

**Expression surfactantassoziierter Proteine und des Vascular Endothelial  
Growth Factors beim experimentell induzierten  
Mekoniumaspirationssyndrom**

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

**Vorgelegt von Leick, Jürgen Joachim  
aus Bitburg  
Gießen 2006**

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

**Gutachter: PD Dr I. Reiss**

**Gutachter: PD Dr. J. Hänze**

**Tag der Disputation: 11.05.2007**

**Inhaltverzeichnis**

INHALTSVERZEICHNIS.....	III
ABBILDUNGS-UND GRAFIKVERZEICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Das pulmonale Surfactantsystem.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Zusammensetzung, Metabolismus und Funktion des pulmonalen Surfactantsystems.....	1
1.1.2 Die Surfactant-Proteine B und C.....	3
1.1.3 Surfactant Protein A und D.....	5
<b>1.2 Das Mekoniumaspirationssyndrom.....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Klinik und Pathophysiologie des Mekoniumaspirationssyndroms.....	6
1.2.2 Therapie des Mekoniumaspirationssyndroms und Komplikationen einer maschinellen Beatmung.....	9
1.2.2.1 Surfactanttherapie des Mekoniumaspirationssyndroms-tierexperimentelle Studien.....	9
1.2.2.2 Surfactanttherapie des Mekoniumaspirationssyndroms.....	10
<b>1.3 Der Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF.....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Biologische Aktivität des VEGF.....	11
1.3.2 Regulation der VEGF Transkription und Funktion der VEGF Rezeptoren.....	12
<b>2 Fragestellung .....</b>	<b>14</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Tierversuche.....</b>	<b>15</b>
3.1.1 Versuchsdurchführung.....	15
3.1.2 Surfactantpräparationen.....	17

3.1.3 Datenerfassung.....	18
3.1.4 Semiquantitative histomorphometrische Untersuchung.....	18
<b>3.2 RNA-Isolation und Reverse Transkription.....</b>	<b>19</b>
3.2.1 RNA-Isolation.....	19
3.2.2 Photometrische Quantifizierung der RNA-Menge.....	20
3.2.3 Reverse Transkription.....	20
<b>3.3 Real-time PCR.....</b>	<b>21</b>
3.3.1 Real-time PCR – Prinzip der relativen Quantifizierung mittels $\Delta\Delta C_T$ - Methode.....	21
3.3.2 Real-time PCR – Durchführung.....	26
<b>3.4 Quantifizierungen der Surfactantproteine aus Lungenhomogenat.....</b>	<b>27</b>
3.4.1 SP-B und SP-C- ELISA.....	27
<b>3.5 Statistische Datenanalysen.....</b>	<b>29</b>
<b>4 Ergebnis.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 mRNA Expression und Quantifizierung der SF-Proteine B und C.....</b>	<b>30</b>
4.1.1 Surfactant Protein B und C mRNA Expression.....	30
4.1.2 Surfactant Protein B und C Konzentration.....	31
<b>4.2 Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Expression.....</b>	<b>35</b>
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>37</b>
<b>5.1 Der Effekt einer exogenen Surfactantapplikation auf die Expression der     Surfactantproteine B und C am tierexperimentellen     Mekoniumaspirationssyndrom.....</b>	<b>39</b>
<b>5.2 Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in der Lunge.....</b>	<b>46</b>
5.2.1 Rolle des VEGF in der Lungenentwicklung und im Atemnotsyndrom des Neugeborenen.....	46
5.2.2 Der Einfluss des VEGF auf die CLD.....	49
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>52</b>
<b>7 Summary.....</b>	<b>54</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>LVI</b>
<b>9 Anhang.....</b>	<b>LXXX</b>
Materialien.....	LXXX
Erklärung.....	LXXXVII

Danksagung.....	LXXXVIII
Lebenslauf.....	LXXXIX

## Abbildungs- und Grafikverzeichnis

### Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Darstellung des SF-Metabolismus [63].....	2
Abbildung 2: Anordnung und Funktion des SP-C im SF-Layer [34, 70].....	4
Abbildung 3: Röntgen Thorax Aufnahme eines Neugeborenen mit MAS [57].....	7
Abbildung 4: Graphische Ausgabe der rt-PCR-Werte eines Plates mit Dreifachwerten für 4 Gene.....	23

### Grafiken

Grafik 1: Pulmonale mRNA Expression und Protein Konzentration für SP-B im experimentell induzierten MAS [82].....	33
Grafik 2: Pulmonale mRNA Expression und Protein Konzentration für SP-C im experimentell induzierten MAS [82].....	34
Grafik 3: pulmonale VEGF mRNA Expression beim neugeborenen Ferkel im experimentell induzierten MAS.....	36
Grafik 4: Einfluss einer exogenen SF-Applikation auf den paO <sub>2</sub> , paCO <sub>2</sub> , C <sub>dyn</sub> und VEI beim MAS [81].....	40
Grafik 5: Darstellung der histologischen Score Werte im oberen und unteren Lappen der rechten Lunge [81].....	43

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: mRNA Expression der SF-Proteine B und C.....	31
Tabelle 2: pulmonale VEGF mRNA Expression beim neugeborenen Ferkel im experimentell induzierten MAS.....	35

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb	Abbildung
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
AS	Aminosäuren
AZV	Atemzugvolumen
$\beta$ -act	Beta – Actin
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy DANN
$C_{dyn}$	dynamische Compliance
CLD	chronic lung disease
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
d.w	dry weight (Trockengewicht)
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FET	Floureszenz Energietransfer
FP	Forward Primer
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible-factor-1 $\alpha$
HPRT	Hypoxanthin-guanine-phosphoribosyl-transferase
IL	Interleukine
KG	Körpergewicht
LPC	Lysophatidylcholin
LPS	Lipopolysaccharide
MAS	Mekoniumaspirationssyndrom
nat.-SF	natürliches Surfactant Präparat
NTC	non template control
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEEP	positiver expiratorischer Druck
PIP	positiver inspiratorischer Druck
PL	Phospholipide
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PPHN	persistierender pulmonaler Hypertonus
RDS	Respiratory Distress Syndrome
RP	Reverse Primer

Schwangerschaftswoche	SSW
rSP-C	recombinant hergestelltes Surfactant Protein-C
rt-PCR	real-time PCR
RT	Reverse Transkription
SF	Surfactant
SP-B	Surfactant Protein B
SP-C	Surfactant Protein C
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
VEI	Ventilations-Effizienz-Index
Vs.	Versus

## **1. Einleitung**

### **1.1 Das pulmonale Surfactantsystem**

Im menschlichen Organismus spielt das pulmonale Surfactantsystem eine zentrale Rolle im physiologischen Ablauf der alveolären Ventilation und des Gasaustauschs. Durch Stabilisierung der Alveolen während der Atemexkursion, wirkt es einem endexpiratorischen Kollaps der Alveolen und somit einem Verlust der Gasaustauschfläche entgegen. Dies ermöglicht die Atmung bei normalen transpulmonalen Drücken [62; 111; 112].

Bereits im Jahre 1929 vermutete K. von Neergard die Präsenz eines oberflächenspannungsreduzierenden Faktors in der Lunge [147]. Jedoch erst in jüngerer Zeit erlangte man Kenntnisse über die Zusammensetzung, Metabolismus, Funktion und Pathophysiologie des Surfactants. Für die vorliegende Arbeit sind insbesondere die Surfactantproteine B und C von Interesse.

#### **1.1.1 Zusammensetzung, Metabolismus und Funktion des pulmonalen Surfactantsystems**

Das pulmonale Surfactant (SF) setzt sich aus Lipiden und Proteinen zusammen. Der Lipidanteil des SF beträgt 90%. Er besteht im Wesentlichen aus Phospholipiden (PL). Zu diesen zählt man die ungesättigten Phosphatidylcholinen, deren Hauptanteil durch Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) gebildet wird, negativ geladene Phosphatidylglycerole, einen geringen Anteil an Phosphatidylethanolamin, Sphingomyelin und Cardiolipin. Neben den PL besteht der Lipidanteil zu ca. 10% aus Neutrallipiden. Zu diesen gehören Triglyceride, Cholesterol, -ester, Monoglyceride und Diglyceride [64; 112; 144; 146].

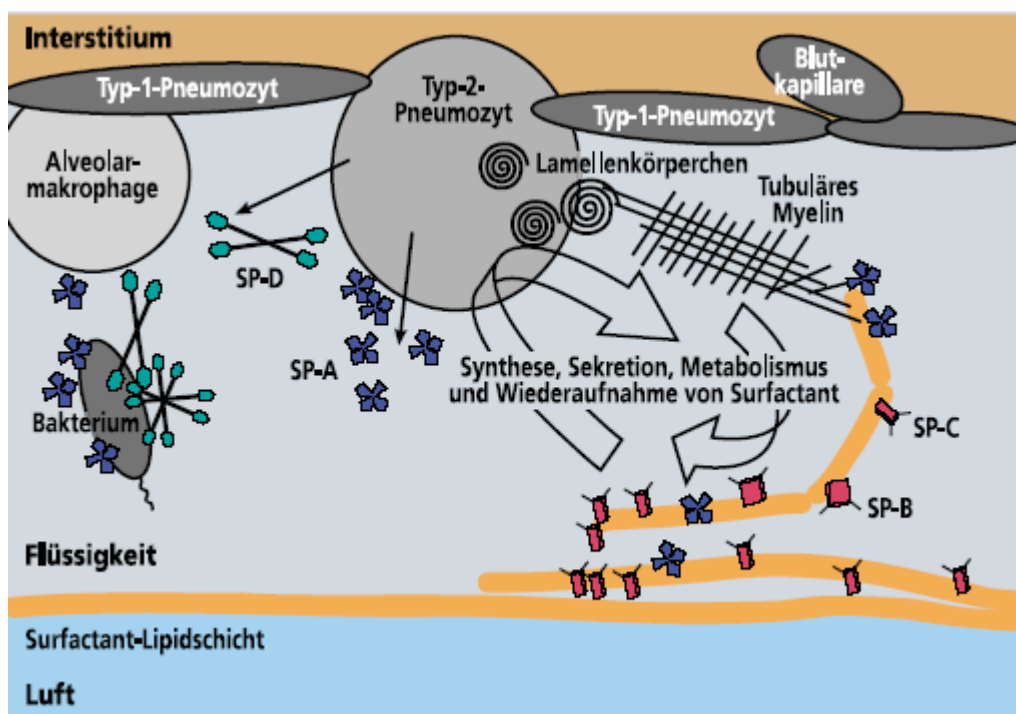
Der Proteinanteil beträgt 10%. Die Proteine wurden nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt: SF Protein A (SP-A), SF Protein B (SP-B), SF Protein C (SP-C) und SF Protein D (SP-D) [144]. Aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften werden die beiden hydrophoben Proteine SP-B und SP-C sowie die beiden hydrophilen Proteine SP-A und SP-D gemeinsam betrachtet [28; 62; 63].

Das SF wird von Typ II Pneumozyten synthetisiert und intrazellulär in multilamellaren Vesikeln, den Lamellarkörperchen, gespeichert. Diese werden in den Extrazellularraum



sezerniert und dort in eine gitterartige aus Lipiddoppelschichten bestehende Struktur, das sog. tubuläre Myelin, umgewandelt. Das tubuläre Myelin dient als Hauptreservoir des intraalveolären SF und ist maßgeblich an der Ausbildung des SF-Layers beteiligt. 85% des alveolären SF werden wieder in die Typ II Pneumozyten aufgenommen und dort „recycled“. Die restlichen 15% unterliegen dem Abbau durch Alveolarmakrophagen, einem ziliären Transport in die großen Atemwege und einer lymphogenen Clearance [7; 148; 149; 150; 151]. Abbildung 1 zeigt schematisch die Synthese, Sekretion, Metabolismus und Wiederaufnahme von SF.

**Abbildung 1: Schematische Darstellung des SF-Metabolismus (Griese et al. [63])**



Der SF-Layer überzieht als antiadhäsiver Lipoproteinfilm die alveoläre Oberfläche an der Luft-Wasser-Grenzfläche. Dort wird er im Wechsel von Ein- und Ausatmung expandiert bzw. komprimiert. Er ist dadurch für die dynamische Veränderung der Oberflächenspannung verantwortlich. Die amphiphilen SF-Moleküle adsorbieren in wässriger Lösung an der Luft-Wasser-Grenzfläche. Den biochemischen Gesetzen folgend, richten sich die hydrophilen Anteile zum Wasserfilm, dementsprechend die hydrophoben Anteile zur Luftphase aus [152; 153]. Die oberflächenspannungsreduzierende Wirkung ist konzentrationsabhängig und zeigt einen zur Konzentration des SF proportionalen Verlauf. Durch Kompression der Alveole in der Expirationsphase steigt die SF Konzentration an der Luft-Wasser-Grenzfläche. Hierdurch

wird der oberflächenspannungsreduzierende Effekt verstärkt. Durch Senkung der Oberflächenspannung auf Werte nahe 0 mN/m verhindert er den endexpiratorischen Kollaps der Alveolen, der zu einer Einschränkung des pulmonalen Gasaustauschs und der Lungenfunktion führen würde [64; 65].

### 1.1.2 Die SF-Proteine B und C

Das, in dem pulmonalen SF-System enthaltene, hydrophobe SP-B setzt sich aus einer 79 Aminosäuren (AS) langen Sequenz zusammen und wird aus einem 381 AS großen Proprotein, durch Abspaltung von AS, in die funktionstüchtige Form umgewandelt. Der genetische Code für die Proproteinsequenz des humanen SP-B Gens ist auf Chromosom 2 lokalisiert und wird von den alveolären Typ II Pneumozyten sowie von den Clara-Zellen exprimiert [66; 67].

Das native SP-B wird in Lamellarkörperchen der Typ II Pneumozyten, den Clara Zellen, aber auch in Zellen des Gastrointestinaltrakts und der Tuba auditiva identifiziert [68; 86; 146].

Das SP-B ist überwiegend biophysikalisch aktiv. Es steigert in Gegenwart von SP-A die Adsorption von PL an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche und außerdem die Aufnahme von Phosphatidylcholin in die Typ II Pneumozyten. Es ist somit an der Homöostase des pulmonalen SF-Systems beteiligt [86].

Des Weiteren wird ihm eine SF-Film schützende Wirkung gegenüber Serum-Proteasen zugeschrieben [69]. Untersuchungen haben gezeigt, dass das SP-B hauptsächlich an der Reduktion der Oberflächenspannung beteiligt ist [9]. Ein Gendefekt des SP-B, wie bei der angeborenen Alveolarproteinose, führt zu einer stark erhöhten Oberflächenspannung, einer verminderten SP-C Konzentration und dem Auftreten eines atypischen Surfactantproteins. Dieses entspricht in seinem Aufbau der immaturren SP-C Vorstufe und kann als Ausdruck einer unvollständigen Umwandlung des Pro-SP-C gewertet werden [7]. Die Gendeletion von SP-B ist letal [70].

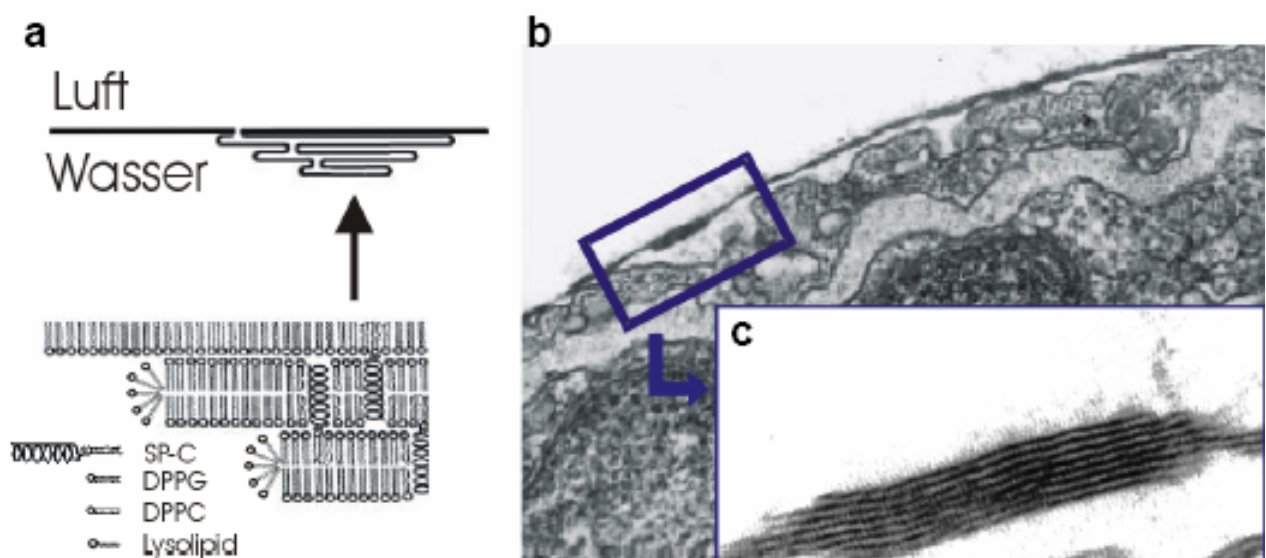
Das hydrophobe SP-C wird als 197-AS Proprotein synthetisiert und durch posttranslationale Modifikation in ein 35 AS langes Peptid überführt. SP-C ist auf Chromosom 8 codiert. Es konnte bisher nur in den Typ II Pneumozyten gefunden werden.

SP-C ist neben SP-B für die biophysikalische Aktivität des SF wichtig. Hypoxieversuche an Knockout Mäusen haben gezeigt, dass SP-C effektiv an der Lipidadsorption beteiligt ist und

eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der Alveolen bei niedrigem Lungenvolumen spielt [9]. SP-C induziert während der Phase der Expiration eine Ausbildung von Lipid/Protein-Multischichtstrukturen, die an der Grenzfläche lokalisiert bleiben. Diese Lokalisation macht während der Inspiration ein schnelles Zurückgleiten der Multischichtstrukturen in den Film möglich (siehe Abbildung 2a). Aufgrund des hydrophoben Molekülbereichs ist es in der Lage sich exakt in den hydrophoben Anteil einer Lipidschicht einzugliedern und diesen zu durchspannen. Die hydrophilen Aminosäuren des SP-C treten in Wechselwirkung mit den polaren Randgruppen der Lipide dieser und benachbarter Lipidschichten und stabilisieren dadurch die Alveolen während der Expiration. In der Inspirationsphase bildet sich nun wieder durch Expansion des SF-Layers und daraus resultierender Destabilisierung der SP-C Verbindungen eine Monoschicht aus (siehe Abb. 2) [34; 38; 39; 40; 41].

Eine Mutation im SP-C Gen führt im humanen Organismus zu der autosomal dominant vererbten interstitiellen Lungenerkrankung. Diese geht mit der Ausbildung einer interstitiellen Fibrose und dem Verlust der alveolären Oberfläche einher [40; 154]. Neben den Folgen einer Dysregulation und den oben beschriebenen Effekten auf die Funktion des SF Films, konnten in vitro Studien eine Induktion der Wiederaufnahme von SF-PL in die Typ II Pneumozyten nachweisen. Dies zeigt die wichtige Rolle des SP-C in Bezug auf SF-Metabolismus und Funktion [86].

**Abbildung 2: Anordnung und Funktion des SP-C im SF-Layer [34, 70]**



**Abbildung 2a** zeigt schematisch die Anordnung und Funktion des SP-C während In- und Expiration.

**Abbildung 2b und 2c** zeigt eine EM Aufnahme einer Alveole, die die Multischichten auf der wässrigen Phase verdeutlicht.

Zusammenfassend spielen SP-B und SP-C eine wichtige Rolle in der Formierung, Aufrechterhaltung und Funktion des SF-Films. Die Mechanismen und Erklärungsmodelle sind jedoch derzeit nicht vollständig erforscht und Gegenstand zahlreicher Diskussionen.

### **1.1.3 Surfactant Protein A und D**

Die zur Familie der Kollektine gehörenden hydrophilen Proteine SP-A (26-38 kDa) und SP-D (43 kDa) sind in ihrem Aufbau ähnlich und übernehmen wichtige immunologische Funktionen [8].

SP-A und SP-D besitzen eine Opsoninwirkung für verschieden Viren (z.B. Influenza A; Herpes simplex Virus), Bakterien, Mykobakterien (nur SP-A), Pilze und Pneumocystis carinii [8]. Für SP-A konnte eine Verstärkung der Phagozytose durch Alveolarmakrophagen und eine chemotaktische Wirkung auf immunkompetente Zellen nachgewiesen werden [29; 30; 31; 32]. Ebenso spielt es eine wesentliche Rolle in der Regulation von Sekretion und Wiederaufnahme des SF in die Typ II Pneumozyten sowie an der Bildung von tubulären Myelins. Es bindet SF-Phospholipide (über 99% SP-A sind in Lavage - Flüssigkeit an Phospholipide gebunden) und verhindert eine SF-Inaktivierung durch Serum Proteine. Zusätzlich kann es die SF de novo Synthese und dessen Sekretion aus den Typ II Pneumozyten hemmen [8; 35; 36; 37]. Diese Eigenschaften zeigen den bedeutenden Anteil an der Surfactanthomöostase.

## **1.2 Das Mekoniumaspirationsyndrom**

Das Mekoniumaspirationssyndrom (MAS) ist eine der häufigsten Ursache einer ARDS ähnlichen Lungenerkrankung des Neugeborenen. Trotz intensiver perinataler medizinischer Therapien ist es mit einer hohen Mortalität und Morbidität assoziiert [6]. In den industrialisierten Ländern ist bei 8 bis 20% aller Lebendgeborenen mit einem Gestationsalter >34. Schwangerschaftswoche (SSW) mekoniumhaltiges Fruchtwasser nachweisbar. Von diesen können 1-9% ein MAS ausbilden [109; 114]. Die Inzidenz des MAS liegt zwischen 1:3000–1:5000 bei einer Mortalität von 1%. [50; 51; 52; 114].

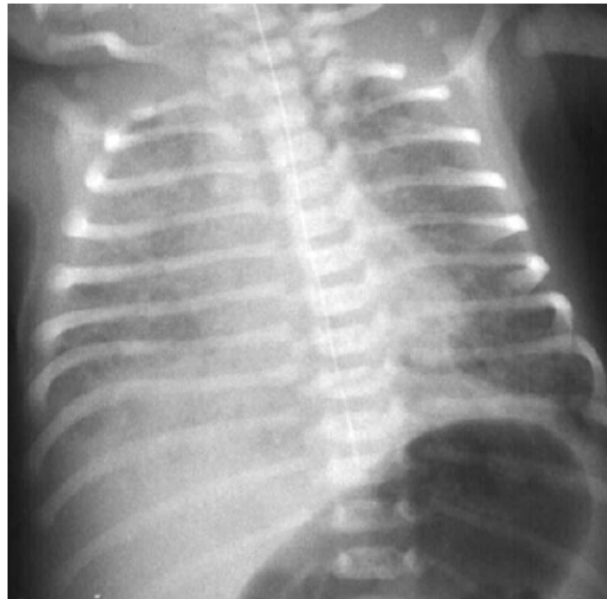
### 1.2.1 Klinik und Pathophysiologie des Mekoniumaspirationssyndroms

Beim MAS handelt es sich um eine obstruktive Lungenerkrankung infolge einer Aspiration von mekoniumhaltigem Fruchtwasser. Die Diagnose wird bei folgender Konstellation gestellt: grünes, mekoniumhaltiges Fruchtwasser, Atemnot, typischer radiologischer Befund im Thoraxröntgenbild ohne andere, den Zustand erklärende, Ätiologie [50; 110; 112].

