

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
(Department) Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde IV
(Schwerpunkt: Neonatologie, Neonatologische Intensivmedizin)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Ch. Poets

**Rekombinanter humaner
Keratinozytenwachstumsfaktor als Alternative zu
Glukokortikoiden: Spezifische Effekte auf
Surfactantstatus und Leberphospholipide in
neugeborenen Ratten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Florian Michael Ohler

aus
Bietigheim-Bissingen

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. W. Bernhard

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Riessen

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	I
<u>Tabellenverzeichnis</u>	V
<u>Abbildungsverzeichnis</u>	VI
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	VIII
<u>1 Einleitung</u>	1
1.1 Fragestellung der Arbeit	4
<u>2 Grundlagen des Lungensurfactant</u>	8
2.1 Biophysikalische Grundlagen	8
2.2 Zusammensetzung des Surfactant	10
2.2.1 Phospholipide	12
2.2.2 Einflüsse der Phospholipide auf die Oberflächenspannung	16
2.2.3 Surfactantproteine (SP-) A, B, C und D	17
2.2.3.1 Hydrophile Surfactantproteine SP-A und SP-D	17
2.2.3.2 Hydrophobe Surfactantproteine SP-B und SP-C	19
2.3 Surfactantsynthese und Sezernierung	20
2.3.1 Phospholipidsynthese	20
2.3.1.1 Hormonelle Einflüsse auf die Phospholipidsynthese	23
2.3.1.1.1 Einflüsse von Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF)	23
2.3.1.1.2 Einflüsse durch Glukokortikoide	24
2.3.2 Synthese, Speicherung und Sezernierung des Surfactantgemischs	24
2.4 Das kindliche Atemnotsyndrom (eng. „infant-respiratory-distress-syndrome - IRDS)	26
2.4.1 Definition	26
2.4.2 Ätiologie und Pathophysiologie	27
2.4.3 Klinik und Diagnostik	28

2.4.4 Therapie	29
2.4.5 Chronische Folgen	29
3 <u>Materialien und Methoden</u>	31
3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	31
3.1.1 Phospholipid-Extraktion	31
3.1.2 Phosphatbestimmung	32
3.1.3 HPLC-Analytik	32
3.2 Chemikalien und Reagenzien	33
3.2.1 Chemikalien	33
3.2.2 Reagenzien	35
3.3 Versuchstiere	35
3.4 Gewinnung von Organen und sezerniertem Surfactant	36
3.5 Analytische Methoden	40
3.5.1 Phospholipid-Extraktion	40
3.5.1.1 Extraktion nach Bligh und Dyer	40
3.5.1.2 Extraktion nach Folch	41
3.5.2 Phospholipid-Analytik	42
3.5.2.1 Bestimmung der Gesamtpospholipide - Phosphatbestimmung nach Bartlett	42
3.5.3 HPLC-Analytik der Phosphatidylcholin -Spezies	43
3.5.3.1 Festphasenextraktion von Phosphatidylcholin	43
3.5.3.2 Bestimmung der individuellen Phosphatidylcholin-Spezies mit Hilfe der Umkehrphasen- Hochdruckflüssigkeitschromatographie	45
3.6 Statistische Auswertung	52
4 <u>Ergebnisse</u>	53
4.1 Körpergewicht nach rhKGF- und Betamethason-Behandlung	53
4.2 Größe der Phospholipidpools	55
4.2.1 Phospholipidpoolgrößen in lavagiertem Lungengewebe und Lungenspülflüssigkeit	55

4.3 Sphingomyelin in lavagiertem Lungengewebe und Lungenspülflüssigkeit	58
4.4 Molekulare Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies in lavagierter Lunge und Lungenspülflüssigkeit	59
4.4.1 Molekulare Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies in Lungengewebe und Lungenspülflüssigkeit	60
4.5 Größe des Phosphatidylcholin-Pools in Lunge und Lavageflüssigkeit	62
4.5.1 Gesamt-Poolgrößen	62
4.5.2 Einflüsse von rhKGF, Betamethason oder Kombination auf Poolgrößen der wichtigsten Surfactant-Bestandteile	64
4.6 Phospholipid-Poolgrößen in Leber und Blutplasma	67
4.7 Molekulare Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies in Leber und Blutplasma	69
4.7.1 Molekulare Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies in Leber und Blutplasma	70
4.8 Größe des Phosphatidylcholin-Pools in Leber und Plasma	71
4.8.1 Gesamt-Poolgrößen	71
4.8.2 Einfluss von rhKGF, Betamethason oder Kombination auf den Arachidonoyl-PC-Pool	73
<u>5 Diskussion</u>	<u>75</u>
5.1 Klinischer Kontext	75
5.2 Methodenkritik	77
5.2.1 Tiermodell der sich entwickelnden Lunge am Beispiel der Ratte	77
5.2.2 Labormethoden der Phospholipid- und Phosphocholinanalytik	78
5.2.3 Systemische Applikation von rhKGF und Betamethason	78
5.3 Diskussion der Ergebnisse	78
5.3.1 Effekte von rhKGF und Betamethason den Surfactant-Pool	78
5.3.2 Effekte von rhKGF und Betamethason auf die Surfactant-Zusammensetzung	81

5.3.3 Einflüsse von Betamethason und rhKGF auf den Lipid-Pool in Leber und Blutplasma	83
5.3.4 Molekulare Zusammensetzung der PC-Spezies in Leber und Blutplasma	84
5.4 Zusammenfassung und Beurteilung der Ergebnisse	85
5.5 Fazit und Ausblick	87
<u>6 Zusammenfassung</u>	<u>89</u>
<u>7 Literaturverzeichnis</u>	<u>91</u>
<u>8 Danksagung</u>	<u>102</u>
<u>9 Lebenslauf</u>	<u>103</u>

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Einteilung der Glycerophospholipid-Klassen nach der chemischer Struktur ihrer Kopfgruppen.....	13
Tab. 2.2: Wichtige Fettsäuren von Glycerophospholipiden.....	14
Tab. 3.1: Bestandteile des verwendeten HPLC-Systems.	46
Tab. 4.2: Sezernierte Fraktion (Anteil des Lavagephospholipids am Gesamtphospholipid der Lunge).....	58
Tab. 4.3: Phosphatidylcholin-Poolgrößen in lavagiertem Lungengewebe und LLF	63
Tab. 4.4: Phospholipidstoffmengen von Lebergewebe und Blutplasma	69
Tab. 4.5: Phosphatidylcholin-Poolgrößen in Leber und Plasma	72

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Schematische Zusammensetzung von Surfactant.	11
Abb. 2.2: Phosphatidylcholin-Zusammensetzung bei adulten Ratten und Mensch	11
Abb. 2.3: Strukturformel eines Dipalmitoyl-Glycerophospholipids	13
Abb. 2.4: Klassische Vorstellung der Surfactantfunktion durch DPPC in vitro ..	17
Abb. 2.5: Strukturvorstellung von SP-A und SP-D	18
Abb. 2.6: Strukturvorstellung von SP-B und SP-C	19
Abb. 2.7: Bildung von Phosphatidsäure und Diazylglycerol	21
Abb. 2.8: CDP-Cholin-Pathway (Kennedy-Pathway) zur Neusynthese von Phosphatidylcholin.....	22
Abb. 2.9: Elektronenmikroskopische Darstellung einer Alveolarwand und schematische Darstellung des Surfactant-Films unter Kompression. .	25
Abb. 3.1: Durchführung einer Lavage am Beispiel einer 21 Tage alten Ratte ..	39
Abb. 3.2: Phosphatstandardkurve	42
Abb. 3.3: Schema zur Durchführung einer Festphasenextraktion	45
Abb. 3.4: Flussdiagramm einer RP-HPLC mit Nachsäulen-Derivatisierung	47
Abb. 3.5 A, B: Typische FL-Chromatogramme	49
Abb. und Tab. 4.1: Gewicht nach 2 Tagen rhKGF bzw. Betamethason-Behandlung.....	54
Abb. 4.2: Phospholipidpools von Lungenlavage (A: LLF) und lavagiertem Lungengewebe (B: LU).....	57
Abb. 4.3: Sphingomyelin in lavagiertem Lungengewebe (LU) und Lungenspülflüssigkeit (LLF).....	59

Abb. 4.4: Molekulare Zusammensetzung der PC-Spezies in lavagiertem Lungengewebe der 3-21d-Tiere (A-D) nach Behandlung mit rhKGF/Betamethason	61
Abb. 4.5: Molekulare Zusammensetzung der PC-Spezies in Lungenlavageflüssigkeit der 3-21d-Tiere (A-D) nach Behandlung mit rhKGF/Betamethason	62
Abb. 4.6: Einflüsse von rhKGF, Betamethason oder Kombination auf Poolgrößen der wichtigsten Surfactantbestandteile in der lavagierten Lunge	66
Abb. 4.7: Phospholipidstoffmengen von Lebergewebe (A) und Blutplasma (B)	68
Abb. 4.8: Prozentuale molekulare Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies in Lebergewebe und Plasma bei 7d und 21d alten Ratten...	71
Abb. 4.9: Einflüsse von rhKGF, Betamethason oder Kombination auf die Poolgröße des Arachidonoyl-PC-Pools in Leber (A, B) und Plasma (C, D) bei 7d und 21d alten Ratten.....	73

Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidest.	Aqua bidestilata
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
cAMP	cyclisches Adenosin-3,5'-monophosphat
CPAP	eng. „Continuous Postive Airway Pressure“
CRD	eng. „carbohydrate recognition domain“
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien
DPPC	Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (= PC16:0/16:0)
EC	eng. „enzyme commission“
FGF	eng. „fibroblast growth factor“
G-3-P	Glycerin-3-Phosphat
IRDS	eng. „infant respiratory distress syndrome“
KGF	eng. „keratinocyte growth factor“ (Keratinozyten-Wachstumsfaktor)
KGW	Körpergewicht
lav.	Lavagiert
LB	Lamellarkörperchen, eng. „lamellar bodies“
LLF	Lungenlavageflüssigkeit, eng. „lung lavage fluid“
mRNA	eng. „messenger ribonucleic acid“
MW	Mittelwert
N	eng. „number of experiments“
n.s.	nicht signifikant

NC-IUBMB	eng. „Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology“
p.a.	pro analysi
PA	Phosphatidsäure, eng. „phosphatic acid“
PC	Phosphatidylcholin
P _{CO2}	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidyinositol
PL	Phospholipid
PMPC	Palmitoylmyristoyl- Phosphatidylcholin (=PC16:0/14:0)
PPPC	Pamitoylpalmitoleoyl-Phosphatidylcholin (=PC16:0/16:1)
PS	Phosphatidylserin
rhKGF	rekombinater humaner Keratinozyten-Wachstumsfaktor
RP-HPLC	Umkehrphasen- Hochdruckflüssigkeitschromatographie, eng. „Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography“
SD	Standardabweichung, eng. „standard deviation“
SP	Surfactant-Protein
SPH	Spingomyelin
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

Das Atmungssystem der Säugetiere ist komplex. Seine Hauptaufgabe ist der Gasaustausch, das heißt, es sorgt für die Oxygenierung des Blutes durch Aufnahme von Sauerstoff und regelt die Abgabe von Kohlenstoffdioxid und anderen gasförmigen Stoffwechselendprodukten durch deren Abgabe an das alveoläre Atemgasgemisch. Durch Regelkreise (z. B. Steigerung des Atemzeitvolumens durch Reizung peripher-arterieller und zentral-nervöser Chemorezeptoren im Glomus caroticum und in der Medulla oblongata durch einen Anstieg der Protonen ($[H^+]$) -Konzentration bzw. einem Anstieg des P_{CO_2}) steuert das respiratorische System zusammen mit den Nieren den Säure-Basen-Haushalt. Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Bereitstellung immunologischer Mechanismen zur Abgrenzung des Organismus gegenüber der Außenwelt.

Das Atmungssystem teilt sich in luftleitende Anteile und die eigentliche Respirationszone auf. Zu den luftleitenden Anteilen zählen die oberen Atemwege mit Nase, Nasennebenhöhlen, Pharynx und den proximalen Anteilen des Larynx bis zur Epiglottis. Distal wird die Luft über die Trachea zu den beiden Hauptbronchien weitergeleitet und über diese gleichmäßig auf beide Lungenflügel verteilt. Im weiteren Verlauf erfolgt eine Aufzweigung des Bronchialsystems in immer feinere luftleitende Strukturen, die Bronchien und Bronchiolen bis hin zu den Terminalbronchioli. Die Schleimhaut des Bronchialsystems ist mit Flimmerepithelien und Drüsenzellen ausgekleidet. Mittels des dort produzierten Schleims und der nach proximal gerichteten Schlagbewegung der Zilien werden Fremdpartikel schon vor der Respirationszone gefiltert (sog. Mukoziliäre Clearance). Somit dient das Bronchialsystem nicht nur dem Atemgastransport der Befeuchtung und der optimalen Luftverteilung, sondern erfüllt auch einen wichtigen Beitrag zur Atemluftreinigung.

Der eigentliche Gasaustausch findet am Ende des luftleitenden Systems in den Bronchioli respiratorii und den Alveolen statt. Alveolen sind mit einem dichten, einschichtigen Epithel ausgekleidet. Es besteht zum größten Teil aus Typ-I-

Pneumozyten. Sie kleiden ca. 95% der Gesamtoberfläche der Lungenalveolen aus. Typ-I-Pneumozyten bilden zusammen mit dem Kapillarendothel und der dazwischenliegenden Basalmembran die sogenannte Blut-Luft-Schranke. Ihre Aufgabe - die Abgrenzung der Lumenoberfläche vom pulmonalen Parenchym - wird durch feste interzelluläre Verbindungen ermöglicht. Tight junctions und Desmosomen verschließen den Interzellularspalt und verhindern dadurch ein Eindringen von Fremdpartikeln oder Erregern. Gap junctions zwischen Zellen erlauben die interzelluläre „Verständigung“, die z. B. zur Synchronisation der Zilienbewegung und den Transport von Substanzen wichtig ist. Dabei muss gleichzeitig eine schnelle Aufnahme und Abgabe der Atemgase möglich bleiben. Morphologisch haben Typ-I-Pneumozyten deshalb eine abgeflachte Form. So wird eine kurze und somit zeitsparende Diffusionsstrecke garantiert.

Die restlichen 5% der Lungenoberfläche werden von Typ-II-Pneumozyten gebildet. Sie sind kubisch geformt und stellen den Zellpool zum Ersatz zugrunde gegangener Typ-I-Pneumozyten dar. Ihre wichtigere Funktion ist jedoch die Produktion und Sezernierung von Surfactant, einem oberflächenaktiven Phospholipoproteinkomplex (Surfactant = **Surface active agent**). Weitere Zelltypen im Lungenparenchym sind immunkompetente und zur Phagozytose fähige Zellen (Alveolarmakrophagen und interstitielle Makrophagen), welche durch Phagozytose und T-Lymphozytenregulation zu einem großen Teil die pulmonalen Abwehrfunktionen ausmachen [57, 111].

Durchschnittlich besteht eine menschliche Lunge aus ca. 480 Millionen Alveolen. Der Durchmesser einer einzelnen Alveole variiert dabei zwischen 50 und 250 μm [88]. Die daraus entstandene Gesamtoberfläche von 80-120 m^2 ermöglicht einen optimalen Gasaustausch. Allerdings erfordert diese enorm große Oberfläche sowohl Stabilität als auch Flexibilität während des Atemzyklusses. Dies wird einerseits gewährleistet durch das elastische Lungengewebe selbst, andererseits muss eine möglichst kraftsparende Entfaltung der Lunge sicher gestellt sein. Schon 1929 wurde durch Kurt von Neergard ein oberflächenaktiver Faktor vermutet, der die Oberflächenspannung an der Luft-Alveolen-Grenzfläche entscheidend absenkt und somit einen Kollaps der kleinen Alveo-

len verhindern kann [126]. Wissenschaftlich nachgewiesen wurde dieser Faktor aber erst 25 Jahre später durch Pattle [91] in Lungenödemflüssigkeit und durch Clements in Extrakten aus Ratten-, Katzen-, und Hundelungen [31]. Als ein Hauptbestandteil dieses Faktors wurde von Thannhauser 1946 das Dipalmityllecithin (heute bekannt als Dipalmitoylphosphatidylcholin oder DPPC) beschrieben [118].

Ein Zusammenhang zwischen antenatalem Surfactantmangel und dem neonatalen Atemnotsyndrom („infant respiratory distress syndrome“, IRDS) wurde erstmals 1959 durch Avery und Mead postuliert [5]. Sie untersuchten Extrakte aus Lungen verstorbener frühgeborener Kinder, die unter den typischen Symptomen des Surfactantmangels litten. Die von ihnen erworbenen Erkenntnisse bildeten die Grundlage der modernen Surfactantforschung. Seither wurde eine Vielzahl von Publikationen veröffentlicht, die sich mit den biochemischen, biophysikalischen und hormonregulatorischen Grundlagen des pulmonalen Surfactant beschäftigen. Schon vor fast 40 Jahren wurde durch Liggins et al. an pränatalen Schafen nachgewiesen, dass katabole Wirkeinflüsse von Glukokortikoiden zu einer Steigerung der Surfactantkonzentration im extrazellulären Alveolarbereich führen. Dieser therapeutische Nutzen einer antenatalen Glukokortikoidgabe wird seither erfolgreich zur sogenannten „Lungenreifeinduktion“ eingesetzt [75]. 1980 erfolgte erstmals die erfolgreiche Substitution eines supplementierten bovinen Surfactantextraktes bei an IRDS erkrankten Kindern durch Fujiwara et al. [43].

