 % betragen, kann der Mengenunterschied der Startkopienzahl eines Gens in zwei verschiedenen Proben durch die Normalisierung auf das Housekeeping-Gen als Verhältniszahl wiedergegeben werden.

### 3.2.3.2 Real-time-PCR-Durchführung

Die PCR ist sensitiv für die Kontamination mit probenähnlicher DNA und somit anfällig für falsch positive Amplifikationen. Insbesondere beim Arbeiten mit gleichen Primersystemen über einen längeren Zeitraum tritt dieses Problem auf, da jedes amplifizierte Produkt wieder ein optimales Template für weitere Amplifikationen darstellt. Daher wurden Vorsichtsmaßnahmen getroffen, um eine Kontamination zu vermeiden:

- Autoklavierung der Reaktionsgefäße (90 min; 120 °C)
- RNase-freie Pipettenspitzen
- getrennte Pipettensätze zur Herstellung des PCR-Reaktionsansatzes (PCR-Mastermix) und der späteren cDNA-Analyse
- räumliche Trennung zwischen Herstellung des Mastermix, der Pipettierung der cDNA in die TaqMan-Reaktionsplatte (Reaction Plate) und der eigentlichen Detektion bzw. Quantifizierung der PCR-Produkte
- Bei jedem rt-PCR-Durchgang wurde eine Negativprobe (Non Template Control = NTC) bestehend aus Amplifikationsansatz und HPLC-reinem Aqua dest. zur Kontrolle der Kontaminationsfreiheit des Reaktionsansatzes mit amplifiziert

Zunächst wurde ein Ansatz bestehend aus qPCR-Mastermix (Puffer, MgCl<sub>2</sub>, Stabilisator, Fluoreszenzfarbstoff), für das jeweilige Gen spezifischem Forward Primer (FP) und Reverse Primer (RP), sowie einer genspezifischen Fluoreszenzsonde und HPLC-reinem Aqua dest. hergestellt. Die Primer-Endkonzentration des Ansatzes betrug jeweils für FP und RP 300 nM, die Sondenkonzentration 150 nM. Die Konzentrationen wurden in Vorversuchen optimiert. Primer und Sonden wurden mit Hilfe der Software Primer Express (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) unter Bezugnahme auf Hardt et al. [90] designed.

In die Reaktionsplatte wurden pro Well 24 µl Amplifikationsansatz und 1 µl cDNA pipettiert und die Wells anschließend mit lichtdurchlässigen Kunststoffverschlüssen (Optical Caps) verschlossen.

Die cDNA der zu analysierenden Proben wurden als 3fach-Werte, sowie pro Platte eine NTC-Probe und eine Kalibrator-cDNA als 3fach-Wert pipettiert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mit dem Abi Prism 7700 Sequenz Detector (Applied Biosystems, Carlsbad, USA).

Es wurde das folgende standardisierte PCR-Profil nach sorgfältiger Optimierung gewählt:

- Initiale Denaturierung bei 50 °C für 2 min und 95 °C für 10 min
- 45 Zyklen der Denaturierung bei 95 °C für jeweils 15 sec



- „primer annealing“ bei 60 °C für 1 min
- „primer extension“ bei 60 °C für 1 min

Die Quantifizierung erfolgte wie oben beschrieben mittels der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode.

### 3.2.4 Quantifizierung von SP aus Lungenhomogenat

Die hydrophoben Apoproteine SP-B und SP-C wurden mit Hilfe eines modifizierten Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) nach Kramer et al. [94] bestimmt. Die SP-Konzentrationen wurden aus Homogenat der linken oberen und unteren Lungenlappen bestimmt. Dieses Homogenat wurde, wie bei der RNA-Isolierung beschrieben, durch Homogenisierung der Lungen unter Zuhilfenahme von flüssigem Stickstoff hergestellt. Als Trägermaterial für den ELISA wurden 96 Well Mikrotiterplatten (Polysorp F96 mit Zertifikat, Nunc, Wiesbaden) verwendet.

Diese Untersuchungen wurden durchgeführt im Labor Prof. Dr. med. Andreas Günther, Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Gießen.

#### 3.2.4.1 SP-B-ELISA

Die für die SP-B Quantifizierung zu messenden Proben wurden in einem Verhältnis von 1:1000 mit PBS/1-Propanol (1:1, pH 7,4) verdünnt und anschließend in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Standards wurden ebenfalls mit PBS/1-Propanol (1:1, pH 7,4) seriell in abnehmender Konzentration (40 ng/Well bis 312,5 pg/Well) verdünnt und anschließend auf die Mikrotiterplatten aufgetragen. Als SP-B Standard diente isoliertes humanes SP-B.

Die Mikrotiterplatten wurden anschließend bei 37 °C für 6 h getrocknet. Durch die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Trifluorethanol wurde das variable Bindungsverhalten der Proben an der Plattenoberfläche minimiert. Als nächstes erfolgte, durch zwei Waschschrte mit jeweils 200  $\mu\text{l}$  Diisopropylether/1-Butanol (3:2), die selektive Entfernung der Phospholipide von den an der Platte gebundenen SP-B. Der erste Waschschrte beinhaltete eine Inkubationszeit von 20 min unter Schütteln bei Raumtemperatur.

Nach Entfernung des Waschüberstandes wurden die Proben mit 200  $\mu\text{l}$  PBS/0,5 Tween 20 dreimal hintereinander gewaschen. Nun wurde den Proben zur Blockierung überschüssiger Bindungsstellen PBS/1% Rinderserumalbumin (bovines Serumalbumin = BSA) zugegeben für 2 h inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrten mit PBS/0.5 Tween 20 wurden die

Proben mit dem primären Antikörper 12 h bei Raumtemperatur mit dem monoklonalen anti-SP-B: 8B5E-Antikörper gegen rabbit SP-B inkubiert.

Die Konzentration der SP-B Antikörper betrug 5 µg/ml in PBS/1% BSA.

Nach einem weiteren Waschschrift erfolgten die Auftragung der sekundären Antikörper und eine anschließende Inkubation von 3 h bei Zimmertemperatur. Nach der Inkubationszeit erfolgte wiederum ein dreimaliges Waschen. Die sekundären Antikörper bestanden aus biotinyliertem SP-B Anti-Maus-IgG Antikörper (Amersham Biosciences, Freiburg)

Diese Antikörper lagen in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS/1% BSA vor.

Zur Verstärkung der Empfindlichkeit des Tests wurde die Avidin/Biotin-Peroxidase-Technik (AB-Komplex) angewendet. Durch die Zugabe von 2,2-Azino-di-[3-ethylbenziazolinsulfonat (6)] (ABTS) als Substrat wurde die anschließende enzymatische Farbentwicklung eingeleitet. 30 min nach der Farbentwicklung erfolgte die spektralphotometrische Auswertung bei 450 nm mit einem ELISA-Photometer (Tecan, Crailsheim). Die SP-Standardkurven wurden durch rechnergestützte Cubic-Spline-Interpolation gewonnen.

### 3.2.5 Statistische Datenanalyse

Die statistische Analyse wurde am Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen durch W. Pabst unter Verwendung von SPSS für Windows, Version 11.5 durchgeführt.

Eine Normalverteilung der Lungenfunktionsdaten konnte angenommen werden.

Der Effekt einer SF-Applikation auf die Variablen der Lungenfunktion während des Beobachtungszeitraumes wurde mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse getestet.

Der histologische Score ist als geometrischer Mittelwert und Standardabweichung mit einem 95 %-Konfidenzintervall dargestellt.

Die Ergebnisse der rt-PCR-Analyse und der Proteinkonzentrationsbestimmung sind als Median und Interquartilbereich (25 %-75 %) in boxplots dargestellt.

Für diese Daten lag keine Normalverteilung vor. Die rt-PCR Daten wurden auf zwei Housekeeping-Gene mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Methode normalisiert. Für weitere Analysen und zum besseren Vergleich der Gruppen untereinander wurden die Daten logarithmiert und eine einfaktorielle Varianzanalyse mit einem posthoc-Test nach Scheffé durchgeführt.

Das Signifikanzniveau ist im Ergebnisteil angegeben [156].

### 3.3 Material

#### 3.3.1 Chemikalien

TRIZol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe Art.-Nr.: 15596-018
RNase OUT	Invitrogen, Karlsruhe Art.-Nr.: 10777-019
0,1 M DTT	Invitrogen, Karlsruhe Art.-Nr.: s. Superscript II
Alveofact Zusammensetzung: SP-B und SP-C (insg. 1 %) 90 % Phospholipidanteil 3 % Cholesterol 0,5 % freie Fettsäuren andere Bestandteile	Boehringer, Ingelheim
Venticute Zusammensetzung: 2 % rSP-C 63 % Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) 28 % Palmitoyloleoylphosphatidyl-Glycerol 4,5 % Palmitinsäure 2,5 % CaCl <sub>2</sub>	Altana, Bad Homburg
LiChrosolv HPLC Wasser	MERCK, Darmstadt Art.-Nr.: 1.15333.2500
Ethanol absolut	Riedel-de-Haen, Seelze Art.-Nr.: 32205

Trichlormethan/Chloroform

ROTIPURAN

Art. 3313.4

2-Propanol

a) Riedel-de-Haen, Seelze

Art.-Nr.: 59304

b) JT-Baker, Phillipsburg, NJ, USA

Art.-Nr.: 8067

### 3.3.2 Enzyme und Kits

Random Primer p(dN)<sub>6</sub>

F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz

1034731

Art.-Nr.: 85732224-74

Superscript I

Invitrogen, Karlsruhe

Art.-Nr.: 18064-014

dNTP mix 10M

Invitrogen, Karlsruhe

Art.-Nr.: 18109-017

1st. Strand Buffer

Invitrogen, Karlsruhe

Art.-Nr.: 18064-71

PCR Mastermix for TaQman Assays  
(5 mM final MgCl<sub>2</sub>)

Eurogentec, Seraing, Belgien

Art.-Nr.: RT-QP2X-03

Lot. No. 11/1

### 3.3.3 Geräte

Mettler PJ800 Waage	Mettler Toledo, Gießen
Perfusor VI	Braun Melsungen, Melsungen
Polystat	Fisher Bioblock Scientific Illkirch Cedex, Frankreich
Thermolux Wärmeunterlage	Witte + Sutor, Murrhardt
Eppendorf Referenz Pipette, variable 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg Art.-Nr.: 4910 000.018
Eppendorf Referenz Pipette, variable 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg Art.-Nr.: 4910 000.024
Eppendorf Referenz Pipette, variable 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg Art.-Nr.: 4910 000.069
Eppendorf Easypet mit Ladegerät und Wandhalter	Eppendorf, Hamburg Art.-Nr.: 4860 000.011
ABI PRISM Cap Installing Tool	Applied Biosystems, Foster City, USA Art.-Nr.: 4330015
Zentrifuge Hettich Universal 30 RF	Andreas Hettich, Tuttlingen Art.-Nr.: nicht mehr im Handel
Zentrifuge Hettich EREBA 12	Andreas Hettich, Tuttlingen Art.-Nr.: nicht mehr im Handel

Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemie, USA Art.-Nr.: G 560
Thermal Cycler PTC-200	MJ Research Inc., Waltham, USA Art.-Nr.: PTC-0200
Tomy Digital Biology PMC-060 Capsulefuge	Tomy Digital Biology, Tokyo, Japan Art.-Nr.: PMC-060 Capsulefuge
ABI PRISM 770 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, USA Art.-Nr.: 770-01-220/240
Medizinische Pinzette, blau, unsteril 12,5 cm lang	Tüshaus, Medical Produkte, Velen-Ramsdorf Art.-Nr.: 01.900.00.473
Babylog 8000 plus	Dräger, Lübeck
Favorita II GT 104 Schergerät	Aesculap, B. Braun Vet Care, Tuttlingen
3.3.4 Arbeitsmaterial	
Disposable Scalpel Sterile No21	FEATHER Safety Razor, Osaka, Japan Art.-Nr.: 31602740
Latexhandschuhe, puderfrei	Ansell, München Art.-Nr.: 31404862
Parafilm 10 cm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA Art.-Nr.: 32436000