Klinisch imponiert eine unmittelbar nach der Geburt einsetzende ausgeprägte Atemdepression, Schnappatmung, Bradykardie, Hypotonie und Kreislaufdepression.

Zum Krankheitsbild des MAS gehört eine postnatal persistierende fetale Zirkulation mit intrapulmonalen Shunts, der sog. persistierende pulmonale Hypertonus des Neugeborenen (PPHN). Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung mit Zyanose und Azidose. Durch den erhöhten Gefäßwiderstand kommt es zu einer mangelnden Umstellung des fetalen Kreislaufs und Persistenz des Rechts – Links – Shunt über das Foramen ovale und den Ductus arteriosus Botalli, ohne Nachweis einer Kardiopathie. Der erhöhte pulmonale Gefäßwiderstand entsteht bereits intrauterin infolge einer chronischen Hypoxie. Eine postnatale Mekoniumaspiration spielt dann nur noch eine untergeordnete Rolle [52; 112; 113; 118; 119].

Im Thoraxröntgenbild imponiert das Bild des MAS als ein- oder beidseitig disseminierte oder fokale Verdichtungen. Typisch ist zudem das Bild der „Honigwabenlunge“, das durch die Übereinanderprojektion von Atelektasen, Infiltraten und Emphyseblasen infolge der Überblähung mit sogenanntem „*air trapping*“ entsteht [23; 24; 25]. Abbildung 3 zeigt ein Thoraxröntgenbild eines Neugeborenen mit MAS. Man sieht eine Überblähung der Lungenflügel sowie grobfleckige, teils noduläre Verschattungen [57]. Histologisch zeigt sich das Bild eines hämorrhagischen Ödems. Weiterhin zeigt das histologische Bild, Stunden nach der Aspiration, ultrastrukturelle Veränderungen des pulmonalen Epithels und endothelialer Strukturen. Die Zellen weisen im Zytoplasma eine Vakuolisierung sowie Schwellung und Zerfall von Zellorganellen auf [1; 25; 26; 27].

**Abbildung 3: Röntgen-Thorax Aufnahme eines Neugeborenen mit MAS**

Die Pathophysiologie des MAS ist komplex. Zwischen der 10. und 16. Gestationswoche kann beim Feten erstmals Mekonium im Darm nachgewiesen werden. Es besteht aus einer Kombination abgestorbener Zellen, Gallensäuren, Pankreassaft, intestinalen Sekreten, fetalem Urin, Mucus und einem hohen Anteil an Biliverdin, das ihm seine charakteristische schwärzlich – grünliche Färbung gibt. Zum Zeitpunkt der Geburt enthält der Darm zwischen 60 und 200g Mekonium. Es wird normalerweise innerhalb der ersten 12-24 Stunden postnatal als erster Stuhlabgang abgesetzt [54; 55]. In der Regel kommt es vor der 37. SSW aufgrund einer intrauterin verminderten Darmperistaltik und eines erhöhten Sphinktertonus nicht zum Mekoniumabgang [50; 110]. Pathophysiologisch erfolgt der Mekoniumabgang in das Fruchtwasser durch eine intrauterine oder unter der Geburt ausgelöste Hypoxie, die zur Vasokonstriktion mesenterialer Gefäße führt. Dadurch kommt es zu einer kurzzeitigen Darmischämie mit Hyperperistaltik und zusätzlicher Relaxation des Musculus sphincter ani. Dies führt zu einem vorzeitigen Mekoniumabgang [25; 112]. Zudem kann die Kompression des kindlichen Kopfes, der Nabelschnur oder der Placentagefäße eine vagale Reaktion hervorrufen und dadurch den Mekoniumabgang begünstigen [53]. Die fetale Hypoxie ruft eine gesteigerte fetale Atemaktivität hervor, die zu einer zur Aspiration von Mekonium bis in die Bronchioli und prospektiven Atemwege führen kann. Ebenso kann auch unter der Geburt mit den ersten Atemzügen eine Mekoniumaspiration stattfinden [112].

Das dickflüssige und hochvisköse Mekonium führt, je nach Partikelgröße, zu einer partiellen Verlegung der Bronchien. Die Mekoniumpfropfe in den Atemwegen bewirken ventilartige

Verschlüsse. Die Folgen sind Atelektase und akutes obstruktives intraazinäres Emphysem mit teils extremer Überblähung der Sakkuli. Dies kann Wandrupturen begünstigen und zu einer extraalveolären Luftansammlung im Sinne eines interstitiellen Lungenemphysems führen. Durch diese Veränderungen kommt es vermehrt zu einem intrapulmonalen Shunt, einer reduzierten Diffusionskapazität und zur Herabsetzung der Lungencompliance [50; 52; 81; 110; 112; 113]. Zusätzlich kommt es im Krankheitsverlauf zu einer ausgeprägten Inflammation und Immigration immunkompetenter Zellen. Diese führen durch Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. Interleukin (IL)-1  $\beta$ , IL-6, IL-8 und reaktiven Sauerstoffradikalen, sowie vasoaktiver Substanzen, z.B. Endothelin-1, Thromboxan A<sub>2</sub> und Prostacyclin, zu einer lokalen Entzündungsreaktion [3; 4; 5]. Im Verlauf der Entzündungsreaktion entstehen Nekrosen des Epithels im Bereich der Bronchioli und Sakkuli bzw. der Alveolen sowie des Endothels der Kapillaren mit Lockerung der interzellulären Verbindungen [112]. Dies hat ein intraalveoläres und interstitielles Ödem zur Folge. Nach 24-48h resultiert das Bild einer chemischen Alveolitis mit Tachydyspnoe, Zyanose, Fieber und Schüttelfrost [54]. Gehäuft tritt im Verlauf eine bakterielle Superinfektion hinzu.

Die beschriebenen pulmonalen Veränderungen sind nicht alleine die Folge der Obstruktion der Atemwege und des verminderten Lufteinstrom in die Alveolen, sie werden zusätzlich durch eine Inaktivierung des pulmonalen Surfactants (SF) durch Mekonium begünstigt. Eine Herabsetzung der oberflächenspannungsreduzierenden Wirkung des SF-Systems führt zu einem endexpiratorischem Kollaps der Alveolen. Verschiedene Komponenten des Mekoniums, wie z.B. freie Fettsäuren, sind in der Lage SF an der Luft-Flüssigkeitsgrenze zu verdrängen [13; 85; 112; 113; 115]. Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), ein weiterer Bestandteil des Mekoniums, hydrolysiert Phospholipide, die eine wichtige Komponente des SF darstellen. PLA<sub>2</sub> konnte in Typ II Pneumozyten, neutrophilen Granulozyten, im Pankreas und Intestinaltrakt nachgewiesen werden. Das im Mekonium enthaltene PLA<sub>2</sub> entstammt der Pankreassekretion und aus Zellen des Gastrointestinaltraktes. PLA<sub>2</sub> setzt die oberflächenspannungsreduzierende Wirkung des SF auf zwei Wege herab: direkt durch Hydrolyse des SF-Bestandteils DPPC und indirekt durch das hierbei entstehende lipophile Produkt Lysophosphatidylcholin (LPC), das in der Lage ist die SF-Aktivität und Sekretion zu inhibieren [13; 115]. Neben diesen Effekten haben vermutlich die im Mekonium enthaltenden Gallensäuren einen direkten zytotoxischen Effekt auf die Typ II Pneumozyten und somit Einfluss auf die SF-Synthese [61; 112; 115]. Zudem inhibiert Mekonium die postnatal einsetzende SF de novo Synthese. Der Mechanismus ist jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt

noch nicht genau geklärt [25]. Diese Faktoren führen in ihrer Gesamtheit zu einem sekundären Surfactantmangel.

### **1.2.2 Therapie des Mekoniumaspirationssyndroms und Komplikationen einer maschinellen Beatmung**

In der Therapie des MAS wird nach spezifischen Ansätzen gesucht. Dazu gehört eine aufmerksame Überwachung der Geburt zur rechtzeitigen Erkennung von asphyktischen Zuständen, für die eine höhere Inzidenz der Mekoniumaspiration nachgewiesen wurde. Durch gründliches pharyngeales Absaugen vor dem ersten Atemzug und durch adäquate neonatologische Versorgung, die in schweren Fällen eine maschinellen Beatmung und in einigen Fällen sogar eine Extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO) beinhaltet, konnte die Letalität auf unter 5% gesenkt werden [119; 120; 121]. Bis zu 30% der Kinder mit MAS bedürfen einer maschinellen Beatmung. Als Komplikation einer maschinellen Beatmung kann es zur Entwicklung einer chronischen Lungenerkrankung (chronic lung disease (CLD)) kommen. Die Folge der CLD kann in einigen Fällen eine irreversible Erkrankung mit Entwicklung einer Lungenfibrose sein. Prädisponierend sind folgende Faktoren: eine Lungenunreife, die Sauerstofftoxizität und das, durch die maschinelle Beatmung induzierte, Gewebstrauma [23; 112]. In Deutschland erkranken jährlich ca. 1300-1500 Kinder an BPD. Die Inzidenz beträgt somit 1-1,8 pro 1000/Lebendgeborene [112].

Einen weiteren Therapieansatz in der Behandlung des MAS stellt die exogene Applikation von SF-Präparaten dar.

#### **1.2.2.1 Surfactanttherapie des Mekoniumaspirationssyndroms – tierexperimentelle Studien**

In Tierversuchen konnte durch endotracheale Applikation von Mekonium ARDS ähnliches Krankheitsbild mit histologischem Nachweis von hyalinen Membranen induziert werden [26; 112; 123; 124]. Eine exogene Surfactantapplikation verbesserte die Lungenmechanik und den Gasaustausch. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die SF-Wirkung dosisabhängig ist. So trat nach niedriger SF-Dosis (100/kg Körpergewicht (KG)) im Vergleich zu einer höheren Dosis (200mg/kg KG) eine erneute Verschlechterung der Oxygenierung ein [123; 124; 125].



Ebenso konnte eine unterschiedliche Wirkpotenz zwischen modifizierten natürlichen SF-Präparaten, die die SF-Proteine B und C enthalten, und durch Lavage gewonnen „kompletten natürlichen“ Surfactants dargestellt werden. Die „kompletten natürlichen“ Surfactants waren den modifizierten natürlichen SF-Präparaten in ihrer Wirkung überlegen [112]. Diese Überlegenheit wird u.a. auf das Vorhandensein des SP-A zurückgeführt, welches in vitro Studien die Resistenz gegenüber einer Surfactant-inhibition signifikant erhöhte [85; 123]. Jedoch muss angemerkt werden, dass Ergebnisse von Tierexperimenten bezüglich der Bedeutung von SP-A beim sekundären Surfactantmangel, wie z.B. beim MAS widersprüchlich sind [127; 128; 129].

Im Rahmen des Herstellungsprozesses kommerziell erhältlicher modifizierter natürlicher Surfactantpräparationen (nat.-SF) werden die Surfactantproteine A und D eliminiert, so dass das Endprodukt die Surfactantproteine B und C enthält. Es wird versucht durch den Zusatz von Additiven (Dextran, Polythylenglykol, Polymyxin, Hyaluronsäure oder sogar Albumin) eine Resistenzerhöhung gegenüber Surfactant-inhibitoren zu erreichen [112; 130; 131; 132].

Gegenüber den natürlichen SF-Präparaten haben In Vitro Studien ebenfalls eine Wirksamkeit für ein rekombinant hergestelltes SP-C-haltiges (rSP-C) SF-Präparat aufgezeigt. Es konnte nach Instillation sowohl von nat.-SF als auch von rSP-C eine Verbesserung der Oxygenierung und Lungenfunktion aufgezeigt werden [2; 14, 25; 133; 134]. Des Weiteren ist das rSP-C Gegenstand zahlreicher Diskussionen, da eine verminderte Inaktivierung durch Mekonium und Plasmabestandteile im Vergleich zu anderen SF-Präparationen aufgezeigt wurde [85]. Dies könnte ein Vorteil in der Therapie des MAS gegenüber den nat.SF-Präparaten darstellen.

### **1.2.2.2 Surfactanttherapie des Mekoniumaspirationssyndroms – klinische Studien**

In nicht kontrollierten klinischen Studien wurden nur Neugeborene mit MAS mit SF behandelt, die bereits über einen langen Zeitraum mit hohen inspiratorischen Drücken und hohen Sauerstoffkonzentrationen behandelt worden waren [135]. Hierbei zeigte sich nur bei einem geringen Teil der behandelten Neugeborenen mit MAS eine geringgradige Verbesserung der Oxygenierung [120; 136; 137; 138; 139]. Findlay et al. konnte dahingegen die Wirksamkeit einer hochdosierten SF – Substitution innerhalb der ersten sechs Lebensstunden in der Behandlung des MAS in einer kontrollierten klinischen Studie nachweisen [140]. Es zeigte sich ebenfalls, dass eine kumulative Dosis (300mg/kg KG) zu einer deutlichen Verbesserung der Oxygenierung führte. Zudem konnte eine Reduktion der

Komplikationsrate (z.B. Pneumothorax), Beatmungsdauer und Anzahl der Kinder, die im weiteren Verlauf einer ECMO bedurften aufgezeigt werden. Weitere Studien beschreiben ebenfalls eine Verbesserung der Oxygenierung, des Gasaustauschs sowie einen Rückgang der Kinder, die einer ECMO-Therapie zugeführt werden müssten. Jedoch konnte keine Reduktion der Mortalität aufgezeigt werden [2; 110; 141; 142].

Neben der tierexperimentell und klinisch belegten Wirksamkeit der SF-Substitution beim sekundären, durch SF-Inhibitoren bedingten SF-Mangel beim MAS, wird ein Vorteil durch eine Modulation der pulmonalen Immunantwort durch die exogene SF-Therapie diskutiert [81; 82].

### **1.3 Der Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF**

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein pluripotenter Wachstums- und Permeabilitätsfaktor, der einen deutlichen Einfluss auf die Endothelzellfunktionen ausübt. Die VEGF-Familie umfasst VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D sowie den Plazenta Wachstumsfaktor [42; 45]. In der vorliegenden Arbeit soll VEGF-A (von nun an nur als VEGF abgekürzt) näher untersucht werden. VEGF werden eine Reihe von Funktionen, insbesondere für die Lunge, welches das Organ mit der höchsten VEGF-Expression darstellt, zugeschrieben. Er beeinflusst die Entwicklung der Lunge maßgeblich und ist darüber hinaus an der Aufrechterhaltung der adulten Lungenstruktur beteiligt [207]. VEGF besitzt eine geringe physiologische Breite. Außerhalb dieses Bereichs werden VEGF eine Reihe von pathophysiologischen Veränderungen in der Lunge zugeschrieben. Diese beinhalten eine gestörte Lungenentwicklung, die Entwicklung eines neonatalen Atemnotsyndroms (Respiratory distress syndrome = RDS) sowie einer CLD, und Entstehung eines Emphysems [42].

#### **1.3.1 Biologische Aktivität des VEGF**

In der Lunge fungiert VEGF als Wachstums-, Überlebens- und Differenzierungsfaktor für die Endothelzellen [45; 108]. Die Eigenschaften als Wachstumsfaktor konnten in vitro und vivo Studien dargestellt werden [42; 108]. Ebenso konnte dargestellt werden, dass der Einfluss von VEGF auf das Endothelwachstum organ- und situationsspezifisch ist. So reagieren, z.B.

Endothelzellen, stärker auf VEGF, wenn sie sich in einem Tumorverband befinden oder an der Neovaskularisation des Corpus luteum beteiligt sind [42].

Die Effekte von VEGF auf die funktionellen Eigenschaften der Endothelzellen sind vielfältig und besonders bedeutend für die Lungenfunktion und Eigenschaften der Pulmonalgefäße. So induziert es die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin. Die Synthese dieser Stoffe führt zu einer Vasodilatation und systemischen Hypotension [71; 72]. Die, durch VEGF aktivierte, NO-Synthetase fungiert wiederum, neben der NO-Synthese, als ein Mediator für die Angiogenese [73; 94; 100]. Ebenso vermittelt NO eine Erhöhung der Permeabilität der Gefäße [101]. Die Eigenschaften als Überlebensfaktor beruhen auf einer Aktivierung des Bcl-2 Proteins, das als ein Antagonist der Apoptose identifiziert wurde [102; 103].

Neben diesen Effekten auf die Endothelzellen, können auch eine Reihe nicht-endothelialer Zellen VEGF-Rezeptoren (VEGFR) exprimieren und so in ihrem Wachstum und ihrer Überlebenszeit durch VEGF moduliert werden. So unterliegen z.B Typ II Pneumozyten in ihrem Wachstum und Differenzierung der Anwesenheit von VEGF [104; 105]. Zudem konnten für VEGF Effekte auf Neurone, Pankreaszellen sowie für die Mobilisation und für das Überleben von Knochenmarkstammzellen und die Aktivierung von Immunzellen nachgewiesen werden [174; 175; 176]. Interessanterweise zeigt sich eine altersabhängige, progrediente Abnahme des Überlebenseffekts von VEGF auf die Endothel- und Knochenmarksstammzellen, die eine Rolle im Altern der Lunge spielen könnte [177].

### **1.3.2 Regulation der VEGF Transkription und Funktion der VEGF-Rezeptoren**

Das auf Chromosom 6 lokalisierte und von verschiedenen Zelltypen gebildete VEGF, ist ein 42-kD großes, Heparin-bindendes homodimeres Glykoprotein. Beim Menschen konnten fünf verschiedene Isoformen nachgewiesen werden. Diese unterscheiden sich anhand ihrer Größe (121, 145, 165, 189, 206 AS), biologischer Eigenschaften und Heparin-Sulfat-Bindungsfähigkeit [42]. Die meisten Zellen besitzen die Eigenschaft, verschiedene Isoformen gleichzeitig zu synthetisieren, wobei 121 und 165 die vorherrschenden Isoformen sind [23]. Während VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub> sezerniert und frei löslich sind, bleiben die größeren Isoformen VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> membrangebunden [178].

Die VEGF mRNA – Expression wird durch viele Faktoren beeinflusst. Die wichtigsten Faktoren sind Hypoxie, Hypoglykämie, verschiedene Zytokine, wie z.B. IL-1, IL-6, IL-4,

TNF- $\alpha$ , Platelet Derived Growth Factor, und aktivierte Onkogene [106; 107]. Die durch Hypoxie bedingte Transkription hängt von der Bindung eines Transkriptionsfaktors, dem hypoxia-inducible-factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), ab. Dieser bindet an eine HIF-1 $\alpha$  Bindungsstelle auf dem VEGF- Promotor und stimuliert die VEGF – Produktion [21]. Ebenso kontrolliert HIF-2 $\alpha$  die Expression der Isoformen VEGF<sub>164</sub> und VEGF<sub>189</sub> [191].

VEGF bindet an zwei partiell homologe Tyrosin–Kinase-Rezeptoren, VEGFR-1 (Flk-1) und VEGFR-2 (Flt-1). Diese Rezeptoren bestehen aus sieben extrazellulär angeordneten immunglobulin-artigen und einer intrazellulären tyrosinkinase-spaltenden Domäne. Sie interagieren und modifizieren die biologischen Effekte des VEGF [42]. VEGFR-1 und VEGFR-2 induzieren unterschiedliche Effekte von VEGF. Terman et al. beschrieben für VEGFR-2 die meisten, von VEGF induzierten, Effekte auf die Endothelzellen, wie z.B Zellproliferation, NO- und Prostazyklinsynthese sowie Angiogenese und Gefäßpermeabilität [18; 19; 42; 179]. Eine vermehrte Prostazyklinproduktion führt wiederum über einen Feedbackmechanismus zu einer vermehrten VEGF-Expression [42]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Hypoxie, neben einer vermehrten VEGF Expression, ebenfalls zu einer erhöhten Expression des VEGFR-2 führt [181; 182]. Durch tierexperimentelle Studien an VEGFR-2 Knock-Out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen dieses Rezeptors bereits embryonal durch eine fehlende Vaskulo- und Angiogenese letal ist [180].

Im Gegensatz hierzu ist VEGFR-1 nicht in der Lage, die Proliferation oder eine Chemotaxis in Endothelzellen zu induzieren. Interessanterweise induziert dieser Rezeptor aber die Migration von Monozyten und scheint darüber hinaus notwendig zu sein, um eine maximale VEGF-Antwort in Endothelzellen zu vermitteln [42; 183]. Ebenso wird über eine Feedback Funktion des Rezeptors für VEGF diskutiert [22]. Wie an Knock-Out-Mäusen gezeigt werden konnte, ist der VEGFR-1 essentiell für die Organisation der embryonalen Gefäße. Die Embryos dieser Tiere bildeten abnormale Gefäßkanäle aus endothelialen tubulären Strukturen aus. Sie starben schließlich in utero aufgrund einer fehlenden strukturellen Organisation der Gefäßwände [184].

## 2. Fragestellung

Das Mekoniumaspirationssyndrom ist eine der häufigsten Erkrankung des Neugeborenen mit einer Mortalität von 1%. Die Pathophysiologie des Mekoniumaspirationssyndroms ist komplex und primär durch eine toxische Pneumonitis bedingt. Die Folge ist eine Inaktivierung des intraalveolären Surfactantsystems. Diese geht mit einer Hypoxämie einher, die für den Krankheitsverlauf entscheidend ist. Eine Applikation von natürlichen Surfactantpräparaten führt in einigen Fällen zu einer Verbesserung der Oxygenierung und der Lungenmechanik. Jedoch sind hohe Dosen zur Überwindung des inhibitorischen Potenzials im alveolären Kompartiment von entscheidender Bedeutung. Neuere synthetisch hergestellte Präparate könnten zu einer Überwindung der Surfactantinaktivierung beitragen.

Weiterhin spielen eine Reihe von Wachstumsfaktoren, unter anderem auch der Vascular Endothelial Growth Factor, für die Entstehung von neonatalen Lungenerkrankungen eine Rolle. VEGF fungiert als Wachstums-, Überlebens- und Differenzierungsfaktor für die Endothelzellen. Studien konnten zeigen, dass das neonatale Atemnotsyndrom mit einer veränderten VEGF Expression einhergeht.

Vor diesem Hintergrund sollen in dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Welchen Effekt hat die intratracheale Applikation eines natürlichen, SP-B- und SP-C-haltigen Surfactantpräparates bzw. eines synthetischen SP-C-haltigen Surfactantpräparates auf die mRNA Expression und Proteinkonzentration der surfactantassoziierten Proteine B und C in einem experimentell induzierten Mekoniumaspirationssyndrom?
- 2) Welchen Effekt hat das, durch intratracheale Mekoniumapplikation induzierte, inflammatorische Lungenversagen auf die mRNA Expression des Vascular Endothelial Growth Factor?
- 3) Inwieweit beeinflusst die Gabe eines natürlichen, SP-B- und SP-C-haltigen Surfactantpräparates bzw. eines synthetischen SP-C-haltigen Surfactantpräparates die mRNA Expression des Vascular Endothelial Growth factor?

### **3. Materialien und Methoden**

#### **3.1 Tierversuche**

Die Tierversuche wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Martin Dörner (Betreuer PD Dr. med Irwin Reiss) durchgeführt. Ein Teil dieser Ergebnisse wurde bereits publiziert [81; 82]. Die aus den Tierversuchen entnommenen Lungen lieferten die Grundlage für die vorliegende Arbeit.

Des Weiteren entstammten 28 Proben gesunder Tiere der Forschungsgruppe von PD. Dr. A. Trotter (Abteilung für Neonatologie und Intensivmedizin, Universität Ulm). Die Proben dienten als Kontrollgruppe zur Analyse der mRNA- und Proteinexpression von SP-B, SP-C sowie des VEGF. Die von Trotter et al. gewonnenen Ergebnisse wurden bereits publiziert [157]. Den gesunden Tieren wurden, nach Entbindung und Tötung am 114. Tag der Trächtigkeit, der Thorax eröffnet und ein Gewebestück aus der linken Lingula entnommen und für die weiteren Analysen, wie unten beschrieben, aufbereitet.