Es zeigte sich weiterhin, dass der pulmonale Surfactant nicht nur eine Reduktion der Oberflächenspannung bewirkt, sondern auch einen wichtigen Beitrag in der Immunabwehr leistet. Dabei ist seine molekulare Zusammensetzung entscheidend. So haben hydrophile Surfactantbestandteile wie die Surfactant-Proteine A und D (s. u.) die Fähigkeit zur Opsonierung und Agglutination von pathogenen Keimen und unterstützen somit die Phagozytose [48, 65, 81, 119]. Hydrophobe Bestandteile (Phospholipide, Surfactant-Proteine B und C, s. u.) hingegen beeinflussen direkt die Aktivität der zellulären Immunabwehr. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Surfactant-Konstrukte

abhängig von ihrer Zusammensetzung einen hemmenden oder aktivitätssteigernden Effekt auf die proliferative T-Zellaktivität oder die Makrophagenaktivität haben können [11, 133]. Eine aktuelle Studie von Gille et al. zeigt zudem, dass Einzelkomponenten im Surfactant einen unterschiedlichen Effekt auf die Makrophagendifferenzierung und T-Lymphozytenproliferation haben [44].

Seit etwa 20 Jahren stehen leistungsfähige Messmethoden zur Verfügung, die eine genauere Analyse des Surfactantgemischs erlauben [15, 53, 92, 101]. Während die molekulare Zusammensetzung des Surfactants unter physiologischen Bedingungen breit erforscht ist [12, 13, 14, 32, 124], ist die individuelle Zusammensetzung bei pathologischen Zuständen und während der Lungenentwicklung jedoch Gegenstand intensiver aktueller Forschung [32, 42, 47, 61, 134].

1.1 Fragestellung der Arbeit

Das neonatale Atemnotsyndrom (IRDS, „infant respiratory distress syndrome“) bedingt eine erhöhte Mortalität und Morbidität unreifer Frühgeborener, deren Lungen noch keine ausreichenden Mengen an Surfactant sezernieren können [4, 59, 119]. Da Surfactant lediglich in Typ-II-Pneumozyten synthetisiert wird, ist es wichtig nach Regulationsmechanismen zu suchen, welche selektiv deren Differenzierung und Funktion stimulieren. Eine seit über 30 Jahren anerkannte und gut etablierte pharmakologische Methode ist die antenatale Gabe von Cortikosteroiden. Eine systemische Glukokortikoid-Therapie der Mutter kurz vor Geburt soll die Synthese bestimmter an der Surfactant-Produktion beteiligter Proteine induzieren [6, 22, 23, 46, 59]. Streitfrage aktueller Forschung ist derzeit auch, ob eine Verlangsamung des Surfactant-Metabolismus oder des Surfactant-Recyclings eine Rolle spielt [21, 24]. Der Erhöhung des Surfactantpools liegt zudem wahrscheinlich eine frühzeitige oder akzelerierte Differenzierung der Zellen zugrunde. Dies bedeutet, dass Glukokortikoide direkt die Bildung und Sekretion pränatal angelegter intrazellulärer Surfactantspeicher stimulieren [22, 23, 46, 56, 79], eine „echte“ Zellvermehrung jedoch nicht stattfindet. In früheren

Untersuchungen wurde außerdem nachgewiesen, dass Glukokortikoide die Aktivität wichtiger an der Fettsäuresynthese beteiligter Enzyme maßgeblich steigern können [12].

Die Risiken einer Glukokortikoidtherapie beruhen vorrangig auf deren immunmodulatorischen und katabolen Effekten. Zu nennen sind erhöhte Infektanfälligkeit als Zeichen der immunsuppressiven Wirkung [50, 59, 127], verringertes Geburtsgewicht durch Proteinkatabolismus, aktivierter Glukoneogenese und gesteigerter Lipolyse [50, 110, 127] sowie eventuelle neurologische Spätfolgen aufgrund verschiedener Einflüsse auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems [9, 56]. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass eine antenatale Glukokortikoidgabe die Entwicklung einer Bronchopulmonalen Dysplasie, der Hauptkomplikation des IRDS, begünstigt [50, 55]. Dies könnte mit der durch Glukokortikoide vermittelten Induktion des Vasoendothelialen Growth Factors zusammenhängen, welcher die Alveolarisierung behindert [46]. Generell führen Glukokortikoide zu einer Entleerung der pulmonalen Speicher von Glykogen und Neutrallipiden, beeinträchtigen den Lipidmetabolismus des Zentralnervensystems und resultieren in einer systemischen Hyperlipidämie. Im Tiermodell zeigten sich deutliche Effekte auf die Lipidzusammensetzung von Leber, Plasma und Hirngewebe [21].

Im Gegensatz zu Glukokortikoiden vermag rekombinanter humaner Keratinozyten-Wachstumsfaktor (rhKGF) eine Differenzierung der Typ-II-Pneumozyten während der Alveolarisierung zu induzieren, die ohne die systemischen Nebenwirkungen der Glukokortikoide abläuft. RhKGF stellt einen Vertreter der Fibroblast-Growth-Factor (FGF) Familie dar, welcher direkt am spezifischen KGF-Rezeptor - der IIIb-Variante des FGF-2-Rezeptors - extrazellulär bindet. Da sich der FGF-2IIIb-Rezeptor ausschließlich auf Epithelien befindet, kann KGF spezifisch epitheliale Zellen zur Proliferation stimulieren [19, 27, 107, 108, 129]. Eine Wirkung auf die Typ-II-Pneumozyten *in vitro* wurde nachgewiesen [29]. Weiterhin kann KGF-Exposition in Zellkulturen humaner Pneumozyten die Differenzierung der Typ-II-Pneumozyten zu Typ-I-Pneumozyten verlangsamen und wirkt antiapoptotisch [18, 29, 40, 129].

Außerdem sind starke Effekte auf die mRNA-Expression der Surfactantproteine sowie einiger an der Fettsäuresynthese beteiligter Enzyme nachgewiesen worden [29, 78, 137]. Eine Exposition mit KGF und Glukokortikoiden *in vitro* zeigte additive Effekte beider Substanzen gegenüber den Einzelsubstanzen auf die Surfactant-Protein A und B Konzentrationen [84]. Kaza et al. zeigten im Tierversuch, dass die exogene Zufuhr von rhKGF nach Hemipneumonektomie die Alveolarisierung und das kompensatorische Lungenwachstum beschleunigt [60]. Gleichzeitig stellen hohe Konzentrationen von rhKGF im Trachealsekret einen wichtigen prognostischen Faktor gegen die Entstehung einer Bronchopulmonalen Dysplasie dar, wie Danan et al. in ihrer Studie belegen konnten [33].

RhKGF scheint sich damit als therapeutische Alternative oder Zusatztherapie zur Behandlung eines schweren IRDS anzubieten. Seine Auswirkungen bezogen auf den Surfactant-Pool und die molekulare Zusammensetzung des Surfactants in der sich entwickelnden Lunge ist bis jetzt aber noch nicht untersucht.

Daraus ergeben sich die Fragestellungen dieser Arbeit:

- Ist die systemische Kurzzeitgabe von KGF bezüglich des Surfactantpools und der molekularen Zusammensetzung des Surfactants gleichwertig oder überlegen gegenüber einer klassischen Induktion der „Lungenreifung“ mit Glukokortikoiden?
- Kann die Kombination des epithelialen Differenzierungsfaktors rhKGF mit Betamethason die lipidmetabolischen Nebenwirkungen von Betamethason auf die Lunge antagonisieren?
- Lässt sich für die rhKGF-Behandlung ein optimales therapeutisches Zeitfenster während der pulmonalen Differenzierung definieren?

Dies sollte an der sich entwickelnden Rattenlunge *in vivo* überprüft werden. Dieses Tiermodell ist ideal, da die wichtige Phase der Alveolarisierung bei der Ratte postnatal (zwischen Tag 4 und Tag 13) stattfindet [25]. Daher lässt sich die Wirkung von rhKGF auf das Surfactant-System relativ einfach *in vivo* unter

Spontanatmung untersuchen, ohne die Lunge zu schädigen oder einen hohen apparativen Aufwand - wie durch Intubation und Beatmung - betreiben zu müssen. Dazu wurden Ratten im Alter von 3 Tagen („*3d-Tiere*“ à vor Alveolarisierung), 7 Tagen („*7d-Tiere*“ à während Alveolarisierung), 15 Tagen („*15d-Tiere*“ à kurz nach der Alveolarisierung) und 21 Tagen („*21d-Tiere*“ à abgeschlossene Alveolarisierung mit reifen, d. h. einschichtigem Kapillarbett) (jeweils postnatal) über zwei Tage mit je 5mg/kg KGW rhKGF täglich, 1mg/kg KGW Betamethason täglich oder einer Kombination dieser Substanzen behandelt (Dosisreferenz siehe [54]).

Anschließend wurden Lungenlavageflüssigkeit (LLF) und Lunge entnommen und mithilfe biochemisch-analytischer Methoden der Surfactantpool der Organe und die molekulare Zusammensetzung der einzelnen Phosphatidylcholinspezies mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) untersucht. Zusätzlich wurden Lebern und Plasmen nach gleicher Methodik untersucht, um zu überprüfen, welche extrapulmonalen Wirkungen rhKGF bei systemischer Gabe auf den Phospholipidstoffwechsel ausübt und um die pulmonalen Wirkungen von rhKGF gegenüber Betamethason im gesamtphysiologischen Kontext zu beurteilen.

Im folgenden Kapitel sollen zum besseren Verständnis dieser Arbeit zunächst die wichtigsten Bestandteile des Surfactant, seine biophysikalischen Eigenschaften sowie Grundlagen zum Krankheitsbild des IRDS dargestellt werden.

2 Grundlagen des Lungensurfactant

2.1 Biophysikalische Grundlagen

Die Oberfläche der Alveolarwände ist mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm ausgekleidet. An dieser *Luft-Wasser-Grenzfläche* kommt es, bedingt durch die Kohäsion des Wassers zu Anziehungskräften, welche bestreben, die Oberfläche möglichst klein zu halten. Diese Kräfte bezeichnet man auch als *Oberflächenspannung*. Während des dynamischen Atemzyklusses ist das Lungengewebe einer wechselnden Retraktionskraft durch das interstitielle Bindegewebe ausgesetzt. Bei Entfaltung der Lunge ist sie größer, bei Expiration wird sie kleiner. Die weitaus größere Retraktionskraft an Grenzflächen wird jedoch durch die Oberflächenspannung ausgeübt. Sie lässt sich als physikalischer Zusammenhang von Innendruck einer luftgefüllten (idealen) Blase, Oberflächenspannung und Radius als sogenannte *Young-Laplace-Gleichung* beschreiben:

$$p = \frac{2 \cdot \gamma}{r}$$

p = Innendruck einer Kugel [Kollapsdruck einer Kugel]

γ = Oberflächenspannung

r = Radius

Demnach verhält sich der Kollapsdruck proportional zur Oberflächenspannung und umgekehrt proportional zum Radius. Der Druck und damit die Retraktion ist umso höher, je kleiner der Radius ist. Also wird erst bei Oberflächenspannungen nahe 0 mN/m die Retraktion der Lunge am Ende der Expiration kleiner als in der Inspiration sein, weil sie nur noch von den interstitiellen Bindegewebskräften abhängt [70].

Dieser Zusammenhang gilt strenggenommen nur in Bezug auf ideale runde Hohlkörper. Das Alveolarsystem ist wesentlich komplexer. Hier herrscht ein Nebeneinander kleinerer und größerer polyedrischer, nicht kugelförmiger Strukturen mit sehr unterschiedlichen Krümmungsradien. Somit lässt sich die *Young-Laplace-Gleichung* nicht einfach übernehmen. Vielmehr ist folgende Beziehung anzunehmen:

$$p = \gamma \cdot \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right)$$

p = Innendruck

γ = Oberflächenspannung

r_1 = Querradius

r_2 = Längsradius

Im Bereich der Bronchioli respiratorii kann $1/r_2$ beispielsweise sehr geringe Werte annehmen, da es sich bei diesen Strukturen um sehr kleine, sackförmige Ausstülpungen handelt, die nicht annähernd kugelförmig sind. Somit würde nach obiger Gleichung gelten, dass $p = \gamma/r$.

Vereinfacht kann das Alveolarsystem der Lunge als ein Nebeneinander unterschiedlich großer und miteinander kommunizierender Sphären, Sacculi und Tubuli mit sehr unterschiedlichen Krümmungen und damit Radien beschrieben werden. Unter der Annahme einer konstant hohen Oberflächenspannung würden in Abhängigkeit von Radius und Krümmung der terminalen Lungenstrukturen an den Grenzflächen unterschiedliche Binnendrucke (Kollapsdrücke) vorherrschen. Dies hätte zur Folge, dass Strukturen mit stärkerer Krümmung (kleinere Alveolen mit höherem Kollapsdruck) kollabieren und die anderen Lungenstrukturen überdehnt würden. Das bedeutet eine hohe Belastung durch Scherkräfte für die Gewebestrukturen und zudem eine erhöhte

Atemarbeit. Vor allem endexpiratorisch wird dadurch ein massiver Alveolarkollaps hervorgerufen (Atelektasenbildung).

Die Oberflächenspannung an einer reinen Luft-Wasser-Grenzfläche (bei 37°C und 760mmHg) entspricht etwa 70 mN/m (mJ/m^2). Surfactant ist in der Lage, diesen Wert auf nahe 0 mN/m (mJ/m^2) abzusinken, was den Kollaps terminaler Lungenstrukturen und die Bildung hoher interstitieller Scherkräfte verhindert sowie die Atemarbeit erheblich vermindert.

2.2 Zusammensetzung des Surfactant

Surfactant ist ein Phospholipoproteingemisch, das zu etwa 90% aus Lipiden und zu 10% aus Proteinen besteht. Den Hauptanteil innerhalb der Lipide (ca. 90%) stellen die Phospholipide (PL) dar. Der Rest sind Neutrallipide (Cholesterol) und Membranbestandteile. Die Hauptfunktion der Lipide ist die Reduktion der Oberflächenspannung. Die einzelnen Surfactant-Proteine (SP) A, B, C und D sind für die strukturelle Organisation des Surfactants an der pulmonalen Gas-Flüssigkeitsgrenzfläche zuständig und nehmen wichtige Immunfunktionen wahr (s. u.) [123, 138].

Während die molekularen Bestandteile des Surfactant über viele Säugetierspezies hinweg weitgehend identisch sind, können die Konzentrationen der Einzelsubstanzen stark variieren. Auch innerhalb der Spezies verändert sich die Zusammensetzung während der Entwicklung [14, 102, 103] und in Abhängigkeit an physiologische Anforderungen [13, 14, 16, 103]. Weiterhin ist das Surfactant-System bei einer Reihe pathologischer Zustände gestört [37, 42, 47]. Abbildungen 2.1 und 2.2 zeigen schematisch die Zusammensetzung des extrazellulären Surfactants beim erwachsenen Menschen sowie die PC-Zusammensetzung des Surfactants bei adulter Ratte und dem Menschen.

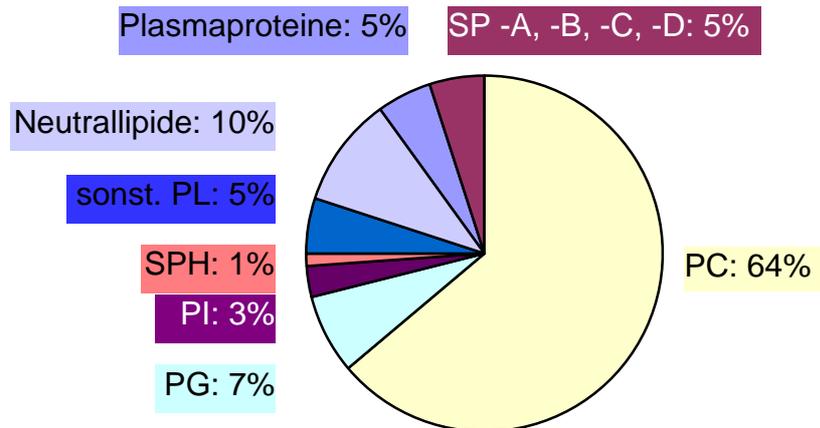


Abb. 2.1: **Schematische Zusammensetzung von Surfactant.** (modifiziert nach [49, 103]).
 PC=Phosphatidylcholin, PG=Phosphatidylglycerol, PI=Phosphatidylinositol,
 SPH=Sphingomyelin, PL=Phospholipide, SP=Surfactant-Proteine (Angabe in Gew.%).