Tubes 0,2 ml	Pure Pak Molecular BioProducts, San Diego, USA Art.-Nr.: 3414
Safe-Lock-Tubes 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg Art.-Nr.: 0030 121.023
Microtubes 1,5 ml, 39 x 10,8 mm Ø farblos/neutral	Sarstedt, Nürnberg Art.-Nr.: 72.690
Safe Lock Tube 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg Art.-Nr.: 0030 120.094
Chirurgische Ligatur	Ethilon monofil Ethicon Products, Norderstedt Art.-Nr.: EH6740G
Pipettenspitzen natur; 0,5 - 10 µl mit PE-Filter; RNase, DNA-, & pyrogenfrei, 96 im Rack, steril	Nerbe Plus, Winsen a. d. Luhe Art.-Nr.: 07.722.5360
Pipettenspitzen natur; 1-100 µl mit PE-Filter; RNase, DNA-, & pyrogenfrei, 96 im Rack, steril	Nerbe Plus, Winsen a. d. Luhe Art.-Nr.: 07.742.5360
Pipettenspitzen natur 1-200 µl mit PE-Filter; RNase, DNA-, & pyrogenfrei, 96 im Rack, steril	Nerbe Plus, Winsen a. d. Luhe Art.-Nr.: 07.752.5360
Pipettenspitzen natur 100-1000 µl mit PE-Filter; RNase-, DNA-, & pyrogenfrei, 96 im Rack, steril	Nerbe Plus, Winsen a. d. Luhe Art.-Nr.: 07.792.5360

Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, USA Art.-Nr.: N801-0560
ABI PRISM Optical Caps, (8 Caps/Strip)	Applied Biosystems, Foster City, USA Art.-Nr.: 4323032
Braunoderm	Braun Melsungen, Melsungen
Discofix Dreiwegehahn	Braun Melsungen, Melsungen
Ecoject Plus Perfusion 50 ml Spritze	Dispomed, Gelnhausen
Hamilton Microliter Syringe 710 NR, 100 µl	Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz
Microflo Perfusionsbesteck mit Flügel 25 GA, 0,5 x 20 mm	LDKS Oversan, Ind. Biomedica SpA Gemonio, Spanien
Mullkompressen, 12-fach, 10 x 13 cm, Ref. 1038	Beese, Barsbüttel
Perfusor-Leitung, 150 cm, mit Luer-Lock	Braun Melsungen, Melsungen
Vasocan Braunüle, 20 G 1¼'' (1,1s33 mm), 22 G 1'' (0,9 x 25 mm)	Braun Melsungen, Melsungen
Tubus mit Cuff	Rüsch, Kernen-Rommelshausen



### 3.3.5 Primer

ROTH, Karlsruhe

Rab-b-actin forward Primer	5'-CCG-AGG-CGC-TGT-TCC-A-3'
Rab-b-actin reverse Primer	5'-CGC-ACT-TCA-TGA-TCG-AGT-TGA-3'
Rab-SP-C forward Primer	5'-GGC-TCC-ACC-GGC-ATT-GT-3'
Rab-SP-C reverse Primer	5'-TCT-TCA-TGA-GGT-AGC-AGC-AGG-TT-3'
Rab-SP-B forward Primer	5'-CAT-CGT-CAA-CAT-CCT-AAC-CAA-GAT-3'
Rab-SP-B reverse Primer	5'-GTC-GCA-CTC-ATG-CTC-CAG-AA-3'
Rab-18S forward Primer	5'-GCC-GCT-AGA-GGT-GAA-ATT-CTT-G-3'
Rab-18S reverse Primer	5'-CAT-TCT-TGG-CAA-ATG-CTT-TCG-3'

### 3.3.6 Sonden

OliGold, Eurogentec, Seraing, Belgien

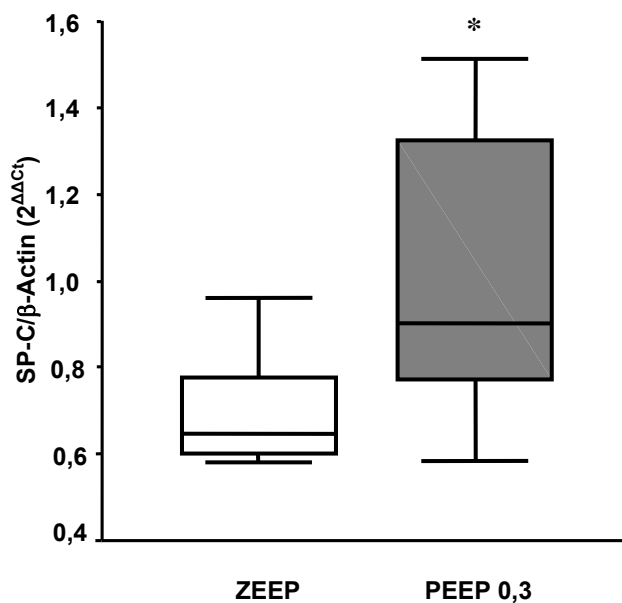
Rab-b-actin	5'-TCC-TTC-CTG-GGC-ATG-GAG-TCC-TGC-3'
Rab-SP-B	5'-AGG-CCA-TTT-TCC-AGG-ACA-CCA-TAC-GG-3'
Rab-SP-C	5'-ACT-ACC-AGC-GGC-TCC-TGA-TCG-CCT-3'
Rab-18S	5'-CCG-GCG-CAA-GAC-GGA-CCA-GA-3'

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Effekt eines natürlichen und eines rekombinanten SF-Präparates auf die endogene Surfactantproduktion unter Beatmung mit verschiedenen PEEP-Niveaus

Die mRNA Expression für SP-B und SP-C im Lungenober- und -unterlappen unterschied sich nicht signifikant im Vergleich der beiden SF-Präparate untereinander, oder beim Vergleich zwischen beatmeten und unbeatmeten Kontrolltieren nach Kochsalzapplikation (Tab. 3).

Für die Beatmung mit PEEP hingegen konnte eine signifikant höhere mRNA Expression von SP-C im Vergleich zu ZEEP-beatmeten Kontrolltieren (für Ober- und Unterlappen) gezeigt werden ( $p < 0,02$ , Abb. 4, Abb. 5). Dieser Effekt konnte unabhängig vom applizierten SF-Präparat gezeigt werden, d. h. statistisch bestand keine signifikante Interaktion der Variablen (Zwei-Weg-ANOVA  $p = 0,5$ ), obwohl der Effekt bei den mit NaCl 0,9 % Lsg.-instillierten Gruppen am deutlichsten ausfiel.

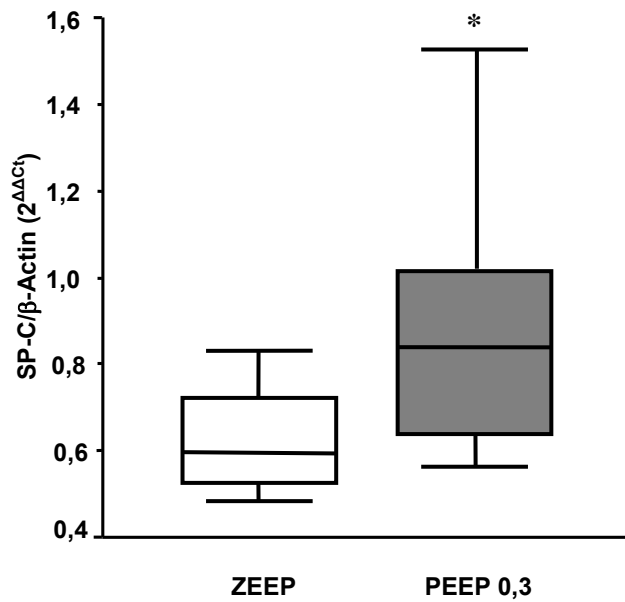


**Abb. 4**

SP-C mRNA Expression aller Surfactant-Behandlungsgruppen, oberer Lungenlappen. Vergleich zwischen Beatmung mit PEEP ( $n = 15$ ) und ZEEP ( $n = 8$ ). Die relative Zunahme der SP-C mRNA Expression im Oberlappen (Abb. 4) und Unterlappen (Abb. 5) ist normalisiert auf das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Actin angegeben.

\* $p < 0,02$  vs. ZEEP

PEEP angegeben in kPa



#### Abb. 5

SP-C mRNA Expression aller Surfactant-Behandlungsgruppen, unterer Lungenlappen.

Vergleich zwischen Beatmung mit PEEP (n = 15) und ZEEP (n = 8). Die relative Zunahme in der SP-C mRNA Expression im Oberlappen (Abb. 4) und Unterlappen (Abb. 5) ist normalisiert auf das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Actin angegeben.

\*p < 0,02 vs. ZEEP

PEEP angegeben in kPa

Ein signifikanter Einfluss auf die SP-B-Konzentrationen im Lungenhomogenat konnte mittels ELISA weder für die unterschiedlichen Surfactantpräparationen ( $1,22 \pm 0,09$  (NaCl 0,9 % Lsg; PEEP 0,3);  $2,72 \pm 2,23$  (nat. SF; PEEP 0,3);  $1,07 \pm 0,60$  (rSP-C SF; PEEP 0,3)), noch für unterschiedliche Ventilationsstrategien ( $1,25 \pm 0,96$  (NaCl 0,9 % Lsg; ZEEP);  $1,22 \pm 0,09$  (NaCl 0,9 % Lsg; PEEP 0,3)) gezeigt werden.

#### 4.2 Effekt eines natürlichen und eines rekombinanten SF-Präparates auf die Lungenstruktur unter Beatmung mit verschiedenen PEEP-Niveaus

Die Behandlung mit Surfactant alleine bewirkte keinen statistisch signifikanten Unterschied der Alveolenzahl zwischen den Gruppen.

Unter Beatmung mit PEEP zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung der Zahl belüfteter Alveolen und Bronchioli terminales (Median  $43,8 \pm 7,4$ /Gesichtsfeld) im Vergleich zu ZEEP ( $36,6 \pm 5,3$ /Gesichtsfeld;  $p < 0,02$ ). Dieser Effekt trat in vergleichbarer Weise bei allen Surfactant-behandelten Gruppen und Kontrollen auf, was eine statistisch signifikante Interaktion ausschließt (Zwei-Weg ANOVA  $p = 0,2$ ).

Die Alveolarsepten-Dicke unterschied sich weder im Vergleich zwischen den Ventilationsstrategien, noch zwischen den verschiedenen Surfactant-Gruppen.

#### 4.3 Effekt eines natürlichen und eines rekombinanten SF-Präparates auf die Lungenfunktion unter Beatmung mit verschiedenen PEEP-Niveaus

Nach 30minütiger Beatmung mit ZEEP (ZEEP = zero PEEP) zeigte sich für Versuchstiere unter bovinem SF eine deutliche Tendenz zu verbesserter dynamischer Compliance ( $C_{dyn}$ ) und erhöhtem AZV gegenüber der Kontrollgruppe (Kochsalz).  $\Delta P$  konnte signifikant gesenkt werden (=Differenz aus maximalem Beatmungsdruck (PIP) - PEEP) gegenüber der Kontrollgruppe signifikant ( $p < 0,001$ ).