##### **3.1.1 Versuchsdurchführung**

Die Experimente sind an 24 Ferkeln durchgeführt worden. Untersucht wurden nur Tiere, bei denen keine klinischen Zeichen für eine Infektion vorlagen. Ein Tier aus der Kontrollgruppe verstarb, ein weiteres aus dieser Gruppe wurde aufgrund technischer Fehler ausgeschlossen. Das Gewicht der in die Auswertung eingegangenen Tiere (n=22) betrug im Median 2200g (Bereich 1900-2500g) bei einem Alter im Median von 6 (Bereich 1-11 Tage) Tagen.

Nach Prämedikation mittels intramuskulärer Applikation von Ketamin (10mg/kg KG) erfolgte die Narkose über eine in der Ohrvene liegenden Kanüle (22 G, Vygon) mit Ketamin (5 mg/kg KG) und Midazolam (1 mg/kg KG). Alle Tiere wurden orotracheal intubiert (3,0 Rüs) und druckkontrolliert mit einem Servo 900C Respirator (Siemens Elma, Lund, Schweden) maschinell beatmet. Im Anschluss an die endotracheale Intubation in Rückenlage wurden die Tiere auf einem Heizkissen und unter einem Wärmestrahler gelagert. Die Temperatur wurde rektal bestimmt und während der gesamten Beobachtungsphase zwischen 38-38,5°C konstant gehalten. Die Lagerungsposition wurde gesichert und während der Beobachtungsphase nicht verändert. Während der Präparation und einer 30-minütigen Erholungsphase wurden die Tiere

mit einem PIP von 1,5 kPa, einem PEEP von 0,2 kPa, einer Atemfrequenz von 30 pro Minute, einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration ( $FiO_2$ ) von 1,0 und einem Inspirations-Expirations-Verhältnis von 1:2 maschinell beatmet.

Die Narkose wurde mit einer kontinuierlichen Infusion von Ketamin (2 mg/kg KG/h), Midazolam (1mg/kg KG/h) und Vecuronium (0,1mg/kg KG/h) aufrechterhalten und bei Bedarf der klinischen Situation angepasst. Die Gabe vasoaktiver bzw. inotroper Medikamente war während der Beobachtungsphase nicht erforderlich.

Die Volumenhomöostase der Tiere wurde mittels entsprechender Volumensubstitution mit Ringer-Laktat-Lösung bei einer Flussrate von 10 ml/kg KG /h aufrechterhalten. Zur Überwachung des Kreislaufes und Bestimmung der arteriellen Blutgase erhielten alle Tiere eine Kanüle in die rechte A. carotis und mittels perkutaner Punktion der V. femoralis einen zentralvenösen Katheter zur Messung des zentralvenösen Venendruckes und der kontinuierlichen Infusion der Narkotika und der Flüssigkeitssubstitution.

Das Lungenversagen wurde ähnlich dem von Soukka und Mitarbeiter [6] beschriebenen Modell induziert: Mekonium wurde von gesunden Neugeborenen mit fehlendem Nachweis einer Infektion gewonnen, lyophilisiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Zur Induktion des Lungenversagens wurden 5 ml/kg KG Mekonium 20% (65mg/ml NaCl 0,9%) in vier Aliquots innerhalb von 2-3 Minuten intratracheal verabreicht. Nachdem 15 Sekunden der PIP auf 2,5 kPa und PEEP auf 0,4 kPa erhöht wurde, wurde das Mekonium unter laufender Beatmung für alle Tiere in gleicher Weise intratracheal verabreicht. Die übrigen Beatmungsvariablen wie die Beatmungsfrequenz (30/min), das Verhältnis von In- zu Expiration (I:E=1:2) und die inspiratorische Sauerstoffkonzentration ( $FiO_2=1,0$ ) wurden beibehalten. 30 Minuten nach Applikation von Mekonium kam es zu einer deutlichen Gasaustauschstörung mit einem  $paO_2 < 9$  kPa, sowie den radiologischen Zeichen eines Mekoniumaspirationssyndroms mit Atelektasen, überblähten Lungenarealen und beidseits infiltrativen Veränderungen. Die Gasaustauschstörung stellte den Ausgangswert für ein stabiles Lungenversagen beim Mekoniumaspirationssyndrom dar.

Nach Induktion des Lungenversagens erfolgte die Randomisierung in eine von drei Behandlungsgruppen. Die Kontrolltiere erhielten intratracheal einen Bolus physiologischer Kochsalzlösung, während bei der Behandlungsgruppe I 75 mg/kg KG eines rekombinanten SP-C Surfactants (ALTANA Pharma, Konstanz) und bei der Behandlungsgruppe II 75 mg/kg

KG eines natürlichen bovinen SP-B- und SP-C- haltigen Surfactants (SF-RI1; Alveofact®, Boehringer Ingelheim, Biberach) appliziert wurden. Nach einer weiteren Beobachtungszeit von 330 Minuten erfolgte die schmerzlose Tötung der Tiere durch eine Überdosis an Kaliumchlorid und Phenobarbital. Unter laufender Beatmung wurde der Brustkorb eröffnet und eine Kanüle in die A. pulmonalis platziert, anschließend der linke Vorhof inzidiert und die Lunge über die liegende Kanüle *in situ* mit einer Ringer-Laktat-Lösung mit Procaine (250mg/l), Heparin (20U/ml) und CaCl (2,2 mmol/l) für zehn Minuten perfundiert. Der PIP wurde für 15 Sekunden bei 2,5 kPa und anschließend bei 1,0 kPa belassen. Die Lungengewebsproben des oberen und unteren linken Lungenlappens wurden entnommen und in Flüssigstickstoff für molekularbiologische Untersuchungen asserviert. Die gesamte rechte Lunge wurde mit 300ml einer Formaldehyd (4,6%)-Glutaraldehyd (0,5%)-Lösung für zehn Minuten perfundiert, anschließend die Trachea bei einem PEEP von 1,0 kPa abgeklemmt, die Lunge entnommen und in die gleiche Lösung für die anschließenden histologischen Untersuchungen gebracht.

### 3.1.2 Surfactantpräparationen

Für alle Experimente wurde SF-RI1 (Alveofact®, Boehringer Ingelheim, Biberach) verwendet. Die Herstellung dieser Surfactantpräparation geht im Wesentlichen auf eine schon beschriebene Methode zurück [155]. Die Zusammensetzung ist vergleichbar mit anderen Rinderlungensurfactants und besteht aus 88% Phospholipiden, 4% Cholesterol, 1% hydrophoben surfactant-assoziierten Proteinen, 0,6% freien Fettsäuren, Triglyceriden und Kalzium. Diese Bestandteile wurden in 0,45% NaCl suspendiert. Der pH-Wert lag bei 6,5. Das Material adsorbierte in weniger als einer Sekunde an eine Wasseroberfläche und verringerte die Oberflächenspannung bei Kompression auf etwa 6 mN/m. Bei zyklischer Kompression und Entspannung betrug die Oberflächenspannungsdifferenz 20 mN/m (pulsierende Blase). Die vorliegende Trockensubstanz wurde in 0,9%iger Kochsalzlösung mit einer Phospholipidkonzentration von 25 mg/ml zubereitet.

Der rSP-C Surfactant (Venticute®; ALTANA Pharma, Konstanz) enthält 2% rekombinant hergestelltes SP-C; rSP-C besteht aus 34 Aminosäuren, deren Sequenz mit der des humanen SP-C weitgehend identisch ist, hat aber im Gegensatz dazu in Position 4 und 5 die Aminosäure Cystein durch Phenylalanin und in Position 32 Methionin durch Isoleucin ersetzt. Hierdurch



wird eine Aggregation des SP-C unter Beibehaltung der physikalischen Eigenschaften des SP-C in dipalmitoylierter Form verhindert. Dem rSP-C sind Phospholipide mit einem Verhältnis von 70:30 von DPPC und Palmitoyl-oleoylphosphatidylglycerol mit 5% (w/w) Palmitinsäure zugefügt. Das rekombinante SP-C Surfactant liegt als Trockensubstanz vor und wird vor Anwendung in 0.9%iger Kochsalzlösung mit einer Konzentration von 25 mg Phospholipid/ml zubereitet.

### **3.1.3 Datenerfassung**

Bei allen Versuchstieren wurde kontinuierlich der arterielle Blutdruck (RR) und zentralvenöse Druck (ZVD) gemessen. Die Herzfrequenz wurde mit Hilfe eines R-Zacken getriggerten Frequenzmessers über das EKG bestimmt. Die dynamische Compliance (C<sub>dyn</sub>) und das inspiratorische Tidalvolumen wurden über ein Pneumotachometer, das am Tubusadapter aufgesetzt wurde, kontinuierlich ermittelt (C02SMO plus 8100, Novamatrix Medical Systems Inc, USA). In arteriellen Blutproben wurde unmittelbar nach der Blutabnahme der Sauerstoffpartialdruck (paO<sub>2</sub>), der Kohlendioxidpartialdruck (paCO<sub>2</sub>) mit Standardblutgaselektroden (ABL 520, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) gemessen. Alle 30 Minuten wurden paO<sub>2</sub>, paCO<sub>2</sub>, C<sub>dyn</sub>, Tidalvolumen, Herzfrequenz, RR und ZVD registriert.

### **3.1.4 Semiquantitative histomorphometrische Untersuchung**

Die semiquantitative histomorphometrische Auswertung der histologischen Lungenpräparate erfolgte ohne Angaben der Behandlungsgruppen durch Dr. med. Michael Ebsen. Hierbei wurden jeweils die rechten Lungen getrennt, nach Oberlappen (ventral und dorsal), Mittellappen und Unterlappen (ventral und dorsal) untersucht und mit Hilfe eines Scoringsystems von 1-3 je nach Intensität und Ausprägung nach folgenden Kriterien lichtmikroskopisch (Mikroskop Axiophot 2, Fa. Zeiss) ausgewertet: alveoläre und interstielle Inflammation pro Gesichtsfeld bzw. Grad der Ausprägung, interstitielle und alveoläre Einblutungen sowie interstitielles und alveoläres Ödem. Weiterhin wurden atelektatische und überblähte Lungenareale entsprechend bewertet [81; 82; 157].

### 3.2 RNA –Isolation und Reverse Transkription

Um die Degradierung der RNA durch eine Kontamination der Proben mit RNAsen zu vermindern, wurden folgende Maßnahmen durchgeführt:

- Autoklavierung der Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen (90min/120 °C).
- Es wurden nach Möglichkeit RNase-freie Materialien verwendet.
- Getrennte Räumlichkeiten und Pipettensätze zur Herstellung der Reaktionsansätze und späterer RNA-Zugabe.
- Bei jeder RT wurde eine negativ Probe aus Reaktionsansatz und HPLC-reinem Aqua bidest. hergestellt. Diese Probe diente als Kontrolle der Kontaminationsfreiheit.

#### 3.2.1 RNA-Isolierung

Zur Isolation wurde eine modifizierte Guanidinium - Thiozyanat-Phenol – Chloroform - Methode nach Chomczynski et al. [75] angewendet.

Die zuvor in -80°C gelagerten Lungen wurden unter stetiger Zugabe von flüssigem Stickstoff (-196 °C) mit einem Pistill mechanisch homogenisiert. Die Zellen des gewonnen Homogenats wurden nun mit einer Lösung aus 1000µl Phenol und Guanidin-Isothiocyanat lysiert (Trizol<sup>®</sup>, Gibco). Die Extraktion der RNA erfolgte, nach Zugabe von Chloroform, im Verhältnis 1:10 und anschließender Inkubation auf Eis (5 Minuten). Im Anschluss an die Inkubation wurden die Proben für 15 Minuten (12.000 U/min, 4 °C) zentrifugiert. 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 Minuten auf Eis und anschließender Zentrifugation für zwölf Minuten (12.000 U/min, 4 °C), wurde eine vollständige Ausfällung der RNA erreicht. Das entstandene Pellet wurde nun mit 70-prozentigem Ethanol (500µl) und einem weiteren Zentrifugationsschritt von acht Minuten (7.500 U/min, 4 °C) gewaschen. Nach diesem Schritt wurde das Ethanol mit einer Pipette abgezogen und das Pellet 15 Minuten bei Raumluft getrocknet. Das trockene RNA-Pellet wurde nun in 50 µl HPLC gereinigtem Wasser gelöst und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

### 3.2.2 Photometrische Quantifizierung der RNA-Menge

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde spektralphotometrisch durch die Messung der optischen Dichte bei 260 nm Lichtwellenlänge bestimmt, da Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm ihr Absorptionsmaximum besitzen. Der Quotient der Extinktionen bei 260 nm (DNA/RNA) und 280 nm (Proteine) gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA [88]. Der Referenzbereich liegt zwischen 1,6 und 1,8. Niedrige Quotienten weisen auf eine starke Verunreinigung der Probe hin.

### 3.2.3 Reverse Transkription (RT)

In der folgenden RT werden die gewonnenen RNA-Fragmente enzymatisch in komplementäre DNA-Stränge (copy-DNA, cDNA) transskribiert. Dies geschieht mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) sowie mittels der 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 hergestellten RNA wurden mit Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 50µl ergänzt. Die RNA wurde zusammen mit dem Primermix, um intra- und intermolekulare Sekundärstrukturen des Primers zu vermeiden, fünf Minuten bei 65 °C inkubiert und im Anschluss für eine Minute auf 4 °C abgekühlt. Danach wurde der Enzymmix hinzugegeben und der RT-Ansatz in den Thermocycler überführt.

Folgendes Cycler-Protokoll wurde gewählt:

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

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

### **3.3 Real-time PCR**

Real-time-PCR (rt-PCR) ist ein PCR-Verfahren (PCR = Polymerase-Kettenreaktion), das die Menge der entstandenen Produkte während der PCR-Reaktion in Echtzeit misst. Man kann rt-PCR also mit Echtzeit-PCR übersetzen. In der Literatur wird u. a. auch der Begriff kinetic PCR (kinetische PCR) verwendet.

#### **3.3.1 Real-time PCR – Prinzip der relativen Quantifizierung mittels $\Delta\Delta C_T$ –Methode**

Mit der PCR ist es möglich, in vitro spezifische Sequenzbereiche einer Nukleinsäure schon aus kleinsten Mengen heterogenen genetischen Ausgangsmaterials ökonomisch (automatisiert) zu amplifizieren, und es so einer Analyse oder der Weiterverarbeitung zugänglich zu machen.

Die rt-PCR macht sich die 5' Exonuklease Aktivität der Taq Polymerase zu nutze und vereint Amplifikation und PCR-Produktnachweis simultan in einem Reaktionsgefäß. Sie ist sensitiver und präziser als die kompetitive PCR.

Bei der rt-PCR wird die Mengenveränderung des Amplifikats in Echtzeit durch die Erfassung der Fluoreszenzlichtemission im Reaktionsansatz, welche in Abhängigkeit von der Produktmenge erzeugt wird, ermittelt. Durch die Messung wird der Amplifikationsvorgang nicht gestört [77, 15].

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. Sie ist am 5' Ende mit einem

fluoreszenten Farbstoff (Fluoreszinderivat), dem sogenannten Reporter, und am 3' Ende mit einem weiteren Farbstoff, dem sogenannten 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) [78].

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 [15; 79; 80]. Freie nicht hybridisierte Sonden werden folglich nicht hydrolysiert.

Aufgrund der Akkumulation der PCR-Produkte steigt die 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 rtPCR in der exponentiellen Phase der Reaktion gilt:

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

mit

$R_C$  = das 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

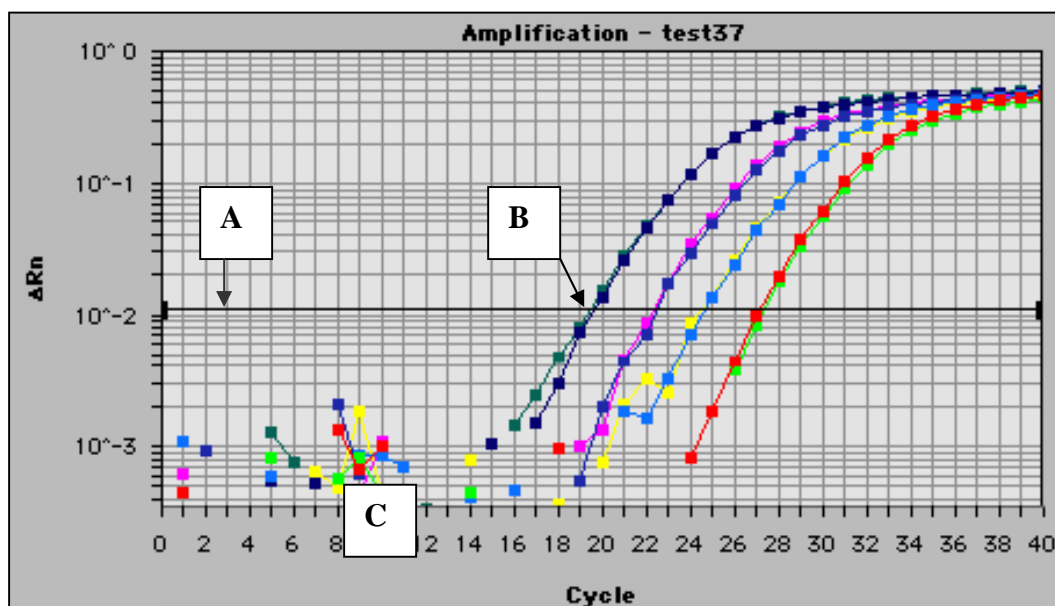
$E$  = Effizienz der PCR des Amplikons.

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 im selben Zeitraum 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 (Abb. 4A). Da die zur Berechnung der relativen DNA-Menge herangezogene Mathematik nur für PCR-Reaktionen im Stadium der exponentiellen Amplifikation gilt, muss der Threshold in diesem Bereich gewählt werden, der aufgrund der halblogarithmischen Darstellung der Werte leicht als Gerade ausgemacht werden kann. Weiterhin muss ein mathematischer Glättungsfaktor, die Baseline, festgelegt werden. Dieser Faktor minimiert ein Störsignal, das vor allem in den Anfangszyklen auftritt und die Baseline-Floureszenz nicht deutlich sichtbar macht. In dieser Studie wurde der Startpunkt der Baseline als 3. Zyklus der Amplifikation festgelegt. Als Stoppunkt wurde der Zyklus gewählt, an dem noch kein Anstieg der Kurven zu sehen war. Der Vergleichsparameter ist derjenige PCR-Zyklus, währenddessen der Graph des Gens 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. Der in Abb. 4 gezeigte  $C_T$  Wert beträgt folglich etwa 19,1 (Abb. 4B).

**Abb. 4 Graphische Ausgabe der rt-PCR-Werte eines Plates mit Dreifachwerten für 4 Gene.**



Threshold (A),  $C_T$ -Wert (B), Baseline (C): Start Zyklus 3, Stop Zyklus 15

Mit der Einführung eines Thresholds ändert sich die oben genannte Gleichung in

$$T = K \cdot N_0 \cdot (1 + E)^{C_T} \quad \text{äquivalent mit} \quad N_0 = \frac{T}{K} \cdot \frac{1}{(1 + E)^{C_T}}$$

mit

T = Threshold;  $C_T$  = Zyklus, an dem T erreicht wird (s. o.).

Sind Baseline und Threshold festgelegt, lassen sich nun  $C_T$ -Werte von Proben miteinander vergleichen, für die diese beiden Parameter konstant sind. Demnach gilt dies 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 relativ zu einer zweiten nicht verwandten Gensequenz, dem so genannten Housekeeping-Gen geschätzt. Ein Housekeeping-Gen ist durch seine konstante Expression in einem bestimmten Organ gekennzeichnet. Diese Methode bietet den Vorteil, ohne Umweg 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 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.

Wird nun, ausgehend von der gleichen cDNA, sowohl ein Zielgen als auch ein Housekeeping-Gen amplifiziert, kann man folgenden Quotienten bilden:

$$\frac{N_{Z0}}{N_{H0}} = \frac{\frac{T_Z}{K_Z} \cdot \frac{1}{(1 + E_Z)^{C_{Tz}}}}{\frac{T_H}{K_H} \cdot \frac{1}{(1 + E_H)^{C_{Th}}}}$$

mit Index Z für Zielgen und Index H für Housekeeping-Gen.

Unter der Annahme  $E_Z = E_H = E$  kann der Term vereinfacht werden zu:

$$N_{Z_0, H_0} = \frac{N_{Z_0}}{N_{H_0}} = \frac{T_Z \cdot K_H}{K_Z \cdot T_H} \cdot (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

mit  $\Delta C_T = C_{Tz} - C_{Th}$ .

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 stets gleiche Kalibrator-cDNA eingeführt.

Die Kalibratorprobe wurde zuvor nach dem gleichen Procedere, wie dem der Probengewinnung (s. o.), aus dem Material mehrerer zufällig ausgewählter Lungen von Versuchstieren der Vorversuche gewonnen. Der Kalibrator wurde in Vorversuchen etabliert

und enthielt alle untersuchten Gene in gleicher Expression wie im Probenmaterial. Er wurde, neben den zu untersuchenden Proben, für jedes Gen (= für jeden Mastermix) auf jedem Plate in getrennter Reaktion als 3fach-Wert in die PCR eingebracht.

Durch die Einbringung des Kalibrators als Verankerung ergibt sich nun, indem man das Verhältnis der Startkopienzahl von Ziel- und Housekeeping-Gen im Kalibrator willkürlich gleich 1 setzt, folgender Quotient:

$$N_{Z_0, H_0, K_0} = \frac{N_{Z_0, H_0 P}}{N_{Z_0, H_0 K}} = (1 + E)^{-\Delta\Delta C_T}$$

mit  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T_P} - \Delta C_{T_K}$ .

Index P steht für die untersuchte Probe, Index K für den Kalibrator.

Mit dieser Gleichung kann, unter der Voraussetzung konstant gleicher PCR-Effizienzen von Ziel- und Housekeeping-Gen in allen durchgeführten PCR-Ansätzen, das Verhältnis der Startkopienzahlen von Ziel- und Housekeeping-Gen zueinander in den Proben 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, vereinfacht sich der Ausdruck zu

$$N_{Z_0, H_0, K_0} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Durch diese Berechnung wird das Zielgen auf das Housekeeping-Gen normalisiert.

Bei der relativen Quantifizierung mittels der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode kann folglich der Mengenunterschied der Startkopienzahl eines Gens in zwei verschiedenen Proben, durch die Normalisierung auf das Housekeeping-Gen, als Verhältniszahl wiedergegeben werden. Buchstäblich würde das eine Aussage wie „In Probe A beträgt das Verhältnis von Ziel-Gen zu Housekeeping-Gen das 1,539fache des Verhältnisses der beiden Gene in Probe B“ zulassen. Einfacher ausgedrückt ist die Expression des betrachteten Gens in Probe A also ca. 1,5 Mal höher als in Probe B.



### 3.3.2 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. Um eine Kontamination mit probenähnlicher DNA zu vermeiden, wurden folgende Maßnahmen getroffen:

- 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
- Amplifikation einer Negativprobe (Non Template Control = NTC) bei jedem rt-PCR-Durchgang, bestehend aus Amplifikationsansatz und HPLC-reinem Aqua bidest., zur Kontrolle der Kontaminationsfreiheit des Reaktionsansatzes.