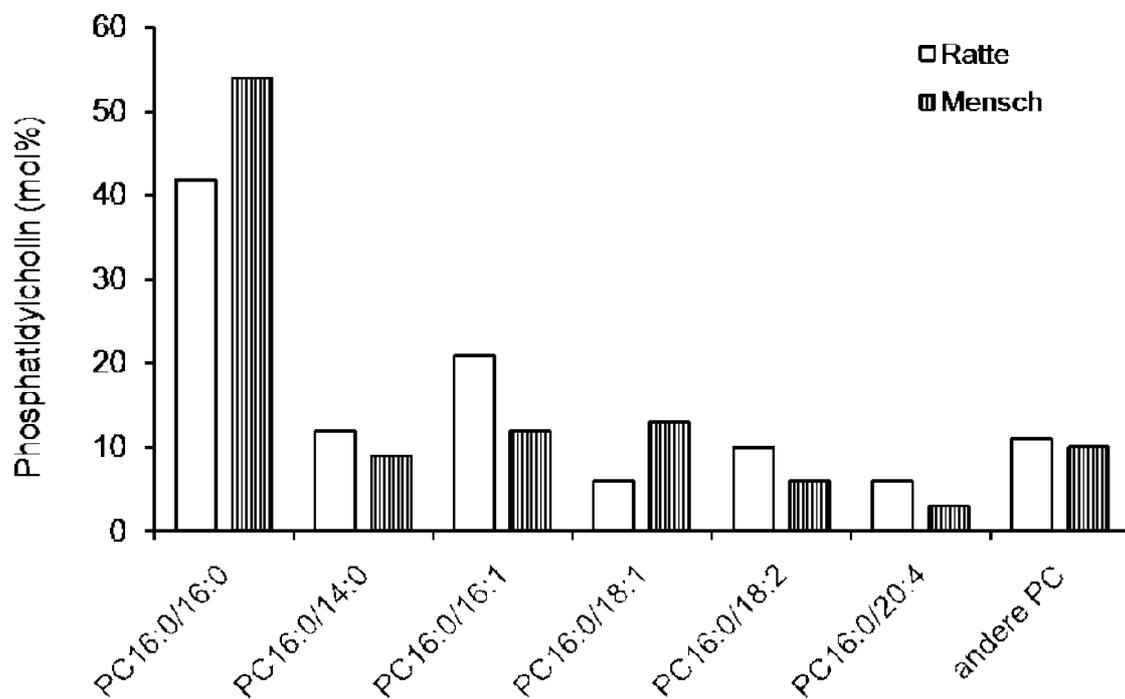


Abb. 2.2: **Phosphatidylcholin-Zusammensetzung bei adulten Ratten und dem Menschen** (modifiziert nach [49, 103]). PC=Phosphatidylcholin. Erläuterung zur Nomenklatur der PC-Spezies siehe Kap. 2.2.1. „Andere PC“ ist die Summe aus PC16:0/18:0, 16PC18:1/18:2, PC18:1/18:1, PC18:0/20:4.

2.2.1 Phospholipide

Phospholipide sind amphiphile Substanzen, das heißt, diese Moleküle besitzen sowohl polare (hydrophile) als auch apolare (hydrophobe) Bereiche (s. Abb. 2.3). Grundgerüst der Phospholipide im Surfactant ist das Glycerin, das an den Kohlenstoffatomen C_1 und C_2 mit einem hydrophoben Fettsäurerest verestert ist. Am C_3 -Kohlenstoff des Glycerins ist über eine Phosphodiesterbindung eine geladene oder ungeladene Kopfgruppe kovalent gebunden. Das Glycerin hat demnach drei unterschiedliche Bindungsstellen. Sie werden mit *sn*-1, *sn*-2 und *sn*-3 bezeichnet, abgeleitet vom englischen „stereospecifically numbered“.

Die Variation der Kopfgruppen führt zu unterschiedlichen Phospholipidklassen. Die unterschiedlichen Fettsäurekombinationen in *sn*-1 und *sn*-2 ergeben die molekularen Spezies der jeweiligen PL-Klasse. Daraus resultiert eine nahezu unbegrenzte theoretische Kombinationsmöglichkeit mit unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften, von denen in den Organen allerdings immer nur bestimmte molekulare Spezies dominieren.

Die Benennung der Einzelsubstanzen beginnt mit der Nennung der beiden Fettsäuren, gefolgt vom Namen der Kopfgruppe. **1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DPPC¹)** besteht demnach aus zwei Palmitoylresten, die an den Positionen 1 und 2 des Glyceringerüst verestert sind sowie einer Phosphocholin-Kopfgruppe an Position 3 (s. Abb. 2.3 und Tab. 2.1).

¹ Eine andere übliche Abkürzung ist PC16:0/16:0, wobei PC für die PL-Klasse steht. Die Zahlencodes stehen für die Fettsäurereste in Position 1 & 2 des Glycerolgrundgerüsts. Die Ziffern vor dem Doppelpunkt definieren die Anzahl der C-Atome der Fettsäure, die Ziffer hinter dem Doppelpunkt die Anzahl der Doppelbindungen. 16:0 ist damit eine Fettsäure aus 16 C-Atomen mit 0 Doppelbindungen = Hexadecansäure = Palmitinsäure. PC16:0/16:0 ist damit 1,2-Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin.

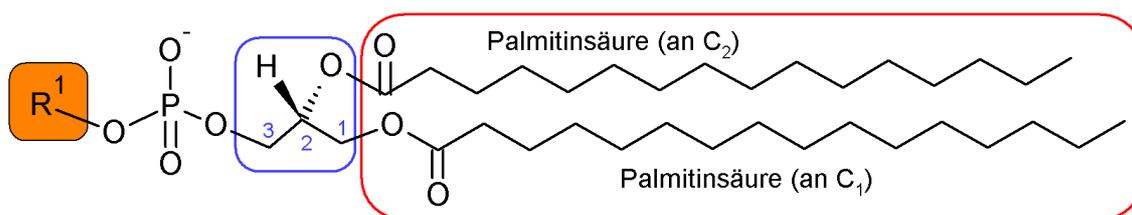


Abb. 2.3: **Strukturformel eines Dipalmitoyl-Glycerophospholipids**; Grundgerüst bildet das Glycerin (**blau**) an dem an Position sn-1 und sn-2 die Fettsäuren in Esterbindung angehängt sind (**rot**, hier am Beispiel der Palmitinsäure, hydrophober Anteil). An C₃ ist über eine Phosphodiesterbindung die Kopfgruppe gebunden (**R¹**, hydrophiler Anteil).

Polare Kopfgruppe	Name
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p style="text-align: center;">Cholin</p>	Phosphatidylcholin (PC)
$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R} \end{array}$ <p style="text-align: center;">Glycerin</p>	Phosphatidylglycerol (PG)
$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}$ <p style="text-align: center;">Ethanolamin</p>	Phosphatidylethanolamin (PE)
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R} \end{array}$ <p style="text-align: center;">Serin</p>	Phosphatidylserin (PS)
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{HC}-\text{CH}-\text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$ <p style="text-align: center;">Inositol</p>	Phosphatidylinositol (PI)

Tab. 2.1: **Einteilung der Glycerophospholipid-Klassen nach der chemischer Struktur ihrer Kopfgruppen**. „R“ entspricht dem 1,2-Diacyl-gycero-3-Phosphat-Rest (Phosphatidyl-Rest), an dessen Phosphatgruppe die Kopfgruppe angehängt ist.

Durch ihre molekulare Struktur besitzen Phospholipide die Eigenschaft, in wässriger Umgebung als Tensid zu wirken: Sie richten ihre polaren Köpfe zum polaren Medium (Wasser) aus und die Fettsäuren treten in hydrophobe Wechselwirkung miteinander. Dadurch können sie sich zu Mizellen und Liposomen zusammenlagern. An Grenzflächen zwischen Luft und Wasser bilden sie mono- und oligomolekulare Filme aus, wobei die polare Kopfgruppe zur wässrigen Phase hin orientiert ist und die hydrophoben Fettsäuren der obersten Schicht in die Luft zeigen [32, 99].

Untersucht man die einzelnen Phospholipide genauer, stellt man fest, dass sich bei den Phospholipiden nicht nur die Kopfgruppen unterscheiden, sondern vor allem die Fettsäureketten an *sn*-1 und *sn*-2 hinsichtlich ihrer Kohlenstoffkettenlänge und der Anzahl der Doppelbindungen differieren. Diese Unterschiede gibt es nicht nur zwischen unterschiedlichen Phospholipid-Klassen, sondern auch organotypisch und subzellulär innerhalb einer Klasse wie den Phosphatidylcholinen (sog. molekulare Spezies). Wichtige Fettsäuren und ihre Nomenklatur sind in Tab. 2.2 erläutert.

Abkürzung	Name der Fettsäure
14:0	Myristinsäure
16:0	Palmitinsäure
16:1	Palmitoleolinsäure
18:0	Stearinsäure
18:1	Ölsäure
18:2	Linolsäure
20:4	Arachidonsäure
22:6	Docosahexaensäure

Tab.2.2: **Wichtige Fettsäuren von Glycerophospholipiden.** Die Abkürzung bezeichnet die Anzahl der Kohlenstoffatome vor dem Doppelpunkt und die Anzahl der Doppelbindungen im Molekül nach dem Doppelpunkt. 16:0 bedeutet damit eine Fettsäure mit 16 Kohlenstoffeinheiten ohne Doppelbindungen = $C_{16}H_{32}O_2$.

In der internationalen Nomenklatur hat sich etabliert, bestimmte Abkürzungen in der Benennung der Phospholipide zu verwenden: Die entsprechende Kopfgruppe wird mit zwei Großbuchstaben angegeben (z. B. PC = Phosphatidylcholin, PG = Phosphatidylglycerol, PE = Phosphatidylethanolamin, etc.). Darauf folgt ein Zahlencode, beispielsweise 16:0/14:0. Die erste Zahlenkombination (16:0) entspricht der Fettsäure in *sn*-1-Position, die zweite Zahlenkombination (14:0) der Fettsäure in *sn*-2-Position. Die Zahlen selbst stehen für die Anzahl der C-Atome und die Anzahl der Doppelbindungen im jeweiligen Fettsäureester. Demnach entspricht PC16:0/14:0 „1-Palmitoyl-2-myristoyl-glycero-3-phosphocholin“.

Wie in Abb. 2.1 gezeigt, stellen die Phosphatidylcholone mengenmäßig den Hauptbestandteil der Surfactantlipide. Ihre molekulare Zusammensetzung ist dabei sehr charakteristisch und lässt sich in dieser Kombination nur im Surfactant nachweisen [14, 16, 32, 49, 103]. Das (nach klassischer Vorstellung funktionell) wichtigste Phosphatidylcholin ist das Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/16:0=DPPC). Es macht allgemein etwa die Hälfte aller PC-Spezies im Lungensurfactant aus (s. Abb. 2.2). Seine Konzentration wird jedoch speziesabhängig, entwicklungsabhängig und angepasst an physiologische Gegebenheiten (wie die Atemfrequenz) verändert [14, 16]. So stellt DPPC bei neonatalen Ratten direkt postnatal ca. 50% des Gesamt-PC. Nach 3 Tagen fällt dieser Wert auf unter 40% und steigt mit zunehmendem Alter wieder an (siehe Ergebnisse dieser Arbeit und [13, 14]).

Neben DPPC enthält Surfactant hauptsächlich Palmitoylmyristoyl-PC (PC16:0/14:0 = PMPC) und den einfach ungesättigten Spezies Palmitoylpalmitoleoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/16:1 = PPPC), Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/18:1 = POPC) und Palmitoyl-linoleoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/18:2). Weitere Bestandteile sind Phosphatidylcholone mit polydesaturierten Fettsäureketten in geringen Mengen.

PC16:0/16:0, PC16:0/14:0 und PC16:0/16:1 werden zusammen und präferentiell in den Surfactant sezerniert. Sie machen grundsätzlich 75-80% des Gesamt-PC aus, ihr jeweiliger Anteil ist aber variabel und an Atemphysiologie und

Entwicklung angepasst. Die Anreicherung des Surfactant mit diesen drei Bestandteilen stellt eine aktive Leistung der Typ-II-Pneumozyten aufgrund selektiver Transportprozesse der endoplasmatisch synthetisierten Phospholipide dar [14].

2.2.2 Einflüsse der Phospholipide auf die Oberflächenspannung

Das Ausmaß, indem das Phospholipid-Gemisch die Oberflächenspannung absenken kann, hängt nach klassischer Vorstellung entscheidend von seiner molekularen Zusammensetzung ab: Monolayer, die hauptsächlich aus fluiden und ungesättigten Fettsäuren bestehen (z. B. PC16:0/18:1, PC18:0/18:1 oder PC14:0/14:0), können sich bei Körpertemperatur nicht eng genug zusammenlagern und kollabieren unter wechselnden Spannungsverhältnissen. Kompression führt bei diesen PC-Spezies deshalb zu wesentlich höheren Oberflächenspannungen (s. Abb. 2.3). Umgekehrt sind Komponenten wie PC16:0/16:0, die bei Körpertemperatur (37°C) im Gelzustand sind, zwar alleine imstande die Oberflächenspannung auf nahe 0 mN/m zu senken, da sie an der Grenzflächen eine stabile Schicht bilden. Reines DPPC unterhalb seiner Phasenübergangstemperatur (41,5°C) kann aber unter den dynamischen Bedingungen der oszillierenden Alveole nur sehr langsam einen stabilen Oberflächenfilm ausformen. Für eine optimale Funktion ist also eine Kombination aus DPPC mit fluideren Phosphatidylcholinen und den hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C (s. u.) unerlässlich.

Die nur in geringen Konzentrationen vorkommenden anionischen Phospholipide (Phosphatidylglycerole und Phosphatidylinositole) sowie die Neutrallipide scheinen ebenfalls einen wichtigen Beitrag zur optimalen Surfactant-Funktion unter dynamischen Bedingungen beizutragen. Sie optimieren Adsorption und Spreitverhalten des Surfactant-Films und verhindern dessen Kollabieren [82].

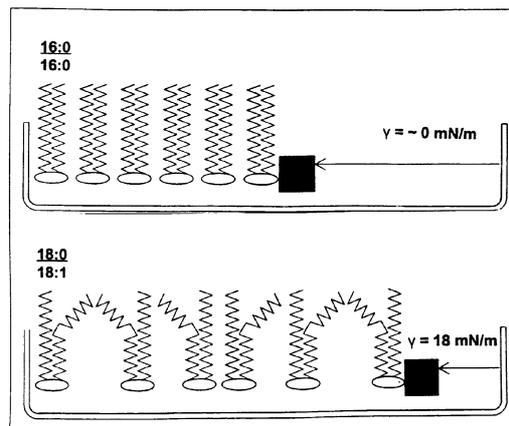


Abb.2.4: **Klassische Vorstellung der Surfactantfunktion durch DPPC in vitro.** (nach [99]). Oben: Ein Monolayer aus DPPC (16:0/16:0) lagert sich bei Lateralkompression eng zusammen und kann so die Oberflächenspannung nahe 0 mN/m absenken. Unten: Fluides ungesättigtes PC (PC18:0/18:1) bedeckt eine größere Oberfläche und ist nicht komprimierbar, so dass Oberflächenspannungen unter 18 mN/m nicht erreicht werden, da der Film vorher kollabiert..

2.2.3 Surfactantproteine (SP-) A, B, C und D

Das erste Surfactant assoziierte Protein wurde bereits 1973 entdeckt [62]. 6 Jahre später folgte die Entdeckung zweier hydrophober Proteine [94] und 1988 die Entdeckung des vierten [97]. Nach Possmayer wurden die 4 bisher beschriebenen Proteine in der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt: Surfactant-Protein (SP-) A, B, C und D. Generell werden die Proteine hinsichtlich ihres Lösungsverhaltens in Wasser unterschieden. SP-A und SP-D verhalten sich hydrophil, SP-B und SP-C sind hydrophob.

2.2.3.1 Hydrophile Surfactantproteine SP-A und SP-D

Die Monomere der hydrophilen Proteine SP-A und SP-D besitzen eine prinzipiell ähnliche Struktur. Beide sind aus einer unterschiedlichen Anzahl von Homotrimeren zusammengesetzt, die den beiden Proteinen ihre charakteristische Tertiärstruktur verleihen. Bei SP-A sind es 6 Homotrimere, die ein Oktadekamer bilden, während es bei SP-D 4 Homotrimere sind, die ein Dodekamer bilden. Im Endergebnis sehen SP-A und SP-D deshalb

unterschiedlich aus: SP-A ähnelt einem Blumenstrauß, SP-D ähnelt einem Kreuz (s. Abb. 2.4). Das den Trimeren zugrundeliegende Monomer setzt sich aus 4 Domänen mit einem aminoterminalen Ende, einem kollagenartigen Segment, einer Halsregion und einem carboxyterminalen globulärlecithinartigen Ende zusammen. Letztere ist die sogenannte Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne (eng. „carbohydrate recognition domain“, CRD) (s. Abb. 2.4) [46, 89].

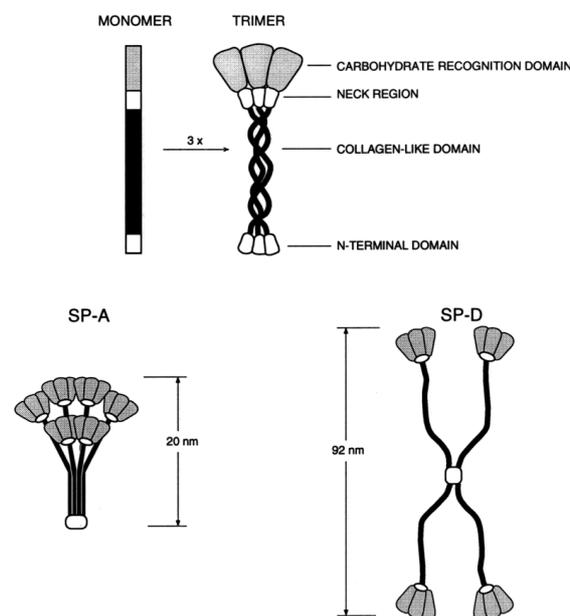


Abb. 2.5: **Strukturvorstellung von SP-A und SP-D** (nach [46]).