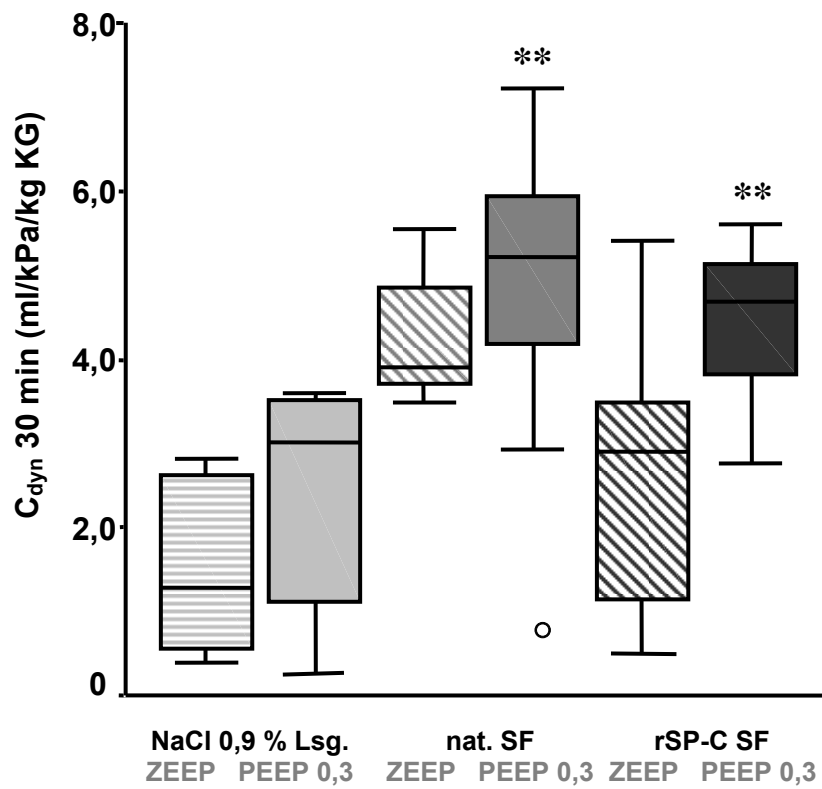
Im Gegensatz dazu zeigten mit rSP-C behandelte Tiere unter ZEEP ähnliche, aber weniger ausgeprägte Effekte, insbesondere in Bezug auf das AZV (s. Tab. 2, Abb. 2, Abb. 3).

Vergleicht man die Werte ZEEP-beatmeter Tiere unter SF-Applikation mit denen PEEP-beatmeter Kaninchenfetten nach Kochsalz-Applikation, so zeigte sich ein Trend zu erhöhter dynamischer Compliance und gesunkenem  $\Delta P$  nur in der Gruppe der Alveofact-behandelten Tiere, während für rSP-C-behandelte Tiere kein Effekt gezeigt werden konnte (s. Tab. 2, Abb. 2, Abb. 3)).

PEEP-beatmete Versuchstiere unter SF-Applikation zeigten im Vergleich zur kochsalzbehandelten Kontrollgruppe bei ähnlichem AZV, sowohl unter Alveofact- als auch unter rSP-C-Applikation signifikant erhöhte dynamische Compliance und gesunkenes  $\Delta P$  ( $p < 0,001$ ; s. Tab. 2, Abb. 2, Abb. 3). Auffällig war eine deutliche Tendenz zu erhöhtem AZV unter PEEP in der Gruppe ohne SF-Instillation im Vergleich zu ZEEP-beatmeten Kontrolltieren.

Unter Beatmung mit PEEP zeigten sich im Vergleich der beiden SF-Präparate untereinander bezüglich der Lungenfunktion gleiche Trends: Mit Ausnahme des signifikant niedrigeren  $\Delta P$  für PEEP-beatmete Tiere unter Alveofact-Applikation im Vergleich zur rSP-C-behandelten Tieren, konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden ( $p < 0,001$ , s. Tab. 2, Abb. 2, Abb. 3).

Die Beatmung mit PEEP erhöhte signifikant das AZV ( $p < 0,01$ , Tab. 2). Die Stärke dieses Effektes variierte zwischen den Gruppen und war in der Gruppe der Kochsalz-Kontrollgruppe am stärksten.



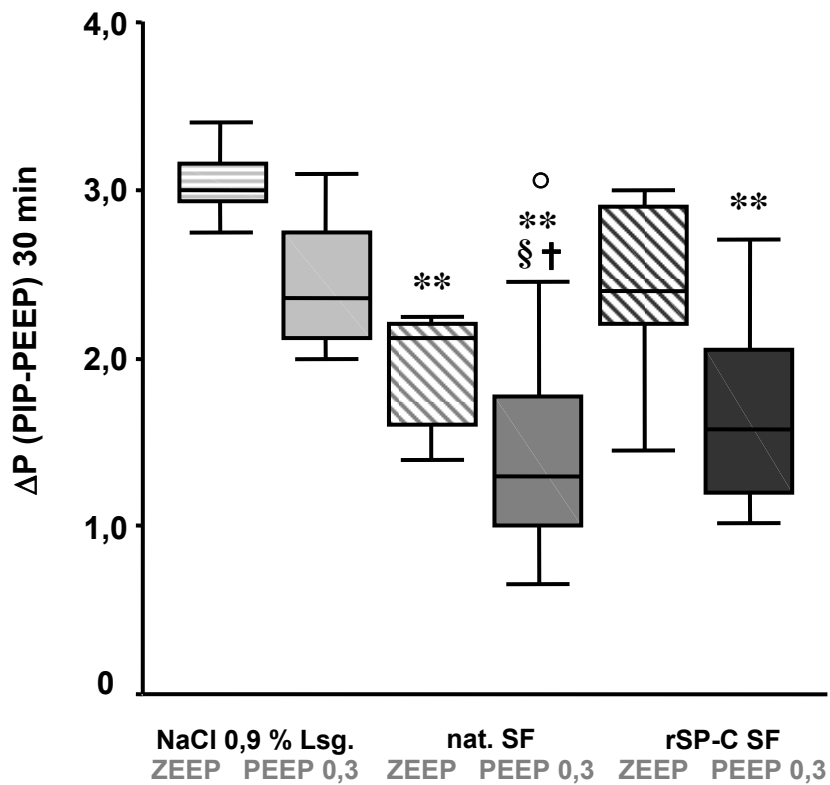
**Abb. 2**

$C_{dyn}$  in den verschiedenen Versuchsgruppen nach Beatmung für 30 Minuten

\*\*  $p < 0,001$  vs. NaCl 0,9 % Lsg. ZEEP

Kennzeichnung eines Ausreißerwerts (○)

PEEP angegeben in kPa



**Abb. 3**

ΔP in den verschiedenen Versuchsgruppen nach Beatmung für 30 min.

Kennzeichnung eines Ausreißerwerts (○).

\*\* p < 0,001 vs. NaCl 0,9 % Lsg. ZEEP

§ p < 0,001 vs. NaCl 0,9 % Lsg. PEEP 0,3

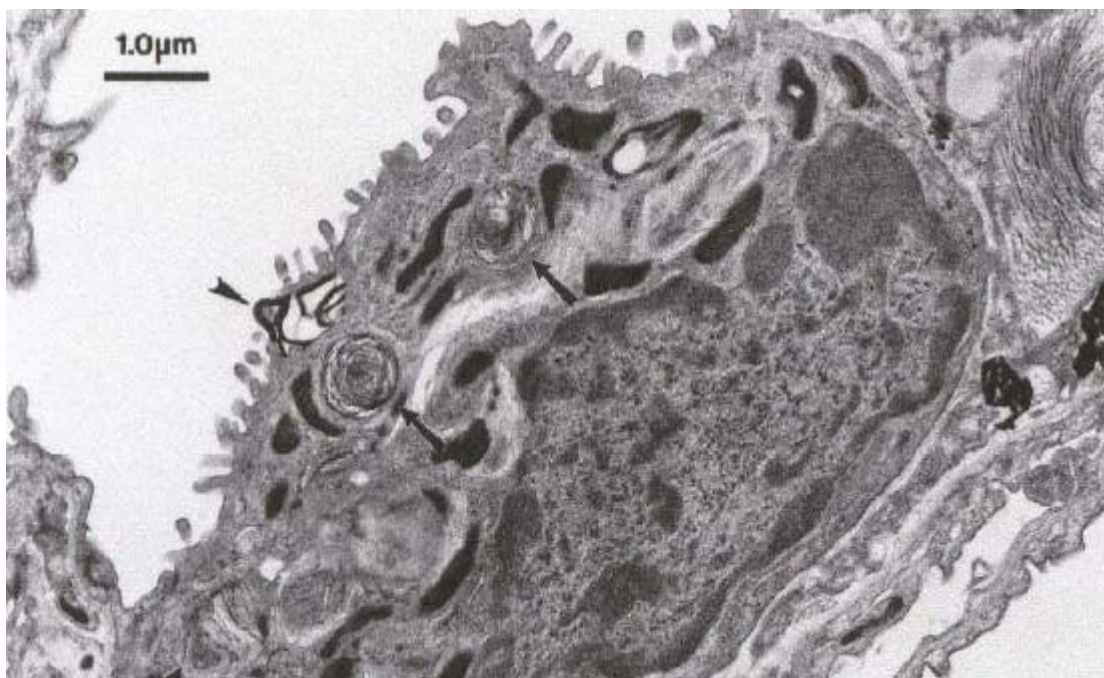
† p < 0,001 vs. rSP-C PEEP 0,3

PEEP angegeben in kPa

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Effekt eines natürlichen und eines rekombinanten SF-Präparates auf die endogene Surfactantproduktion unter Beatmung mit verschiedenen PEEP-Niveaus

Das SF wird von Typ-II-Pneumozyten in das Lumen der Alveolen sezerniert. Vom Entstehungsort, dem endoplasmatischen Retikulum, wird es über den Golgi-Apparat in die multivesikulären Körperchen (multivesicular bodies), transportiert [14] und schließlich in Form von Lamellar-Körperchen (lamellar bodies), zwiebelschalenförmig angeordneten Phospholipid-Bilayern, gespeichert [15] (Abb. 6.).

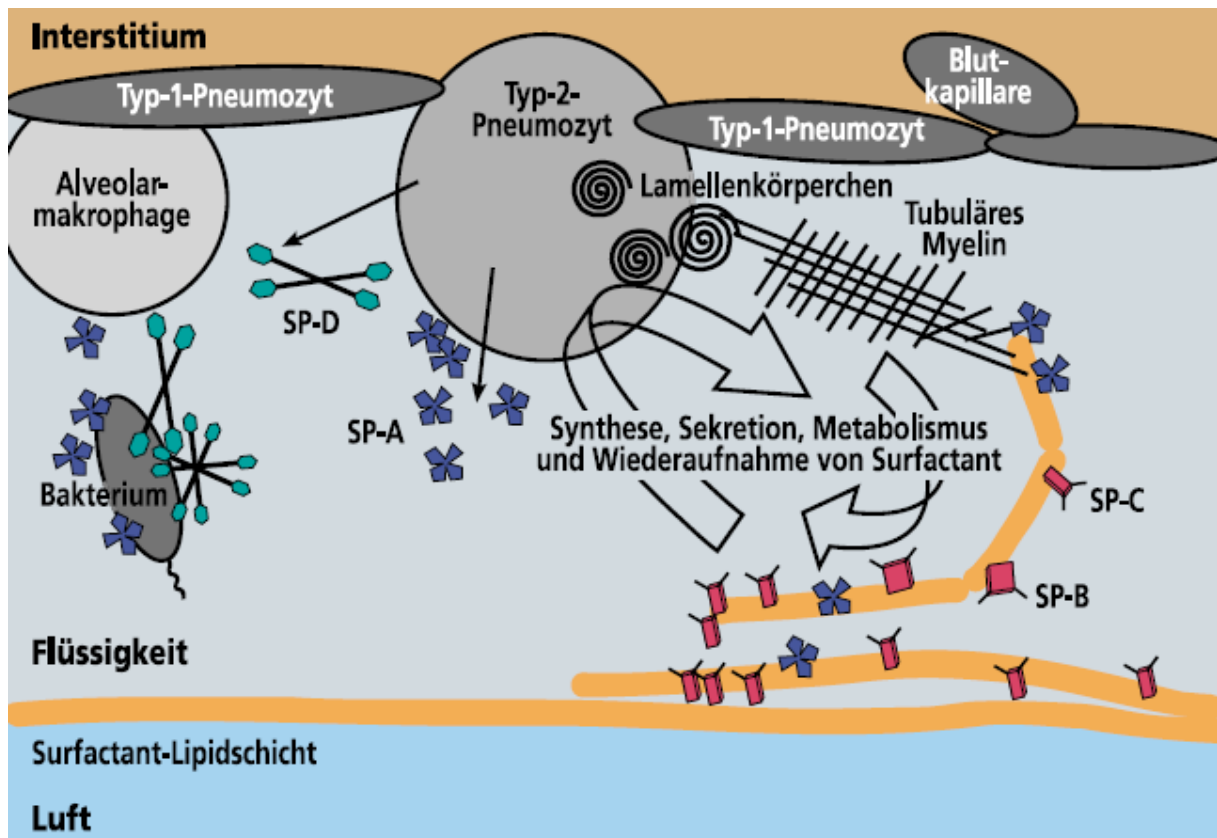


**Abb. 6**

Lamellar bodies: Die langen Pfeile markieren die Doppelschichtstrukturen der lamellar bodies, die als intrazelluläre Speicherform des SF (kurzer Pfeil) vor der Sekretion dienen

Nachdem das SF durch Exozytose in die Hypophase, den Flüssigkeitsraum an der zum Luftraum gewandten Seite der Alveole, sezerniert wurde, wandelt es sich in seine erste extrazelluläre Form, das tubuläre Myelin („tubular myelin“) um [16]. Schon das tubuläre Myelin ist biophysikalisch hoch aktiv und gilt als Präkursor- und Speicherfraktion des Grenzflächenfilms der Lunge [17], s. Abb. 7.