Zunächst wurde ein aus qPCR-Mastermix™ bestehender Ansatz, für das jeweilige Gen spezifischem Forward Primer (FP) und Reverse Primer (RP) sowie einer genspezifischen Fluoreszenzsonde und HPLC-reinem Aqua bidest., 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) unter Bezugnahme auf Hardt et al [16] designed. Es wurden die folgenden Gene untersucht: VEGF sowie SP-B und SP-C. Eine detaillierte Beschreibung der Primer und TaqMan™-Probes findet sich im Anhang (siehe LXXIII ff.).

In das Reaction Plate (Plate) 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 Dreifach Werte sowie pro Platte eine NTC-Probe und eine Kalibrator-cDNA als Dreifach-Wert pipettiert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mit dem Abi Prism 7700 Sequenz Detector.

Es wurde folgendes standardisiertes PCR-Profil nach sorgfältiger Optimierung gewählt:

- Initiale Denaturierung bei 50 °C für zwei Minuten und 95 °C für zehn Minuten.
- 45 Zyklen der Denaturierung bei 95 °C für jeweils 15 Sekunden und „primer annealing“ bzw. „primer extension“ bei 60 °C für eine Minute.

Die Quantifizierung erfolgte, wie oben beschrieben mittels der  $\Delta\Delta C_t$  – Methode.

### **3.4 Quantifizierungen der Surfactantproteine aus Lungenhomogenat**

Die Quantifizierung der Surfactantproteine mittels ELISA erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. med. Andreas Günther am Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen.

Die hydrophoben Apoproteine SP-B und SP-C wurden mit Hilfe eines modifizierten und bereits von Krämer et al. [76] und Schmidt et al [89] publizierten ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay) Verfahren bestimmt. Die SP- Konzentrationen wurden aus Homogenat des linken Ober- und Unterlappens 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.

#### **3.4.1 SP-B und SP-C- 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 (40ng/Well bis 312.5 pg/well), verdünnt und anschließend auf die Mikrotiterplatten aufgetragen. Als SP-B-Standard diente isoliertes humanes SP-B.

Das Protokoll des SP-C ELISA entsprach, bis auf einige Ausnahmen, dem Ablauf der SP-B Quantifizierung. Die Verdünnung der Proben zur SP-C Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit 80%iger 2-Propanol-Lösung im Verhältnis 1:500. Ebenso wurde der Standard

mit dieser Lösung in abnehmender Konzentration verdünnt. Der Standard bestand aus dipalmitoylierten rekombinanten SP-C.

Die Mikrotiterplatten wurden anschließend bei 37°C sechs Stunden lang getrocknet. Durch eine Zugabe von 100µl Triflourethanol wurde das variable Bindungsverhalten der Proben an der Plattenoberfläche minimiert. Als nächstes erfolgte durch zwei Waschschriffe mit jeweils 200µl Diisopropylether/1-Butanol (3:2 v/v) die selektive Entfernung der Phospholipide von den an der Platte gebundenen SP-B. Der erste Waschschriff beinhaltete eine 20-minütige Inkubationszeit bei Zimmertemperatur unter Schütteln. Zur SP-C Quantifizierung wurden die oben beschriebenen Waschschriffe mit Methanol durchgeführt.

Nach Entfernung des Waschüberstandes wurden die Proben mit 200µl PBS/0.5 Tween 20 dreimal hintereinander gewaschen. Nun wurde den Proben zur Blockierung überschüssiger Bindungsstellen PBS/1% Rinderserumalbumin (BSA) hinzugegeben und zwei Stunden lang inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriffen mit PBS/0.5 Tween 20 wurden die Proben mit dem primären Antikörper zwölf Stunden bei Raumtemperatur inkubiert:

- anti SP-B: 8B5E, monoklonale Antikörper gegen porcines SP-B.
- anti-SP-C: poloyklonales Antiserum gegen humanes rekombinantes SP-C und Kreuzreaktion mit porcinem SP-C.

Die Konzentration der SP-B Antikörper betrug 5µg/mL in PBS/1% BSA. Anti-SP-C lag in einer 1:2000 (v:v) Verdünnung in PBS/1% BSA vor.

Nach einem weiteren Waschschriff erfolgte die Auftragung der sekundären Antikörper und eine anschließende Inkubation von drei Stunden bei Zimmertemperatur. Nach der Inkubationszeit erfolgte wiederum ein dreimaliges Waschen. Die sekundären Antikörper bestanden aus:

- biotinylierten SP-B Anti-Maus-IgG Antikörper (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland).
- biotinylierten SP-C Anti-Hasen-IgG Antikörper (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland).

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 Minuten nach der Farbentwicklung erfolgte die spektralphotometrische Auswertung bei

450 nm mit einem ELISA-Photometer (Tecan, Crailsheim, Deutschland). Die SP-Standardkurven wurden durch rechnergestützte Cubic-Spline-Interpolation gewonnen.

### **3.5 Statistische Datenanalysen**

Die statistische Analyse wurde am „Institut für Medizinische Informatik“ der Justus – Liebig – Universität Gießen durch Herrn Wolfgang Pabst unter Verwendung von SPSS für Windows Version 11.5, durchgeführt.

Der Effekt einer SF-Applikation auf die Variablen der Lungenfunktion während des Beobachtungszeitraumes wurde mittels einer Zweifaktoren-Varianzanalyse in wiederholten Messungen getestet. Eine Normalverteilung der Daten konnte angenommen werden.

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. Bei diesen 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 Einfaktoren-Varianzanalyse mit einem posthoc-Test nach Scheffé durchgeführt.

Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0.05$  festgesetzt. Die jeweiligen Signifikanzniveaus sind im Ergebnisteil angegeben.

## 4. Ergebnis

Für die mRNA Expressionsanalyse der SF-Proteine B und C und des VEGF sowie zur Quantifizierung der SF-Proteine B und C standen 18 Proben zur Verfügung. Aufgrund von Degradation der RNA konnten für zwei Tiere aus der MAS-nat-SF Gruppe und für ein Tier aus der MAS-NaCl Gruppe keine Analysen durchgeführt werden. Die Ergebnisse der SP-B und SP-C Expression wurden bereits von Hilgendorff et al. in *Critical Care Medicine* (2006;34(1):203-10) publiziert [82].

Als Kontrollgruppe (n=28) dienten die von der Arbeitsgruppe von PD Dr. A. Trotter zur Verfügung gestellten 28 Proben. Diese Proben wurden von Trotter et al. gewonnen und die Ergebnisse bereits im Rahmen der Arbeit „*Prenatal Estrogen and Progesterone Deprivation Impairs Alveolar Formation and Fluid Clearance in Newborn Piglets*“ publiziert [157].

Es ergab sich folgende Gruppeneinteilung:

- Kontrollgruppe (gesund) n=28
- MAS-NaCl n=5
- MAS-rSP-C n=6
- MAS-nat SF n=4.

### 4.1 mRNA Expression und Quantifizierung der SF-Proteine B und C

#### 4.1.1 Surfactant Protein B und C mRNA Expression

Nach Induktion des MAS zeigte sich nach dem Beobachtungszeitraum eine signifikant erhöhte SP-B mRNA Expression in der MAS-NaCl Gruppe im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ( $p < 0.001$  Grafik 1A;  $p < 0.05$  Tabelle 1). Eine Applikation von rSP-C bzw. nat-SF führte in diesen beiden Gruppen ebenfalls zu einer signifikant erhöhten mRNA Expression von SP-B, verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ( $p < 0.001$ , Grafik 1A;  $p < 0.05$  Tabelle 1). Vergleicht man die beiden SF-behandelten Gruppen mit der MAS-NaCl Gruppe, so zeigt sich eine tendenziell höhere Ausprägung der SP-B mRNA Expression in den SF-Gruppen. Signifikante Unterschiede konnten jedoch nicht gefunden werden.

Die SP-C mRNA Expression war in der MAS-NaCl Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt ( $p < 0.001$ , Grafik 2A;  $p < 0.05$  Tabelle 1). Die Applikation von rSP-C

( $p < 0.03$ , Grafik 2) oder nat.-SF ( $p < 0.001$ , Grafik 2) führte zu keiner signifikanten Veränderung der SP-C Expression im Vergleich zur MAS-NaCl-Gruppe.

Im Vergleich der Ober- und Unterlappen konnten in der Genexpression keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

**Tabelle 1: mRNA Expression der SF-Proteine B und C**

Gruppe	SP-B (18S)	SP-C (18S)
Kontrollgruppe (n=28)	6.59 (3.05-30.56)	3.52 (1.63-6.76)
MAS-NaCl (n=5)	83.67* (0.51-576.0)	0.26* (0.01-0.92)
nat.-SF (n=4)	301.72* (2.40-3019.3)	0.43* (0.02-2.39)
rSP-C SF (n=6)	289.43* (1.41-2480.9)	0.31* (0.01-1.64)

\*  $p < 0.05$  vs. Kontrollgruppe; Median und Bereich

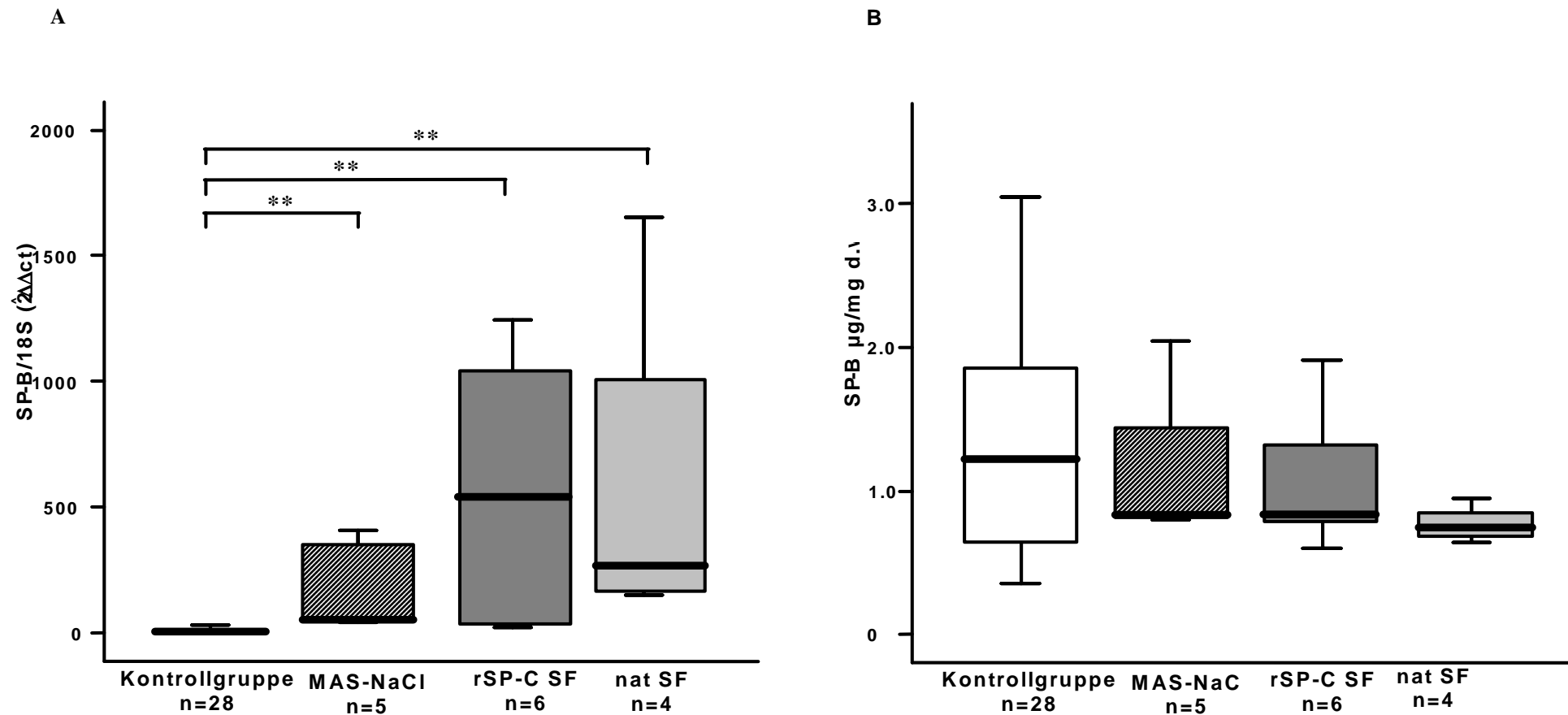
#### 4.1.2 Surfactant Protein B und C Konzentrationen

In der getrennten Analyse der Proteinkonzentration des Ober- und Unterlappens der linken Lunge konnte kein signifikanter Unterschied in der SP-B und SP-C Konzentration innerhalb der einzelnen Gruppen dargestellt werden. Daher wurden die Mittelwerte berechnet und zur weiteren Analyse benutzt. Die nachgewiesenen SP-B und SP-C Konzentrationen wurden zum besseren Vergleich in Relation zum Trockengewicht der Lunge (*lung dry weight*, d.w.) gesetzt.

Die Analyse der Proteinkonzentrationen zeigte keinen signifikanten Unterschied der SP-B und SP-C Konzentration zwischen der gesunden Kontrollgruppe und der MAS-NaCl Gruppe

(Grafik 1B; 2B). Jedoch war ein Trend zu verminderten SP-B-Konzentrationen in Lungenhomogenaten der MAS- Gruppen erkennbar, dieser war allerdings nicht signifikant ( $p=0.2$ , Grafik 1B; 2B)

Eine Applikation von rSP-C oder nat.-SF führte nicht zu einem signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Grafik 1B; 2B).

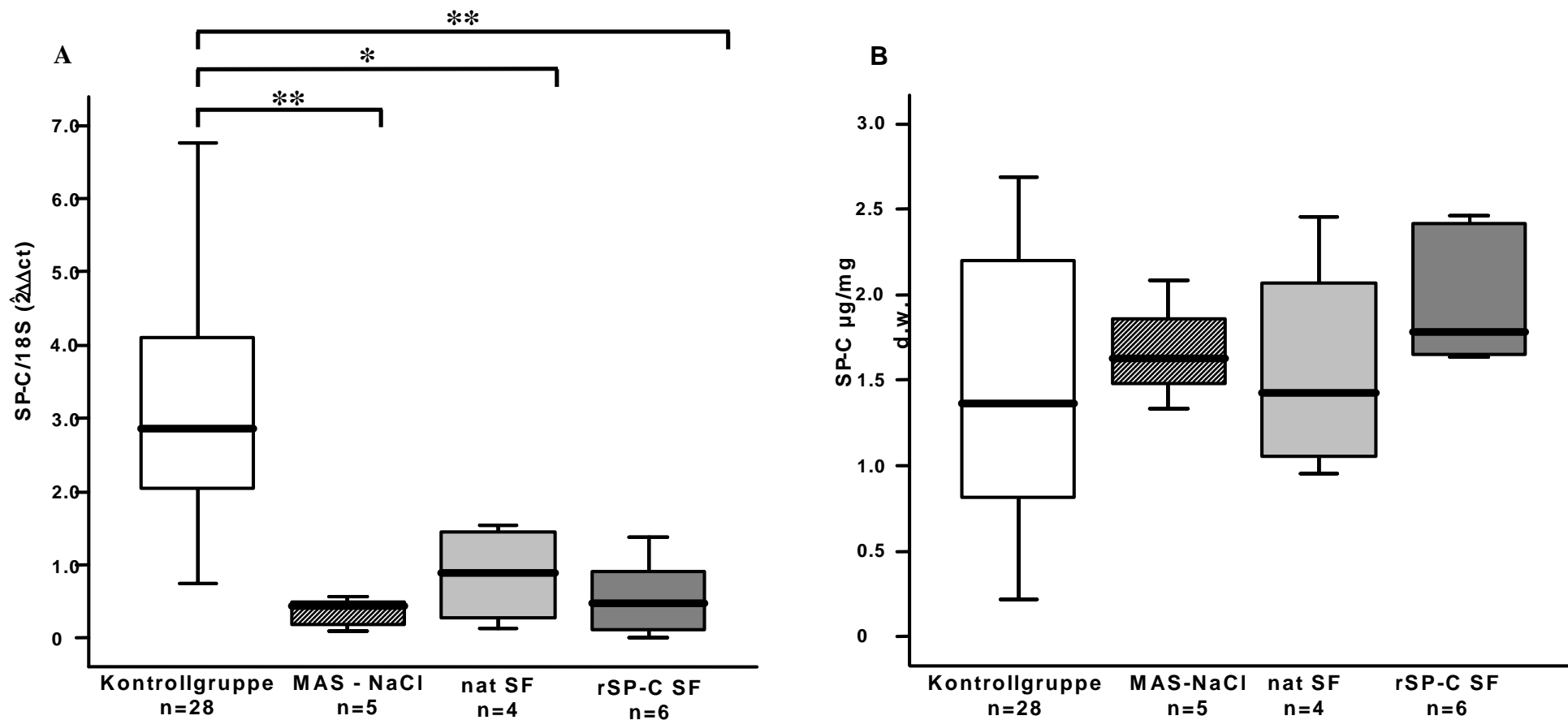
**Grafik 1: Pulmonale mRNA-Expression und Protein-Konzentration für SP-B im experimentell induzierten MAS [82]**

**A:** Die relative Quantifizierung der mRNA wurde mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode mit 18S als Housekeeping Gen durchgeführt. In der Abbildung sind Median, Interquartilbereich (25-75%) und Extremwerte dargestellt.  $**p < 0.001$  im Vergleich zur Kontrollgruppe.

**B:** SP-B Konzentration, angegeben in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  und d.w. Es sind Median, Interquartilbereich (25-75%) und Extremwerte dargestellt.



Grafik 2: Pulmonale mRNA-Expression und Protein-Konzentration für SP-C im experimentell induzierten MAS [82]



**A:** Die relative Quantifizierung der mRNA wurde mit Hilfe der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode mit 18S als Housekeeping Gen durchgeführt. In der Abbildung sind Median, Interquartilbereich (25-75%) und Extremwerte dargestellt.  $P^* < 0.03$ ;  $**p < 0.001$  im Vergleich zur Kontrollgruppe.

**B:** SP-C Konzentration, angegeben in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  und d.w.. Es sind Median, Interquartilbereich (25-75%) und Extremwerte dargestellt.

#### 4.2 Vascular Endothelia Growth Factor mRNA-Expression

Da keine signifikanten Unterschiede in der Expression des VEGF zwischen Ober- und Unterlappen der linken Lunge dargestellt werden konnten, werden im Folgenden die Ergebnisse für die gesamte linke Lunge besprochen. Die Analyse der VEGF mRNA-Expression aus Proben der gesamten linken Lunge ergab in den drei MAS –Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedrige Werte ( $p < 0.001$ ; 18S;  $\beta$ -Actin; Tabelle 2, Grafik 3). Tendenzielle Veränderungen innerhalb der einzelnen Gruppen im Gegensatz zur Kontrollgruppe konnten nicht aufgezeigt werden. Die Applikation von rSP-C oder nat.-SF führte zu keiner signifikanten Veränderung der VEGF mRNA-Expression innerhalb des Beobachtungszeitraums (Tabelle 2, Grafik 3) im Vergleich zur MAS-NaCl-Gruppe.

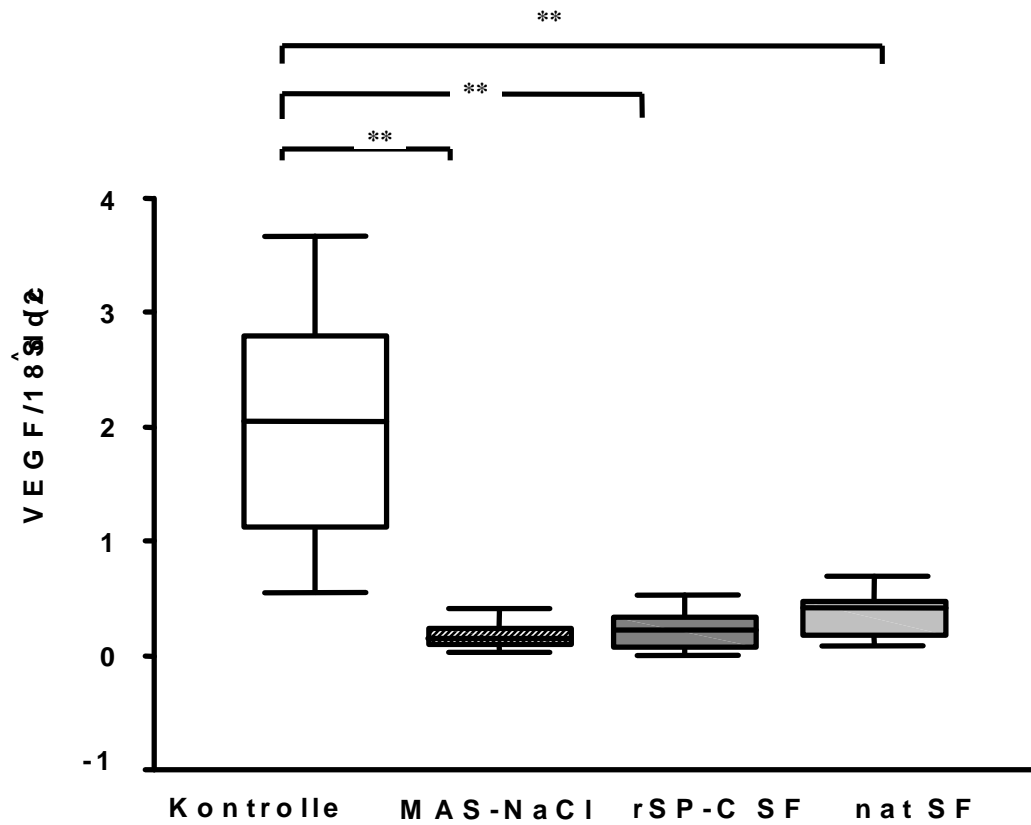
**Tabelle 2: pulmonale VEGF mRNA-Expression beim neugeborenen Ferkel im experimentell induzierten MAS**

Gruppe	VEGF (18S)	VEGF ( $\beta$ -Act)
Kontrollgruppe	1.83 $\pm$ 0.59	2.64 $\pm$ 0.59
MAS-NaCl	0.15 $\pm$ 0.49 **	0.33 $\pm$ 0.37 **
nat.-SF	0.26 $\pm$ 0.38 **	0.31 $\pm$ 0.38 **
rSP-C SF	0.15 $\pm$ 0.27 **	0.52 $\pm$ 0.40 **

Die mRNA-Expression wurde auf die verschiedenen Housekeeping-Gene normalisiert; Geometrisches Mittel und Dispersionsfaktor.

\*\*  $p < 0.001$  vs. Kontrollgruppe

**Grafik 3: pulmonale VEGF mRNA-Expression beim neugeborenen Ferkel im experimentell induzierten MAS**



Relative mRNA-Quantifizierung mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Als Housekeeping- bzw. Referenz - Gen wurde 18S verwendet. In der Abbildung sind Median, Interquartilbereich (25-75%) und Extremwerte dargestellt. \*\* $p < 0.001$  im Vergleich zur Kontrollgruppe.

## 5. Diskussion

Die Pathophysiologie des Mekoniumaspirationssyndroms (MAS) ist sehr komplex. Primär ist sie neben der mechanischen Obstruktion der Atemwege durch eine chemische Alveolitis bedingt, die durch die Mekoniumbestandteile induziert wird. Ebenso führt Mekonium selbst zu einem direkten Zellschaden, der diese Vorgänge zusätzlich begünstigt [3; 159; 160]. In einer frühen Phase des MAS kommt es wie beschrieben durch Aspiration von Mekonium zu einer Obstruktion, Hypoxämie, Hyperkapnie und letztendlich zu einer Azidose [161]. Im weiteren Verlauf dieser Erkrankung kommt es zur Entstehung von Atelektasen und intraazitären Emphysemen mit teils extremer Überblähung der Sakkuli [112]. Weiterhin entsteht innerhalb weniger Stunden eine ausgeprägte pulmonale und zum Teil auch systemische Inflammation. Im Rahmen der Inflammation kommt es zu einer Liberation von Prostaglandinderivaten, die zum einen zu einer Erhöhung des pulmonalen vaskulären Widerstandes führen und zum anderen neben Mekonium ebenfalls zu einer Inaktivierung des endogenen und des exogenen SF führen [3; 6; 59; 113; 162].