Das mengenmäßig häufigste Surfactantprotein ist das SP-A. Beide Proteine werden zu den Kollektinen gerechnet, deren Vertreter wichtige Funktionen im angeborenen Immunsystem ausüben. Sie sind in der Lage, inhalierte obligate oder fakultative Pathogene zu binden (Opsonierung), was deren Phagozytose stimuliert. Weiterhin wird Migration (Chemotaxis) und Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus Alveolarmakrophagen gefördert. Untersuchungen an SP-A und SP-D Knock-out-Mäusen zeigten eine drastisch erhöhte

Empfindlichkeit gegenüber einer Vielzahl lungenpathogener Bakterien und Viren [68, 71, 72, 73, 74, 80]. Für SP-A wurde außerdem eine direkte Interaktion mit den Surfactantlipiden, insbesondere mit PC16:0/16:0, ihrer Strukturbildung (tubuläres Myelin) sowie Einflüsse auf Sekretion und Wiederaufnahme von Surfactantbestandteilen in Typ-II-Pneumozyten nachgewiesen (s.u.) [48, 80, 93, 94].

2.2.3.2 Hydrophobe Surfactantproteine SP-B und SP-C

Die Proteine SP-B und SP-C stellen den geringeren Anteil der Surfactantproteine dar. Ihre chemisch wichtigste Eigenschaft ist die extreme Hydrophobizität. So ist SP-C das hydrophobste Protein im Menschen, das bislang entdeckt wurde. SP-B ist in seiner aktiven Form ein Homodimer, das aus jeweils 3 α -Helices zusammengesetzt ist. SP-C stellt in seiner Sekundärstruktur eine monomere α -Helix dar, die vorrangig aus Valinresten aufgebaut ist. Zusätzlich ist es an den Cysteinresten an Position 5 und 6 palmitoyliert. Dadurch erklärt sich seine extreme Hydrophobizität (s. Abb. 2.5) [48, 122, 123, 130, 132].

Die Notwendigkeit der hydrophoben Proteine wird vor allem dadurch deutlich, dass ein angeborener SP-B-Mangel zu einem Atemnotsyndrom führt [131, 132]. Dieses verläuft ohne Lungentransplantation letal.

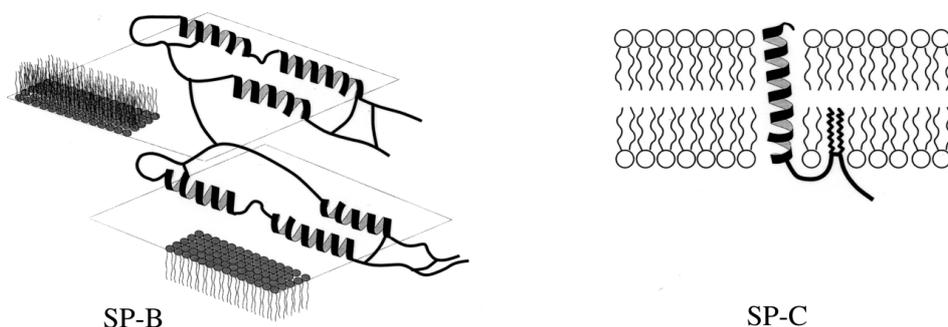


Abb. 2.6: **Strukturvorstellung von SP-B und SP-C** (nach [46]).

Nach neuesten Modellvorstellungen und gestützt durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen sollen sie dies durch Organisation von eng gepackten und mit DPPC angereicherten Clustern an der Grenzfläche erreichen (sog. „*liquid condensed domains*“), die von mehr fluideren Strukturen (sog. „*liquid expanded domains*“) umgeben sind [69, 97]. Durch die selektive Anreicherung mit gesättigten Fettsäuren an der Oberfläche leisten sie einen entscheidenden Beitrag zur optimalen Surfactantfunktion. Weiterhin beschleunigen sie die Lipidadsorption, die Organisation eines „oberflächenassoziierten Surfactantreservoirs“ und das Auseinanderspreiten des Phospholipide am Interface während des dynamischen Atemprozesses.

2.3 Surfactantsynthese und Sezernierung

2.3.1 Phospholipidsynthese

Der Grundbaustein der Neusynthese der Phospholipide ist die Phosphatidsäure. Ihre Synthese beginnt beim Glycerin-3-Phosphat (G-3-P), das durch Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) entsteht. Substrat für G-3-P ist Glukose aus intrazellulären Glykogenspeichern (häufig) oder direkt aus dem Blut (selten) [49]. In einem weiteren Reaktionsschritt werden an seine C₁- und C₂-Position durch eine Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase (EC 2.3.1.15) und eine 1-Acylglycerol-3-phosphat-O-Acyltransferase (EC 2.3.1.51) die entsprechenden Fettsäureketten verestert. Als Fettsäuresubstrate dienen hierbei vor allem gesättigte Kohlenstoffketten, da intrazellulär vorrangig Palmitoyl-CoA vorhanden ist (s. Abb. 2.6) [121]. Die Fettsäuren selbst können entweder direkt intrazellulär mittels einer Fettsäure-Synthase (EC 2.3.1.85) hergestellt werden oder sie werden aus dem Blut aufgenommen. Letztere Variante spielt vor allem bei der sich entwickelnden Lunge eine große Rolle, da die Typ-II-Pneumozyten noch nicht in der Lage sind, ausreichende Mengen an PC-Spezies allein bereitzustellen [16, 49]. Die Leber als Hauptsyntheseort und Blutplasma als Transportmedium der Fettsäuren finden deshalb in dieser Arbeit eine gesonderte Beachtung.

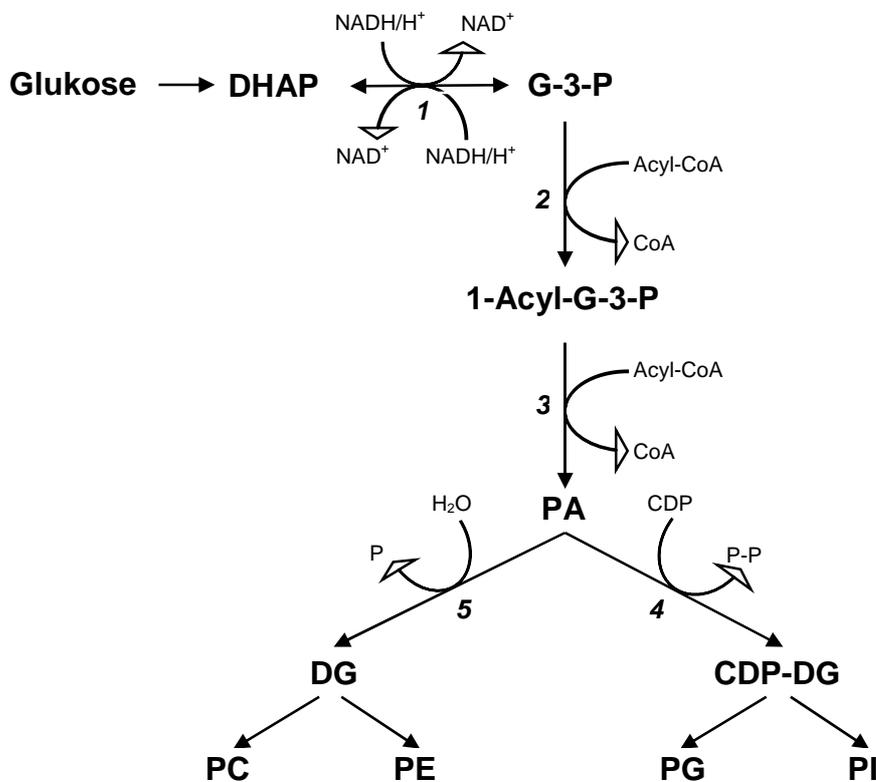


Abb. 2.7: **Bildung von Phosphatidsäure und Diacylglycerol** (modifiziert nach [121]). DHAP=Dihydroxyacetonphosphat, G-3-P=Glycerin-3-Phosphat, PA=Phosphatidsäure, DG=Diacylglycerol, PC=Phosphatidylcholin, PE=Phosphatidylethanolamin, PG=Phosphatidylglycerol, PI=Phosphatidylinositol, P=Phosphat, P-P=Pyrophosphat. **Beteiligte Enzyme:** 1=Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase [EC 1.1.1.8], 2=Glycerol-3-phosphat-Acyltransferase [EC 2.3.1.15], 3=1-Acylglycerol-3-phosphat-O-Acyltransferase [EC 2.3.1.51], 4=CDP-Diacylglycerol-Synthase [EC 2.7.7.41], 5=Phosphatidat-Phosphatase [EC 3.1.3.4]. Die EC-Nummern folgen der offiziellen Nomenklatur des "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)".

Der Einbau der Kopfgruppe ist am besten am Beispiel der *de novo*-Synthese des Phosphatidylcholins erklärbar. In allen kernhaltigen Zellen geschieht der Kopfgruppeneinbau über den CDP-Cholin-Pathway (sog. *Kennedy-Pathway*). Das Ausgangssubstrat dieser Reaktionsfolge, Cholin, kann nicht direkt von der Säuger- bzw. Vertebratenzelle synthetisiert werden und wird als essentieller Nährstoff über die Nahrung zugeführt. Das in die Zelle über vorwiegend

mittelfaffine Transporter aufgenommene Cholin wird über eine Cholin-Kinase (EC 2.7.1.32) phosphoryliert und anschließend über die CTP:Phosphocholin-Cytidyltransferase (EC 2.7.7.15) aktiviert. Das so entstandene CDP-Cholin wird dann mittels CDP-Cholin:1,2-Diacylglycerol-Phosphocholintransferase (EC 2.7.8.2) auf Diacylglycerol übertragen, worauf das Phospholipid entsteht (s. Abb. 2.7) [121, 139].

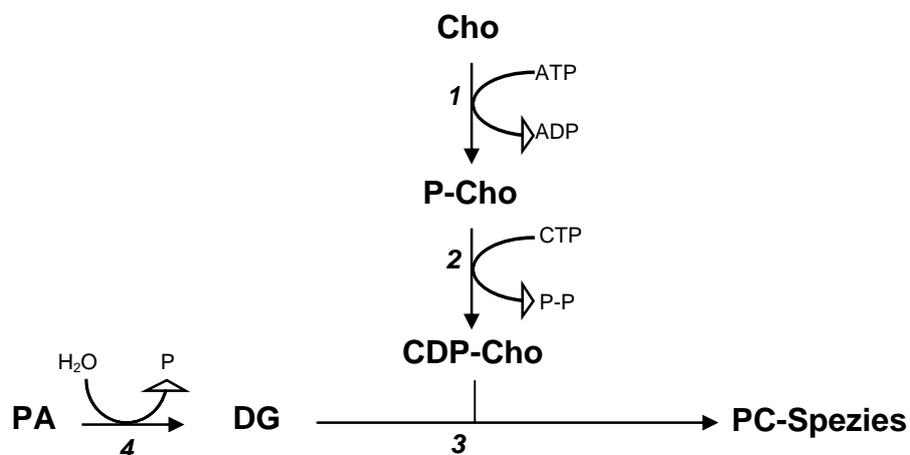


Abb. 2.8: **CDP-Cholin-Pathway (Kennedy-Pathway) zur Neusynthese von Phosphatidylcholin** (modifiziert nach [121]). Cho=Cholin, PA=Phosphatidsäure, DG=Diacylglycerol, PC=Phosphatidylcholin. **Beteiligte Enzyme:** 1= Cholin-Kinase [EC 2.7.1.32], 2= CTP:Phosphocholin-Cytidyltransferase [EC 2.7.7.15], 3= CDP-Cholin:1,2-Diacylglycerol-Phosphocholintransferase [EC 2.7.8.2], 4= Phosphatidat-Phosphatase [EC 3.1.3.4]. Die EC-Nummern folgen der offiziellen Nomenklatur des "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)".

Die an der *de-novo*-Synthese der PC-Spezies beteiligten Enzyme besitzen keine Substratspezifität bezüglich der Fettsäuren des DAG. Dessen Zusammensetzung determiniert, dass nur etwa 25% des PC auch DPPC sind. Die restlichen 25% des DPPC werden über das *Phospholipid-remodeling* (sog. Lands-Zyklus) gebildet. Hierbei wird durch eine Phospholipase A₂ (EC 3.1.1.4) die am C₂-Atom des Glycerols veresterte ungesättigte Fettsäure abgespalten und durch Palmitinsäure ersetzt [34].

2.3.1.1 Hormonelle Einflüsse auf die Phospholipidsynthese

Der Surfactant-Metabolismus der Lunge unterliegt einer Vielzahl von Regelmechanismen, er ist in erster Linie entwicklungsabhängig [112]. Zusammensetzung und Funktion können sich aber auch durch bestimmte Umweltfaktoren wie Nahrungszusammensetzung oder Ernährungszustand und eine Vielzahl von Erkrankungen verändern [32].

Pharmakologische bzw. hormonelle Einflüsse sind unter anderem für Glukokortikoide [12, 22, 23], Keratinozyten-Wachstumsfaktor [29, 30, 76, 78, 79] sowie eine Reihe weiterer Faktoren, wie „Epidermal Growth Factor“, Thyroxin oder Neuregulin 1 beschrieben worden [89, 108, 124]. KGF und Glukokortikoide stellen die für diese Arbeit wichtigsten Mediatoren dar, und sollen deshalb genauer betrachtet werden.

2.3.1.1.1 Einflüsse von Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF)

Es wurde *in vitro* gezeigt, dass KGF wichtige Enzyme der Lipogenese in den Typ-II-Pneumozyten beeinflussen kann. Die wichtigsten dieser Enzyme sind die Fettsäure-Synthase (EC 2.3.1.85), die Stearoyl-CoA-Desaturase (EC 1.14.19.1) und die Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (EC 2.3.1.15) [29, 78]. Die Enzyminduktion soll über eine Aktivierung einer Reihe intrazellulärer Transkriptionsfaktoren geschehen. An isolierten Typ-II-Pneumozyten wurde außerdem gezeigt, dass rhKGF-Exposition eine vermehrte Aufnahme und einen vermehrten Einbau von Cholin in DPPC bewirkt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die CTP:Phosphocholin-Cytidyltransferase (EC 2.7.7.15, s. o.), ein Schlüsselenzym der *de novo*-Synthese der Phosphatidylcholine, ebenfalls durch rhKGF reguliert wird [28]. Die genaueren molekularen Grundlagen der rhKGF-Wirkung auf die Lipogenese sind aber ebenso unklar wie die *in vivo*-Bedeutung und bedürfen noch eingehender Untersuchung.

Am besten erforscht ist die KGF-Wirkung auf die Genexpression der Surfactant-Proteine. Unter rhKGF-Einfluss zeigten sich *in vitro* sowohl Expressions- als

auch Konzentrationszunahmen aller vier Surfactant-Proteine [29, 77, 117, 136]. Die Wirkungen von KGF *in vivo* auf die Genexpression von SP-A bis -D sind hingegen völlig unklar.

2.3.1.1.2 Einflüsse durch Glukokortikoide

Die bisher beschriebenen Effekte der Glukokortikoide auf die Phospholipidsynthese *in vitro* ähneln denen von KGF: Deutliche Aktivitätszunahme der maßgeblich an der Lipogenese beteiligten Enzyme CTP:Phosphocholin-Cytidyltransferase (EC 2.7.7.15) und Fettsäure-Synthase (EC 2.3.1.85) sowie Expressionszunahme der Surfactant-Proteine [84, 100, 110].

Beide Regulationssysteme, sowohl das KGF-System, als auch das Glukokortikoid-System, sind eng miteinander verknüpft. Oshika et al. zeigten an explantierten Rattenlungen nach Dexamethasongabe eine Transkriptionserhöhung von KGF und dem KGF-Rezeptor [89]. In einer Studie von Chelly et al. konnte dieser Effekt *in vitro* an Lungenfibroblasten bestätigt werden [30].

Interessanterweise hat eine Kombination beider Substanzen additive Effekte auf der Ebene der Surfactant-Proteine, was *in vitro* an fetalen Typ-II-Pneumozyten gezeigt wurde [84]. Eine Untersuchung der Auswirkung auf den pulmonalen Lipidmetabolismus bei gleichzeitiger Gabe *in vivo*, insbesondere bei unreifen Organismen hat bisher jedoch noch nicht stattgefunden. Im Hinblick auf die Potenz von rekombinantem humanem KGF als Therapeutikum allein oder in Kombination mit Glukokortikoiden, ist diese experimentelle Lücke dringlichst zu schließen.

2.3.2 Synthese, Speicherung und Sezernierung des Surfactantgemischs

Alle Surfactantkomponenten werden am rauen endoplasmatischen Retikulum der Typ-II-Pneumozyten synthetisiert. Es folgen Transport zum Golgi-Apparat,

Modifizierung bestimmter Komponenten (Proteinprocessing, Fettsäureaustausch bei Lipiden) und letztlich die Speicherung in intrazellulären Vesikeln, den sogenannten Lamellarkörperchen (eng. „*lamellar bodies*“ - LB). Für die Bildung der LB spielt insbesondere SP-B eine wichtige Rolle. Außerdem werden die Phospholipide nach der Länge der Fettsäurereste sortiert. Das hat zur Folge, dass die Fettsäureketten der PC-Spezies präferentiell 14 bis 16 Kohlenstoffeinheiten aufweisen [3, 14]. Auf verschiedene sekretorische Reize hin werden die LB in den Alveolarraum sezerniert und zunächst zum tubulären Myelin entfaltet. Das tubuläre Myelin steht in Verbindung mit den luminalen Strukturen, dem oberflächenassoziierten Surfactantreservoir und dem Surfactantfilm an der Wasser-Luft-Grenzfläche (s. Abb. 2.9).