**Abb. 7**

Schematische Darstellung des SF-Metabolismus

70-90 % des SF wird von Typ-II-Pneumozyten endozytotisch aufgenommen und wiederverwertet. Weiterhin wird SF durch Alveolarmakrophagen eliminiert ( $\approx 10-15\%$ ) [28], ein geringer Teil wird entlang der Atemwege abtransportiert ( $\approx 2-3\%$ ) [29].

Das Gleichgewicht zwischen Neuproduktion von SF und Recycling nach Wiederaufnahme wird als „balancierte Clearance“ bezeichnet [22; 23; 24; 25; 26; 27; 28].

Der überwiegende Anteil des SF-Gemischs besteht aus Lipiden (85-90 %), die sich wiederum in Phospholipide (80-90 %) und Neutrale Lipide (10-20 %) aufteilen [2]. Unter den Phospholipiden dominiert Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) vor Phosphatidylglycerol. Die Phospholipide sind hauptsächlich für die oberflächenspannungsreduzierende Wirkung des SF-Monolayers verantwortlich.

10-15 % der Surfactanttrockenmasse besteht aus Proteinen. Bei 50 % der Proteine handelt es sich um surfactantassoziierte Proteine (SP), die in der Klassifikation nach Possmayer in vier Klassen eingeteilt werden: SP-A (35 kDa), SP-B (7 kDa), SP-C (5 kDa), SP-D (43 kDa) [10]. In der Aufgliederung der Gesamtsurfactanttrockenmasse befinden sich anteilig 3-4 % SP-A, jeweils 2 % SP-B und SP-C und 0,1-0,3 % SP-D. SP-A und SP-D sind hydrophile Moleküle, SP-B und SP-C haben, wie oben beschrieben, stark hydrophoben Charakter [11].

Das hydrophile SP-A kann als ein Faktor der lokalen Immunität der Lunge angesehen werden. Es ist beteiligt bei der Adsorption von Phospholipiden an der Luft-Wasser-Interphase und hat eine regulatorische Rolle bei den oberflächenaktiven Eigenschaften des SF und moduliert die sekretorische Aktivität von Typ-II-Pneumozyten. SP-D ist ein hydrophiles Protein, dessen Funktion im Organismus derzeit noch Gegenstand kontroverser Diskussion ist. Eine wesentliche Rolle in Bezug auf die oberflächenaktive Wirkung des SF-Films wird derzeit verneint.

Demgegenüber haben die hydrophoben SF-Proteine B und C in erster Linie entscheidenden Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften des Surfactant. SP-B wird von Typ-II-Pneumozyten und Clara-Zellen, aber auch von Zellen des Gastrointestinaltrakts und der Tuba auditiva im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und im Golgi-Apparat glykosyliert. Nach proteolytischer Spaltung zum murenen Protein wird SP-B in Lamellar-Körperchen gespeichert und assoziiert nach seiner Freisetzung mit dem Phospholipidfilm, sowie SP-C.

DPPC ist der Lipidanteil des SF-Films der hauptsächlich für die oberflächenspannungsreduzierende Wirkung des SF-Monolayers verantwortlich gemacht wird. Es werden zwei SP-B-abhängige Mechanismen diskutiert, die an der Anreicherung der Luft-Wasser-Interphase mit DPPC beteiligt zu sein scheinen:

- a) Die selektive Adsorption von DPPC-reichen Domänen in der Inspirationsphase durch Interaktion mit SP-A und SP-B [34; 35].
- b) Die selektive Extraktion von nicht-DPPC-Lipiden aus dem SF-Layer durch SP-B und SP-C in der Expirationsphase [36; 37; 38; 39; 40].

SP-B ist beteiligt bei der Wiederaufnahme von SF durch Typ-II-Pneumozyten und bei der Verbindung und Fusion von Membranen. Es schützt den SF-Film vor der Deaktivierung durch Serum-Proteine [30; 41; 42; 43; 44; 45; 46].

SP-B ist mit SP-A essentieller Faktor bei der Ausbildung von tubulärem Myelin [6; 47; 48]. Es ist das einzige SF-assoziierte Protein, das für die postnatale Anpassung der Lunge von vitaler Bedeutung ist. Dies zeigt sich an den Konsequenzen des absoluten SP-B Mangels:

Durch eine Mutation im SP-Gen wird bei der „kongenitalen alveolaren Proteinose“ das aberrante SP-B-Gen zwar transkribiert, die entstehende mRNA ist jedoch so instabil, dass sie zu bis zu 92 % vor der effektiven Translation abgebaut wird [50]. Die klinische Folge ist eine auch durch Zugabe von exogenem SF nicht beherrschbare respiratorische Insuffizienz, deren

radiologischer Befund dem RDS ähnelt. Fehlt endogenes SP-B völlig, kommt es zu einer gestörten Prozessierung des SP-C Präkursorproteins [97].

Laut Johansson et al. ist SP-C das einzige Surfactantprotein, das bisher ausschließlich im Lungengewebe nachgewiesen werden konnte, während die anderen SP auch in anderen Organen anzutreffen sind [11]. Die intrazelluläre Prozessierung von Pro-SP-C zu SP-C ist ein SP-B-abhängiger Prozess. SP-C reguliert zusammen mit SP-B den Einbau von DPPC in die Luft-Wasser-Interphase (s. o.). Ebenso wie für SP-B konnte man auch bei SP-C eine protektive Potenz gegenüber der SF-inaktivierenden Wirkung von Serum-Proteinen zeigen [51].

Nogee et al. konnten zeigen, dass eine „splice-site-Mutation“ im SP-C-Gen zu chronisch interstitieller Lungenkrankheit führt [53], was einen Zusammenhang zwischen SP-C-Defizienz und eher chronischen als akuten Lungenkrankheiten nahe legt.

Beim Menschen führen Aberrationen im SP-C-Gen wie im Mausmodell zu interstitieller Lungenerkrankung bzw. zur Produktion eines abnormen SP-C [52]. Dabei entsprechen die histologischen Befunde beim Menschen mit interstitieller Fibrose, dem Verlust von alveolärer Oberfläche, vermehrten Rundzellularinfiltraten und vaskulärem Remodeling denen im Mausmodell [52].

Ausgehend davon, dass exogen applizierte Surfactantpräparate die biophysikalischen Eigenschaften der Lunge nachhaltig und damit die Integrität der SF-produzierenden Systeme (v. a. Typ-II-Pneumozyt) beeinflussen, vermuteten wir eine Wirkung auf den endogenen SF-Metabolismus. Darum wurde die mRNA Expression von SP-B und SP-C in Lungenhomogenat nach 30 min Beatmungszeit bestimmt. Im vorliegenden Modell kam es aber weder nach der Applikation des rSP-C basierten Surfactantpräparats noch nach der Anwendung des natürlichen, bovines Präparats zu einer statistisch signifikanten Beeinflussung der SP-B oder -C Expression. Amato et al. hatten in einem in vitro Modell mit radioaktiv markierten Stoffwechselmetaboliten gezeigt, dass ein natürliches bovines SF-Präparat und eine synthetische, proteinfreie SF-Mischung die Aufnahme der markierten Metaboliten und damit die Leistungsfähigkeit der pulmonalen SF-Synthese im Modell beeinflussen können. Trotzdem blieb auch in diesem Modell die SF mRNA-Synthese unbeeinflusst (hier für SP-A, SP-B und SP-C) [109]. Ein Grund für die ausbleibende Expressionsänderung kann in der Beatmungszeit von 30 Minuten liegen, die als Reiz für eine Steigerung der SF-Produktion zu kurz gewesen sein könnte. Alternativ wäre denkbar, dass die

metabolische Schädigung, v. a. der Typ-II-Pneumozyten so ausgedehnt war, dass eine Hochregulation der endogenen SF-Produktion nicht mehr erfolgen konnte.

Weitere Studien mit längerer Beatmungszeit könnten hier weiterführende Ergebnisse bringen.

Bezüglich der mRNA Expression von hydrophoben SF-assoziierten Proteinen ist die vorliegende Arbeit nach unserer Kenntnis die erste, die eine Veränderung der mRNA Expression von SP-C infolge einer Beatmung mit PEEP (0,3 kPa) unabhängig vom gewählten SF-Regime zeigen konnte. Die gesteigerte SP-C mRNA Expression könnte eine verbesserte Integrität der Typ-II-Pneumozyten (einer der wesentlichen Synthesorte für SP-C) unter PEEP-gestützter Beatmung widerspiegeln. In Übereinstimmung mit unserer Beobachtung zeigten vorangegangene Studien unter Beatmung mit PEEP eine Senkung des Verlusts an großen SF-Aggregaten und Gesamt-Alveolar-Surfactant [109]. Weiterhin kann die Stabilisation der Alveoli durch PEEP das beatmungsbedingte Lungentrauma reduzieren, welches sowohl die Oberflächenaktivität des SF-Films, als auch dessen Oberflächenstruktur beeinflusst [111; 112].

Die Tatsache, dass die Steigerung der mRNA Expression von SP-C (deren Einschränkung mit schweren akuten und chronischen Lungenkrankheiten assoziiert ist) bei der Beatmung mit PEEP gegenüber ZEEP in der Gruppe der kochsalzbehandelten Tiere am größten war, könnte den protektiven Effekt der Beatmung mit PEEP auf die pulmonale alveoläre Struktur widerspiegeln.

Da für verschiedene SF-Regimes schon auf mRNA-Ebene für SP-B keine signifikanten Veränderungen in der Transkriptionsrate gezeigt werden konnten, war hier, zumindest auf Basis einer de novo-Synthese, ein signifikanter Einfluss auf Proteinebene nicht zu erwarten.

Für die unter der Beatmung mit positivem endexpiratorischem Druck nachgewiesene, signifikant erhöhte Transkriptionsrate für SP-C-mRNA gegenüber Beatmung mit ZEEP konnte auf Proteinebene kein Korrelat gezeigt werden, da nur die Konzentration von SP-B im Lungenhomogenat untersucht wurde. Weitere Studien mit längeren Beatmungszeiträumen und Untersuchung des SF-Metabolismus auf mRNA- und Proteinebene für SP-B und SP-C erscheinen sinnvoll.

## 5.2 Effekt eines natürlichen und eines rekombinanten SF-Präparates auf die Lungenstruktur unter Beatmung mit verschiedenen PEEP-Niveaus

Trotz der signifikanten Verbesserung der Lungenfunktionsparameter in der vorliegenden Studie, konnten wir nach 30 min Beatmung kein statistisch signifikantes histologisches Korrelat zeigen: Alveolar count und Alveolarsepten-Dicke unterschieden sich zwischen den Surfactant-Gruppen nicht signifikant. Unter Berücksichtigung der relativ kurzen Beatmungszeit kann angenommen werden, dass, insbesondere angesichts der erzielten Lungenfunktionswerte, nach einer längeren Beatmungszeit histologische Effekte hätten gezeigt werden können. Hieraus hätte möglicherweise ein protektiver Einfluss der SF-Therapie auf das Lungengewebe gegenüber einem möglichen Ventilationstrauma abgeleitet werden können.