In tierexperimentellen Studien konnte aufgezeigt werden, dass eine exogene SF Substitution zu einer deutlichen Verbesserung des Gasaustauschs und der Lungenmechanik beim MAS führt. Insbesondere konnte dies für relativ hohe SF-Dosen aufgezeigt werden [122; 124; 125]. Die Ergebnisse der tierexperimentellen Studien konnten in klinischen Beobachtungsstudien bestätigt werden [112]. Es konnte gezeigt werden, dass die Oxygenierung durch die SF-Substitution nachhaltig verbessert wurde [74; 84; 137; 139; 140; 164]. Weiterhin zeigte Findlay et al. [84] auf, dass der Effekt einer exogenen SF-Applikation auf die Oxygenierung durch multiple Dosen bis maximal 4 x 150 mg/kg KG im Abstand von jeweils sechs Stunden noch verstärkt werden konnte. Die Metaanalyse der Surfactanttherapie bei Neugeborenen mit MAS kann sich nur auf zwei kontrollierte randomisierte Studien stützen (Lotze et al. und Findlay et al. [74; 84; 139]). Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen konnte zwar, wie beschrieben, eine Verbesserung des Gasaustauschs und ein Rückgang der Zahl der Kinder, die einer ECMO-Therapie bedurften aufgezeigt werden. Ein Rückgang der mittlerweile sehr geringen Mortalität blieb jedoch aus [112; 142].

Tierexperimentelle Studien zu Applikationstechniken der SF-Substitution zeigen eine deutliche Verbesserung der Oxygenierung durch Lavage mit verdünnter SF-Lösung auf [125; 170; 171]. Jedoch konnte bei bei einer Lavage mit verdünnten SF eine zusätzliche Schädigung

der Lunge, infolge eines spülflüssigkeitsbedingten Lungenödems sowie eine Kreislaufbelastung durch hohe Restmenge von verbleibender Lavageflüssigkeit, beobachtet werden [112; 172]. Da die intratracheale Bolusapplikation von SF derzeit die einzig ausreichend etablierte Applikationstechnik darstellt, wurde beim vorliegenden experimentellen Ansatz diese Applikationsform gewählt.

Die in der Therapie des MAS eingesetzten SF-Präparate enthalten die hydrophoben SF-Proteine B und C. Sie sind zumeist natürliche SF-Präparationen bovinen oder porcinen Ursprungs, die durch eine bronchoalveoläre Lavage gewonnen und aufbereitet werden [2; 74; 83]. In dieser Arbeit wurde das nat.-SF-Präparat Alveofact® verwendet. Demgegenüber ist Colfosceril (Exosurf)® ein SF-Protein-freies synthetisch hergestelltes Präparat auf dem Markt. Tierexperimentelle Studien wiesen für dieses Präparat, im Vergleich zu natürlichen SF-Präparationen, auf eine verminderte pulmonale Wirksamkeit hin [86; 103]. Die Weiterentwicklung dieses synthetischen Phospholipidgemischs stellt das in dieser Arbeit verwendete rekombinant hergestellte SP-C haltige SF-Präparat dar (rSP-C). Das synthetisch hergestellte rSP-C unterscheidet sich von dem humanen Protein durch den Austausch von Phenylalanin durch Cystein in Position 4 und 5 sowie das Ersetzen von Isoleucin durch Methionin in Position 32 [112].

In-vitro-Studien weisen darauf hin, dass insbesondere durch die Anwesenheit von hydrophoben SF-Proteinen es zu einer weniger stark ausgeprägten SF-Inaktivierung durch Mekonium kommt [85; 132; 165; 166]. Weiterhin konnte von Herting et al. gezeigt werden, dass synthetisch hergestelltes rSP-C im Vergleich zu nat.-SF gegenüber der SF-Inaktivierung durch Mekonium resistenter ist [85]. Dieser Effekt beruht vermutlich auf den im Rahmen der rSP-C-Herstellung erfolgten Austausch der oben beschriebenen AS, einer Palmitoylierung sowie der langen hydrophoben Region. Durch diese Modifikationen kann eine verbesserte Stabilisierung des SF-Films an der Hypophase im Vergleich zu den natürlichen SF-Präparaten erreicht werden [167; 168].

Ein signifikanter Beweis für die Effektivität und Funktionalität von SF-Präparaten, SF-Dosierung und SF-Applikation beim MAS existiert derzeit nicht.

Vor diesem Hintergrund soll in dieser Arbeit zum einen der Effekt des MAS auf das pulmonale SF-System und zum anderen die Auswirkungen einer exogenen SF-Bolusapplikation auf das endogene Surfactantsystem, insbesondere die SF-Proteine B und C untersucht werden. Des Weiteren soll untersucht werden, inwieweit sich die

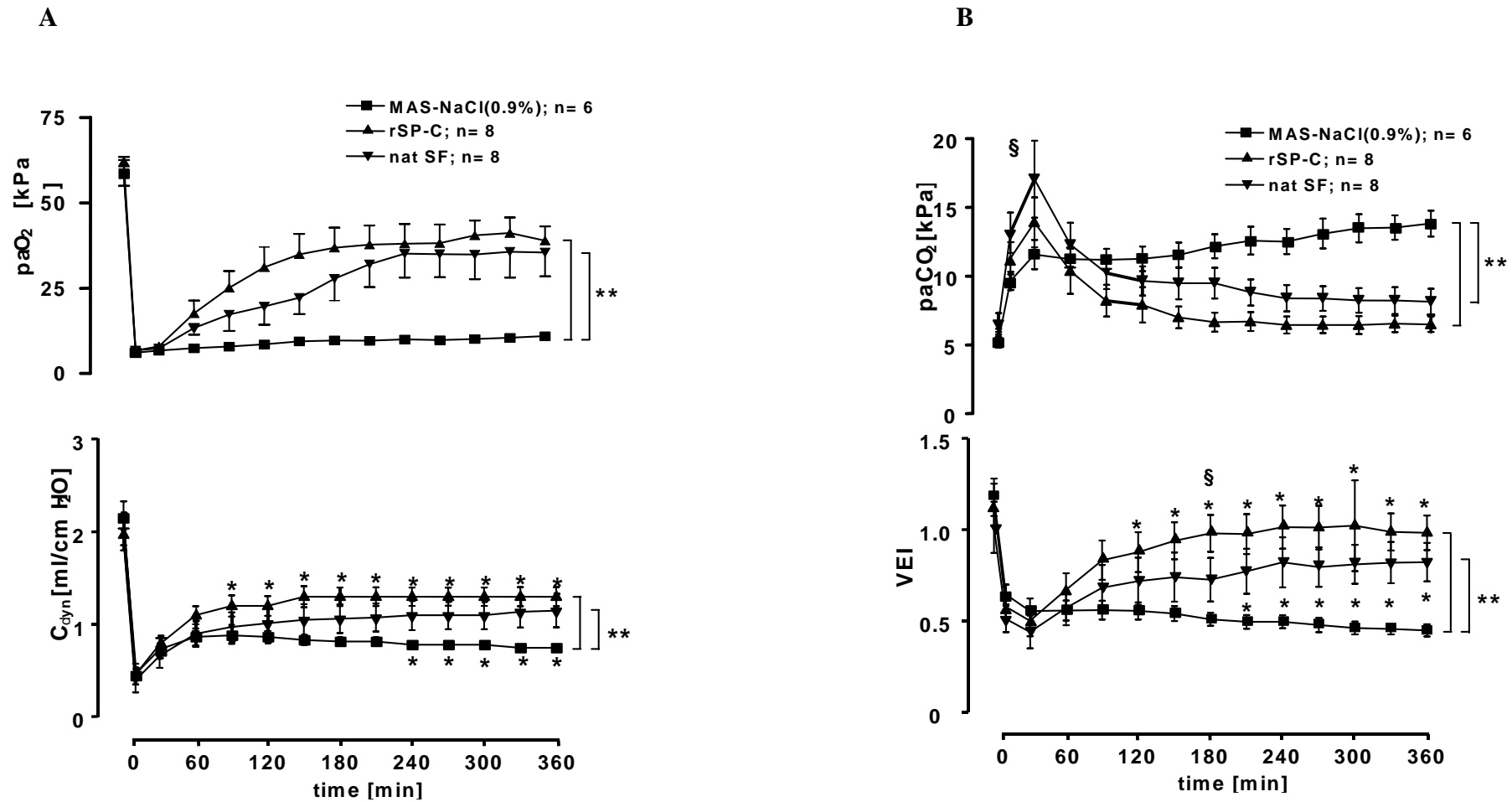
pathophysiologischen Veränderungen des MAS sowie die Therapie mit SF-Präparaten auf die VEGF mRNA Expression auswirken. Einer veränderten VEGF mRNA-Expression wird die Ursache einer gestörten vaskulären Regeneration nach einer Schädigung der Lunge zugeschrieben.

### **5.1 Der Effekt einer exogenen Surfactantapplikation auf die Expression der Surfactant-Proteine B und C am tierexperimentellen Mekoniumaspirationssyndrom**

Die Induktion des MAS führte zu einer signifikanten Verminderung des pulmonalen Gasaustauschs und der Lungenfunktion [81; 82]. Die Applikation von nat.-SF oder rSP-C zeigte eine signifikante Verbesserung des Gasaustauschs und der Lungenfunktion. Tendenziell waren diese Verbesserungen in der rSP-C behandelten Gruppe stärker ausgeprägt als in der nat.-SF behandelten Gruppe (Grafik 4; [81]). Dies bestätigen die Ergebnisse früherer Studien [86]. Diese Effekte können zum Teil den SF- stabilisierenden Eigenschaften der in den SF-Präparaten enthaltenen SF-Proteine zugeschrieben werden.

Da in der Literatur derzeit kein eindeutiger Konsens über die relative Bedeutung der SF-Proteinzusammensetzung der unterschiedlichen Präparate in Bezug auf eine optimale Wirksamkeit besteht, kann hypothetisch postuliert werden, dass die tendenziell stärker ausgeprägte Verbesserung der pulmonalen Funktion in der rSP-C Gruppe, im Vergleich zur nat.-SF Gruppe, durch eine Beeinflussung des pulmonalen SF-Systems durch rSP-C entstanden ist. Dieser Effekt könnte durch eine Stimulation der endogenen SF-Synthese oder durch eine Mobilisation intrazellulärer SF-Speicher, um das Fehlen von SP-B zu kompensieren, erklärt werden [82]. Um die unterschiedlichen Wirkungsweisen der beiden SF-Präparate genauer zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression und Proteinkonzentration der SF-Proteine B und C bestimmt.

**Grafik 4: Einfluss einer exogenen SF-Applikation auf den paO<sub>2</sub>, paCO<sub>2</sub>, C<sub>dyn</sub> und VEI beim MAS [81]**



**Grafik 4A** zeigt die paO<sub>2</sub> (angegeben in kPa; obere Grafik) und C<sub>dyn</sub> (angegeben in ml/cmH<sub>2</sub>O; untere Grafik) Veränderungen vor und nach Mekoniumapplikation sowie nach Applikation von SF- (nat.-SF oder rSP-C) oder physiologischer Kochsalzlösung (MAS-NaCl).

**Grafik 4B** zeigt die paCO<sub>2</sub> (angegeben in kPa; obere Grafik) und VEI Veränderungen vor und nach Mekoniumapplikation sowie nach Applikation von SF- (nat.-SF oder rSP-C) oder physiologischer Kochsalzlösung (MAS-NaCl). Die Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts angegeben. \*\* p < 0.001 vs MAS-NaCl.

Die SP-B mRNA-Expression der MAS-Gruppen zeigte einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Weitere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass es nach einem kardiopulmonalen Bypass als Modell eines generalisierten inflammatorischen Reizes zunächst zu einem initialen Abfall der SP-B-Konzentration im Trachealsekret kommt [95; 97]. Nach ca. 24 Stunden konnte im Falle eines unkomplizierten Verlaufs ein Anstieg der SP-B-Konzentration im Trachealsekret um 100% der Ausgangskonzentration gemessen werden [95]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen könnte der gefundene Anstieg der SP-B mRNA-Expression als Ausdruck eines Kompensationsmechanismus der verbleibenden Typ II Pneumozyten oder als Reparaturmechanismus dieser Zellen im alveolären Kompartiment gewertet werden. Värynen et al [96] konnte Veränderungen in der SP-B- und SP-C mRNA-Expression durch Lipopolysaccharide (LPS) und Zytokine nachweisen. Diese waren abhängig vom Grad der Lungenentwicklung. So zeigte er, dass die SP-B- und SP-C-Expression in Gegenwart von LPS in termingerechten Neugeborenen vermindert war, wohingegen die SP-B mRNA-Expression in Frühgeborenen, induziert durch diesen inflammatorischen Reiz, anstieg. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit, könnte die Abweichung dieser Ergebnisse, durch einen zu kurz gewählten Beobachtungszeitraum oder durch Abweichungen zwischen den in vivo und in vitro Bedingungen bedingt sein.

Die SP-C mRNA-Expression war in den MAS-Gruppen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant vermindert. Dies kann als Ausdruck einer ausgeprägten Schädigung der Typ II Pneumozyten angesehen werden, da SP-C bisher nur in den Typ II Pneumozyten identifiziert wurde. Unterstützend zu dieser Hypothese konnte eine Studie an ARDS leidenden Patienten zeigen, dass die SP-C-Konzentration in der bronchoalveolären Lavage dieser Patienten signifikant reduziert war [90]. Tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass eine Deletion im SP-C Gen zu Symptomen einer respiratorischen Insuffizienz führt. Zudem wurde die Entwicklung einer interstitiellen Pneumonitis und die Ausbildung eines Emphysems beschrieben [38].

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der SP-B und SP-C konnte keine signifikanten Unterschiede der Konzentration nach Induktion der Lungenschäden zeigen. Jedoch wies die SP-B Konzentration in den MAS Gruppen tendenziell niedrigere Werte auf. Dies könnte ein Hinweis auf Kompensationsmechanismen in einer zuvor gesunden Lunge auf den starken inflammatorischen Reiz und die daraus folgenden Veränderungen in der Lunge sein [82].

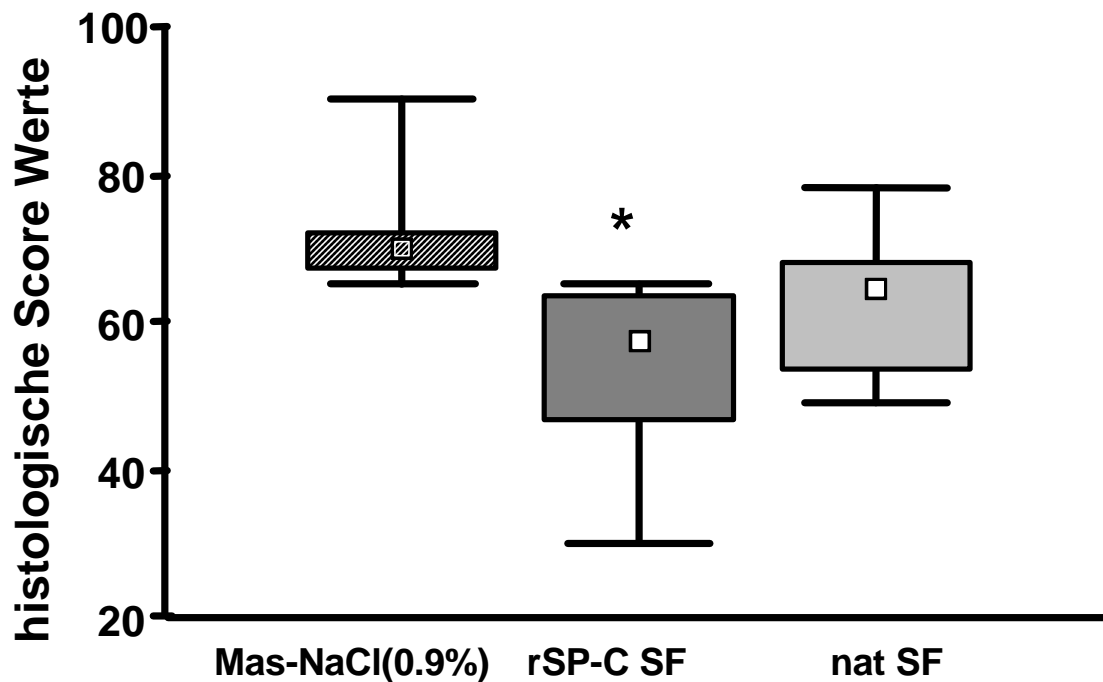


Bezüglich des Effekts einer exogenen SF Applikation auf das pulmonale SF System konnte weder eine signifikante Veränderung der SP-B und SP-C mRNA Expression, noch der Proteinkonzentration gezeigt werden. Dennoch war die SP-B mRNA Expression in den SF-behandelten Gruppen tendenziell höher als in der MAS-NaCl Gruppe. Dies könnte wiederum ein Hinweis auf Regenerationsmechanismen in den alveolären Epithelzellen sein [82].

Histomorphometrische Untersuchungen lassen auf eine verminderte Schädigung des alveolären Kompartiments in den SF-behandelten Gruppen schließen [81; 82]. Diese Untersuchungen konnten eine signifikante Verbesserung der histomorphometrischen Charakteristika für rSP-C und eine tendenzielle Verbesserung für nat.-SF im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen (Grafik 5; [81]). Die Charakteristika beinhalten die Ausprägungen der alveolären und interstiellen Inflammation pro Gesichtsfeld, interstitielle und alveoläre Einblutungen sowie interstitielles und alveoläres Ödem [81; 157].

Diese Daten lassen auf eine verminderte Schädigung und Wiederherstellung des pulmonalen SF-Systems nach Applikation der SF-Präparate insbesondere rSP-C schließen. Dies deutet darauf hin, dass die Verbesserung des Gasaustauschs und der Lungenfunktion zu einer verminderten Schädigung des alveolären Kompartiments und dessen Wiederherstellung führt. Da die mRNA und Proteinkonzentration der beobachteten SF-Proteine nicht signifikant beeinflusst wurde, führt dies zur Annahme, dass die Wiederherstellung des SF-Systems nach Applikation der SF-Präparate in dem Studienprotokoll nicht gänzlich erfasst wurde. In Anlehnung daran zeigen weitere Studien eine Erholung des pulmonalen SF-Systems, repräsentiert durch einen Anstieg der SP-B und SP-C Konzentration, dass eine Messung der Werte oberhalb des Ausgangsniveaus nicht vor vier Stunden nach Induktion der Lungenschäden zu erwarten ist [97]. Weiterhin zeigten tierexperimentelle Studien des ARDS einen Anstieg der SF-Proteine erst nach bis zu 48 Stunden nach Induktion des Lungenversagens [90].

**Grafik 5: Darstellung der histologischen Score-Werte im oberen und unteren Lappen der rechten Lunge [81]**



Dargestellt ist der histologische Score, der sich aus den Merkmalen alveoläre und interstitielle Inflammation, alveoläre und interstitielle Blutansammlungen, Atelektasen, alveoläre Ödeme, interstitielle Ödeme, Emphyseme und Nekrosen zusammensetzt. Die einzelnen Merkmale können die Ausprägung 0 (keine Veränderung) bis 4 (maximale Lungenschäden) erreichen. Die Daten sind als geometrisches Mittel, Standardabweichung und 95% Konfidenzintervall dargestellt. \* $p < 0.05$  vs MAS-NaCl.

Unabhängig von diesen Ergebnissen kann der unterschiedliche Gehalt der PL der beiden SF-Präparate als ein eventueller zusätzlicher Mechanismus in der Beeinflussung der Lungenfunktion und des SF- Metabolismus angenommen werden.

Aufgrund der diskutierten Ergebnisse muss ein protektiver Effekt vor allem für rSP-C, auf die Typ II Pneumozyten oder verschiedene Anteile des alveolären Kompartments in Betracht gezogen werden.

Neben diesem vermuteten Effekt konnte Hilgendorff et al. [81; 82] eine Modulation der Inflammation durch eine exogene SF-Applikation insbesondere für r-SP-C, nachweisen. Sie untersuchten am tierexperimentellen MAS die mRNA Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TGF  $\beta$  und IL-10). Studien hatten gezeigt, dass die mRNA Expression proinflammatorisch wirksamer Zytokine im Rahmen des MAS signifikant erhöht und die mRNA Expression des antiinflammatorischen IL-10 signifikant

vermindert [3; 4; 11; 91]. Es konnte dargestellt werden, dass eine SF-Bolusapplikation von rSP-C zu einer signifikanten Verminderung der mRNA Expression des proinflammatorisch wirksamen IL-1 $\beta$  im Vergleich zur nat.SF- und MAS-NaCl-Gruppe führte [81; 82]. Tierexperimentelle Studien an Ratten zeigten, nach einmaliger Injektion eines rekombinanten IL-1, eine akute neutrophile Entzündung mit Alveolar- und Kapillarschäden ähnlich dem Bild des ARDS [92]. Beim Menschen konnten erhöhte Werte von IL-1 in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit und in Alveolarmakrophagen von Patienten mit ARDS gefunden werden [93]. Die bereits publizierten Daten lassen auf eine Modulation der Transkription des proinflammatorischen IL-1 $\beta$  durch rSP-C schließen [81; 82].

Des Weiteren konnte eine erhöhte mRNA Expression des antiinflammatorisch wirksamen IL-10 nach SF-Bolusapplikation von rSP-C und nat.-SF dargestellt werden. Im humanen Organismus wird das antiinflammatorische IL-10 von TH-1 und TH-2 Zellen synthetisiert. Es supprimiert die antigen-spezifische Proliferation und Zytokinproduktion dieser Zellen und hemmt die Synthese von IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  in von bakteriellen LPS aktivierten Makrophagen. Zusätzlich hemmt es die Antigenpräsentation [10; 12]. Durch diese Funktionen ist IL-10 einer der wichtigsten antiinflammatorischen Zytokine. Als ein Indikator für die antiinflammatorische Wirkung des rSP-C muss die erhöhte mRNA Expression von IL-10 in der gesamten linken Lunge angesehen werden. Da IL-10 aufgrund seiner entzündungshemmenden Eigenschaften als ein potentieller Wirkstoff in der Behandlung chronisch inflammatorischer Lungenveränderungen Neugeborener [98; 99; 10] diskutiert wird, könnte aufgrund dieser Ergebnisse, rSP-C eine wichtige klinische Rolle in der Behandlung dieser Erkrankungen zuteil werden.

Wie gezeigt werden konnte, geht das MAS mit signifikanten Veränderungen der mRNA Expression der surfactantassoziierten Proteine B und C einher. Eine Veränderung der mRNA Expression dieser Proteine sowie eine Veränderung der Proteinkonzentration nach SF-Applikation, konnte nicht beobachtet werden. Dies könnte auf einen zu kurz gewählten Beobachtungszeitraum zurückzuführen sein. Die hier gefundenen Ergebnisse lassen keinen Rückschluss auf einen signifikanten Vorteil von synthetischen SF-Präparaten gegenüber natürlichen SF-Präparaten zu.