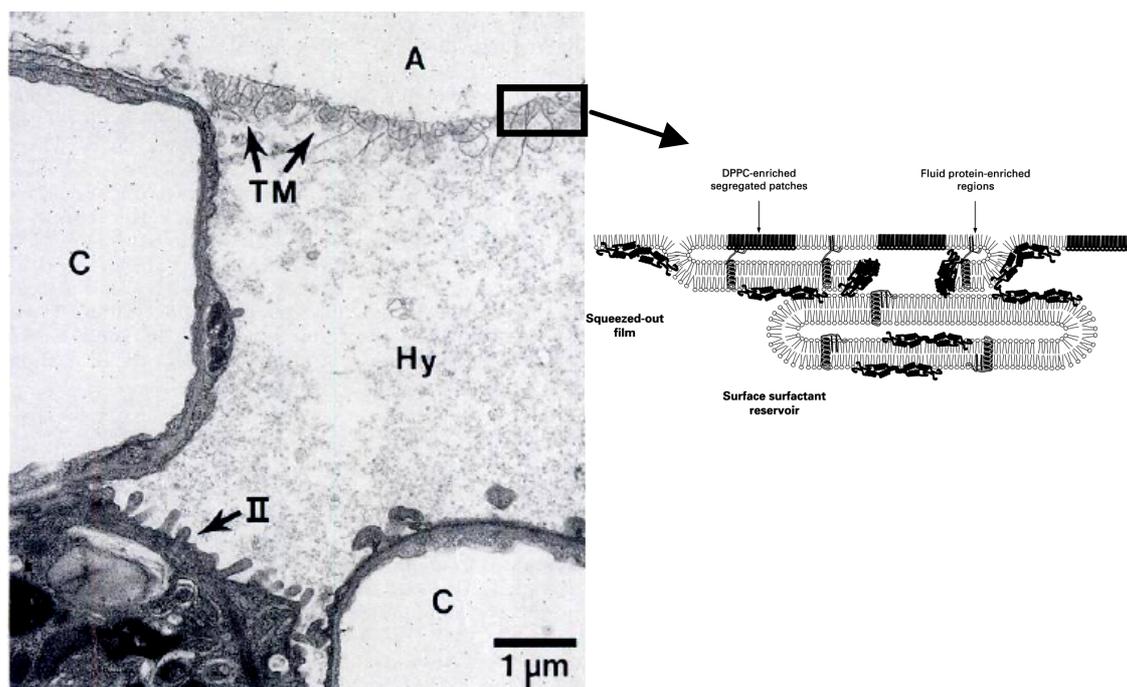


Abb.2.9: **Elektronenmikroskopische Darstellung einer Alveolarwand und schematische Darstellung des Surfactant-Films unter Kompression** (nach [93, 106]). II=Typ-II-Pneumozyt, C=Blutkapillare mit Endothelzelle, TM=tubuläres Myelin, A=Alveolarraum.

Die LB-Sekretion wird durch physikalische oder chemische Reize stimuliert. Zug an den Typ-II-Pneumozyten, wie er bei den ersten Atemzügen eines Neugeborenen entsteht, ist dabei der stärkste Stimulus [3, 36]. Chemisch löst vor allem die Aktivierung von β_2 -Rezeptoren über eine nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade eine Vesikelentleerung aus. Diese Kaskade ist G-Protein gekoppelt, stimuliert die Adenylat-Cyclasen II und IV (EC 4.6.1.1), die einen intrazellulären Anstieg von cAMP und somit eine Aktivierung der Phosphokinase A (EC 2.7.4.4) bewirken [95]. Körperliche Arbeit und Stress verstärken sowohl Synthese als auch Sekretion von Surfactant, weshalb das adrenerge System vor allem bei der Geburt sowie schwerer körperlicher Arbeit wichtig ist [3, 105]. Eine Vielzahl weiterer Faktoren, wie z. B. Adenosin, Glucagon-like-peptide-1, Gastrin-releasing-peptide oder Tumor- nekrose-Faktor- α haben in Studien ebenfalls gezeigt, dass sie Einfluss auf die Surfactant-Sekretion haben können [3]. Inwiefern letztgenannten zukünftig Bedeutung zukommt, ist noch Gegenstand aktueller Forschung.

Das „verbrauchte“ Surfactantgemisch selbst unterliegt grundsätzlich 2 unterschiedlichen Mechanismen zur Entfernung aus dem Alveolarraum: Entweder durch Abbau durch die Alveolarmakrophagen oder es erfolgt eine Wiederaufnahme in die Typ-II-Pneumozyten. Nur etwa 15% des extrazellulär vorhandenen Surfactants stammt aus der *de novo*-Synthese (s. Kap. 2.3.1). Die restlichen 85% werden in den Typ-II-Pneumozyten rezykliert und erneut in Lamellarkörperchen gespeichert.

2.4 Das kindliche Atemnotsyndrom (eng. „infant-respiratory-distress-syndrome - IRDS)

2.4.1 Definition

Das IRDS (auch ANS = Atemnotsyndrom; frühere Bezeichnung: *Hyaline Membrankrankheit*) stellt eine respiratorische Insuffizienz des Frühgeborenen dar. Sie ist bedingt durch eine funktionelle Unreife des Atemapparates und eine ungenügende Anreicherung von Surfactant in der Lunge. Ein Zusammenhang

zwischen Surfactant-Mangel und der Entwicklung eines IRDS wurde erstmals 1959 von Mary Ellen Avery postuliert. Sie stellte fest, dass die Lungen von verstorbenen IRDS-Patienten - im Gegensatz zu Lungen von Neugeborenen mit anderen Todesursachen - eine eher leberähnliche Struktur aufwiesen und dass Lungenextrakte die Oberflächenspannung nicht deutlich reduzieren konnten [5]. Sie schloss daraus: „*[T]he disease is associated with the absence or the late appearance of some substances which in the normal subject renders the internal surface capable of attaining a low surface tension when lung volume is decreased*“ [5].

2.4.2 Ätiologie und Pathophysiologie

Der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines IRDS ist die Frühgeburtlichkeit. Daneben existieren andere Risikofaktoren, wie z. B. männliches Geschlecht, Zwillingsschwangerschaft, Prä-Eklampsie bzw. Diabetes der Mutter, perinatale Asphyxie, genetische Polymorphismen der Surfactant Proteine und Kaiserschnittgeburt, um nur einige zu nennen [26, 28, 35, 51, 52, 66, 119].

Die Entwicklung der menschlichen Lunge beginnt in der Embryonalphase und endet etwa im 3. Lebensjahr. Die embryo-fötale Lungenentwicklung durchläuft dabei bestimmte Phasen. In der *embryonalen Phase* (0-7. Woche) entstehen erste Vorläuferstrukturen der Atemwege und des Lungenparenchyms. In der folgenden *pseudoglandulären Phase* (7.-17. Woche) findet eine Verzweigung der Atemwegsstrukturen statt und Gefäße sprossen ein. Ab der 17. bis zur 27. Gestationswoche (*canaliculäre Phase*) entstehen erste Alveolarstrukturen (Bronchioli respiratorii, Ductus alveolares und primitive Alveolen). Erst ab etwa der 26. Gestationswoche (bis zur 36. Woche - *sacculäre Phase*) beginnen die peripheren Atemwege sich zu verbreitern und die Gasaustauschoberfläche vergrößert sich [59]. Lamellarkörperchen, die intrazelluläre Speicherform des Surfactants, können erst ab der 19.-20. Gestationswoche nachgewiesen werden. Die Surfactant-Akkumulation steigt während der weiteren Pränatalperiode kontinuierlich an. Eine ausreichende Menge extrazellulären

Surfactants, die eine Atmung ohne zusätzliche technische Hilfe ermöglicht, ist durchschnittlich erst nach der 32. Gestationswoche vorhanden [20].

Ein fehlender Surfactant führt letztlich zur Atelektasenbildung. Pathophysiologisch bedeutet dies eine verminderte Lungen-Compliance und verminderte funktionelle Residualkapazität. Es resultiert ein Ventilations-Perfusions-Mismatch in den gut durchbluteten aber schlecht belüfteten Lungenarealen mit der Gefahr der Ausbildung von intrapulmonalen Shunts. Verstärkt durch die gleichzeitige Hypoventilation kommt es zu Hypoxie und Hyperkapnie. Folge ist eine Azidose, die zur systemischen Hypotension und pulmonalen Vasokonstriktion führt. Ein Rechts-Links-Shunt auf Vorhofebene kann entstehen. Sowohl Azidose und Hypoxie als auch der reduzierte Stoffwechsel in der minderperfundierten Lunge inhibieren wiederum die postnatal einsetzende *de novo*-Synthese des Surfactant (*Circulus vitiosus*). Erhöhte Beatmungsdrücke können kollabierte Alveolen zwar offen halten, dies führt aber gleichzeitig zu einer Dehnung der proximalen Atemwege, da diese eine höhere Compliance aufweisen. Durch die Überdehnung der Atemwege kommt es letztlich zu einem Epithelschaden, der zu einem „*Protein-Leck*“ führt. Plasma kann aus diesen Leckagen austreten und kleidet im Verlauf die innere Gasaustauschfläche aus. Folge ist die Bildung der früher namensgebenden „*hyalinen Membran*“. Sekundär verstärken inflammatorische Prozesse das Krankheitsbild [116].

2.4.3 Klinik und Diagnostik

Die klinischen Zeichen sind Atemnot, juguläre und intercostale Einziehungen, Tachypnoe und ein charakteristisches expiratorisches Stöhnen, das vor allem bei sehr unterentwickelten Frühgeborenen mit IRDS auftritt (Geburt vor der 30. Gestationswoche) sowie Zyanose aufgrund der Hypoxie. Das Stöhnen kommt durch expiratorisch geschlossene Stimmlippen zustande, wodurch das Kind versucht, den intrapulmonalen Druck positiv zu halten, um einem Alveolarkollaps entgegenzuwirken.

Neben diesen typischen klinischen Zeichen ist das Röntgenbild diagnostisch wegweisend. Typisch ist ein feingranuläres bis retiukläres Muster mit (oder ohne) Aerobronchogramm und im Endstadium eine „Weiße Lunge“ (totale Lungenatelektase) [1].

2.4.4 Therapie

Milde Formen des IRDS, die vorrangig relativ reife Frühgeborene betreffen (Geburt nach der 32. Woche), können durch einfache Sauerstoffgabe therapiert werden. Benötigt das Kind mehr als 30-40% O₂ zur Aufrechterhaltung einer adäquaten Sauerstoffsättigung, kann durch eine „Continuous Positive Airway Pressure“ (CPAP-) Beatmung nachgeholfen werden [45]. Seit deren Einführung in die Therapie des IRDS durch Gregory et al. ist es zur Entwicklung einer Vielzahl unterschiedlicher Beatmungsschemata gekommen, die eine Anpassung der CPAP-Atemhilfe an unterschiedlichste pathophysiologische Vorbedingungen zulässt. Allen Schemata ist gemein, dass ein positiver, endexpiratorischer Druck erzeugt wird, der dem Alveolarkollaps entgegenwirkt [2].

Wichtigster Meilenstein in der IRDS-Therapie war jedoch die endotracheale Instillation von exogenem Surfactant 1980 durch Fujiwara et al. [43]. Für die meisten an schwerem IRDS erkrankten Kinder ist dies die Standardtherapie.

2.4.5 Chronische Folgen

Folge eines IRDS und der hyperoxischen Überdruckbeatmung kann die Entwicklung einer Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) sein. Die BPD ist definiert als chronische Lungenerkrankung des Neugeborenen, die mit persistierender Hypoxie, Hyperkapnie und erhöhtem Sauerstoff-Bedarf einhergeht und bis über den 28. Lebenstag hinaus besteht. Ätiologisch spielen bei der Entwicklung der BPD die maschinelle Beatmung und Infektionen der Atemwege eine Rolle [7].

Seit der Erstbeschreibung der BPD durch Northway et al. [87] ist die Morbiditätsrate der BPD kontinuierlich zurückgegangen. Dies ist durch die Einführung der Surfactant-Therapie und der Entwicklung besserer Beatmungsregime bedingt. Glukokortikoide haben keinen nachgewiesenen wesentlich positiven Effekt auf die BPD-Häufigkeit [6, 55, 56].

3 Materialien und Methoden

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

3.1.1 Phospholipid-Extraktion

Falcon ®-Röhrchen	Volumen 50 ml, Ø 26 mm, Schraubdeckel,
Falcon ®-Röhrchen	Volumen 15 ml, Ø 15 mm, Schraubdeckel,
Pyrex®-Röhrchen	Volumen 40 ml, Ø 28 mm, Schraubdeckel, Schott
Glas-Pasteurpipetten, Saugball	Short size (150 mm), WU Mainz
Faltenfilter	Ø 90 mm, Whatman ® Schleicher & Schuell
Glastrichter	
Multipipette, Combitips	100 µl, 250µl, 5 ml, Ritips ® bzw. Eppendorf ®
Probenrüttler Modell Vortex REAX top ®	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG; Schwabach
Dispergiergerät ULTRA- TURRAX ® T25 basic und Rotor S25N-10G	Beide Ika Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen
Tischzentrifuge, Modell: MULTIFUGE 1 S-R	Heraeus Holding GmbH; Hanau

3.1.2 Phosphatbestimmung

Pyrex®-Röhrchen	Volumen 10 ml, Ø 14 mm, Schraubdeckel, Duran ®
Präzisions-Glasspritzen, 10, 25, 100, 500 µl	Hamilton Company; Reno, Nevada, USA
Multipipette®, Combitips®	100 µl, 250µl, 5 ml, Ritips ® bzw. Eppendorf ®
Glasmessküvette, Ø 10 mm	
Blockthermostat BT 200	Kleinfeld Labortechnik; Gehrden
UV/VIS Spectrometer Lambda	PERKIN ELMER; Massachusetts, USA

3.1.3 HPLC-Analytik

HPLC-Probengefäße und Schraubdeckel	1,1 ml konische Mikroliterflasche mit Gewinde, 32 x 11,6 mm, Schraubdeckel mit PP-Membran, beide VWR international GmbH, Darmstadt
Präzisions-Glasspritzen, 10, 25, 100, 500, 1000 µl	Hamilton Company; Reno, Nevada, USA
Einmal-NH ₂ -Säulen zur Probenaufarbeitung 100 mg / ml	Phenomenex Strata ®, Torrance, CA, USA

Die verwendete HPLC-Anlage ist unter 3.5.3.2 dargestellt.

3.2 Chemikalien und Reagenzien

3.2.1 Chemikalien

Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	MERCK KGaA; Darmstadt, Reinheit > 99 %
L(+)-Ascorbinsäure	VWR International; Fontenay sous bois, Reinheit > 99,7 %
Brij 35®	25 % w/w in H ₂ O, MERCK KGaA; Darmstadt
Cholinchlorid	SIGMA-ALDRICH; Steinheim, Reinheit > 98 %
Chloroform	J. T. Baker; Deventer, Holland
Methanol	LiChrosolv®, MERCK KGaA; Darmstadt, Reinheit > 99,9 %
Perchlorsäure	70%ig, Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze
2,2,2-Trifluorethanol	„TFE“, SIGMA-ALDRICH; Steinheim, Reinheit > 99,5 %
Stickstoff, Reinheit 99,9%	LINDE; München
Wasserstoffperoxid (Perhydrol®, 30%, p.a.)	30%ig, MERCK KGaA; Darmstadt
Kalziumchlorid-Dihydrat	MERCK KGaA; Darmstadt, Reinheit > 99,5 %
Natriumchlorid-Lösung, 0,9%	„NaCl 0,9%“, fertige Infusionslösung, 500 ml, Fresenius Kabi, Bad Homburg
Phosphatgebufferte Kochsalzlösung (Natriumchlorid=137mM, Kaliumchlorid=2,7mM, Phosphat=12mM; pH 7,4)	„PBS“, Biochrom AG, Berlin

Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	MERCK KGaA; Darmstadt, Reinheit > 99,5 %
2,5 N Schwefelsäure p. a.	33,32 ml 95-97%ige Schwefelsäure (MERCK KGaA; Darmstadt) ad 500 ml H ₂ O
1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien p. a.	„DPH“, SIGMA-ALDRICH; Steinheim
Tetrahydrofuran	LiChrosolv®, MERCK KGaA; Darmstadt, Reinheit > 99,9 %

3.2.2 Reagenzien

Narkoselösung

1,2 ml Ketamin 10%ig² und 0,8 ml Xylazin 2%ig³, verdünnt auf 5 ml Gesamtvolumen mit 3 ml 0,9%iger NaCl-Lösung entspricht einer Konzentration von 2,4 mg Ketamin pro 100 µl und 0,32 mg Xylazin pro 100 µl. Einer Narkosedosis entsprechen 10 µl pro g KGW dieser Lösung (entsprechend 240 mg/kg Ketanest bzw. 32 mg/kg Xylacin). Die Narkoselösung wurde vor jedem OP-Tag frisch angesetzt.