Zur Interpretation der Ergebnisse muss generell die vorher definierte Beatmungsdauer von nur 30 min berücksichtigt werden. Sie bot einerseits die Möglichkeit klinisch wichtige Früheffekte der SF-Therapie abzuleiten, macht aber andererseits zur Beurteilung von Langzeiteffekten, insbesondere in Bezug auf histologische Veränderungen und den SF-Metabolismus, weitere Studien erforderlich. Auf diese Weise könnten in vitro erzielte Studienergebnisse, die 24 h nach SF-Gabe keine verstärkte mRNA Expression zeigen konnten, weiter beleuchtet und hinterfragt werden [108].

Als Standardverfahren in der klinischen Behandlung Frühgeborener untersuchten wir die Beatmung mit PEEP in Bezug auf ihren Einfluss auf die Lungenstruktur: Die Ergebnisse des Alveolar count unter PEEP zeigten ein signifikant verbessertes alveoläres Recruitment durch diese Ventilationsstrategie (Median  $43,8 \pm 7,4$ /Feld im Vergleich zu ZEEP  $36,6 \pm 5,3$ /Feld;  $p < 0,02$ ). Trotzdem konnte in der vorliegenden Studie innerhalb des Beobachtungszeitraumes unter PEEP keine weitere Verbesserung der histologischen Parameter unter zusätzlicher SF-Applikation gezeigt werden, obwohl der o. g. positive Einfluss auf die Lungenfunktionsparameter erzielt werden konnte. Die Alveolarsepten-Dicke unterschied sich weder zwischen den Beatmungsregimes (Alveolarsepten-Dicke unter PEEP im Median  $7,4 \pm 2,6$ /Feld vs.  $6,4 \pm 1,1$ /Feld ohne PEEP), noch zwischen den SF- oder Kontrollgruppen signifikant. Trotzdem besteht Grund zu der Annahme, dass histologische Langzeiteffekte durch die verbesserten Beatmungsparameter, wie signifikant reduziertes  $\Delta P$  oder erhöhte Lungen-Compliance, bei längerem Beobachtungszeitraum die Folge wären. Weitere Studien mit längerer Beatmungszeit erscheinen auch aus diesem Gesichtspunkt sinnvoll.

### 5.3 Effekt eines natürlichen und eines rekombinanten SF-Präparates auf die Lungenfunktion unter Beatmung mit verschiedenen PEEP-Niveaus

Seit den Untersuchungen von Avery und Mead ist bekannt, dass die Ursache des RDS in einem Mangel an oberflächenaktiven Substanzen besteht [55]. Heute weiß man, dass die Auskleidung der Alveolen mit SF die Grundlage für den physiologischen Atemvorgang ist. Fehlt SF, so sind alveoläre Atelektasen, eine Abnahme der pulmonalen Compliance und eine verminderte funktionelle Residualkapazität die Folge. Die resultierenden Gasaustauschstörungen führen zu einem erhöhten intrapulmonalen Shuntfluss mit konsekutiver Verschlechterung der Oxygenierung des Blutes. Als Folge der hypoxischen Stoffwechsellage findet eine Vasokonstriktion der Lungenstrombahn statt, die den pulmonalen Strömungswiderstand erhöht, die Perfusion der Lunge stört und zu einer Erhöhung der rechtsventrikulären Nachlast führt. Die durch pathophysiologische Lungenmechanik, Hypoxie und Hypoperfusion geschädigte alveolokapilläre Membran wird durchlässig für plasmaproteinreiche Flüssigkeit („protein-leakage“, v. a. Fibrinogen und Fibrin) zunächst in das Interstitium. Der Einstrom von Plasmaproteinen in den Alveolarraum im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung führt zur Inaktivierung des im Rahmen des RDS vorgeschädigten SF-Films. Auf diese Weise erhöht sich die Oberflächenspannung der Alveole weiterhin, ein *circulus vitiosus* ist in Gang gekommen. Die „hyalinen Membranen“, die sich auf der Innenseite der Alveolen aus dem proteinreichen Exsudat bilden, gaben der Erkrankung in den 60er und 70er Jahren den Namen „Hyaline Membranen Krankheit“ [56]. Die negative Beeinflussung der Lungenmechanik im Rahmen des RDS (Abnahme von Compliance, funktioneller Residualkapazität und Vitalkapazität) resultiert beim beatmeten Patienten in einer Zunahme der Beatmungsinvasivität: Im Rahmen der IPPV-Beatmung sinkt das erzielbare AZV, bzw. der aufzuwendende Beatmungsdruck steigt.

Zur Behandlung des RDS liegt mit der intratrachealen Applikation eines exogenen SF ein etablierter Standard zur Therapie des RDS vor [76; 108]. Wie einleitend erwähnt, herrscht in Hinsicht auf das ideale SF noch Uneinigkeit [75; 76; 77]. Die Vorteile rekombinanter Präparate liegen in unbegrenzter industrieller Verfügbarkeit, gleich bleibender Wirkstoffkonzentration, höherer Sicherheit in Bezug auf Allergene und Krankheitserreger und der größeren Toleranz gegenüber Inaktivierung. Bekannte Nachteile liegen in der noch geringeren Dosisdichte und im derzeit noch hohen Preis. Ein experimenteller Vergleich der Wirksamkeit unter verschiedenen Anwendungsbedingungen ist also zu fordern. Frühere Studien am Tiermodell für das Lungenversagen des Frühgeborenen haben die Wirksamkeit

rSP-C-basierter Surfactantpräparate im Vergleich zu natürlichem Schaf-Surfactant untersucht, das sich allerdings nicht in der klinischen Anwendung befindet [113]. In dieser Arbeit verglichen wir ein rSP-C-basierendes Präparat (Venticute) mit einem bovinen Präparat aus der klinischen Routine bei RDS (Alveofact).

Durch eine Beatmung mit positivem endexpiratorischem Druck (PEEP) kann den negativen biomechanischen Auswirkungen des RDS entgegengewirkt werden: Der erhöhte Atemwegsdruck in der Endexpiration verhindert, dass sich das System Lunge unterhalb des unteren „Inflection-Point“ der pulmonalen Compliance-Kurve retrahieren kann. Somit sinkt der aufzuwendende Beatmungsdruck vor allem am Beginn der Inspiration. Dies bedeutet weniger Scherkräfte, sowie eine Stabilisierung der Atemwege in der Expiration. Des Weiteren kann auf diese Weise der Kollaps der surfactantdefizienten Alveole vermieden werden, bzw. kollabierte Alveolen werden wiedereröffnet (verstärktes alveoläres Recruitment). Der positive Effekt der Beatmung mit PEEP auf die Beatmungsparameter konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden (s. Tab. 2). Wie oben erwähnt kann die Beatmung mit PEEP aber insbesondere beim extrem Frühgeborenen schwere Nebenwirkungen haben. Ein ideales SF-Präparat wäre also auch bei Beatmung mit geringem PEEP in der Lage, die volle unterstützende Wirkung auf die Lungenfunktion zu entfalten.

Mit dem auf rSP-C basierenden SF-Präparat konnten dynamische Compliance ( $C_{dyn}$ ),  $\Delta P$  und AZV deutlich verbessert werden. Unter Beatmung mit PEEP war das rSP-C Präparat einem bovinen Präparat aus Lungenlavage in Hinsicht auf die Lungenfunktionsparameter leistungsäquivalent und konnte im Vergleich zu ZEEP-beatmeten Kontrolltieren die  $C_{dyn}$  signifikant erhöhen, sowie  $\Delta P$  signifikant senken ( $p < 0,001$ ). In Hinsicht auf das benötigte  $\Delta P$  war natürliches SF unter PEEP dem rekombinanten Präparat signifikant überlegen ( $p < 0,001$ ).

Bei der Beatmung ohne positiven endexpiratorischen Druck konnte das bovine Präparat AZV und  $C_{dyn}$  steigern, sowie  $\Delta P$  signifikant gegenüber ZEEP beatmeten Kontrolltieren senken ( $p < 0,001$ ). Das rekombinante Präparat zeigte diese Effekte nur in geringerer, nicht signifikanter Ausprägung.

Hieraus kann geschlossen werden, dass im vorliegenden Modell des akuten Lungenversagens die Wirksamkeit eines auf rSP-C basierenden SF-Präparats durch die Beatmung mit PEEP gesteigert, bzw. stabilisiert wird. Im Rahmen des Modells kann rSP-C-basiertes Surfactant die Lungenfunktion verbessern, wenn eine Beatmung unter PEEP erfolgt. In Hinblick auf die

positiven und negativen Eigenschaften einer Beatmung mit PEEP, die für die Therapie mit rSP-C-Präparaten unerlässlich scheint, sollten weitere Vergleichsstudien zwischen Zweit- und Drittgenerationspräparaten unter verschiedenen PEEP-Niveaus erfolgen, um die Strategien in der Therapie des RDS weiter zu optimieren.



## 6. AUSBLICK

Es wurde gezeigt, dass ein synthetisches SF-Präparat im Modell für RDS unter Beatmung mit PEEP in Bezug auf die untersuchten Variablen einen vergleichbaren therapeutischen Effekt hatte wie ein natürliches SF-Präparat der zweiten Generation. Weitere Studien, v. a. mit Focus auf die Anwendung verschiedener positiver endexpiratorischer Drücke werden nötig sein, unsere Ergebnisse nun zu untermauern. Darüber hinaus bieten neue Darreichungsformen (ENSURE, SF-Inhalation) Chancen für eine noch effektivere und schonendere Anwendung von SF-Präparaten.

Die erfolgreiche Anwendung eines quasi unbeschränkt synthetisch produzierbaren Präparates, das sich sicher an der Luft-Wasser-Interphase der Lunge anreichert, macht darüber hinaus weitere Anwendungen des untersuchten Präparates, z. B. als Carrier für andere Medikamente denkbar. Taut et al. konnten zeigen, dass ein rekombinantes SF-Präparat bei Patienten mit Atemnotsyndrom des Erwachsenen (ARDS), die als Auslöser eine Aspiration oder primäre Pneumonie hatten, sowohl bezüglich der Mortalität, als auch der Oxygenierung wirksam war [82]. Würde man das SF-Präparat z. B. zusätzlich mit einem lokal wirksamen Antibiotikum beladen, könnten sich gute synergistische Effekte erzielen lassen.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss eines rekombinanten SP-C-Präparates auf Lungenfunktion, endogene Surfactantproduktion auf mRNA- und Proteinebene, sowie auf die Lungenhistologie in einem Tierversuch für das neonatale RDS bei Beatmung mit und ohne PEEP untersucht. Frühgeborene Kaninchen wurden in Gruppen für Applikation eines bovinen Präparats (Alveofact, beinhaltet SP-B und SP-C), eines rekombinanten SP-C-Präparats (Venticute) und von isotoner Kochsalzlösung randomisiert. Es erfolgte 30minütige Beatmung entweder mit oder ohne PEEP (0,3 kPa).

Die Lungenfunktion konnte sowohl unter Anwendung des rekombinanten Präparats als auch unter bovinem SF verbessert werden. Hierbei waren die Effekte, die unter rSP-C erzielt werden konnten, abhängig von der Beatmung mit PEEP.

Die Beatmung mit PEEP führte zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von endogenem SP-C. Weiterhin steigerte PEEP-Beatmung histologisch die Anzahl offener Alveolen.

Für die Konzentration maturen SP-B in Lungenhomogenat konnte weder unter den verschiedenen Beatmungsbedingungen, noch für die verschiedenen SF-Präparate ein signifikanter Einfluss gezeigt werden.

Das rekombinante SP-C war im vorliegenden Tiermodell zuverlässig effektiv, wenn mit PEEP beatmet wurde.