Die Suche nach synthetischen SF-Präparaten, die in ihrer Wirkung vergleichbar mit den natürlichen SF-Präparaten sind, hält an. Sie sind daher von Interesse, da die natürlichen SF-Präparate aufgrund ihres tierischen Ursprungs eine mögliche Antigenität und Infektiösität besitzen. Des Weiteren könnte der Vorteil synthetischer Präparate in der besseren

Verfügbarkeit und niedrigeren Herstellungskosten liegen. Indem diese neuen Präparate funktionelle synthetisch hergestellte Apoproteine besitzen, könnten sie die natürlichen SF-Präparate in ihrer biophysikalischen Wirkung ebenbürtig sein bzw. sie sogar übertreffen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse und die von PD Dr. med. Reiss und Hilgendorff et al. publizierten Daten [81; 82] liefern neue Beweise für die Effektivität einer exogenen synthetischen SF-Applikation an dem tierexperimentellen MAS. Sie könnten einen Anstoss für weiterführende Experimente geben, in denen die unterschiedlichen Effekte dieser Präparate auf die Lungenfunktion, Gasaustausch, Histologie und Inflammation nähergehend untersucht werden. Ebenso stehen noch viele Fragen bezüglich des Fehlens von SP-B, da bisher aufgrund des zu großen Moleküls noch keine synthetische Herstellung geglückt ist [112], und der unterschiedlichen SP-C Konzentrationen in den synthetischen SF-Präparaten offen [173].

## **5.2 Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in der Lunge**

VEGF ist ein pluripotenter Wachstums- und Permeabilitätsfaktor. Er hat einen deutlichen Einfluss auf die Funktion der Endothelzellen. Das Lungengewebe weist eine hohe VEGF Proteinkonzentration auf [42]; viele unterschiedliche Zellarten der Lunge, unter anderem auch Typ II Pneumozyten [197], produzieren und reagieren auf VEGF. Er ist entscheidend für die Entwicklung der Lunge sowie für die Aufrechterhaltung der adulten Lungenstruktur. Zusätzlich zu diesen physiologischen Funktionen des Proteins gibt es zahlreiche Beweise, dass VEGF auch eine Rolle bei verschiedenen akuten und chronischen Lungenerkrankungen, wie z.B RDS und bei der Emphysementstehung, spielt. Ebenso gibt es Hinweise, dass er in Assoziation zur pulmonalen Inflammation steht [106; 107].

Da derzeit keine Studien über die Rolle des VEGF beim MAS vorliegen, interessiert die Frage, ob eine Aspiration von Mekonium zu einer veränderten VEGF mRNA Expression führt. Weiterhin konnten Studien zeigen, dass die Typ II Pneumozyten in ihrem Wachstum, Differenzierung und SF-Produktion durch VEGF beeinflusst werden [42; 43; 44]. Daher war es von Interesse, ob eine exogene SF-Applikation zu einer veränderten VEGF mRNA Expression führt.

### **5.2.1 Rolle des VEGF in der Lungenentwicklung und im Atemnotsyndrom des Neugeborenen**

Die Lungenentwicklung ist ein sorgfältig organisierter Prozess, der eine Reihe von komplexen Interaktionen zwischen Wachstumsfaktoren, Matrix-Proteinen und Zytokinen beinhaltet [185]. Neue Studien der Lungenentwicklung stellen eine direkte Beziehung zwischen der Entwicklung der Luftwege und dem begleitenden vaskulären Netzwerk dar [42].

Es können drei Prozesse beschrieben werden, die zur Formierung der vaskulären Lungenstrukturen beitragen: die Angiogenese, die als Ursprung von den zentralen Lungengefäßen ausgeht und zu einem Aussprossen neuer Gefäße führt [186]; die Vaskulogenese, die von inselartig angeordneten Zellen im Mesenchym, den Hämangioblasten, ausgeht. Die peripheren Zellen dieser Blutinseln differenzieren sich zu Gefäßendothelzellen, die das Gefäßrohr einzellig, tapetenartig auskleiden [46]. Als letztes erfolgt eine Fusion der zentralen und peripheren Gefäßsysteme um die pulmonale Zirkulation zu gewährleisten [186]. Die Gefäßentwicklung in der frühen Lunge bedingt die

Reifung der Lungenstrukturen. Ein ungestörte Angio- und Vaskulogenese ist unabdingbar zur Ausbildung des Organs [42; 108].

VEGF spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Angio- und Vaskulogenese, insbesondere während der fetalen Lungenentwicklung [187]. Durch das hypoxische Umfeld, in der sich entwickelnden Lunge kommt es zu einer vermehrten Expression des HIF-1 $\alpha$  abhängigen VEGF [189]. In der fetalen Lunge konnte eine Expression von VEGF und VEGFR-2 in Zellen in den von den terminalen Bronchioli aussprossenden Tubuli und vaskulären Mesenchymzellen gefunden werden. In vitro konnte in rekonstruierten Zellkulturen, die fetale Epithelzellen und Mesenchymzellen enthielten, ebenfalls eine VEGF Expression nachgewiesen werden [42; 187].

Die zeitliche und räumliche Expression des VEGF lässt vermuten, dass er für die koordinierte Morphogenese des Epithels der Atemwege und der endothelialen Lungenkompartimente entscheidend ist [178; 191]. Ebenso wird eine bestimmte VEGF Konzentration für die Lungenentwicklung benötigt. Diese wird von den Tubuli gebildet [42; 108]. Die VEGF Expression zeigt eine geringe physiologische Breite. So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression zu einer pulmonalen Fehlentwicklung führt. Eine zu geringe VEGF Expression oder eine Blockade des VEGFR-2 führt sowohl zu einer gestörten Angiogenese als auch zu einer verminderten Alveolenanlage und somit zu einer reduzierten Gasaustauschfläche [186; 188; 190; 191]. Der Grund hierfür liegt darin, dass VEGF neben dem Effekt auf die Endothelzellen auch das Wachstum der Typ II Pneumozyten und die Surfactant Sekretion fördert [43; 105; 109].

In Übereinstimmung mit den beschriebenen physiologischen und pathophysiologischen Effekten des VEGF auf die Lungenentwicklung zeigten Experimente, dass eine Störung der VEGF-Signalkaskade während der fetal- und perinatal-Phase zu einem neonatalen Atemnotsyndrom (RDS) führt [193]. Das RDS ist pathophysiologisch charakterisiert durch einen Surfactantmangel in einer strukturell unreifen Lunge. Daraus resultiert ein typisches klinisches Erscheinungsbild mit Tachy- und/oder Dyspnoe, expiratorischem Stridor sowie erhöhtem Sauerstoffbedarf [206].

Eine der häufigsten Ursachen des Lungenversagens beim reifen Neugeborenen stellt das MAS dar. Da Studien auf eine verminderte Konzentration des VEGF im Trachealsekret von Neugeborenen mit einer Atemstörung hinweisen [47], war es in der vorliegenden Arbeit von Interesse, ob es im Rahmen des MAS zu einer Alteration der VEGF mRNA-Expression

kommt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die VEGF mRNA Expression sechs Stunden nach Mekoniumaspiration signifikant reduziert war.

Es gibt verschiedene Hypothesen, in denen versucht wird, die niedrige VEGF Konzentration durch eine Schädigung der Lunge zu erklären [197]. Diese beschreiben eine verminderte VEGF Expression durch den Verlust von TYP II Pneumozyten und Endothelzellen sowie einen vermehrten Abbau durch Proteasen, die im Rahmen der Inflammation von neutrophilen Granulozyten und anderen inflammatorischen Zellen freigesetzt werden. Ebenso wird eine vermehrte VEGF Abgabe in das Plasma, aufgrund einer Schädigung der Luft-Blut-Schranke postuliert [197; 198]. Letztendlich sind jedoch die Mechanismen, wie eine Schädigung der Lunge die VEGF Expression beeinflusst, immer noch unklar. Weiterführende Studien werden benötigt, um die Zusammenhänge genauer zu untersuchen.

Da, wie aufgeführt, die VEGF Expression beim MAS signifikant erniedrigt war, war des Weiteren interessant, inwiefern eine exogene SF-Applikation, die sich in der Therapie des MAS etabliert hat, die VEGF Expression beeinflusst. Weder eine Applikation von nat.-SF noch von rSP-C erbrachte einen signifikanten Unterschied in der pulmonalen VEGF mRNA Expression im Vergleich zur MAS-NaCl Gruppe. Dies könnte bedeuten, dass, obwohl VEGF einen Einfluss auf das Wachstum der Typ II Pneumozyten und die SF-Sekretion besitzt, diese wiederum keinen Einfluss auf die VEGF mRNA Expression ausüben. Weiterhin könnte die unverändert verminderte mRNA Expression Ursache eines zu kurz gewählten Beobachtungszeitraumes sein.

Die Auswirkungen dieser verminderten VEGF Expression, die beim Atemnotsyndrom des Neugeborenen und in der vorliegenden Arbeit im Rahmen des experimentell induzierten MAS nachgewiesen wurden, konnten in tierexperimentellen Studien untersucht werden. So wurde in Studien nach hohen Dexamethason Dosen eine während der Lungenentwicklung verminderte VEGF und VEGFR-2 Expression beobachtet. Dies führte bei den adulten Tieren zur Ausbildung von Emphysemen [192; 194; 195] und lässt die Schlussfolgerung zu, dass VEGF nicht nur für das endotheliale, sondern auch für das epitheliale Wachstum verantwortlich ist [42]. Eine andere Studie konnte durch Blockade des VEGFR-1 und VEGFR-2 zeigen, dass dies zu einer unreifen Lunge führt, die bis ins adulte Leben persistiert und eine pulmonale Hypertension zur Folge hat [188; 196]. Dies konnte auch durch tierexperimentelle Untersuchungen mit HIF-2 $\alpha$  Knock-Out-Mäuse gezeigt werden. Die Tiere wiesen eine gestörte SF-Produktion, ein Defizit der alveolären Kapillaren und ein RDS auf, das durch Applikation von VEGF therapiert werden konnte [43]. Eine weitere

tierexperimentelle Studie konnte durch eine postnatale Applikation von monoklonalen Rattenantikörpern, die gegen den VEGFR-2 gerichtet waren, eine Schädigung und Aufweitung der Alveolen darstellen, die sich innerhalb eines Monats zurückbildete [42]. Neben diesen pathologischen Effekten einer verminderten VEGF Konzentration beschreiben Le Cras et al. [199], dass eine VEGF Überexpression ebenfalls zu Lungenschäden, einschließlich emphysematösen Veränderungen und hämorrhagischen Ödemen führt.

Unabhängig von den beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen konnte für VEGF eine Inhibition der Apoptose durch Aktivierung des Bcl-2 Proteins gezeigt werden [102; 103]. Eine verminderte VEGF oder VEGFR-2 Expression führt zu einer großen Anzahl von apoptotischen Pneumozyten und, wie bereits oben beschrieben, zur Ausbildung eines Emphysems [203]. Dies zeigt die bedeutende Rolle von VEGF in Bezug auf die Aufrechterhaltung der Lungenstruktur [42]. Andererseits gibt es Vermutungen, dass VEGF auch einen Effekt auf die Phagozytose der apoptotischen Zellen besitzt. Die Phagozytose der apoptotischen Zellen ist ein sehr effektiver Prozess, der fest in die Homöostase und inflammatorischen Prozesse der Lunge eingebettet ist [42; 204; 205]. Durch die Phagozytose dieser Zellen wird eine postapoptische Nekrose verhindert. Diese stellte einen starken inflammatorischen Reiz dar. Wie gezeigt werden konnte, induzieren Monozyten und Makrophagen [20] sowie verschiedene Zytokine, insbesondere IL-1 $\beta$  und IL-6, die VEGF-Produktion [106, 107]. Durch Studien konnte gezeigt werden [42], dass eine Inkubation von Makrophagen mit einem VEGFR-Blocker die Phagozytose dosisabhängig inhibiert. Neutralisierende Antikörper, die gegen VEGF und VEGFR-1 gerichtet waren, zeigten den gleichen Effekt. Es wird vermutet, dass die Makrophagen durch Produktion von VEGF autokrin die Phagozytose fördern [42]. Dies zeigt, dass VEGF neben den beschriebenen Effekten ebenfalls eine Rolle in inflammatorischen Prozessen spielt.

### **5.2.2 Der Einfluss des VEGF auf die Entstehung der CLD**

Wie diese Studien belegen, führt eine Störung der VEGF Expression zu deutlichen Schäden in der Lunge. Aufgrund der enormen Bedeutung von VEGF während der Lungenentwicklung vermuten Voelkel et al. [42] einen Zusammenhang zwischen einem Ungleichgewicht der VEGF Expression und der CLD. Die CLD ist eine chronische potentiell reversible Erkrankung beatmeter Frühgeborener (<32 SSW, Geburtsgewicht <1500g) [112]. Da 30% der Kinder mit MAS einer maschinellen Beatmung zugeführt werden müssen, ist die Inzidenz der



CLD bei Kindern mit MAS deutlich erhöht [112]. Im Mittelpunkt der Pathogenese steht eine exsudative Entzündungsreaktion, die mit einer Flüssigkeitsansammlung im Interstitium einhergeht. Der Entzündungsprozeß entsteht aufgrund verschiedener externer Schadensfaktoren, wie z.B. eine perinatale Infektion, Aspiration von Mekonium oder im Rahmen der Beatmung durch ein Barotrauma und Hyperoxie [42; 112]. Bhatt et al. [193] konnten eine verminderte VEGF und VEGFR-1 Expression in den Lungen von Neugeborenen, die an der CLD verstarben, nachweisen. Die Lungen dieser Kinder wiesen zudem abnormale alveoläre Kapillaren und eine gestörte vaskuläre Entwicklung auf. Dieses Ergebnis konnte auch in anderen Studien bestätigt werden [200]. Wie beschrieben ist die Hyperoxie im Rahmen der Therapie des Atemnotsyndroms des Neugeborenen, einer der wesentlichen pathophysiologischen Ursachen der CLD. Eine Hyperoxie führt zu einer verminderten VEGF Expression [48; 49]. Weitere Studien zeigten an Rattenlungen, die einer Hyperoxie ausgesetzt waren, ebenfalls eine erniedrigte VEGF Konzentration. Diese ging mit einer reduzierten VEGFR-1 und VEGFR-2 Expression sowie mit einer erhöhten Apoptoserate der Pneumozyten einher [201]. Möglicherweise führt die Hyperoxie im Rahmen der maschinellen Beatmung Neugeborener mit respiratorischer Insuffizienz, wie z.B. beim MAS, zu einer persistierenden Lungenschädigung mit einem ausgedehnten alveolären Schaden. Als Folge davon muss die Unfähigkeit zur VEGF Synthese und Aktivierung der Signalkaskade über den VEGFR betrachtet werden. Dieses Rezeptorsystem wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht eingehend untersucht.

In Anlehnung daran beschreiben einige Autoren, dass VEGF neben der Funktion auf die Angio- und Vaskulogenese eine Regeneration der Lunge fördert [198]. Diese Hypothese wird durch verschiedene in vitro Studien unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass VEGF nicht nur als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für die Endothelzellen fungiert, sondern auch eine Wirkung auf TYP II Pneumozyten ausübt: sie exprimieren den VEGFR-2 und werden durch VEGF in ihrem Wachstum gefördert [43; 105; 109]. Diese Effekte sind vermutlich indirekt, da VEGF in Zellkulturen nicht zu einem vermehrten Wachstum der Typ II Pneumozyten führt [42]. Jedoch konnte eine VEGF-abhängige erhöhte SF-Protein B und C Synthese aufgezeigt werden [43]. In Übereinstimmung hiermit weisen Studien auf ein durch VEGF verstärktes Pneumozytenwachstum und eine gesteigerte SF-Sekretion, nach Schädigung der Lunge hin [43; 47; 202]. Dies führt zur Annahme, dass eine verminderte VEGF Expression eine Rolle in der gestörten vaskulären und strukturellen Regeneration der Lunge im Rahmen chronischer Lungenerkrankungen beim Neugeborenen spielen könnte [47; 48; 49].

Wie dargestellt, spielt VEGF eine wichtige Rolle in der Lungenentwicklung und Aufrechterhaltung der pulmonalen Strukturen. Eine, wie in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte, Verminderung der VEGF mRNA Expression, geht mit verschiedenen akuten und chronischen Lungenerkrankungen, wie z.B. das Emphysem, das Atemnotsyndrom des Neugeborenen und der CLD einher. Einige Autoren [207] sehen in diesem Zusammenhang einen etwaigen Therapieansatz, durch eine Substitution von VEGF. Da, wie gezeigt wurde, VEGF eine sehr geringe physiologische Breite besitzt und daher eine Überexpression ebenfalls zu pulmonalen Schäden führt [199] und die Zusammenhänge einer unphysiologischen VEGF mRNA Expression und der Entstehung von Lungenerkrankungen noch viele Fragen aufwerfen, sind weiterführende Studien erforderlich, die diese Zusammenhänge näher untersuchen.

Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse, bezüglich des SF-Metabolismus sowie zur mRNA Expression des VEGF, stellen nur Teilaspekte der komplexen Schädigungsmechanismen im experimentellen Ansatz des MAS dar. Jedoch ist die vorliegende Arbeit eine der wenigen, die die Teileffekte eines synthetischen SF-Präparates auf den endogenen SF-Metabolismus partiell untersuchten. Sie könnte dazu beitragen, dass die komplexen Schädigungsmechanismen beim MAS eingehender untersucht werden und so zur Entwicklung von neuen Therapieansätzen führen.

## Zusammenfassung

Das Mekoniumaspirationssyndrom (MAS) ist eine der häufigsten Ursache einer ARDS-ähnlichen Lungenerkrankung des Neugeborenen. Es ist gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Obstruktion der Atemwege, toxischen Pneumonitis und Inaktivierung des pulmonalen Surfactants. Diese Surfactantinaktivierung und eine veränderte Expression verschiedener Wachstumsfaktoren spielt bei der Entstehung neonataler Lungenerkrankungen eine entscheidende Rolle. Unter anderem konnte dies für den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), einem pluripotenten Wachstums- und Permeabilitätsfaktor, nachgewiesen werden. Es gibt zahlreiche Beweise, dass VEGF eine Rolle bei verschiedenen akuten und chronischen Lungenerkrankungen spielt, wie z.B. das Atemnotsyndrom des Neugeborenen und bei der Emphysementstehung. Er hat einen deutlichen Einfluss auf die Funktion der Endothelzellen, fördert das Wachstum der Typ II Pneumozyten und stimuliert die SF-Sekretion.

Die im Rahmen der Therapie des MAS eingesetzte Applikation von natürlichen Surfactant-Präparaten, die die Surfactantproteine B und C enthalten, führt in einigen Fällen zu einer Verbesserung der Oxygenierung und der Lungenmechanik. Es werden jedoch hohe Surfactantdosen zur Überwindung des surfactantinhistorischen Potenzials im alveolären Kompartiment benötigt. Studien zeigen für neue, synthetisch hergestellte, SP-C-haltige Surfactant-Präparate eine verminderte Surfactantinaktivierung.

Vor diesem Hintergrund war es in der vorliegenden Arbeit von Interesse, den Effekt einer exogenen Surfactantapplikation eines natürlichen Surfactant-Präparates sowie eines synthetisch hergestellten Surfactant-Präparates, im Rahmen des experimentell induzierten MAS, auf die surfactantassoziierten Proteine B und C zu untersuchen. Zudem war es von Interesse, inwieweit die Induktion des MAS sowie die Applikation eines natürlichen SF-Präparates oder eines synthetisch hergestellten SF-Präparates die mRNA Expression des VEGF beeinflusst.

Die Untersuchung erfolgte an 23 Ferkeln. Zur Induktion des Lungenversagens wurde Mekonium intratracheal unter laufender maschineller Beatmung verabreicht. Hiernach erfolgte eine Randomisierung in eine von drei Behandlungsgruppen: Kontrollgruppe mit physiologischer Kochsalzlösung, natürlichem bovinen Surfactant und rekombinantem SP-C-haltigen Surfactant. 28 Proben gesunder Tiere dienten als Kontrollgruppe.

Die mRNA Expression von SP-B, SP-C und des VEGF wurde aus Proben der linken Lunge bestimmt. Dies erfolgte mittels der TaqMan-Real-time-PCR Methode ( $\Delta\Delta C_T$  –Methode, normalisiert auf die Kontrollgruppen). Des Weiteren wurde die Proteinkonzentration der SF-Proteine B und C bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten nach Induktion des Lungenversagens eine signifikant erhöhte SP-B mRNA Expression und eine verminderte SP-C mRNA Expression im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Weder eine Applikation von natürlichem Surfactant noch des synthetischen Surfactants zeigte einen signifikanten Einfluß auf die mRNA Expression und Proteinkonzentration.

Die VEGF mRNA Expression war nach Induktion des MAS gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert. Eine Surfactantapplikation zeigte keine signifikanten Veränderungen.

Aus den vorangegangenen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass es im Rahmen des MAS, als mögliche Folge einer Schädigung der Typ II Pneumozyten zu einer Induktion der SP-B mRNA Expression sowie einer reduzierten mRNA Expression von SP-C kam. Es konnte weder eine Veränderung der mRNA Expression dieser Proteine noch eine Veränderung der Proteinkonzentration nach SF-Applikation erfasst werden. Dies könnte auf einen zu kurz gewählten Beobachtungszeitraum zurückzuführen sein und erfordert weitergehende Untersuchungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten einen Anstoß für weiterführende Experimente sein, in denen die unterschiedlichen Effekte dieser Präparate auf Lungenfunktion, Gasaustausch, Histologie und Inflammation eingehend untersucht werden.

Wie gezeigt werden konnte, führt das MAS zu einer signifikant erniedrigten VEGF-Expression. VEGF spielt eine wichtige physiologische Rolle in der Angio- und Vaskulogenese sowie in der Entwicklung der Lunge. In Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl eine verminderte als auch eine erhöhte Expression des VEGF mit akuten und chronischen Lungenerkrankung einhergeht, wie z.B. das Atemnotsyndrom des Neugeborenen. Die vorliegende Arbeit könnte dazu beitragen, die komplexen Schädigungsmechanismen beim MAS eingehend zu untersuchen und so zu der Entwicklung neuer Therapieansätze führen.

## SUMMARY

Meconium aspiration syndrome (MAS) is one of the most common causes of an adult respiratory distress syndrome (ARDS) -like lung disease of the newborns. It is characterised by a distinct obstruction of the airways, toxic pneumonitis and deactivation of pulmonary surfactant. This surfactant deactivation and the induction of various growth factors play a pivotal role in development of neonatal pulmonary diseases. Recent evidences suggest that vascular endothelial growth factor (VEGF), a pluripotent growth- and permeability factor, is one key player in different acute and chronic pulmonary diseases, e.g. for respiratory distress syndrome of the newborn and for development of emphysemas. VEGF influences the function of endothelial cells, induce the growth of type II pneumocytes and stimulates secretion of surfactant.

The therapeutic application of native surfactant preparations, containing surfactant proteins B and C, leads to improvement of oxygenation and lung mechanics. High doses of surfactant, however, are needed to overcome the surfactant – inhibiting potential in the alveolar compartment. Previous studies indicated a diminished deactivation of surfactant specifically for SP – C containing surfactant preparations.

According to this background the present dissertation analyses the effect of exogenic surfactant application using native surfactant preparation compared to synthetic made surfactant preparation containing surfactant proteins B and C in an experimentally induced MAS model. In addition the consequences and interaction of induced MAS on VEGF mRNA expression without treatment and with either native surfactant preparation treatment or synthetic made surfactant preparation was analysed.

Under mechanical ventilation meconium was intratracheally applied in 23 piglets to induce lung failure. Subsequently the piglets were randomised to one of the following three groups: the control group received physiological saline, the second group received native bovine surfactant and the last group received recombinant SP-C surfactant. 28 tissues of healthy newborn piglets were used as untreated control group.