Ammoniummolybdat-Lösung

7,724 g Ammoniumheptamolybdattetrahydrat ad 250 ml einer 2,5 N Schwefelsäurelösung. Lagerung bei 4 - 8 °C.

10%ige Ascorbinsäure-Lösung

10 g Ascorbinsäure ad 100 ml H₂O. Lagerung bei 4 - 8 °C.

Phosphatstandard

57,1 mg Kaliumhydrogenphosphat trihydrat ad 250ml H₂O, entspricht 2 mmol/l Phosphatstandard-Lösung. Lagerung bei 4 - 8 °C.

Diphenylhexatrien- (DPH-) Lösung

1 mg 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien pro 1 ml Tetrahydrofuran. Lagerung bei 30°C

0,04%ige Kalziumchlorid-Lösung

0,04 g Kalziumchlorid-Dihydrat ad 1000 ml H₂O. Lagerung bei 4 - 8 °C.

3.3 Versuchstiere

Zur Zucht wurden Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Die adulten Tiere wurden unter standardisierten keimfreien Bedingungen (25 °C, Luftfeuchtigkeit konstant bei 50-55%, konstanter 12stündiger Tag-Nacht-Rhythmus) gehalten. Es bestand

² Ketamin Gräub, 100 mg / ml, animedica GmbH, Senden-Bösensell

³ Xylazin 2 %, 20 mg / ml, CEVA TIERGESUNDHEIT GmbH, Düsseldorf

jederzeit freier Zugang zu sterilisierter Standarddiät⁴ und autoklaviertem Wasser (134 °C, 50 min). Die hygienischen Bedingungen wurden monatlich nach Kunstyr getestet [67].

Die Verpaarung erfolgte über zwei bis fünf Tage. Die Tragdauer der Muttertiere lag zwischen 21 und 23 Tagen. Die Jungtiere wurden während der Versuche und bis zur Organentnahme bei ihrer Mutter belassen und von ihr gesäugt. Es wurden folgende Altersklassen definiert: 3d, 7d, 15d und 21d (post partum - pp). Die Behandlung mit rhKGF, Betamethason oder der Kombination aus beidem erfolgte jeweils über 2 Tage (für 3d an d1/d2, für 7d an d5/d6, für 15d an d13/d14 und für 21d an d19/20 pp) in einem 24h-Interval. rhKGF wurde in einer Dosis von 5mg/kg KGW subkutan in den Nacken verabreicht (Dosis-Referenz siehe [54]), Betamethason in einer Dosis von 1mg/kg KGW intraperitoneal gespritzt. Die Kombination aus beidem wurde entsprechend appliziert. Den Kontrollen wurden gleiche Volumina pharmakonfreie Trägersubstanz (PBS) an identische Stellen gespritzt. Der Gewichtsverlauf der Tiere wurde täglich während der Versuche und vor der Narkose zur Organentnahme mit einer Präzisionswaage⁵ bestimmt.

3.4 Gewinnung von Organen und sezerniertem Surfactant

Vor Probenentnahme wurden die Tiere gewogen. Zur anschließenden Anästhesie und Analgesie wurden Ketaminhydrochlorid und Xylazinhydrochlorid verwendet (Narkoselösung s. 3.2.2). Nach intraperitonealer Injektion der Narkoselösung wurde bis zu deren vollem Wirkeintritt 10 min abgewartet. Die Narkosetiefe wurde mittels gezielter Schmerzreize (Abwesenheit von Ohrpitsch- oder Schwanzwurzelreflex) getestet (s. Abb. 3. 1. **A**).

Nach Eintreten einer kompletten Areflexie wurde das Versuchstier in Rückenlage auf einer Styroporunterlage befestigt. Dann wurde die Haut in der Linea

⁴ Provivmi Kliba SA 3336 ® mit einem Fettanteil von 5.5%

⁵ Model 440-45, Kern&Sohn GmbH, Balingen-Frommern

alba vom Nabelansatz bis zum Kiefernwinkel eröffnet und seitlich stumpf abpräpariert (s. Abb. 3. 1. **B**). Die Trachea wurde unterhalb der sternohyoidalen Muskulatur freigelegt (s. Abb. 3. 1. **C**), mit handelsüblichem Nähgarn umschlungen und ventral zwischen Schildknorpel und oberer Thoraxapertur zwischen zwei Trachealspangen inzidiert. Anschließend wurde eine abgestumpfte und eingekerbte Standardinjektionskanüle (je nach Alter des Versuchstieres in variablem Durchmesser) in die Trachea eingeführt und mit dem Nähgarn durch einen Doppelknoten fixiert, um den sezernierten Surfactant via Lungenspülung (Lungenlavage) zu gewinnen. Die Einkerbungen in der Kanüle verhinderten das versehentliche Herausgleiten (s. Abb. 3. 1. **D**).

Dann wurde die Bauchhöhle eröffnet und das Zwerchfell dargestellt. Das Zwerchfell wurde am Rippenbogen abgetrennt und der knöcherne Brustkorb vorsichtig und ohne das Lungenparenchym zu verletzen abgesetzt. Das nun freiliegende, noch schlagende Herz wurde im rechten Ventrikel mittels einer Einmalinjektionskanüle⁶ punktiert und das venöse Blut zur weiteren Probenaufarbeitung in 1,2 oder 2,7 ml EDTA-Bluttröhrchen⁷ überführt (s. Abb. 3. 1. **E**). Das Vollblut wurde sogleich bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert⁸, das entstandene Plasma abpipettiert und bis zur weiteren Analytik bei -80°C eingelagert. Das Zellpellet wurde verworfen.

Um Verunreinigungen der Lungenlavageflüssigkeit (LLF) (bzw. des sezernierten Surfactants) durch Leckage des intravaskulären Bluts zu verhindern, wurde mittels einer spitzen chirurgischen Schere die Punktionsstelle am rechten Ventrikel erweitert und über diesen Zugang eine gelbe 100µl-Pipettenspitze in den Truncus pulmonalis eingeführt. Die Pipettenspitze war über ein Einmalinfusionsbesteck mit einer Standard-Infusionslösung (eiskalte NaCl 0,9% bei 4 °C) verbunden. Die Lungengefäße wurde bei etwa 12 cm Wassersäule zur

⁶ sterile Einmalinjektionskanüle in var. Ø (23-27G), BD Microlance™ 3, BD GmbH, Germany

⁷ S-Monovette®, 1,2 ml oder 2,7 ml, Sarstedt, Nümbrecht

⁸ MULTIFUGE 1 S-R, Heraeus Holding GmbH; Hanau

Entfernung des vaskulären Blutes perfundiert. Zur Druckentlastung und Vermeidung eines Lungenödems wurde der linke Vorhof inzidiert.

Nachdem die Lunge komplett blutfrei („weiß“, nach ca. 20 Sekunden) war, wurde das Herz an den Gefäßansätzen abgetrennt. Dann folgte die bronchoalveoläre Lavage, um den sezernierten Surfactant zu gewinnen. Hierzu wurde über den liegenden Trachealtubus eiskalte NaCl-Lösung (NaCl-Lösung 0,9% bei 4°C) mittels Einwegspritzen⁹ in die Lunge eingespült (s. Abb. 3. 1. F). Die Lungen wurden dabei zunächst komplett mit Flüssigkeit gefüllt und immer nur so viel zur repetitiven Lavage instilliert, wie vorher entnommen werden konnte. Dieses Vorgehen wurde bis zum Erreichen eines definierten Endvoluminas wiederholt. Die Lungenspülflüssigkeit wurde in Falcon-Röhrchen¹⁰ gesammelt und in Eiswasser zwischengelagert. Die Volumina der Lungenspülflüssigkeit unterschieden sich je nach Altersgruppe: 3ml LLF bei 3d- und 7d-Tiere, 10ml bei 15d- und 21d-Tiere. Zur weiteren Probenaufarbeitung wurden die LLF zunächst zentrifugiert (140 x g bei 4 °C für 10min) und der zellfreie Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Das Zellpellet wurde verworfen. Bis zur endgültigen Phospholipidextraktion wurden die LLF-Proben bei -80 °C eingefroren.

Lunge und Leber wurden direkt nach Durchführung der LLF entnommen, von umliegenden Fett- und Bindegewebsresten befreit, in Kryo-Röhrchen¹¹ überführt und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung bis zur Aufarbeitung der Organe erfolgte bei -80°C.

⁹ Injekt ® Einmalspritzen, 2-teilig, 1 ml oder 2 ml, B. Braun, Melsungen

¹⁰ Falcon ®-Röhrchen mit Schraubdeckel, Volumen 15ml bzw. 40ml

¹¹ Cryo.s ®, PP, mit Schraubverschluss, steril, Greiner, Frickenhausen

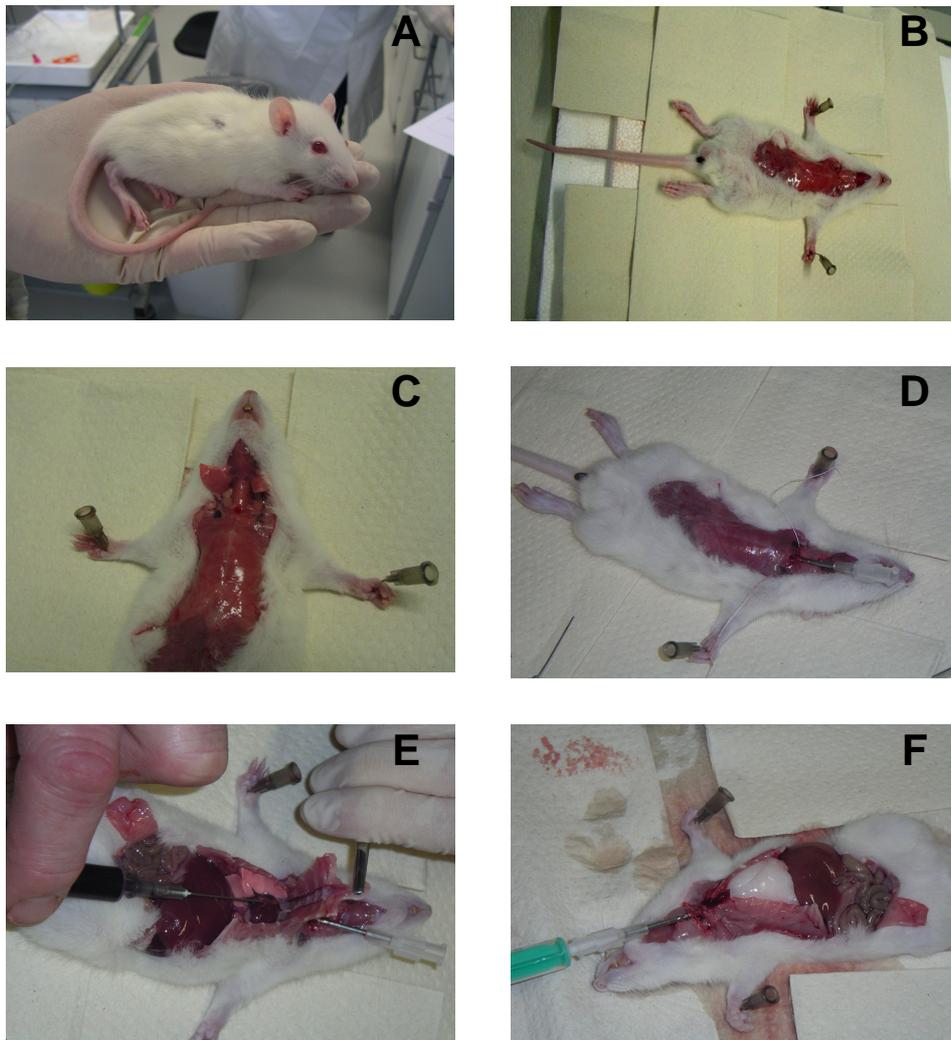


Abb. 3.1: Durchführung einer Lavage am Beispiel einer 21 Tage alten Ratte. A: narkotisiertes Tier; **B:** erster OP-Situs mit abpräpariertem Fell; **C:** Präparation der Trachea; **D:** Liegender Tubus; **E:** Punktion des rechten Ventrikels mit Einwegkanüle; **F:** Durchführung der Lavage über den liegenden Tubus.

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 Phospholipid-Extraktion

3.5.1.1 Extraktion nach Bligh und Dyer

Die Extraktion der Phospholipide (und sonstiger Lipide) aus flüssigen Proben (LLF, Blutplasma) erfolgte nach der Methode von Bligh und Dyer [17].

Prinzip dieser Extraktion ist es, zwei nicht miteinander mischbare Flüssigkeiten (Chloroform, Wasser) und die im Wasser vorhandenen hydrophoben Bestandteilen über einen Lösungsvermittler (Methanol) miteinander mischbar zu machen. Die Extraktionsgeschwindigkeit der hydrophoben Bestandteile hängt dadurch nicht mehr von der Grenzfläche zwischen hydrophiler und hydrophober Phase ab und ist somit erheblich beschleunigt. Die anschließende Phasentrennung durch Zugabe von Chloroform und wässrigem Medium separiert die Lipide (in der Chloroform-Unterphase) von hydrophilen Komponenten (in der Wasser/Methanol-Oberphase). Ausnahme sind einige denaturierte Proteine, die als Präzipitate in der Zwischenphase vorliegen.

Zur Durchführung wurden Aliquots der jeweiligen Proben (zumeist 1 ml) von LLF oder Plasma zunächst in ein phosphatfreies 12 ml-Pyrex-Röhrchen überführt. Danach wurde 1 Volumenanteil Chloroform und 3 Volumenanteile Methanol zugegeben und die Probenanteile mit einem Probenrüttler ca. 1 min durchmischt. Das nun entstandene, sogenannte ternäre Gemisch wurde für 15 min stehen gelassen. Zur Phasentrennung wurden dann 2 Volumenanteile 0,9%ige Kochsalzlösung und 3 Volumenanteile Chloroform zugegeben und erneut gerüttelt. Eine endgültige Trennung in wässrige Oberphase (enthält hydrophile Bestandteile) und organische Unterphase (enthält hydrophobe Bestandteile und Chloroform) wurde entweder durch anschließende Zentrifugation (15 min, 1400 x g) oder durch Lagerung der Proben über Nacht im Eisschrank (-30 °C) erreicht.

Die Oberphasen wurden vorsichtig abgesaugt und verworfen. Mithilfe der Pasteurpipette wurden die Unterphasen in kleinere phosphatfreie Glasbehälter überführt und bis zur weiteren Analytik eingefroren (-80 °C).

3.5.1.2 Extraktion nach Folch

Die Lipidextraktion der Organe (Leber, lavagierte Lunge) erfolgte nach der Methode von Folch [41]. Sie ist für Gewebe besser geeignet, da deutlich größere Stoffmengen zu extrahieren sind (15-25 μmol Phospholipid / g Gewebe gegenüber 250-500 nmol Phospholipid / 10ml LLF). Das Extraktionsprinzip ist analog der Methode von Bligh und Dyer. Beide Methoden unterscheiden sich lediglich in der Durchführung, dem benötigten Volumen an organischem Lösungsmittel (bei der Folch-Extraktion wird deutlich mehr verbraucht) und der Verwendung einer 0,04%igen CaCl_2 -Lösung anstelle von NaCl 0,9%.

Nach Bestimmung des Organgewichtes¹² wurde das Organ (bzw. ein Aliquot desselben bei den Lebern) in ein phosphatfreies Glasröhrchen überführt und 5 ml Methanol zugegeben. Anschließend wurde mit Hilfe eines Dispergiergerätes homogenisiert. Nach Zugabe von 10 ml Chloroform und erneuter Homogenisierung wurde die entstandene Suspension über einen mit Chloroform/Methanol (2+1, v/v) angefeuchteten Faltenfilter in ein weiteres phosphatfreies Glasröhrchen überführt. Dispergiergerät und Kunststoffröhrchen wurden anschließend mehrmals mit Chloroform/Methanol (2+1, v/v) nachgespült und das Extraktvolumen auf 30ml eingestellt. Die Phasentrennung erfolgte durch Hinzupipettieren von 6 ml einer 0,04%igen CaCl_2 -Lösung (s. 3.2.2). Kräftiges Schütteln und Zentrifugation (15 min bei 1400 x g) komplettierten die Phasentrennung.

Die Ober- und Unterphasen wurden mit einer Pasteurpipette voneinander getrennt und separat aufgearbeitet. (analoges Vorgehen zur Bligh und Dyer - Extraktion). Zur einfacheren Lagerung wurden die Unterphasen vor Weiterverarbeitung unter dem Stickstoffstrom eingedampft und in einem definierten Volumen (10 ml) Chloroform/Methanol (2+1, v/v) resuspendiert.

¹² Apothekerwaage, Modell ED124S, Sartorius AG, Göttingen

Von den Oberphasen wurden 3ml-Aliquots abgenommen und ebenfalls zur weiteren Analytik eingefroren (nicht Bestandteil dieser Arbeit).