Die gesteigerte Anzahl offener Alveolen und der erhöhte Metabolismus für SP-C auf mRNA-Ebene unter der Beatmung mit PEEP kann als Hinweis für den lungenprotektiven Effekt dieser Beatmungsform im Rahmen des neonatalen RDS gesehen werden.

## 8. SUMMARY

The impact of administration of a recombinant SP-C preparation on lung function, endogenous surfactant-metabolism (on mRNA and protein level) as well as on histological patterns of the lung was investigated in an animal experiment for neonatal RDS applying different levels of positive end-expiratory pressure.

Preterm rabbits were randomised in three different groups for intra-tracheal application of either Alveofact (bovine SF-preparation, containing both, SP-B and SP-C), Venticute (recombinant SP-C preparation) or sterile saline (controls). Animals were ventilated for a 30 minute period with either 0.3 kPa or without PEEP.

Lung function improved after treatment with rSP-C and natural surfactant with the effect of rSP-C being dependent on the presence of PEEP. Ventilation with PEEP resulted in a significant elevation of the expression of endogenous SP-C mRNA. In addition PEEP led to a significant enhancement of alveolar count in lung histology.

In lung homogenate no elevation of mature SP-B could be shown, neither for different ventilation strategies, nor for one of the SF preparations (ELISA).

In an animal model of primary surfactant deficiency intra-tracheal administration of rSP-C was effective, when PEEP was applied. The impact of PEEP ventilation on histological variables and SP mRNA expression may reflect its lung-protective effects.

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Schmidt RF, Thews G, Lang F**  
„Physiologie des Menschen“  
28. Auflage, Springer, 2000: 565-569
  
2. **Creuwels LAJM, van Golde LMG, Haagsman HP**  
„The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects“  
Lung, 1997, 175: 1-39
  
3. **Golenhofen K**  
„Physiologie heute“  
2. Auflage, Urban & Fischer 1997: 275-276
  
4. **von Neegaard K**  
„Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik“  
Gesamte Exp Med, 1929, 66: 373-394
  
5. **Klaus MH, Clements JA, Havel RJ**  
„Composition of surface-active material isolated from beef lung“  
Proc Natl Acad Sci USA, 1961, 47: 1858-1859
  
6. **King RJ, Klass DJ, Gikas EG, Clements JA**  
„Isolation of apoproteins from canine surface active material“  
Am J Physiol, 1973, 224: 788-795
  
7. **van Iwaarden JF, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, van Golde LMG**  
„Pulmonary surfactant protein A enhances the host defence mechanism of rat alveolar macrophages“  
Am J Respir Cell Mol Biol, 1990, 2: 91-98

8. **Pison U, Max M, Neuendank A, Weissbach S, Pietschmann S**  
„Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence for ‘non-surfactant’ functions of the surfactant system“  
Eur J Clin Invest, 1994, 24: 586-599
  
9. **Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsman KM, Ikegami M, Jobe AH, Wert SE, Stripp BR, Morris RE, Glasser SW, Bachurski CJ, Iwamoto HS, Whitsett JA**  
„Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice“  
Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 9594-9599
  
10. **Possmayer F**  
„A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins“  
Am Rev Respir Dis, 1988, 138: 990-998
  
11. **Johansson J, Curstedt T**  
„Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components“  
Eur J Biochem, 1997, 244: 675-693
  
12. **Polin RA, Fox WW**  
„Fetal and neonatal physiology“  
Elsevier, 1997, 1275-1283
  
13. **Nogee LM**  
„Genetics of the hydrophobic surfactant proteins“  
Bioch et Bioph Acta, 1998, 1408: 323-333
  
14. **Voorhout WF, Weaver TE, Haagsman HP, Geuze HJ, van Golde LM**  
„Biosynthetic routing of pulmonary surfactant proteins in alveolar type II cells“  
Microscopy Research and Technique, 1993, 26: 366-373
  
15. **Wright JR, Clements JA**  
„Metabolism and turnover of lung surfactant“  
Am Rev Respir Dis, 1987, 136: 426-444

**16. Rooney SA, Young SL, Mendelson CR**

„Molecular and cellular processing of lung surfactant“

FASEB, 1994, J 8: 957-967

**17. Hawgood S**

„Pulmonary surfactant apoproteins: a review of protein and genomic structure“

Am J Physiol, 1989, 257: L13-22

**18. Nag K, Munro JG, Hearn SA, Rasmusson J, Petersen NO, Possmayer F**

„Correlated atomic force and transmission electron microscopy of nanotubular structures in pulmonary surfactant“,

J Struct Biol, 1999, 126: 1-15

**19. Lewis JF, Ikegami M, Jobe AH**

„Metabolism exogenously administered in the acutely injured lungs of adult rabbits“

Am Rev Respir Dis, 1992, 147: 19-23

**20. Higuchi R, Lewis J, Ikegami M**

„In vitro conversion of surfactant subtypes is altered in alveolar surfactant isolated from injured lungs“

Am Rev Respir Dis, 1992, 145: 1416-1420

**21. Ikegami M, Jobe A, Yamada T, Priestly A, Ruffini L, Rider E, Seidner S**

„Surfactant metabolism in surfactant-treated preterm ventilated lambs“

J Appl Physiol, 1989 67(1): 429-437

**22. Young SL, Wright RJ, Clements JA**

„Cellular uptake and processing of surfactant lipids and apoprotein SP-A by rat lung“

J Appl Physiol, 1989, 66: 1336-1342

23. **Griese M, Gobran LI, Rooney SA**  
„Surfactant lipid uptake and secretion in type II cells in response to lectins and secretagogues“  
Am J Physiol, 1991, 261: L434-442
24. **Bates SR, Beers MF, Fisher AB**  
„Binding and uptake of surfactant protein B by alveolar type II cells“  
Am J Physiol, 1992, 263: L333-341
25. **Breslin JS, Weaver TE**  
„Binding, uptake and localisation of surfactant protein B in isolated rat alveolar type II cells“  
Am J Physiol, 1992, 262: L699-707
26. **Baritussio A, Pettenazzo A, Benevento M, Alberti A, Gamba P**  
„Surfactant protein C is recycled from the alveoli to the lamellar bodies“  
Am J Physiol, 1992, 263: L607-611
27. **Rice WR, Sarin VK, Fox JL, Baatz J, Wert S, Whitsett JA**  
„Surfactant peptides stimulate uptake of phosphatidylcholine by isolated cells“  
Biochem Biophys Acta, 1989, 1006: 237-245
28. **Rider ED, Ikegami M, Jobe A**  
„Localisation of alveolar surfactant clearance in rabbit lung cells“  
Am J Physiol, 1992, 263: L201-209
29. **Pettenazzo A, Jobe A, Humme J, Seidner S, Ikegami M**  
„Clearance of phosphatidylcholine via the upper airways in rabbits“  
J Appl Physiol, 1988, 65(5): 2151-2155
30. **Veldhuizen EJA, Haagsman HP**  
„Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics“  
Biochim Biophys Acta, 2000, 1467: 255-270

31. **Palaniyar N, Ridsdale RA, Hearn SA, Possmayer F, Harauz G**  
„Formation of membrane lattice structures and their specific interactions with surfactant protein A“  
Am J Physiol, 1999, Apr;276(4 Pt 1):L642-9
32. **Nogee LM**  
„Genetics of the hydrophobic surfactant proteins“  
Biochim Biophys Acta, 1998, 1408: 323-333
33. **Weaver TE**  
„Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C“  
Biochim Biophys Acta, 1998, 1408: 173-179
34. **Schurch S, Possmayer F, Cheng S, Cockshutt AM**  
„Pulmonary SP-A enhances adsorption and appears to induce surface sorting of lipid extract surfactant“  
Am J Physiol, 1992, 263: 210-218
35. **Veldhuizen EJ, Batenburg JJ, van Golde LM, Haagsman HP**  
„The role of surfactant proteins in DPPC enrichment of surface films“  
Biophys J, 2000, 79: 164-171
36. **Nag K, Tavena SG, Perez-Gil J, Cruz A, Keough K**  
„Combinations of fluorescently labeled pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C in phospholipid films“  
Biophys J, 1997, 72: 2638-2650
37. **Pastrana-Rios B, Flach CR, Brauner JW, Mautone AJ, Mendelsohn R**  
„A direct test of the „squeeze-out“ hypothesis of lung surfactant function. External reflection FT-IR at the air/water interface“  
Biochemistry, 1994, 33: 5121-5127



38. **von Nahmen A, Post A, Galla HJ, Sieber M**  
„The phase behavior of lipid monolayers containing pulmonary surfactant protein C studied by fluorescence light microscopy“  
Eur Biophys J, 1997, 26: 359-369
39. **von Nahmen A, Schenk M, Sieber M, Amrein M**  
„The structure of a model pulmonary surfactant as revealed by scanning force microscopy“  
Biophys J, 1997, 72: 463-469
40. **Veldhuizen EJA, Haagsman HP**  
„Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics“  
Biochim Biophys Acta, 2000, 1467: 255-270
41. **Chang R, Nir S, Poulain FR**  
„Analysis of binding and membrane destabilization of phospholipid membranes by surfactant apoprotein B“  
Biochim Biophys Acta, 1998, 1371: 254-256
42. **Creuwels LA, van Golde LM, Haagsman HP**  
„Surfactant protein B: effects on lipid domain formation and intermembrane lipid flow“  
Biochim Biophys Acta, 1996, 1285: 1-8
43. **Hawgood S, Derrick M, Poulain F**  
„Structure and properties of surfactant protein B“  
Biochim Biophys Act, 1998, 1408: 150-160
44. **Thompson MW**  
„Surfactant protein B deficiency: insights into surfactant function through clinical surfactant protein deficiency“  
Am J Med Sci, 2001, 321: 26-32

45. **Veldhuizen EJA, Haagsman HP**  
„Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics“  
Biochim Biophys Acta, 2000, 1467: 255-270
46. **Whitsett JA, Nogee LM, Weaver TE, Horowitz AD**  
„Human surfactant protein B: structure, function, regulation and disease“  
Physiol Rev, 1995, 75: 749-757
47. **deMello DE, Heyman S, Phelps DS, Hamvas A, Nogee L, Cole S, Colten HR**  
„Ultrastructure of lung in surfactant protein B deficiency“  
Am J Respir Cell Mol Biol, 1994, 11: 230-239
48. **Weaver TE, Beck DC**  
„Use of knockout mice to study surfactant protein structure and function“  
Biol Neonate, 1999, 76: 15-18
49. **Kaser MR, Skouteris GG**  
„Inhibition of bacterial growth by synthetic SP-B1-78 peptides“  
Peptides, 1997, 18: 1441-1444
50. **Beers MF, Hamvas A, Moxley MA, Gonzales LW, Guttentag SH, Solarin KO, Longmore WJ, Nogee LM, Ballard PL**  
„Pulmonary surfactant metabolism in infants lacking surfactant protein B“  
Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 22: 380-391
51. **Amirkhanian JD, Bruni R, Waring AJ, Navar C, Taeusch HW**  
„Full length synthetic surfactant proteins SP-B and SP-C reduce surfactant inactivation by serum“  
Bioch et Bioph Acta, 1993, 1168: 315-320
52. **Amin RS, Wert SE, Baughman RP, Tomashefski JF, Jr., Nogee LM, Brody AS, et al.**  
„Surfactant protein deficiency in familial interstitial lung disease“  
J Pediatr, 2001, 139: 85-92

53. **Nogee LM, Dunbar AE, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA**  
„A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease“  
N Engl J Med, 2001, 344: 573-579
54. **Botas C, Poulain F, Akiyama J, Brown C, Allen L, Goerke J, Clements J, Carlson E, Gillespie AM, Epstein C, Hawgood S**  
„Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D“  
Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 11869-11874
55. **Avery ME, Mead J**  
„Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease“  
Am J Dis Child, 1959, 97: 517-523
56. **Kopelman AE, Mathew GP**  
„Common respiratory disorders of the newborn“  
Ped in Rev, 1995, 16: 209-217
57. **Bancalari E, Abdenour GE, Feller R, Gannon J**  
„Bronchopulmonary dysplasia: clinical presentation“  
J Pediatr, 1979, 95: 819-823
58. **Shennan AT, Dunn MS, Ohlson A, Lennox K, Hoskins EM**  
„Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period“  
Pediatrics, 1988, 82: 527-532
59. **Kopelman AE, Mathew GP**  
„Common respiratory disorders of the newborn“  
Ped in Rev, 1995, 16: 209-217