Quantitative mRNA expression levels of SP-B, SP-C and VEGF was measured from tissues samples of the left lung using Real- time PCR ( $\Delta\Delta C_T$  – Method, normalised to control). In addition protein concentrations of surfactant proteins B and C were measured.

The results indicated a significantly increased SP-B and decreased SP-C mRNA expression after induction of lung injury compared to healthy controls. Administration of natural surfactant or synthetically surfactant did not affect SP-B or SP-C mRNA and protein levels.

In addition VEGF mRNA expression was significantly decreased compared to healthy controls upon MAS induction with no significant changes after surfactant treatment.

Previous observations reasoned an induction of SP-B mRNA expression as well as a reduction of SP-C mRNA expression in the context of MAS as a possible consequence of an injury of type II pneumocytes. The unaffected mRNA levels or protein levels of SP-B and SP-C after surfactant application could be due to the short term observation period and requires further long term investigations.

The results of this dissertation could give reasons to continuative studies, in which the different effects of those preparations on lung function, gas exchange, histology and inflammation analysed in details.

MAS lead to a significantly reduced VEGF expression and previous studies indicated that changes in VEGF expression either a decrease or an increase resulted in acute and chronic lung diseases, e.g. acute respiratory distress syndrome of the newborn. VEGF plays an important physiological role in angiogenesis and vasculogenesis as well as in lung development. The present study could achieve more intensive research of the complex mechanism of injury of MAS and that could lead to development of new therapies.

**Literaturverzeichnis**

1. Wiswell TE: Advances in the treatment of the meconium aspiration syndrome. *Acta Paediatr Suppl* 2001; 90:28-30
2. Möller JC, Kohl M, Reiss I, Diederich W, Nitsche EM, Göbel W, Gortner L: Saline Lavage with substitution of bovine surfactant in term neonates with meconium aspiration syndrome (MAS) transferred for extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): a pilot study. *Crit Care* 1999;3:19-22
3. Zagariya A, Bhat R, Uhal B, Navale S, Freidine M, Vidyasagar D: Cell death and lung cell histology in meconium aspirated newborn rabbit lung. *Eur J Pediatr* 2000;159:819-826
4. De Beaufort AJ, Pelikan MD, Elferink JG, Berger HM: Effect of interleukin 8 in meconium on in-vitro neutrophil chemotaxis. *Lancet* 1998;352:102-105
5. Tegtmeier FK, Gortner L, Ludwig A, Brandt E: In vitro modulation of induced neutrophil activation by different surfactant preparations. *Eur Respir J* 1996;9:752-757
6. Soukka H, Rautanen M, Halkola L, Kero P, Kaapa P: Meconium aspiration induces ARDS-like pulmonary response in lungs of ten-week-old pigs. *Pediatr Pulmonol* 1997;23:205-211
7. Bohnhorst B, Stuhmann M, Noguee LM, Brasch F, Müller KM, Poets CF: Congenital alveolar proteinosis: Hereditary surfactant protein B deficiency. *Monatsschr Kinderheilkd* 1996;144:1214-1217
8. Mason RJ, Greene K, Voelker DR: Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *Am. J. Physiol.* 1998;275 (Lung Cell. Mol. Physiol. 19):L1-L13
9. Ikegami M, Weaver TE, Conkright JJ, Sly PD, Ross GF, Whitsett JA, Glasser SW: Deficiency of SP-B reveals protective role of SP-C during oxygen lung injury. *J Appl Physiol* 2002; 92:519-526

10. De Dooy JJ, Mahieu LM, Van Bever HP: The role of inflammation in the development of chronic lung disease in neonates. *Eur J Pediatr* 2001;160:457-463
11. Böcker, Denk, Heitz: Pathologie 2.Auflage. Urban & Fischer-München-Jena 2001
12. Goldman M, Marchant A, Schandene L: Endogenous interleukin-10 in inflammatory disorders: regulatory roles and pharmacological modulation. *Ann N Y Acad Sci* 1996;796:282-293
13. Schrama AJJ, De Beaufort AJ, Sukul YR, Jansen SM, Poorthuis BJ, Berger HM: Phospholipase A2 is present in meconium and inhibits the activity of pulmonary surfactant: an in vitro study. *Acta Paediatr* 2001;90:412-416
14. 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;157:553-559
15. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986-994
16. 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
17. Freist A: Entwicklung von PCR Methoden zur sensitiven Quantifizierung des mit der chronischen myeloischen Leukämie assoziierten BCR/ABL-Fusionstranskriptes. Dissertation.
18. Bhatt AJ, Amin SB, Chess PR, Watkins RH, Maiscalco WM: Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Flk-1 in Developing and Glucocorticoid – Treated Mouse Lung. *Pediatr. Research* 2000;0031-3998/00/4705-0606



19. Voelkel NF, Cool C, Taraceviene – Stewart L, Geraci MW, Yager M, Bull T, Kasper M, Tuder RM: Janus face of vascular endothelial growth factor: The obligatory survival factor for lung vascular endothelium controls precapillary artery remodelling in severe pulmonary hypertension. *Crit Care Med* 2002;Vol.30 No.5:251-256
20. Liu YX, Cox SR., Morita T, Kurembanas S: Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells – identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.* 77:638-643
21. La P, Turanlahti M, Heikkilä P, Andersson LC, Nupponen I, Sarnesto A, Andersson S; Pulmonary Vascular Endothelial Growth Factor and Flt-1 in Fetuses, in Acute and Chronic Lung Disease and in Persist Pulmonary Hypertension of the Newborn. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164(10 Pt 1):1981-7.
22. Kempf VAJ, Volkmann B, Schaller M, Sander CA, Alitalo K, Riess T, Autenrieth IB: Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cellular Microbiology* 2001;3(9):623-632
23. Niessen KH: Pädiatrie 6.Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York 2001; S.125-129
24. Keller, Wiskott: Lehrbuch der Kinderheilkunde 6.Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York 1991;S.185-191
25. Speer, Gahr: Pädiatrie 1.Auflage. Springer Verlag Berlin- Heidelberg - New York 2000;S.199-202;
26. Davey AM; Becker JD, Davis JM: Meconium aspiration syndrome: Physiological and inflammatory changes in a newborn piglet model. *Pediatr Pulmonol* 1993;16:101-108
27. Holopainen R, Aho H, Laine J, Peuravuori H, Soukka H, Kaapa P: Human meconium has high phospholipase A2 activity and induces cellular injury and apoptosis in piglet lungs. *Pediatr Res.* 1999; 46(5):626-32.

28. Meyboom A: Untersuchungen zur Wechselwirkung von Surfactant Protein A mit Liposomen. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin
29. Benne CA, Kraaijeveld CA, Van Strijp JA, Brouwer E, Harmsen M, Verhoef J, Van Golde LM, van Iwaarden JF: Interactions of surfactant protein A with influenza A viruses: binding and neutralization. *J Infect Dis.* 1995;171(2):335-41
30. Van Iwaarden F, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, Van Golde LM: Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990;2(1):91-8.
31. Pikaar JC, Voorhout WF, Van Golde LM, Verhoef J, Van Strijp JA, Van Iwaarden JF: Opsonic activities of surfactant proteins A and D in phagocytosis of gram-negative bacteria by alveolar macrophages. *J Infect Dis.* 1995;172(2):481-9.
32. Benne CA, Benaissa-Trouw B, Van Strijp JA, Kraaijeveld CA, Van Iwaarden JF: Surfactant protein A, but not surfactant protein D, is an opsonin for influenza A virus phagocytosis by rat alveolar macrophages. *Eur J Immunol.* 1997;27(4):886-90.
33. Griese M, Tredano M, Nicolai T, Bahuau M: Molekulare Grundlagen und Klinik der Alveolarproteinosen. *Deutsches Ärzteblatt* 1999;15
34. <http://www.uni-muenster.de/Chemie.bc/fields/ak-galla/l+m/mssurf-d.html>
35. Kuroki Y, Akino T: Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specially binds dipalmitoylphosphatidylcholin. *J. Biol. Chem.* 1991;266: 3068-3073
36. Rice WR, Ross GF, Singleton FM, Dingle S, Whitsett JA: Surfactant-associated protein inhibits phospholipid secretion from type-II-cells. *J. Appl. Physiol.* 1987;63(2): 692-698

37. Ryan RM, Morris RE, Rice WR, Ciruolo G, Whitsett JA: Binding and uptake of pulmonary surfactant protein A (SP-A) by pulmonary type-II-cells. *J. Histochem. Cytochem.* 1989;37: 429-440
38. Glasser SW, Burhans MS, Korfhagen TR, Na CL, Sly P, Ross G, Ikegami M, Whitsett J: Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98: 6366-6371
39. Schurch S, Green FHY, Bachofen H: Formation and structure of surface films: captive bubble surfactometry. *Biochim Biophys Acta* 1408: 180-202
40. Bridges JP, Wert SE, Nogee LM, Weaver TE: Expression of a Human Surfactant Protein C Mutation Associated with Interstitial Lung Disease Disrupts Lung Development in Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(52): 52739-52746
41. Ding J, Takamoto DY, Von Nahmen A, Lipp MM, Lee KY, Waring AJ, Zasadzinski JA.: Effects of lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, and palmitic acid on monolayer stability. *Biophys J.* 2001; 80(5):2262-72.
42. Voelkel NF, Vandivier RW, Tuder RM: Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;290(2):L209-21
43. Compornolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F, Nemery B, Dewerchin M, Van Veldhoven P, Plate K, Moons L, Collen D, Carmeliet P: Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med.* 2002;8(7):702-10
44. Luttun A, Carmeliet P: Angiogenesis and lymphangiogenesis: highlights of the past year. *Curr Opin Hematol.* 2004 Jul;11(4):262-71
45. Ferrara N: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004;25(4):581-611

46. Benninghoff: Anatomie – Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen 15. Auflage. Urban und Schwarzenberg München – Wien – Baltimore;1:529-539
47. Lassus P, Turanlahti M, Heikkila P, Andersson LC, Nupponen I, Sarnesto A, Andersson S: Pulmonary vascular endothelial growth factor and Flt-1 in fetuses, in acute and chronic lung disease, and in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1981-7
48. D'Angio CT, Maniscalco WM: The role of vascular growth factors in hyperoxia-induced injury to the developing lung. *Front Biosci.* 2002;7:1609-23
49. Maniscalco WM, Watkins RH, D'Angio CT, Ryan RM: Hyperoxic injury decreases alveolar epithelial cell expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in neonatal rabbit lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16(5):557-67
50. Cleary GM, Wiswell TE: Meconium-stained amniotic fluid and the meconium aspiration syndrome. An update. *Pediatr Clin North Am* 1998;45(3):511-529
51. Wiswell TE, Tuggle JM, Turner BS: Meconium aspiration syndrome: have we made a difference? *Pediatrics* 1990; 85(5):715-721.
52. Wiswell TE, Bent RC: Meconium staining and the meconium aspiration syndrome. Unresolved issues. *Pediatr Clin North Am*, 1993; 40(5):955-981.
53. Ziadeh SM, Sunna E: Obstetric and perinatal outcome of pregnancies with term labour and meconium-stained amniotic fluid. *Arch Gynecol Obstet* 2000; 264(2): S. 84-87.
54. Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch 259. Auflage. DeGruyter Berlin-New York 2002
55. Haag P, Hanhart N, Müller M: Gynäkologie und Urologie 2003/2004, Medizinische Verlags- und Informationsdienste Breisach

56. Sedaghatian MR, Othman L, Hossain MM et al.: Risk of meconium-stained amniotic fluid in different ethnic groups. *J Perinatol* 2000; 20(4):257-261.
57. Uhl M, Kromeier J Website der Firma: [www.allp.com/LiquiVent/Graphics/sld003.htm](http://www.allp.com/LiquiVent/Graphics/sld003.htm) 2002, San Diego, USA.
58. Suguihara C: Treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr (Rio J)* 2001; 77(Suppl 1):17-24.
59. Bui KC, Hammerman C, Hirschl R et al.: Plasma prostanoids in neonatal extracorporeal membrane oxygenation. Influence of meconium aspiration. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 101(4):612-617.
60. Altshuler G, Hyde S: Meconium-induced vasocontraction: a potential cause of cerebral and other fetal hypoperfusion and of poor pregnancy outcome. *J Child Neurol* 1989; 4(2):137-142.
61. Higgins ST, Wu AM, Sen N et al.: Meconium increases surfactant secretion in isolated rat alveolar type II cells. *Pediatr Res* 1996; 39(3):443-447.
62. Veldhuizen R, Nag S, Orgeig F, Possmayer: The role of lipids in pulmon surfactant. *Biochim. Biophys. Acta* 1998;1408:90-108
63. Griese M, Tredano M, Nicolai T, Bahuau M: Molekulare Grundlagen und Klinik der Alveolarproteinose. *Dtsch. Arztebl* 2002; 99(15):1013-1023
64. Creuwels LAJM, Van Golde LMG, Haagsman HP: The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* 175:1-39
65. Golenhofen K: *Physiologie heute*. 2. Auflage. Urban & Fischer München Jena 1997; 275-276

66. Pilot-Matias TJ, Kister SE, Fox JL, Kropp K, Glasser SW, Whitsett JA: Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B. *DNA* 1989;8:75-86
67. Phelps DS, Floros J: Localization of surfactant protein synthesis in human lung by *in situ* hybridization. *American Review of Respiratory Disease* 1988;137:939-942
68. Weaver TE, Whitsett JA: Processing of hydrophobic pulmonary surfactant protein B in rat type II cells. *American Journal of Physiology* 1989;257 :100-8
69. Veldhuizen EJA, Haagsman HP: Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochim Biophys Acta* ;1467:255-270
70. Noguee LMG, Garnier HC, Dietz L, Singer AM, Murphy DE, Demello HR, Colten: A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J. Clin. Invest.* 1994;93:1860-1863
71. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W: Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(5):391-400
72. Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA: Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol.* 1993;265(2 Pt 2):H586-92
73. He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, Caldwell RB: Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem.* 1999;274(35):25130-5
74. 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

75. Chomzynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-9
76. 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; 152:1540-1544.
77. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology (NY)* 1993;11: 1026-1030
78. Stryer L, Haugland RP: Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967;58:719-726
79. 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
80. Gibson UE, Heid CA, Williams PM: A novel method for real time quantitative RTPCR. *Genome Res* 1996; 6: 995-1001.
81. Hilgendorff A, Rawer D, Doerner M, Tutdibi E, Ebsen M, Schmidt R, Gortner L, Guenther A, Reiss I: Synthetic and natural surfactant differentially modulate inflammation after meconium aspiration. *Intensive Care Med* 2003;29:2247-2254
82. Hilgendorff A, Doerner M, Rawer D, Leick J, Trotter A, Ebsen M, Ruppert C, Gunther A, Gortner L, Reiss I: Effects of a recombinant surfactant protein-C-based surfactant on lung function and the pulmonary surfactant system in a model of meconium aspiration syndrome. *Crit Care Med.* 2006;34(1):203-10
83. Soukka HR, Ahotupa M, Ruutu M, Kaapa PO: Meconium stimulates neutrophil oxidative burst. *Am J Perinatol* 2002; 19(5):279-84.
84. Findlay RD, Tausch HW, Walther FJ: Surfactant replacement therapy for meconium aspiration syndrome. *Pediatrics* 1996; 97:48-52.

85. Herting E, Rauprich P, Stichtenoth G, Walter G, Johansson J, Robertson B: Resistance of different surfactant preparations to inactivation by meconium. *Pediatr Res.* 2001; 50(1):44-9.
86. Gortner L, Hilgendorff A: Surfactant-associated proteins B and C: molecular biology and physiologic properties. *Z Geburtshilfe Neonatol.* 2004;208(3):91-7
87. Rebello CM, Proenca RS, Troster EJ, Jobe AH: Exogenous surfactant therapy--what is established and what still needs to be determined. *J Pediatr (Rio J)* 2002;78 (Suppl 2):215-26
88. Wert SE, Glasser SW, Korfhagen TR, et al: Transcriptional elements from the human SP-C gene direct expression in the primordial respiratory epithelium of transgenic mice. *Dev Biol* 1993;156:426-443
89. Schmidt R, Steinhilber W, Ruppert C, et al: An ELISA technique for quantification of surfactant apoprotein (SP)-C in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:470-474
90. Mora R, Arold S, Marzan Y, et al: Determinants of surfactant function in acute lung injury and early recovery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L342-L349
91. Kolb M, Schmidt M: The Role of Cytokines and Growth Factors in Fibroproliferative Lung Disease. *Pneumologie* 2003;57: 91-97
92. Hybertson BM, Lee YM, Repine JE: Phagocytes and acute lung injury: dual roles for interleukin-1. *Ann NY Acad Sci* 1997;832:266-273
93. Sime PJ, Gauldie J: Mechanisms of scarring. ARDS in adults. Chapman & Hall Medical London 1996; 215-231
94. Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K, Chen D, Witzembichler B, Kearney M, Couffinhal T, Isner JM: Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med.* 1997;3(8):879-86



95. Griese M, Wilnhammer C, Jansen S, Rinker C: Cardiopulmonary bypass reduces pulmonary surfactant activity in infants. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;118(2):237-44
96. Vayrynen O, Glumoff V, Hallman M: Regulation of surfactant proteins by LPS and proinflammatory cytokines in fetal and newborn lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282(4):L803-10
97. Friedrich B, Schmidt R, Reiss I, et al: Changes in biochemical and biophysical surfactant properties with cardiopulmonary bypass in children. *Crit Care Med* 2003;31:284–290
98. Li YH, Brauner A, Jonsson B, Van der Ploeg I, Soder O, Holst M, Jensen JS, Lagercrantz H, Tullus K: Inhibition of macrophage proinflammatory cytokine expression by steroids and recombinant IL-10. *Biol Neonate.* 2001;80(2):124-32
99. Jones CA, Cayabyab RG, Kwong KY, Stotts C, Wong B, Hamdan H, Minoo P, deLemos RA: Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns. *Pediatr Res.* 1996;39(6):966-75
100. Dimmeler S, Zeiher AM: Nitric oxid-an endothelial cell survival factor. *Cell death Differ.* 1999;6:964-968
101. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, Jain RK: Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;27;98(5):2604-9
102. Farahani M, Treweeke AT, Toh CH, Till KJ, Harris RJ, Cawley JC, Zuzel M, Chen H: Autocrine VEGF mediates the antiapoptotic effect of CD154 on CLL cells. *Leukemia.* 2005;19(4):524-30

103. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998;22;273(21):13313-6
104. Comperolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F, Nemery B, Dewerchin M, Van Veldhoven P, Plate K, Moons L, Collen D, Carmeliet P: Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med.* 2002;8(7):702-10
105. Brown KR, England KM, Goss KL, Snyder JM, Acarregui MJ: VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(4):L1001-10
106. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ: Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1996; 271(2):736-41.
107. Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F, Lee ME: Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1995;270(1):308-12
108. Healy AM, Morgenthau L, Zhu X, Farber HW, Cardoso WV: VEGF is deposited in the subepithelial matrix at the leading edge of branching airways and stimulates neovascularization in the murine embryonic lung. *Dev Dyn.* 2000; 219(3):341-52.
109. Glantz JC, Woods JR: Significance of amniotic fluid meconium. *Maternal – Fetal Medicine* 1999;19:393-403
110. Wiswell TE, Bent RC: Meconium staining and the meconium aspiration syndrome. *Unresolved issues. Pediatr Clin North Am.* 1993;40(5):955-81

111. Polin RA, Fox WW: Fetal and neonatal physiology Vols. 1 and 2. Saunders Philadelphia – London – Toronto – Montreal 1992
112. Wauer R: Surfactanttherapie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie. Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York 2004
113. Moses D, Holm BA, Spitale P, Liu MY, Enhorning G: Inhibition of pulmonary surfactant function by meconium. Am J Obstet Gynecol. 1991;164(2):477-81
114. Dargaville PA, Copnell B; Australian and New Zealand Neonatal Network: The epidemiology of meconium aspiration syndrome: incidence, risk factors, therapies, and outcome. Pediatrics. 2006;117(5):1712-21
115. Sippola T, Aho H, Peuravuori H, Lukkarinen H, Gunn J, Kaapa P: Pancreatic phospholipase A2 contributes to lung injury in experimental meconium aspiration. Pediatr Res. 2006;59(5):641-5
116. Speer CP: Surfactantsubstitutionstherapie. Monatschr Kinderheilkd 2002;150:659-668
117. Rudolph AM: High pulmonary vascular resistance after birth. 1. Pathophysiologic considerations and etiologic classification. Clin Pediatr 1980;585-590
118. Hörnchen H, Merz U, Wicher W, Mühler E: Die persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen. Das „PFC – Syndrom“. Z Kinderchir 1990;45:1941-1944
119. Committee on neonatal ventilation/meconium/chest compressions. Guidelines proposed at the 1992 conference on cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiac care. Dallas 1992. JAMA 1992;268:2276-2281

120. Herting E, Sun B, Harms K et al: Surfactant – Behandlung bei Mekoniumaspiration: Widerspruch tierexperimenteller und klinischer Ergebnisse ? Z Geburtsh Neonatol 1995;199:210
121. Wiswell TE, Gannon CM, Jacob J, Goldsmith L, Szyld E, Weiss K, Schutzman D, Cleary GM, Filipov P, Kurlat I, Caballero CL, Abassi S, Sprague D, Oltorf C, Padula M: Delivery room management of the apparently vigorous meconium-stained neonate: results of the multicenter, international collaborative trial. Pediatrics. 2000;105:1-7
122. Paranka MS, Walsh WF, Stancombe BB: Surfactant lavage in a piglet model of meconium aspiration syndrome. Pediatr Res. 1992; 31(6):625-8.
123. Sun B, Herting E, Curstedt T, Robertson B: Exogenous surfactant improves lung compliance and oxygenation in adult rats with meconium aspiration. J Appl Physiol. 1994; 77(4):1961-71.
124. Ohama Y, Itakura Y, Koyama N, Eguchi H, Ogawa Y: Effect of surfactant lavage in a rabbit model of meconium aspiration syndrome. Acta Paediatr Jpn. 1994; 36(3):236-8.
125. Lam BC, Yeung CY, Fu KH, Wong KY, Chan FL, Tsoi NS: Surfactant tracheobronchial lavage for the management of a rabbit model of meconium aspiration syndrome. Biol Neonate. 2000; 78(2):129-38.
126. Cockshutt AM, Weitz J, Possmayer F: Pulmonary surfactant-associated protein A enhances the surface activity of lipid extract surfactant and reverses inhibition by blood proteins in vitro. Biochemistry. 1990;29(36):8424-9
127. Herting E, Strayer DS, Jarstrand C, Sun B, Robertson B: Lung function and bacterial proliferation in experimental neonatal pneumonia in ventilated rabbits exposed to monoclonal antibody to surfactant protein A. Lung. 1998;176(2):123-31