3.5.2 Phospholipid-Analytik

3.5.2.1 Bestimmung der Gesamtphospholipide - Phosphatbestimmung nach Bartlett

Zur Bestimmung der Gesamtphospholipidmenge in den einzelnen Proben wurde der Lipidphosphor der organischen Phase zunächst in anorganisches Phosphat überführt und dieses nach der Methode von Bartlett quantifiziert [9]. Hierbei handelt es sich um eine kolorimetrische Bestimmung, die als quantitative Reaktion nach Farbumschlag keine Veränderungen der Extinktion mehr zeigt. Die Eichkurve dieser Methode verläuft in Extinktionsbereichen zwischen 0,02 und 1,5 linear und durch den Nullpunkt. Somit konnte zu den Messungen eine einfache Dreifachbestimmung einer Standardphosphatlösung als Standard mitgeführt werden (s. Abb. 3.2). Es wurden dabei jeweils 50 μ l Standard, entsprechend 100 nmol Phosphat verwendet (Phosphatstandard, s. Kap. 3.2.2).

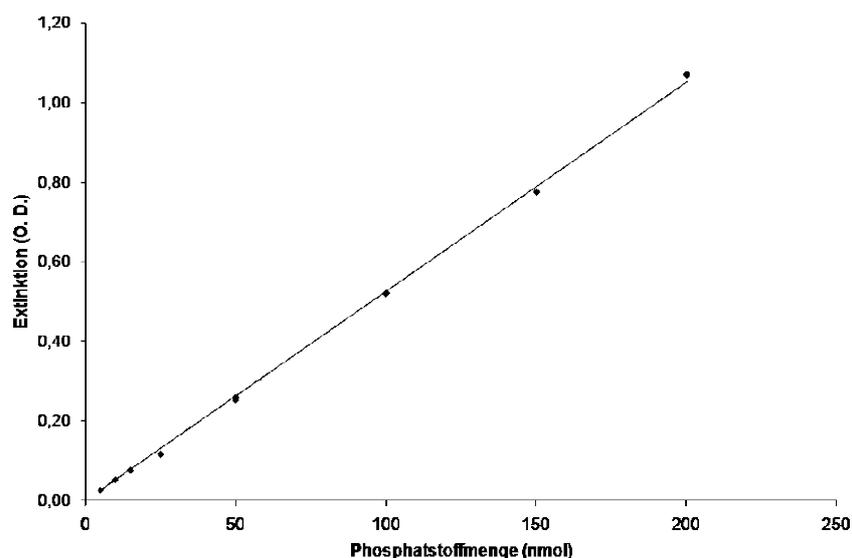


Abb. 3.2: **Phosphatstandardkurve.** Als Standardlösung wurde 2mM wässrige Kaliumhydrogenphosphat trihydrat-Lösung in aufsteigender Stoffmenge verwendet. Die Bestimmung des Phosphat-Gehaltes erfolgte, wie unter 3.5.2.1 beschrieben. O. D.=optische Dichte.

Nach Eindampfen des organischen Lösungsmittels der Proben unter Stickstoffstrom (um das Entstehen giftiger Chlorverbindungen wie Phosgen zu verhindern), wurde zunächst das lipidgebundene Phosphat durch Oxidation in freies Orthophosphat überführt. Hierzu wurden Standard und Proben in säuregereinigten Glasröhrchen mit 500 µl 70%iger Perchlorsäure und 200 µl 30%iger Wasserstoffperoxidlösung p.a. versetzt, in einen Blockthermostat verbracht und 60min bei 190°C verascht. Nach dem Abkühlen und Zugabe von 4 ml aqua bidest. wurden 500 µl 25 mM Ammoniummolybdat-Lösung (s. Kap. 3.2.2) und 200 µl 10%ige Ascorbinsäurelösung (s. Kap. 3.2.2) hinzu pipettiert, die Proben gerüttelt und erneut bei 95°C für 10 min inkubiert. Der nun durch Reduktion entstandene blaue Phosphomolybdat-Komplex wurde nach Abkühlen photometrisch bei einer Wellenlänge von 820 nm bestimmt.

Extinktionen von Leerwert, Standards und Proben wurden in Glasküvetten der Schichtdicke 1 cm gemessen. Der Null-Abgleich des Photometers erfolgte durch den Reagenzienleerwert. Für alle Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Phosphatmenge in den eingesetzten Proben errechnete sich aufgrund der Linearität der Eichkurve mittels Dreisatz aus den Extinktionswerten von Probe und Standard.

3.5.3 HPLC-Analytik der Phosphatidylcholin-Spezies

3.5.3.1 Festphasenextraktion von Phosphatidylcholin

Nach Extraktion (s. o.), enthielten die Proben sowohl Phosphatidylcholin (PC)-Spezies, als auch alle anderen hydrophoben Bestandteile (Phosphatidylinositol, Phosphatidylglycerole, Phosphatidylethanolamine, hydrophobe Proteine) und Neutrallipide. Eine genaue molekulare Differenzierung der einzelnen PC-Spezies mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie ist nur nach ihrer Abtrennung von den anderen Phospholipiden möglich.

Zur Abtrennung der PC-Spezies aus dem Gesamtpospholipid-Gemisch (PL-Gemisch) wurde eine Festphasenextraktion mit Aminopropylsäulen

durchgeführt [14, 15]. Einer definierten Extraktmenge (300-500 nmol PL-Gemisch für Plasma und LLF, 1000 nmol PL-Gemisch für Lunge und Leber) wurde zuerst 100 nmol (für die Organe) bzw. 50 nmol (für Plasma und LLF) Dimyristoyl-PC (PC14:0/14:0)¹³ als interner Standard beigemischt. Anschließend wurden die organischen Lösungsmittel unter Stickstoffstrom bei 37 °C eingedampft und die Extrakte in 1 ml Chloroform gelöst. Danach wurde das Gemisch auf Einmal-NH₂-Säulen überführt. Alle Phospholipide binden dabei an die Aminopropyl-Phase, während Neutrallipide nicht gebunden werden. Glasröhrchen wurden sorgfältig mit Chloroform nachgespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls auf die Säulen gegeben. Im zweiten Schritt wurden durch zweimaliges Spülen mit 1 ml Chloroform unter Sog die Neutrallipide komplett entfernt. Im dritten Schritt erfolgte dann die Eluierung des Phosphatidylcholins und des Sphingomyelins durch 1 ml Chloroform/Methanol (2+1, v/v). Das Eluens wurde in HPLC-Gefäßen aufgefangen, sofort unter Stickstoffstrom eingedampft und in 125 µl Trifluorethanol (TFE) gelöst. Erfolgte nicht sofort nach Elution die HPLC-Analytik, wurden die Proben zwischenzeitlich bei -30°C eingefroren.

Durch dieses Verfahren blieben anionische Phospholipide (PG, PI, PA, PS), einfache freie Fettsäuren und Phosphatidylethanolamin (PE) an die stationäre Phase der Säule gebunden und konnten somit die HPLC-Analytik nicht mehr stören. Zur HPLC-Analytik befanden sich nur die molekularen Spezies von PC sowie Sphingomyelin und der interne Standard (PC14:0/14:0) in den Probegefäßen.

¹³Dimyristoyl-PC (PC14:0/14:0), 2µmol/ml, gelöst in Trifluorethanol, Sigma, Steinheim

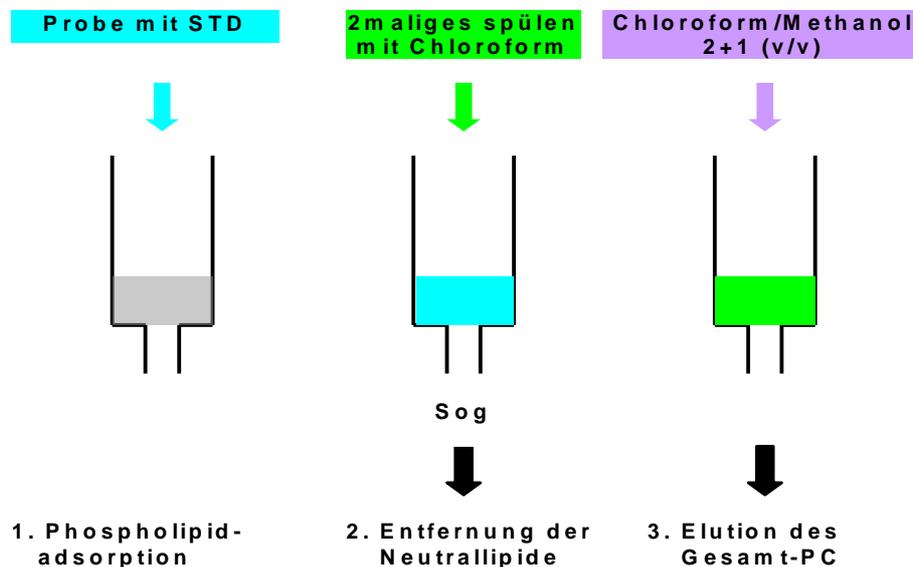


Abb. 3.3: **Schema zur Durchführung einer Festphasenextraktion.** Erläuterung siehe Text.

3.5.3.2 Bestimmung der individuellen Phosphatidylcholin-Spezies mit Hilfe der Umkehrphasen- Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie stellt eine effektive Methode dar, eine selektive Trennung verschiedener Substanzen in einem Gemisch zu erreichen. Hierbei unterliegt sie denselben Trennprinzipien wie andere chromatographische Verfahren. Die Besonderheit dieser Methode ist, dass die mobile Phase in hohem Druck über eine kleinporige Trennsäule („stationäre Phase“) gepresst wird. Vorteile sind eine hohe analytische Trennschärfe durch Verwendung kleiner Partikelgrößen (ca. 1-10 μm) in der stationären Phase, eine stark verkürzte Analysedauer durch Verwendung von starken Pumpensystemen und eine gute Reproduzierbarkeit. Nachteilig ist jedoch der hohe apparative Aufwand, da sämtliche verwendete Geräte hohen Gegendrücken von bis zu 250 bar ausgesetzt sind. Tabelle 3.1 zeigt die Bestandteile des verwendeten Systems.

Trennsäule (stationäre Phase)	Sphere-Image S5-ODS, 2,5µm Porengröße, 250 x 4 mm Innendurchmesser (Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef)
Autoinjektor	L-7200 Autosampler ¹⁴
Eluens (mobile Phase)	925:75:7 Methanol:H ₂ O:Cholinchlorid (v/v/w)
Eluenspumpe	L-7100 HPLC-Pumpe ¹⁴ , Flow 1ml/min
UV-Detektor	D-7455 Diode-Array-Detector ¹⁴ , Extinktion 205nm
Derivatisierungspumpe	L-7100 HPLC-Pumpe ¹⁴ , Flow 2,5ml/min
Nachsäulen-Derivatisierung	2,5l H ₂ O, 300µl Brij ® 35 (25%ig), 125µl 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (1 mg/ml)
Säulenthermostat	Jet-Stream 2 plus-Säulenofen ¹⁴ , eingestellt auf 50°C
Fluoreszenzdetektor	L-7485 Fluoreszenzdetektor ¹⁴ , Exzitation 340nm/Emission 460nm
Interface zur softwaregestützten Datenauswertung	D-7000 Interface ¹⁴
Auswertungssoftware	D-7000 HPLC-System-Manager ¹⁴

Tab. 3.1: **Bestandteile des verwendeten HPLC-Systems.**

Die hier verwendete Methode einer Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) nach [101] stellt eine Sonderform der HPLC dar.

¹⁴ Merck Hitachi, Darmstadt

Hierbei besteht im Gegensatz zur klassischen HPLC die stationäre Phase aus einem unpolaren Kieselgelgerüst an das ein Polymer gebunden ist. Dadurch verhält sie sich hydrophob. Der Trennmechanismus beruht bei dieser Technik auf der Hydrophobizität der zu trennenden Stoffe. Phosphatidylcholine mit langkettigen und gesättigten Fettsäuren benötigen länger zum passieren der Trennsäule als solche mit kurzkettigen und ungesättigten Fettsäuren, da sie stärker an die hydrophobe stationäre Phase gebunden werden. Der polaren mobilen Phase (Eluens) aus Methanol und H₂O wurde zur Absättigung unspezifischer ionischer Bindungsstellen in der Trennsäule Cholinchlorid beigemischt um einer Peakverbreiterung vorzubeugen. Abbildung 3. 4 zeigt schematisch den Aufbau der verwendeten RP-HPLC-Anlage.

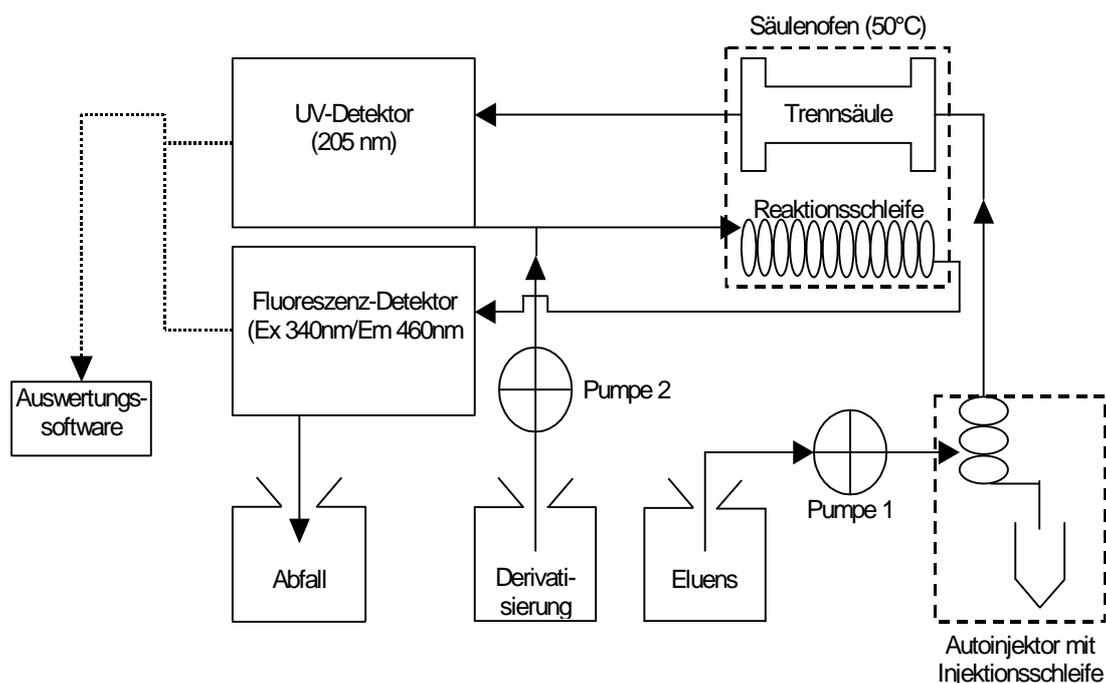


Abb. 3.4: **Flussdiagramm einer RP-HPLC mit Nachsäulen-Derivatisierung.** Pumpe 1: Eluenspumpe, Flow 1 ml/min; Pumpe 2: Derivatisierungspumpe, Flow 2,5 ml/min. Erläuterung siehe Text.

Die Identifikation der einzelnen PC-Spezies gelang mittels einer Nachsäulen-Derivatisierung und anschließender Fluoreszenzmessung in Anwesenheit von

1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH). Dabei wurde über ein T-Stück und eine zweite Pumpe dem Eluens nach Durchfluss durch den UV-Detektor eine wässrige Derivatisierungslösung mit Detergens (Brij 35 ®) und Diphenylhexatrien zugemischt. Der in der Derivatisierungslösung enthaltene Polyalkylenglykolether (Brij 35 ®) fungiert als Detergens, welcher die Mizellenbildung induziert und die Bindung des Fluorogens (DPH) an die Kapillaren verhindert. Durch Einlagerung des 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien in die sich im H₂O-Überschuss bildenden Mizellen wird die Fluoreszenz von DPH (Exzitation 340 nm; Emission 460 nm) verstärkt. Die Fluoreszenz-Emission verhält sich dabei bei einer Temperatur von 50°C proportional zur eingesetzten Stoffmenge der individuellen PC-Spezies [101].

Damit ließ sich die Zusammensetzung der individuellen molekularen Spezies von PC bestimmen. Da sich dieser Zusammenhang auch auf den verwendeten internen Standard (Dimyristoyl-Phosphatidylcholin, PC14:0/14:0, s. Kap. 3.5.3.1) bezieht, konnte anhand des Verhältnisses der Peakfläche von Standard zur Peakfläche der einzelner PC-Spezies auch die Stoffmenge errechnet werden. Die Gesamtposphatidylcholinmenge entsprach der Summe aller Einzelspezies. Die prozentuale molekulare Zusammensetzung wurde bestimmt, indem die Summe aller PC-Spezies gleich 100 % gesetzt wurde.

Die in diesem Versuchsaufbau ebenfalls verwendete UV-Messung bei 205 nm erleichterte lediglich die Identifikation einzelner PC-Spezies, da diese je nach Anzahl der Doppelbindungen ein unterschiedliches UV/FL-Verhältnis haben. Eine quantitative Aussage bezüglich der gemessenen Stoffmenge ist mit UV-Detektion jedoch nicht möglich (siehe [13, 14, 15]).

Die Zuordnung der Peaks zu den einzelnen molekularen Spezies der Phosphocholine erfolgte durch Phosphatidylcholin-Standards und definierten Vergleichschromatogrammen [13, 14, 15, 16, 101]. Abbildungen 3.5 A und B zeigen typische Fluoreszenz-Chromatogramme von Lungen- und Lebergewebe eines 7d-Tieres. Die Zusammensetzung der Einzelspezies dieser Gewebetypen im Vergleich ist sehr unterschiedlich, für das jeweilige Gewebe jedoch hochspezifisch und charakteristisch (s. Ergebnissteil, Kap. 4 ff.).