60. **Robertson PA, Sniderman SH, Laros RK Jr, Cowan R Heilbron D, Goldenberg RL, Iams JD, Creasy RK**  
„Neonatal morbidity according to gestational age and birth weight from five tertiary care centers in the United States, 1983 through 1986“  
Am J Obstet Gynecol, 1992, 166: 1629-1641
61. **Matti P, Pistoia L, Fornale M, Brunn E, Zardini E**  
„Prevalence of RDS in diabetic pregnancy“  
Minerva Ginecol, 1996, 48: 409-413
62. **Dani C, Reali MF, Bertini G, Wiechmann L, Spagnolo A, Tangucci M, Rubaltelli FF**  
„Risk factors for the development of respiratory distress syndrome and transient tachypnoea in newborn infants“  
Eur Respir J, 1999, 14: 155-159
63. **Perelman RH, Palta M, Kirby R, Farrell PM**  
„Discordance between male and female deaths due to the respiratory distress syndrome“  
Pediatrics, 1986, 78: 238-244
64. **Kavvadia V, Greenough A, Dimitriou G, Hooper R**  
„Influence of ethnic origin on respiratory distress syndrome in very premature infants“  
Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 1998, 78: 25-28
65. **Richardson DK, Torday JS**  
„Racial differences in predictive value of the lecithin/sphingomyelin ratio“  
Am J Obstet Gynecol, 1994, 170: 1273-1278
66. **Nagourney BA, Kramer MS, Klebanoff MA, Usher RH**  
„Recurrent respiratory distress syndrome in successive preterm pregnancies“  
J Pediatr, 1994, 129: 591-596

67. **Myriantopoulos NC, Churchill JA, Baszynski AJ**  
„Respiratory distress syndrome in twins“  
Acta Genet Med Gemellol (Roma), 1971, 20: 199-204
68. **Kala P, Ten Have T, Nielsen H, Dunn M, Floros J**  
„Association of pulmonary surfactant protein A (SP-A) gene and respiratory distress syndrome: interaction with SPB“  
Pediatr Res, 1998, 43: 169-177
69. **Rämet M, Haataja R, Marttila R, Floros J, Hallman M**  
„Association between the surfactant protein A (SP-A) gene locus and respiratory distress syndrome in the Finnish population“  
Am J Hum Genet, 2000, 66: 1569-1579
70. **Weber B, Borkhardt A, Stoll-Becker S, Reiss I, Gortner L**  
„Polymorphisms of surfactant protein A genes and the risk of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants“  
Turk J Pediatr, 2000, 42: 181-185
71. **Niessen KH**  
„Pädiatrie“  
Edition Medizin, 1989, 2. Auflage, 74-79
72. **Merritt TA, Hallman M, Bloom BT, Berry C, Benirschke K, Sahn D, Key T, Ewards D, Jarvenpaa AL, Pohjavouri M, Kankaanpaa K, Kunnas M, Paatero H, Rapola J, Jaaskelainen J**  
„Prophylactic treatment of very preterm infants with human surfactant“  
New Engl J Med, 1986, 315: 785-790
73. **Collaborative European Multicenter Study Group**  
„Surfactant replacement therapy for severe neonatal respiratory distress syndrome; an international randomized clinical trial“  
Pediatrics, 1988, 82: 683-691

74. **Hennes HM, Lee MB, Rimm AA, Sharpio DL**  
„Surfactant replacement therapy in respiratory distress syndrome“  
Am J Dis Child, 1991, 145: 102-104
75. **Bernhard W, Mottaghian J, Gebert A, Rau GA, von der Hardt H, Poets CF**  
„Commercial versus native surfactants. Surface activity, molecular components, and the effect of calcium“  
Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162(4 Pt 1): 1524-33
76. **Milligan DW, Ainsworth SB**  
„Animal-derived or synthetic surfactant for the treatment of neonatal respiratory distress syndrome: a review“  
Acta Paediatr Suppl, 2001, 90(436): 25-37
77. **Giannakopoulou C, Hatzidaki E, Korakaki E, Christodoulaki M, Margari KM, Mamoulakis D**  
„Comparative randomized study: administration of natural and synthetic surfactant to premature newborns with respiratory distress syndrome“  
Pediatr Int, 2002, 44(2): 117-21
78. **Takahashi A, Nemoto T, Fujiwara T**  
„Biophysical properties of protein-free, totally synthetic surfactants, ALEC and Exosurf, in comparison with surfactant TA“  
Acta Paediatr Japonica, 1994, 36: 613–8
79. **Corcoran JD, Berggren P, Sun B, Halliday HL, Robertson B, Curstedt T**  
„Comparison of surface properties and physiological effects of a synthetic and natural surfactant in preterm rabbits“  
Arch Dis Child Fetal and Neonatal Edition, 1994, 71: F165–9

80. **Seeger W, Grube C, Gunther A, Schmidt R**  
„Surfactant inhibition by plasma proteins: differential sensitivity of various surfactant preparations“  
Eur Respir J, 1993, 6: 971–7
81. **Rauprich P, Stichtenoth G, Walter G, Johansson J, Robertson B, Herting E**  
„Resistance of new recombinant surfactant preparations to inhibition by meconium“  
Biol Neonate, 1999, 76 Suppl: 42–3
82. **Taut FJ, Rippin G, Schenk P**  
„A Search for subgroups of patients with ARDS who may benefit from surfactant replacement therapy: a pooled analysis of five studies with recombinant surfactant protein-C surfactant (Venticute)“  
Chest, 2008, 134(4): 724-32
83. **Morrison C, Gannon F**  
„The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR“  
Biochim Biophys Acta, 1994, 1219: 493-498
84. **Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R**  
„Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions“  
Biotechnology (NY), 1993, 11: 1026-1030
85. **Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM**  
„Real time quantitative PCR“  
Genome Res, 1996, 6: 986-994
86. **Stryer L, Haugland RP**  
„Energy transfer: a spectroscopic ruler“  
Proc Natl Acad Sci, 1967, 58: 719-726

87. **Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH**  
„Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3'  
exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase“  
Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 7276-7280
88. **Gibson UE, Heid CA, Williams PM**  
„A novel method for real time quantitative RTPCR“  
Genome Res, 1996, 6: 995-1001.
89. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T**  
„Molecular cloning: a laboratory manual“  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 2. Auflage
90. **von der Hardt K, Schoof E, Kandler MA, Dotsch J, Rascher W**  
„Aerosolized perfluorcarbon suppresses early pulmonary inflammatory response in a  
surfactant-depleted piglet model“  
Pediatr Res, 2002, 51:177-182
91. **Lotze A, Mitchell BR, Bulas DI, Zola EM, Shalwitz RA, Gunkel JH**  
„Multicenter study of surfactant (beractant) use in the treatment of term infants with  
severe respiratory failure. Survanta in Term Infants Study Group“  
J Pediatr, 1998, 132: 40-47
92. **Chomzynski P, Sacchi N**  
„Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-  
chloroform extraction“  
Anal Biochem, 1987, 162(1): 156-9
93. **Hilgendorff A, Muth H, Parviz B, Staubitz A, Haberbosch W, Tillmanns H,  
Holschermann H**  
„Statins differ in their ability to block NF-kappaB activation in human blood monocytes“  
Int J Clin Pharmacol Ther, 2003, 41(9): 397-401



94. **Kramer HJ, Schmidt R, Gunther A, Becker G, Suzuki Y, Seeger W**  
„ELISA technique for quantification of surfactant protein B (SP-B) in bronchoalveolar lavage fluid”  
Am J Respir Crit Care Med, 1995, 152(5 Pt 1): 1540-1544
95. **Hilgendorff A, Gortner L**  
„Surfactantproteine SP-B und SP-C: Molikularbiologie und Physiologie”  
Z Geburtsh Neonatol, 2004, 208: 91-97
96. **Epaud R, Ikegami M, Whitsett JA, Jobe AH, Weaver TE, Akinbi HT**  
„Surfactant protein B inhibits endotoxin-induced lung inflammation”  
Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 28: 373-378
97. **Whitsett JA, Weaver TE**  
„Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease”  
N Engl J Med, 2002, 347: 2141-8
98. **Augusto LA, Synguelakis M, Espinassous Q, Lepoivre M, Johansson J, Chaby R**  
„Cellular antiendotoxin activities of lung surfactant protein C in lipid vesicles”  
Am J Respir Crit Care Med, 2003, 168: 335-41
99. **Ramanathan R, Rasmussen MR, Gerstmann DR, Finer N, Sekar K**  
„A randomized, multicenter masked comparison trial of poractant alfa (Curosurf) versus beractant (Survanta) in the treatment of respiratory distress syndrome in preterm infants”  
Am J Perinatol, 2004, 21(3): 109-119
100. **Sarin VK, Gupta S, Leung TK, Taylor VE, Ohning BL, Whitsett JA, Fox JL**  
„Biophysical and biological activity of a synthetic 8.7-kDa hydrophobic pulmonary surfactant protein SP-B”  
Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(7): 2633-2637.

101. **Takei T, Hashimoto Y, Aiba T, Sakai K, Fujiwara T**  
„The surface properties of chemically synthesized peptides analogous to human pulmonary surfactant protein SP-C”  
Biol Pharm Bull, 1996, 19(10): 1247-1253
102. **Hawgood S, Ogawa A, Yukitake K, Schlueter M, Brown C, White T, Buckley D, Lesikar D, Benson B**  
„Lung function in premature rabbits treated with recombinant human surfactant protein-C”  
Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154 (2 Pt 1): 484-490
103. **Johansson J, Nilsson G, Stromberg R, Robertson B, Jornvall H, Curstedt T**  
„Secondary structure and biophysical activity of synthetic analogues of the pulmonary surfactant polypeptide SP-C”  
Biochem J, 1995, 307 (Pt 2): 535-541
104. **Hafner D, Beume R, Kilian U, Krasznai G, Lachmann B**  
„Dose-response comparisons of five lung surfactant factor (LSF) preparations in an animal model of adult respiratory distress syndrome (ARDS)”  
Br J Pharmacol, 1995, 115(3): 451-458
105. **Hilgendorff A, Rawer D, Doerner M, Tutdibi E, Ebsen M, Schmidt R, Guenther A, Gortner L, Reiss I**  
„Synthetic and natural surfactant differentially modulate inflammation after meconium aspiration”  
Intensive Care Med, 2003, 3:3
106. **Ho JJ, Henderson-Smart DJ, Davis PG**  
„Early versus delayed initiation of continuous distending pressure for respiratory distress syndrome in preterm infants”  
Cochrane Database Syst Rev 2002(2): CD002975

107. **Ho JJ, Subramaniam P, Henderson-Smart DJ, Davis PG**  
„Continuous distending pressure for respiratory distress syndrome in preterm infants”  
Cochrane Database Syst Rev 2002(2): CD002271
108. **Schwartz RM, Luby AM, Scanlon JW, Kellogg RJ**  
„Effect of surfactant on morbidity, mortality, and resource use in newborn infants weighing 500 to 1500 g”  
N Engl J Med, 1994, 330(21): 1476-1480
109. **Amato M, Petit K, Fiore HH, Doyle CA, Frantz ID, 3rd, Nielsen HC**  
„Effect of exogenous surfactant on the development of surfactant synthesis in premature rabbit lung”  
Pediatr Res, 2003, 53(4): 671-678
110. **Michna J, Jobe AH, Ikegami M**  
„Positive end-expiratory pressure preserves surfactant function in preterm lambs”  
Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160(2): 634-639
111. **Steinberg JM, Schiller HJ, Halter JM, Gatto LA, Lee HM, Pavone LA, Nieman GF**  
„Alveolar instability causes early ventilator-induced lung injury independent of neutrophils”  
Am J Respir Crit Care Med, 2004, 169(1): 57-63
112. **Panda AK, Nag K, Harbottle RR, Rodriguez-Capote K, Veldhuizen RA, Petersen NO, Possmayer F**  
„Effect of acute lung injury on structure and function of pulmonary surfactant films”  
Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 30(5): 641-650
113. **Davis AJ, Jobe AH, Hafner D, Ikegami M**  
„Lung function in premature lambs and rabbits treated with a recombinant SP-C surfactant”  
Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157(2): 553-559.