128. Strayer DS, Herting E, Sun B, Robertson B: Antibody to surfactant protein A increases sensitivity of pulmonary surfactant to inactivation by fibrinogen in vivo. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153(3):1116-22
129. Sun B, Curstedt T, Lindgren G, Franzen B, Alaiya AA, Calkovska A, Robertson B: Biophysical and physiological properties of a modified porcine surfactant enriched with surfactant protein A. *Eur Respir J.* 1997;10(9):1967-74
130. Stichtenoth G, Herting E, Rauprich P, Walter G, Johansson J, Robertson B: Inhibition of surfactant preparations used for treatment of neonatal acute respiratory distress syndrome (ARDS) caused by meconium aspiration: surface tension vs. area compression. *Biol Neonate* 2000;77 (Suppl 1):25-26
131. Stichtenoth G, Curstedt T, Robertson B, Herting E: Increasing the resistance of curosurf to meconium inactivation by adding lipids, phospholipids or dextran. *Biol Neonate* 2001;80 (Suppl 1):39
132. Tausch HW, Lu KW, Goerke J, Clements JA: Nonionic polymers reverse inactivation of surfactant by meconium and other substances. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:1391-5
133. Hafner D, Germann PG, Hauschke D: Effects of lung surfactant factor (LSF) treatment on gas exchange and histopathological changes in an animal model of adult respiratory distress syndrome (ARDS): comparison of recombinant LSF with bovine LSF. *Pulm Pharmacol.* 1994;7(5):319-32
134. 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):451-8
135. Halliday HL, Speer CP, Robertson B: Treatment of severe meconium aspiration syndrome with porcine surfactant. Collaborative Surfactant Study Group. *Eur J Pediatr.* 1996;155(12):1047-51

136. Auten RL, Notter RH, Kendig JW, Davis JM, Shapiro DL: Surfactant treatment of full-term newborns with respiratory failure. *Pediatrics*. 1991;87(1):101-7
137. Blanke JG, Jorch G: Surfactanttherapie bei 10 Neugeborenen mit Mekoniumaspirationssyndrom. *Klin Pädiatr* 1993; 205:75-78
138. Khammash H, Perlman M, Wojtulewicz J, Dunn M: Surfactant therapy in full-term neonates with severe respiratory failure. *Pediatrics*. 1993;92(1):135-9
139. Lotze A, Knight GR, Martin GR, Bulas DI, Hull WM, O'Donnell RM, Whitsett JA, Short BL: Improved pulmonary outcome after exogenous surfactant therapy for respiratory failure in term infants requiring extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr*. 1993;122(2):261-8
140. Findlay RD, Taeusch HW, Walther FJ: Surfactant replacement therapy for meconium aspiration syndrome. *Pediatrics*. 1996;97(1):48-52
141. Schlösser RL, Veldmann A, Fischer D, Allendorf A, Loewenich V: Lavage mit exogenem Surfactant bei neonataler Mekoniumaspiration. *Z Geburtsh Neonatol* 2002;206:15-18
142. Soll RF, Dargaville P: Surfactant for meconium aspiration syndrome in full term infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD002054
143. Possmayer F: A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis* 1988;138: 990-998
144. Johansson J, Curstedt T: Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *Eur J Biochem* 1997;244: 675-693
145. Paananen R, Glumoff V, Sormunen R, Voorhout W, Hallman M: Expression and localization of lung surfactant protein B in eustachian tube epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:214-220

146. Voorhout WF, Weaver TE, Haagsman HP, Geuze HJ, van Golde LM: Biosynthetic routing of pulmonary surfactant proteins in alveolar type II cells. 1993;26:366-373
  
147. Von Neergarg: Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. Zeitschrift für gesamte experimentelle Medizin 1929;66:373-394
  
148. 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
  
149. Griese M, Gobrian LI, Rooney SA: Surfactant lipid uptake and secretion in type II cells in response to lectins and secretagogues. Am. J. Physiol. 1991;261:434-442
  
150. Bates SR, Beers MF, Fisher AB: Binding and uptake of surfactant protein B by alveolar type II cells. Am. J. Physiol. 1992;263:333-341
  
151. Breslin JS, Weaver TE: Binding, uptake and localisation of surfactant protein B in isolated rat alveolar type II cells. Am. J. Physiol. 1992;262:699-707
  
152. Yu SH, Possmayer F: Reconstitution of surfactant activity by using 6 kDa apoprotein associated with pulmonary surfactant. Biochem. J. 1986;236:85-89
  
153. Yu SH, Possmayer F: Comparative studies on the biophysical activities of the low molecular-weight hydrophobic proteins purified from bovine pulmonary surfactant. Biochem. Biophys. Acta 1988;961:337-350
  
154. Amin RS, Wert SE, Baughman RP, Tomashefski JF Jr, Nogee LM, Brody AS, Hull WM, Whitsett JA: Surfactant protein deficiency in familial interstitial lung disease. J Pediatr. 2001;139(1):85-92

155. Yu S, Harding PGR, Smith N, Possmayer F: Bovine pulmonary surfactant: Chemical composition and physical properties. *Lipids* 1983;18:522-9
156. Thome UH, Schulze A, Schnabel R, Franz AR, Pohlandt F, Hummler HD: Partial liquid ventilation in severely surfactant-depleted, spontaneously breathing rabbits supported by proportional assist ventilation. *Crit Care Med* 2001; 29(6):1175-80.
157. Trotter A, Ebsen M, Kiossis E, Meggle S, Kueppers E, Beyer C, Pohlandt F, Maier L, Thome UH: Prenatal Estrogen and Progesterone Deprivation Impairs Alveolar Formation and Fluid Clearance in Newborn Piglets. *Pediatr Res.* 2006 11
158. Dargaville PA, South M, McDougall PN: Surfactant and surfactant inhibitors in meconium aspiration syndrome. *J Pediatr* 2001;138(1):113-5
159. Cleary GM, Antunes MJ, Ciesielka DA, Higgins ST, Spitzer AR, Chander A: Exudative lung injury is associated with decreased levels of surfactant proteins in a rat model of meconium aspiration. *Pediatrics* 1997;100(6):998-1003
160. De BA, Bakker AC, Van TM, Poorthuis BJ, Schrama AJ, Berger HM: Meconium Is a Source of Pro-Inflammatory Substances and Can Induce Cytokine Production in Cultured A549 Epithelial Cells. *Pediatr Res* 2003;54(4):491-5
161. Tran N, Lowe C, Sivieri EM, Shaffer TH: Sequential effects of acute meconium obstruction on pulmonary function. *Pediatr Res* 1980;14(1):34-8
162. Holopainen R, Soukka H, Halkola L, Kaapa P: Meconium aspiration induces a concentrationdependent pulmonary hypertensive response in newborn piglets. *Pediatr Pulmonol* 1998;25(2):107-13
163. Perlman EJ, Moore GW, Hutchins GM: The pulmonary vasculature in meconium aspiration. *Hum Pathol* 1989;20(7):701-6



164. Gortner L, Pohlandt F, Bartmann P: Bovine surfactant in full-term neonates with adult respiratory distress syndrome-like disorders. *Pediatrics* 1994;93(3):538
165. Seeger W, Thede C, Gunther A, Grube C: Surface properties and sensitivity to protein-inhibition of a recombinant apoprotein C-based phospholipid mixture in vitro - comparison to natural surfactant. *Biochim Biophys Acta* 1991;1081(1):45-52
166. Dargaville PA, Morley CJ. Overcoming surfactant inhibition with polymers: *Acta Paediatr* 2000;89(12):1397-400
167. Possmayer F, Nag K, Rodriguez K, Qanbar R, Schurch S: Surface activity in vitro: role of surfactant proteins. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001;129(1):209-20
168. Qanbar R, Cheng S, Possmayer F, Schurch S: Role of the palmitoylation of surfactant-associated protein C in surfactant film formation and stability. *Am J Physiol* 1996;271(4 Pt1):L572-80
169. Kaneko M, Watanabe J, Ueno E. Surfactant lavage and replacement in meconium aspiration syndrome with pulmonary hemorrhage. *J Perinat Med* 2001;29(4):351-6
170. Wiswell TE, Knight GR, Finer NN et al.: A multicenter, randomized, controlled trial comparing Surfaxin (Lucinactant) lavage with standard care for treatment of meconium aspiration syndrome. *Pediatrics*. 2002;109(6):1081-7
171. Lam BC: Surfactant lavage for the management of severe meconium aspiration syndrome. *Biol Neonate* 1999;76 (Suppl 1):10-4
172. Kattwinkel J: Surfactant lavage for meconium aspiration: a word of caution. *Pediatrics*. 2002 Jun;109(6):1167-8
173. Musante G, Schnitzler E: Different therapeutic perspectives for novel exogenous surfactant preparations. *Crit Care Med*. 2006;34(1):260-1

174. Chen WS, Kitson RP, Goldfarb RH: Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGFR-1 (FLT-1). *In Vivo*. 2002;16(6):439-45
175. Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N: VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*. 2002;27;417(6892):954-8
176. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S: Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2001;7;193(9):1005-14.
177. Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, Magner M, Asahara T, Isner JM: Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*. 1999;99(1):111-20
178. Park JE, Keller GA, Ferrara N: The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*. 1993;4(12):1317-26
179. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB: Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 1991;6(9):1677-83
180. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995;6;376(6535):62-6
181. Asikainen TM, Ahmad A, Schneider BK, Ho WB, Arend M, Brenner M, Gunzler V, White CW: Stimulation of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and VEGF by prolyl 4-hydroxylase inhibition in human lung endothelial and epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2005;15;38(8):1002-13

182. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT: Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J Biol Chem.* 2000;18;275(33):25130-8
183. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999;13(1):9-22
184. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML: Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995;6;376(6535):66-70
185. Price, WA, Stiles AD: New insights into lung growth and development. *Curr. Opin. Pediatr.* 1996; 8:202–208.
186. Galambos C, Ng YS, Ali A, Noguchi A, Lovejoy S, D'Amore PA, DeMello DE: Defective pulmonary development in the absence of heparin-binding vascular endothelial growth factor isoforms. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27(2):194-203
187. Gebb SA, Shannon JM: Tissue interactions mediate early events in pulmonary vasculogenesis. *Dev Dyn.* 2000;217(2):159-69
188. Jakkula M, Le Cras TD, Gebb S, Hirth KP, Tuder RM, Voelkel NF, Abman SH: Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279(3):L600-7
189. Zeng X, Wert SE, Federici R, Peters KG, Whitsett JA: VEGF enhances pulmonary vasculogenesis and disrupts lung morphogenesis in vivo. *Dev Dyn.* 1998;211(3):215-27
190. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH: Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1994;269(43):26988-95

191. Akeson AL, Greenberg JM, Cameron JE, Thompson FY, Brooks SK, Wiginton D, Whitsett JA: Temporal and spatial regulation of VEGF-A controls vascular patterning in the embryonic lung. *Dev Biol.* 2003;264(2):443-55
192. Clerch LB, Baras AS, Massaro GD, Hoffman EP, Massaro D: DNA microarray analysis of neonatal mouse lung connects regulation of KDR with dexamethasone-induced inhibition of alveolar formation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286(2):L411-9
193. Bhatt AJ, Pryhuber GS, Huyck H, Watkins RH, Metlay LA, Maniscalco WM: Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(10 Pt 1):1971-80
194. Choe KH, Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Gera L, Tuder RM, Voelkel NF: Methylprednisolone causes matrix metalloproteinase-dependent emphysema in adult rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(11):1516-21
195. Edelman JL, Lutz D, Castro MR: Corticosteroids inhibit VEGF-induced vascular leakage in a rabbit model of blood-retinal and blood-aqueous barrier breakdown. *Exp Eye Res.* 2005;80(2):249-58
196. Le Cras TD, Markham NE, Tuder RM, Voelkel NF, Abman SH: Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283(3):L555-62
197. Perkins GD, Roberts J, McAuley DF, Armstrong L, Millar A, Gao F, Thickett DR: Regulation of vascular endothelial growth factor bioactivity in patients with acute lung injury. *Thorax.* 2005;60(2):153-8
198. Mura M, dos Santos CC, Stewart D, Liu M: Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury. *J Appl Physiol.* 2004;97(5):1605-17

199. Le Cras TD, Spitzmiller RE, Albertine KH, Greenberg JM, Whitsett JA, Akeson AL: VEGF causes pulmonary hemorrhage, hemosiderosis, and air space enlargement in neonatal mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(1):L134-42
200. Lassus P, Ristimaki A, Ylikorkala O, Viinikka L, Andersson S: Vascular endothelial growth factor in human preterm lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(5 Pt 1):1429-33
201. Klekamp JG, Jarzecka K, Perkett EA: Exposure to hyperoxia decreases the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in adult rat lungs. *Am J Pathol*. 1999;154(3):823-31
202. Ohwada A, Tsutsumi-Ishii Y, Yoshioka Y, Iwabuchi K, Nagaoka I, Fukuchi Y: Acid exposure potentiates intercellular adhesion molecule-1 and e-cadherin expression on A549 alveolar lining epithelial cells. *Exp Lung Res*. 2003;29(6):389-400
203. Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF: Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(3 Pt 1):737-44
204. Vandivier RW, Fadok VA, Hoffmann PR, Bratton DL, Penvari C, Brown KK, Brain JD, Accurso FJ, Henson PM: Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *J Clin Invest*. 2002;109(5):661-70
205. Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, Hoffmann PR, Brown KK, Botto M, Walport MJ, Fisher JH, Henson PM, Greene KE: Role of surfactant proteins A, D, and Clq in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol*. 2002;169(7):3978-86
206. Jobe A: Respiratory distress syndrome--new therapeutic approaches to a complex pathophysiology. *Adv Pediatr* 1983;30:93-130

207. Akeson AL, Cameron JE, Le Cras TD, Whitsett JA, Greenberg JM: Vascular endothelial growth factor-A induces prenatal neovascularization and alters bronchial development in mice. *Pediatr Res.* 2005;57(1):82-8

## **Materialien**

### **Geräte und Verbrauchsmaterialien**

ABI PRISM<sup>®</sup> Cap Installing Tool

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Art.-Nr.: 4330015

ABI PRISM 770 Sequence Detection System

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Art.-Nr.: 770-01-220/240

ABI PRISM<sup>®</sup> Optical Caps, (8 Caps/Strip)

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Art.-Nr.: 4323032

Disposable Scalpel Sterile No21

FEATHER Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan

Art.-Nr.: 31602740

Eppendorf-Referenz Pipette, variable 0,5-10 µl

Eppendorf AG, Hamburg

Art.-Nr.: 4910 000.018

Eppendorf-Referenz Pipette, variable 10-100 µl

Eppendorf AG, Hamburg

Art.-Nr.: 4910 000.024

Eppendorf-Referenz Pipette, variable 100-1000 µl

Eppendorf AG, Hamburg

Art.-Nr.: 4910 000.069

Eppendorf Easypet mit Ladegerät und Wandhalter

Eppendorf AG, Hamburg

Art.-Nr.: 4860 000.011

Latexhandschuhe, puderfrei

Ansell GmbH, München

Art.-Nr.: 31404862

Medizinische Pinzette, blau, unsteril 12.5 cm lang

Tüshaus, Medical Produkte GmbH, 46342 Velen-Ramsdorf

Art.-Nr.: 01.900.00.473

Mikrotiterplatten

Nunc (Wiesbaden)

Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Art.-Nr.: N801-0560

Microtubes 1,5 ml, 39 x 10,8 mm Ø farblos/neutral

Sarstedt, Nürnberg

Art.-Nr.: 72.690

Parafilm 10 cm

Pechiney Plastic Packaging, Inc., Chicago, ILL, USA

Art.-Nr.: 32436000

Pipettenspitzen natur; 0,5 - 10 µl mit PE-Filter

RNAse, DNA-, & pyrogenfrei, 96 im Rack, steril

Nerbe Plus GmbH, Winsen, Luhe

Art.-Nr.: 07.722.5360



Pipettenspitzen natur; 1-100 µl mit PE-Filter  
RNAse, DNA-, & pyrogenfrei, 96 im Rack, steril  
Nerbe Plus GmbH, Winsen, Luhe  
Art.-Nr.: 07.742.5360

Pipettenspitzen natur; 1-200 µl mit PE-Filter  
RNAse, DNA-, & pyrogenfrei, 96 im Rack, steril  
Nerbe Plus GmbH, Winsen, Luhe  
Art.-Nr.: 07.752.5360

Pipettenspitzen natur; 100-1000 µl mit PE-Filter  
RNAse, DNA-, & pyrogenfrei, 96 im Rack, steril  
Nerbe Plus GmbH, Winsen, Luhe  
Art.-Nr.: 07.792.5360

Spektralphotometer Lambda-Bio2.1 UV/VIS  
Perkin Elmer  
Conneticut, USA

Safe-Lock-Tubes 0,5 ml  
Eppendorf AG, Hamburg  
Art.-Nr.: 0030 121.023

Safe Lock Tube 2,0 ml  
Eppendorf AG, Hamburg  
Art.-Nr.: 0030 120.094

Thermal Cyclers PTC-200  
MJ Research Inc., Waltham, MA, USA  
Art.-Nr.: PTC-0200

Tomy Digital Biology PMC-060 Capsulefuge  
Tomy Digital Biology Co. Ltd., Tokio, Japan  
Art.-Nr.: PMC-060 Capsulefuge

Tubes 0,2 ml

Pure Pak Molecular BioProducts, San Diego, USA

Art.-Nr.: 3414

Vortex Genie 2

Scientific Industries, Bohemie, NY, USA

Art.-Nr.: G 560

Zentrifuge Hettich Universal 30 RF

Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

Art.-Nr.: nicht mehr im Handel

Zentrifuge Hettich EREBA 12

Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

Art.-Nr.: nicht mehr im Handel

## **Reagenzien**

0,1M DTT

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Art.-Nr.: s. Superscript II

1<sup>st</sup>. Strand Buffer

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Art.-Nr.: 18064-71

2-Propanol

Riedel de Haen, eine Marke der Honeywell International Inc., Seelze

Art.-Nr.: 59304

dNTP mix 10M

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Art.-Nr.: 18109-017

Ethanol absolut

Riedel-de-Haen, eine Marke der Honeywell International Inc., Seelze

Art.-Nr.: 32205

LiChrosolv HPLC Wasser

MERCK KGaA, Darmstadt

Art.-Nr.: 1.15333.2500

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

Eurogentec, Seraing, Belgien

Best. RT-QP2X-03

Lot. No. 11/1

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

F. Hoffmann-La Roche AG, Basel

1034731, 50A260 units

Art.-Nr.: 85732224-74

RNAse OUT

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Art.-Nr.: 10777-019

Superscript II

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Art.-Nr.: 18064-014

Trichlormethan/Chloroform

ROTIPURAN

Art.-Nr.: 3313.4

TRIzol Reagent 200 ml

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Art.-Nr.: 15596-018

**Primer and TaqMan™ probes**

18 S

Forward primer (FP): 5'- GCC GCT AGA GGT GAA ATT CTT G -3'

Reverse primer (RP): 5'- CAT TCT TGG CAA ATG CTT TCG -3'

Probe: 5'(FAM)- CCG GCG CAA GAC GGA CCA GA -(TAMRA)3'

Hypoxanthin-guanine-phosphoribosyl-transferase:

Forward: 5'-TGGAAAGAATGTCTTGATTGTTGAAG-3'

Reverse: 5'-ATCTTTGGATTATGCTGCTTGACC-3'

Probe: 5'(VIC)-ACACTGGCAAAVAATGCAAACCTTGCT-(TAMRA)3'

β-actin:

Forward: 5'-TCATCACCATCGGCAACG-3'

Reverse: 5'-TTCCTGATGTCCACGTCGC-3'

Probe: 5'(VIC)-CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTGC-(TAMRA)3'

Surfactant protein B (SP-B):

FP: 5'- TCC GCT GGT CGT TGA TCA C -3'

RP: 5'- GTT TGC ACA GGC CCA AGT G -3'

Probe: 5'(FAM)- CAG AGC CAA ATG AAC CTG AAG GCC ATC -(TAMRA)3'

Surfactant protein C (SP-C):

FP: 5'- CAC CTT CTC CAT TGG CTC TAG TG -3'

RP: 5'- ATA CTC TGC GGA GAC ATC TTC ATG -3'

Probe: 5'(FAM)- TGA CTA CCA GCG GCT CCT GAT TGC C -(TAMRA)3'

Vascular Endothelia Growth Factor (VEGF)

FP: 5'- TGTGCCACATGAGGAGTTCA -3'

RP: 5'- TCCTATGTGCTGGCCTTGGT-3'

Probe: 5' (FAM)-ATCGCCATGCAGATTATGCGGATCA-(TAMRA)3'

**Primer**

ROTH GmbH + Co, Karlsruhe

**Sonden**

Eurogentec, Seraing, Belgien: OliGold

**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.“

**Danksagung**

Mein Dank gilt allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Privatdozent Dr. med. Irwin Reiss und Prof. Dr. med. Ludwig Gortner danke ich für die Überlassung des Themas und deren wertvolle wissenschaftlichen Unterstützung.

Herrn PD. Dr. med. Kreuder danke ich für die Überlassung der Materialien und die Arbeit in seinem Labor.

Frau Dr.med. Anne Hilgendorff danke ich für die Unterstützung und wunderbare Betreuung.

Herrn Professor Dr. med. Andres Günther und Herrn Dr. rer. nat. Clements Ruppert danke ich für die Quantifizierung der Surfactantproteine mittels ELISA Verfahren.

Herrn Papst danke ich für die statistische Datenanalyse.

Frau Marga Bötcher gilt mein besonderer Dank für die geduldige und liebevolle Einarbeitung in die praktische Laborarbeit.

Herrn Daniel Rawer danke ich für die Einarbeitung in die Grundlagen und die Durchführung der Real-time PCR. Zudem gilt ihm ein besonderer Dank für die geduldige Beantwortung so vieler Fragen.

Ich danke Herrn Tilo Hanfstingl, für seine menschliche und fachliche Unterstützung und für all diese Gespräche während den Labortätigkeiten.

Meiner Mutter und meinem Vater danke ich für die Ermöglichung meines beruflichen Werdeganges und für die moralische Unterstützung in den Zeiten, in denen ein Fertigstellen dieser Arbeit schier unvorstellbar schien.

**Lebenslauf****Name:** Jürgen Joachim Leick**Geb.:** 13.05.1978 in Bitburg**Wohnhaft:** Rodheimer Str. 49  
35398 Gießen**Schulbildung**

**08/1984 - 07/1988** Grundschule, Arzfeld  
**08/1988 - 07/1994** Kaiser Lothar Realschule, Prüm  
**08/1994 - 07/1997** Regino Gymnasium, Prüm  
**07/1997** Abitur

**Zivildienst**

**08/1997 - 09/1998** Zivildienst im St. Elisabeth Krankenhaus, Gerolstein

**Berufspraxis vor dem Studium**

**09/1998 - 08/1999** Stationshelfer im St. Elisabeth Krankenhaus, Gerolstein

**Studium**

**09/1999 - 07/2001** Vorklinisches Studium, Humanmedizin  
Justus-Liebig-Universität, Gießen  
**09/2001** Ärztliche Vorprüfung  
**08/2002** Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
**03/2005** Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
**05/2006** Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

**Beruflicher Werdegang**

**06/2006** Assistenzarzt, Bürgerhospital Friedberg, Innere Abteilung



**07/2004 Kongreßbeiträge:**

- Ø Surfactantmetabolismus im Model des experimentellen Mekoniumaspirationssyndroms nach Behandlung mit synthetischen und natürlichen Surfactantpräparaten
- Ø Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) in einem Modell des experimentellen Mekoniumaspirationssyndroms nach Behandlung mit natürlichen und synthetischen Surfactantpräparaten
- Ø Genexpressionsanalyse an Tiermodellen des akuten neonatalen Lungenversagens: Evaluation dreier potentieller Housekeeping-Gene für die rt-PCR
- Ø Beeinflussung der Expression surfactant-assoziiierter Proteine durch rekombinantes SP-C Surfactant in einem Tiermodell für RDS

**01/2006 Publikation:**

Hilgendorff A, Doerner M, Rawer D, Leick J, Trotter A, Ebsen M, Ruppert C, Gunther A, Gortner L, Reiss I: Effects of a recombinant surfactant protein-C-based surfactant on lung function and the pulmonary surfactant system in a model of meconium aspiration syndrome. Crit Care Med. 2006;34(1):203-10