114. **Weber B, Borkhardt A, Stoll-Becker S, Reiss I, Gortner L**  
„Polymorphisms of surfactant protein A genes and the risk of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants“  
Turk J Pediatr, 2000, Jul-Sep;42(3): 181-5
115. **Makri V, Hospes B, Stoll-Becker S, Borkhardt A, Gortner L**  
„Polymorphisms of surfactant protein B encoding gene: modifiers of the course of neonatal respiratory distress syndrome?“  
Eur J Pediatr, 2002 Nov;161(11): 604-8
116. **Luecke, T, Herrmann P, Quintel M**  
„High frequency oscillatory ventilation as therapy for acute lung injury and ARDS“  
Anaesthesist, 2000, Nov;49(11): 972-80
117. **Clark JC, Wert SE, Bachurski CJ, Stahlman MT, Stripp BR, Weaver TE, Whitsett JA**  
„Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice“  
Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(17): 7794-7798
118. **Robertson B, Kobayashi T, Ganzuka M, Grossmann G, Li WZ, Suzuki Y**  
„Experimental neonatal respiratory failure induced by a monoclonal antibody to the hydrophobic surfactant-associated protein SP-B“  
Pediatr Res, 1991, 30(3): 239-243
119. **Soll RF, Blanco F**  
„Natural surfactant extract versus synthetic surfactant for neonatal respiratory distress syndrome“  
Cochrane Database Syst Rev, 2001, (2): CD000144. Review
120. **Ainsworth SB, Milligan DW**  
„Surfactant therapy for respiratory distress syndrome in premature neonates: a comparative review“  
Am J Respir Med, 2002, 1(6): 417-33. Review

121. **Sinha SK, Lacaze-Masmonteil T**

„A multicenter, randomized, controlled trial of lucinactant versus poractant alfa among very premature infants at high risk for respiratory distress syndrome“

Pediatrics, 2005, Apr;115(4): 1030-8

122. **Moya FR, Gadzinowski J**

„A multicenter, randomized, masked comparison trial of lucinactant, colfosceril palmitate, and beractant for the prevention of respiratory distress syndrome among very preterm infants“

Pediatrics, 2005, Apr;115(4): 1018-29

123. **Merritt TA, Kheiter A**

„Positive end-expiratory pressure during KL4 surfactant instillation enhances intrapulmonary distribution in a simian model of respiratory distress syndrome“

Pediatr Res, 1995, Aug;38(2): 211-7

124. **Gullberg N, Winberg P**

„Changes in stroke volume cause change in cardiac output in neonates and infants when mean airway pressure is altered“

Acta Anaesthesiol Scand, 1999, 43: 999-1004

125. **Mirro R, Busija D**

„Relationship between mean airway pressure, cardiac output, and organ blood flow with normal and decreased respiratory compliance“

J Pediatr, 1987, 111: 101-106

126. **Greisen G**

„Cerebral blood flow in preterm infants during the first week of life“

Acta Paediatr Scand, 1986, Jan;75(1): 43-51

127. **Rodriguez RJ**

„Management of respiratory distress syndrome: an update“

Respir Care, 2003, 48:279-286

128. **Luecke T, Herrmann P**  
„Hochfrequenzoszillationsventilation bei akuter Lungenschädigung und ARDS“  
Der Anaesthetist, 2000, 48, 11: 972-980
129. **Griese M, Tredano M, Nicolai T, Bahau M**  
„Molekulare Grundlagen und Klinik der Alveolarproteinosen“  
Deutsches Ärzteblatt, 1999, 15
130. **Whitsett JA, Wert SE, Xu Y**  
„Genetic disorders of surfactant homeostasis“  
Biol Neonate, 2005, 87(4): 283-7
131. **Stevens TP, Blennow M, Soll RF**  
„Early surfactant administration with brief ventilation vs selective surfactant and continued mechanical ventilation for preterm infants with or at risk for respiratory distress syndrome“  
Cochrane Database Syst Rev, 2004, (3): CD003063
132. **Henderson-Smart DJ, Wilkinson A, Raynes-Greenow CH**  
„Mechanical ventilation for newborn infants with respiratory failure due to pulmonary disease“  
Cochrane Database Syst Rev, 2002, (4): CD002770
133. **Bhuta T, Henderson-Smart DJ**  
„High frequency jet ventilation may help reduce chronic lung disease in preterm babies but adverse effects are unclear“  
Cochrane Database Syst Rev, 2000, (2): CD000328
134. **The Acute Respiratory Distress Syndrome Network**  
„Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome“  
N Engl J Med, 2000, 342: 1208-1301

135. **Te Pas AB, Lopriore E, Enbers MJ, Walther JF**  
„Early respiratory management of respiratory distress syndrome in very preterm infants and bronchopulmonary dysplasia: a case-control study”  
PLoS ONE, 2007, Feb 7;2(2): e192
136. **Hentschel R, Jorch G**  
„Sequential changes in compliance and resistance after bolus administration or slow infusion of surfactant in preterm infants”  
Intensive Care Med, 2002, 28: 622-628
137. **Hentschel R, Jorch G**  
„Acute side effects of surfactant treatment”  
J Perinat Med, 2002, 30: 143-148
138. **Valls-i-Soler A, Fernandez-Ruanova B, Lopez-Heredia y Goya J**  
„A randomized comparison of surfactant dosing via a dual-lumen endotracheal tube in respiratory distress syndrome. The Spanish Surfactant Collaborative Group”  
Pediatrics, 1998, 101: E4
139. **Skov L, Bell A, Greisen G**  
„Surfactant administration and the cerebral circulation”  
Biol Neonate, 1992, 61 (Suppl 1): 31-36
140. **Leviton A, Van Marter L, Kuban KCK**  
„Respiratory distress syndrome and intracranial hemorrhage: cause or association? Inferences from surfactant clinical trials”  
Pediatrics, 1989, 84: 915-922
141. **Segerer H, van Gelder W, Angenent FWM**  
„Pulmonary distribution and efficacy of exogenous surfactant in lung-lavaged rabbits are influenced by the instillation technique”  
Pediatr Res, 1993, 34: 490-494

142. **Amato MBP, Barbas CSV, Medeiros DM**  
„Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome”  
N Engl J Med, 1998, 338: 347-354
143. **Bahlmann H, Sun B, Nilsson G**  
„Aerosolized surfactant in lung-lavaged adult rats: factors influencing the therapeutic response”  
Acta Anaesthesiol Scand, 2000, 44: 612-622
144. **Lewis JF, Ikegami M, Jobe AH**  
„Aerosolized surfactant treatment of preterm lambs”  
J Appl Physiol, 1991, 70: 869-876
145. **Verder H, Robertson B, Greisen G**  
„Surfactant therapy and nasal continuous airway pressure for newborns with respiratory distress syndrome“  
Engl J Med, 1994; 331: 1051-1055
146. **Halliday HL**  
„Surfactants: past, present and future”  
Journal of Perinatology, 2008, 28: 47-56
147. **Wauer RR**  
„Surfactanttherapie Grundlagen, Diagnostik, Therapie”  
Georg Thieme Verlag, 2004, 3. überarbeitete und erweiterte Auflage
148. **Thomson MA**  
„Continuous Positive Airway Pressure and Surfactant; Combined Data from Animal Experiments and Clinical Trials”  
Biol of the Neonate, 2002, 81 (Suppl. 1) 16-19



149. **Been JV, Zimmermann, LJI**  
„What’s new in surfactant? A clinical view on recent developments in neonatology and paediatrics”  
Eur J Pediatr, 2007, 166: 889-899
150. **Lawson WE et al.**  
„Increased and Prolonged Pulmonary Fibrosis in Surfactant Protein C-Deficient Mice Following Intratracheal Bleomycin”  
Am J Pathol, 2005, 167(5): 1267-1277
151. **Whitsett, JA**  
„Genetic Basis of Familial Interstitial Lung Disease - Misfolding or Function of Surfactant Protein C?”  
Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165: 1201–1202
152. **Sweet D et al.**  
„European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome”  
J Perinat Med, 2007, 35 (3): 175-186
153. **Moya F et. al.**  
„One-Year Follow-up of Very Preterm Infants Who Received Lucinactant for Prevention of Respiratory Distress Syndrome: Results From 2 Multicenter Randomized, Controlled Trials”  
Pediatrics, 2007, 119: e1361-e1370
154. **Spragg RG et al.**  
„Effect of Recombinant Surfactant Protein C-Based Surfactant on the Acute Respiratory Distress Syndrome”  
N Engl J Med, 2004, 351: 884-892

155. **Berg TJ et al.**

„Bronchopulmonary Dysplasia and Lung Rupture in Hyaline Membrane Disease:  
Influence of Continuous Distending Pressure”

Pediatrics, 1975, 55: 51-54

156. **Hilgendorff A et al.**

„Positive End-Expiratory Pressure Modifies Response to Recombinant and Natural  
Exogenous Surfactant in Ventilated Immature Newborn Rabbits”

Biol Neonate, 2006, 90: 210-216

## **10. ERKLÄRUNG**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

## 11. DANKSAGUNG

**Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. med. Irwin Reiss**, danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für seine wertvolle wissenschaftliche Unterstützung.

Frau Dr. med. Anne Hilgendorff danke ich für ihre Unterstützung und Inspiration an 24 Stunden des Tages, an 7 Tagen der Woche. Herzlichen Dank für kreative Durchhalteparolen, einhaltbare Deadlines und so viel Geduld! Ihre Kommunikations- und Koordinationsleistungen haben einen großen Teil des Erfolgs dieser Arbeit ermöglicht.

Ich danke Herrn Dr. med. Daniel Rawer für die altruistische Bereitstellung seines Genies. Ich verdanke ihm die Einführung in die komplexen Grundlagen der real-time PCR. Er löste verworrenste Probleme scheinbar beiläufig und war kompetenter Ansprechpartner für das „Troubleshooting“ praktischer Fragestellungen.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Clemens Ruppert und Herrn Professor Dr. med. Andreas Günther, Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Gießen für die von ihnen durchgeführte Proteinanalytik und für die Überlassung der Räumlichkeiten, in denen die tierexperimentellen Versuche durchgeführt wurden.

Ich danke Herrn Dr. med. Michael Ebsen, Leiter des Instituts für Pathologie des Städtischen Krankenhauses, Kiel, für die histologische Aufarbeitung und Beurteilung der Lungenproben.

Frau Marga Böcher-Metzger danke ich für das geduldige Führen der Hand bei den ersten Pipettierversuchen und für die erfolgreiche Integration in die Hackordnung des Laboralltags.

Von Herzen danke ich meinem Freund Jürgen Leick, der mit mir gemeinsam menschlich und fachlich tiefe Täler durchschritten und steile Berge erklommen hat. Vielen Dank für viele Stunden lachen, arbeiten, streiten.

Ich danke meinen lieben Eltern, die mir meinen beruflichen Werdegang ermöglicht haben und die mich mit dem Rüstzeug ausgestattet haben, ohne das man eine solche Arbeit nicht durchstehen kann. Ich danke besonders meiner Schwester Anna, die mir einen Teil meines

Rückgrats ausmacht, das ich für jede Stunde an dieser Arbeit benötigt habe, sowie ihrem Ehemann Clive für schier unglaublich gewissenhaftes Redigieren.

Ich danke meiner Frau Lenja für Ihre gnadenlose Kritik und dafür, dass es sie gibt.

Ich danke allen, die sich für mich die Mühe gemacht haben, dieses Werk gegenzulesen.