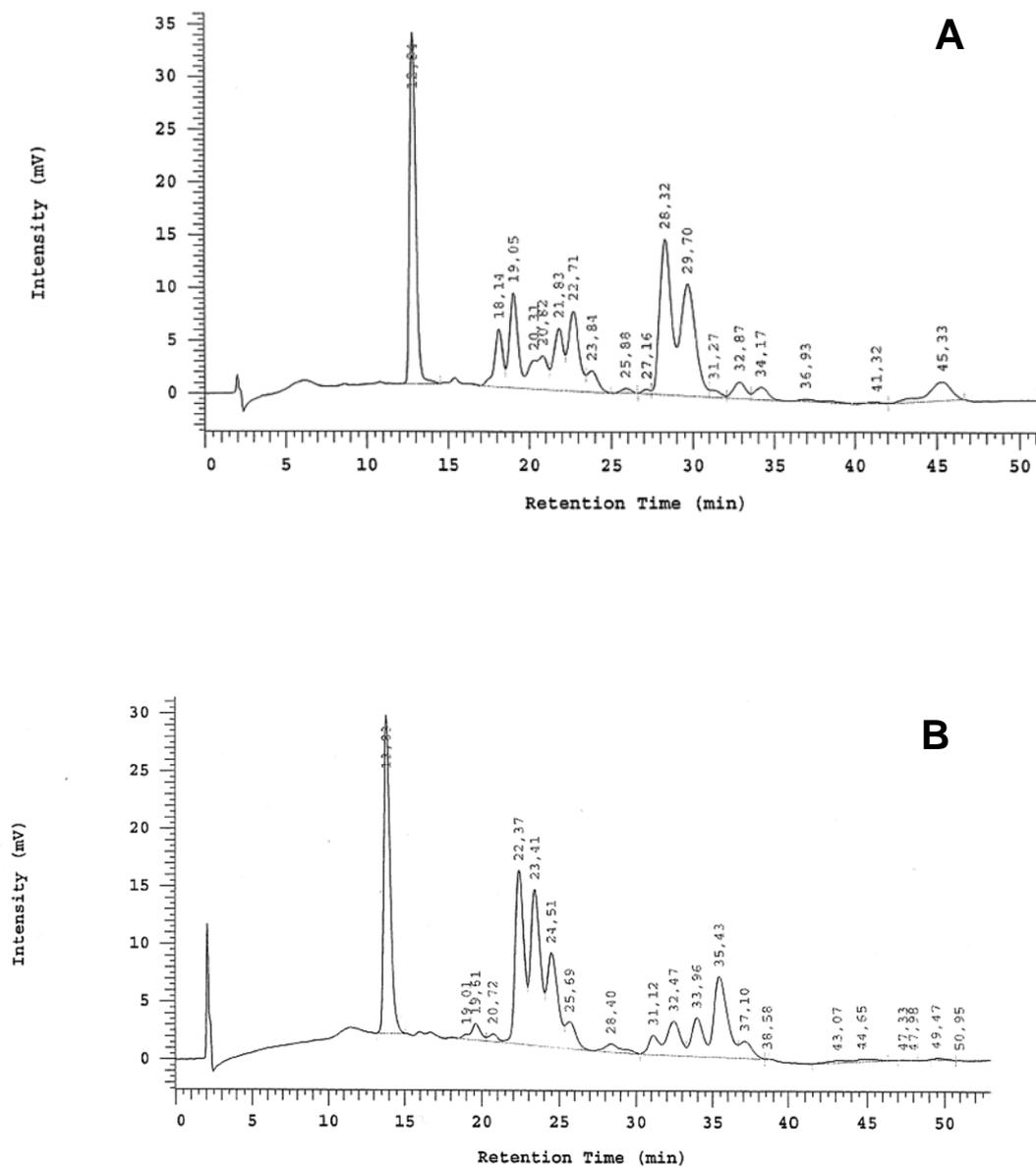


Abb. 3.5 A, B: **Typische FL-Chromatogramme** von Extrakten von Lungen- (A) und Leber- (B) Gewebe eines 7 Tage alten Kontrolltieres. Erläuterung zu den Peaks s. Text.

Zur Identifikation diene sowohl die jeweilige Retentionszeit (RT) als auch die Reihenfolge, in der die Einzelsubstanzen detektiert wurden. Die Retentionszeit selbst wird durch bestimmte Gegebenheiten beeinflusst und ist innerhalb einer Messreihe bei gleichen Stoffen nie identisch. So haben beispielsweise die Ge-

samtlänge der verwendeten Kapillaren, Temperatur, Umgebungsdruck oder das Alter der Trennsäule einen verlängernden Effekt.

In der Reihenfolge ihres Auftretens wurden folgende Einzelspezies im Analysat bestimmt:

Für Lungengewebe und Lavageflüssigkeit (s. Abb. 3.5 **A**):

Peak 1 (RT ca. 13,0min):	PC14:0/14:0 („Standard“)
Peak 2 (RT ca. 18,0min):	Sphingomyelin
Peak 3 (RT ca. 19,0min):	PC16:0/14:0
Peak 4 (RT ca. 20,3min):	PC16:0/16:1
Peak 5 (RT ca. 21,8min):	PC16:0/20:4
Peak 6 (RT ca. 22,7min):	PC16:0/18:2
Peak 7 (RT ca. 23,8min):	PC18:1/18:2
Peak 8 (RT ca. 25,9min):	nicht identifizierte PC-Spezies
Peak 9 (RT ca. 28,3min):	PC16:0/16:0
Peak 10 (RT ca. 29,7min):	PC16:0/18:1
Peak 11 (RT ca. 31,3min):	PC18:1/18:1
Peak 12 (RT ca. 32,9min):	PC18:0/20:4
Peak 13 (RT ca. 34,2min):	PC18:0/18:2
Peak 14 (RT ca. 36min):	nicht identifizierte PC-Spezies

Für Lebergewebe und Blutplasma (s. Abb. 3.5 **B**):

Peak 1 (RT ca. 13,8min):	PC14:0/14:0 („Standard“)
Peak 2 (RT ca. 19,6min):	Sphingomyelin
Peak 3 (RT ca. 20,7min):	PC16:0/14:0
Peak 4 (RT ca. 22,4min):	PC16:0/22:6
Peak 5 (RT ca. 23,4min):	PC16:0/20:4
Peak 6 (RT ca. 24,5min):	PC16:0/18:2
Peak 7 (RT ca. 25,7min):	PC18:1/18:2
Peak 8 (RT ca. 28,4min):	nicht identifizierte PC-Spezies
Peak 9 (RT ca. 31,1min):	PC16:0/16:0
Peak 10 (RT ca. 32,5min):	PC16:0/18:1
Peak 11 (RT ca. 34,0min):	PC18:0/22:6
Peak 12 (RT ca. 35,4min):	PC18:0/20:4
Peak 13 (RT ca. 37,1min):	PC18:0/18:2
Peak 14 (RT ca. 38,5min):	nicht identifizierte PC-Spezies

Rechengrundlage zur Bestimmung der Poolgröße in der LLF bildete [16]. Mittels der dort publizierten Werte zur Gesamtmenge an Phosphatidylcholin in Lungenspülflüssigkeit und einer Regressionsgeraden wurde der durchschnittliche prozentuale Anteil von Phosphatidylcholin innerhalb des Surfactantgemischs über die postnatale Entwicklung berechnet. Folgende Prozentwerte wurden dabei berücksichtigt: für 3d 86,92% PC von PL, für 7d 85,15% PC von PL, für 15d 83,56% PC von PL, für 21d 82,86% PC von PL. Zur Poolgrößenbestimmung des lavagierten Lungengewebes wurden die mittels RP-HPLC aufgetrennten Stoffmengen der Einzelspezies über den internen Standard berechnet. Ihre Summe ergab die Gesamtstoffmenge an Phosphatidylcholin.

HPLC-Analytik wurde sowohl an Extrakten von lavagiertem Lungengewebe und LLF der 3d-, 7d-, 15d-, und 21d- Tiere, als auch an Plasmaextrakten und Leberextrakten von 7d- und 21d- Tieren durchgeführt. Zu Beginn jeder Analysereihe wurde ein Testlauf mit Gesamtlungenextrakt adulter Kontrolltiere

durchgeführt. Standardmäßig wurden 52 μ l (Leber-/Lungengewebe) oder 77 μ l (BALF/Plasma) der Probelösung bei einem Waste-Volumen von 2 μ l injiziert.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programmpaket Graph Pad InStat Version 4¹⁵. Alle angegebenen Daten sind Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (eng. Standard deviation - SD). Eine Testung auf Normalverteilung erfolgte über die Methode nach Kolmogorov und Smirnov. Als statistisches Testverfahren für Gruppenvergleiche kamen die univariate Varianzanalyse (eng. **analysis of variance** - ANOVA) und die Bonferroni-Korrektur zur Anwendung. Alle Parameter wurden auf Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen innerhalb der jeweiligen Altersklasse untersucht.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf 5 % festgelegt ($p < 0,05$). Folgende Signifikanzniveaus wurden angegeben:

versus Kontrolle		versus Betamethason		versus rhKGF	
$p < 0,05$	*	$p < 0,05$	#	$p < 0,05$	§
$p < 0,01$	**	$p < 0,01$	##	$p < 0,01$	§§
$p < 0,001$	***	$p < 0,001$	###	$p < 0,001$	§§§

¹⁵ Graph Pad Software, San Diego, CA, USA

4 Ergebnisse

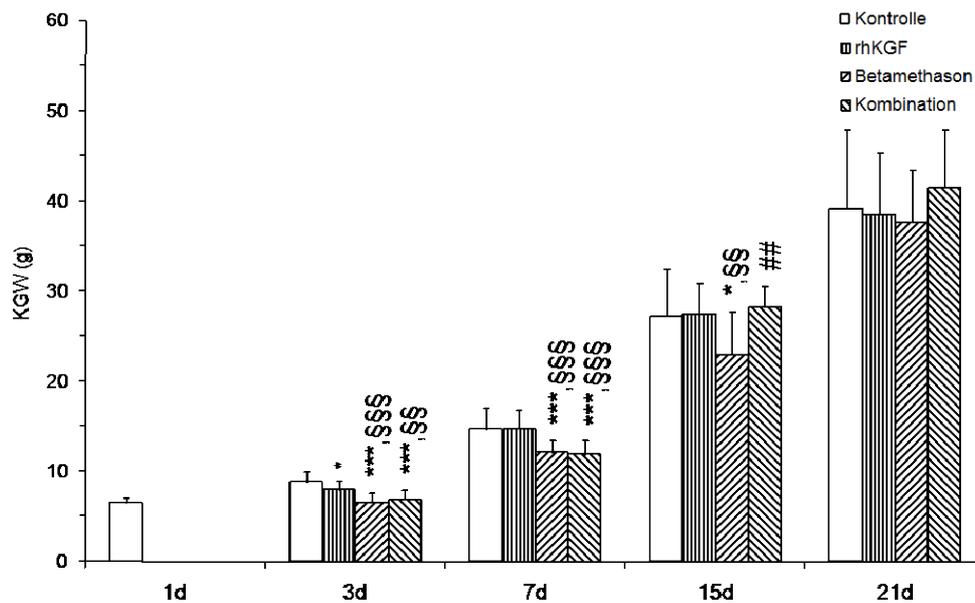
4.1 Körpergewicht nach rhKGF- und Betamethason-Behandlung

Alle Tiere wiesen zu Beginn der Behandlung identische Gewichte auf. Das Körpergewicht der Ratten ohne rhKGF- bzw. Betamethasonbehandlung stieg kontinuierlich von 1d ($6,68 \pm 0,51$ g) bis 21d ($39,08 \pm 8,92$ g) an (s. Abb. und Tab. 4.1).

Eine zweitägige Gabe von 1 mg / kg KGW Betamethason resultierte in einem Sistieren bzw. einer Verminderung der Gewichtszunahme verglichen mit den Kontrollen an 3d, 7d und 15d, nicht aber an 21d.

Eine alleinige Behandlung mit 5 mg / kg KGW rhKGF hatte gegenüber den Kontrolltieren keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung (s. Abb. und Tab. 4.1). Verglichen mit den Betamethason- oder Kombinationstieren waren signifikant höhere Gewichte an 3d und 7d zu verzeichnen. Am Ende der Alveolarisierungsphase (21d) waren zwischen den Gruppen keine Unterschiede messbar.

Eine Kombination von rhKGF und Betamethason führte an den Tagen 3 und 7 zu keinem Unterschied gegenüber der alleinigen Betamethasontherapie, hingegen waren am Tag 15 die Werte identisch zu den Kontrollen und signifikant höher als bei den Betamethasontieren.



	Kontrolle (n=12-30)	rhKGF (n=10-24)	Betamethason (n=10-27)	Kombination (n=10-24)
1d KGW (g)	6,68 ± 0,51			
3d KGW (g)	8,89 ± 1,06	8,03 ± 0,95 *	6,59 ± 1,09 ***,§§§	6,92 ± 1,05 ***,§§
7d KGW (g)	14,74 ± 2,33	14,80 ± 2,09	12,18 ± 1,32 ***,§§§	11,91 ± 1,58 ***,§§§
15d KGW (g)	27,21 ± 5,27	27,49 ± 3,43	23,02 ± 4,72 *,§§	28,31 ± 2,30 ##
21d KGW (g)	39,08 ± 8,92	38,50 ± 6,85	37,70 ± 5,83	41,50 ± 6,43

Abb. und Tab. 4.1: **Gewicht nach 2 Tagen rhKGF bzw. Betamethason-Behandlung.** Die Tiere wurden behandelt wie unter 3.3 beschrieben. Daten sind MW ± SD, N=12-30. Abkürzungen: KGW=Körpergewicht; * p<0,05, *** p<0,001 versus Kontrolle; ## p<0,01 versus Betamethason; §§ p<0,01, §§§ p<0,001 versus rhKGF.

4.2 Größe der Phospholipidpools

Bei allen untersuchten Probenmaterialien (Lungen- und Lebergewebe, LLF und Blutplasma) wurde die Stoffmenge an Gesamtphospholipiden als sogenannter „Gesamtpool“ bestimmt.

Für alle untersuchten Probenmaterialien (Lungen- und Lebergewebe, Plasma und LLF) wurde aus diesen Daten der Anteil der sezernierten Phospholipide gegenüber dem Gesamtpool berechnet.

4.2.1 Phospholipidpoolgrößen in lavagiertem Lungengewebe und Lungenspülflüssigkeit

In Abb. 4.2 sind (nach Behandlungsgruppe und Alter sortiert) die Phospholipid-Poolgrößen von Lungengewebe und LLF in $\mu\text{mol total} / \text{Gesamtorgan}$ bzw. LLF dargestellt. Tab. 4.2 zeigt den relativen Anteil des LLF-Phospholipidpools am Phospholipid der gesamten Lunge („Sezernierte Fraktion“).

Die Größe des Phospholipidpools in der LLF der Kontrollgruppe wies einen charakteristischen Verlauf auf: Einer postnatal erhöhten Stoffmenge von $0,53 \pm 0,23 \mu\text{mol}$ folgte ein Abfallen auf $0,27 \pm 0,06 \mu\text{mol}$ an Tag 7 und ein Wiederansteigen nach abgeschlossener Alveolarisierung an d15 bzw. 21. Dieser grundsätzliche Verlauf wurde durch die unterschiedlichen Interventionen mit rhKGF oder Betamethason nicht beeinflusst (s. Abb. 4.2 A). Die Pools im Lungengewebe der Kontrolltiere zeigten ebenfalls einen charakteristischen Verlauf: Es kam zu einem kontinuierlichen Anstieg bis 15d.

Zu Beginn der postnatalen Lungenreife führte eine Betamethason-Gabe, alleinig oder in Kombination, zum Abfall der Gesamtpoolgröße in der Gesamtlunge bei gleichzeitigem Anstieg der Stoffmenge in der LLF.

Eine alleinige rhKGF-Gabe hingegen führte im Vergleich mit Kontrolltieren zu keinem Abfall, sondern zu einem leichten, statistisch nicht signifikanten Anstieg des intrazellulären Pools sowie gleichzeitig zu einer signifikanten Erhöhung der Phospholipidkonzentration im Surfactant (s. Abb. 4.2). Dieser Effekt war bis 15d

nachweisbar. Die entwickelten Lungen (21d) zeigten keine Reaktion auf alleinige rhKGF-Gabe.

Interessant ist zudem, dass mit zunehmender Lungenreife der alleinige Betamethason-Effekt unbedeutend wurde und nach abgeschlossener Lungenreife nach 21 Tagen nur noch die Kombination wirkungsvolle Effekte aufwies (s. Abb. 4.2).

Zusammenfassend zeigte sich unter Betamethasontherapie eine deutliche Zunahme an Phospholipid in der LLF. Allerdings geht diese massive Poolerhöhung zulasten des intrazellulären Anteils.

RhKGF führte dem gegenübergestellt zu signifikanten intraalveolären Poolerhöhungen bei gleichzeitiger Erhöhung des Gewebepools, insbesondere bei 7d- und 15d-Tieren.

Die Kombinationstherapie spiegelt bei den unreifen (3d- und 7d-)Tieren den Betamethasoneffekt wieder. In den älteren Gruppen (15d und 21d) erhöhte die kombinierte Gabe als Einzige den Lipidpool in Lunge und Lavage signifikant gegenüber den Kontrollen.

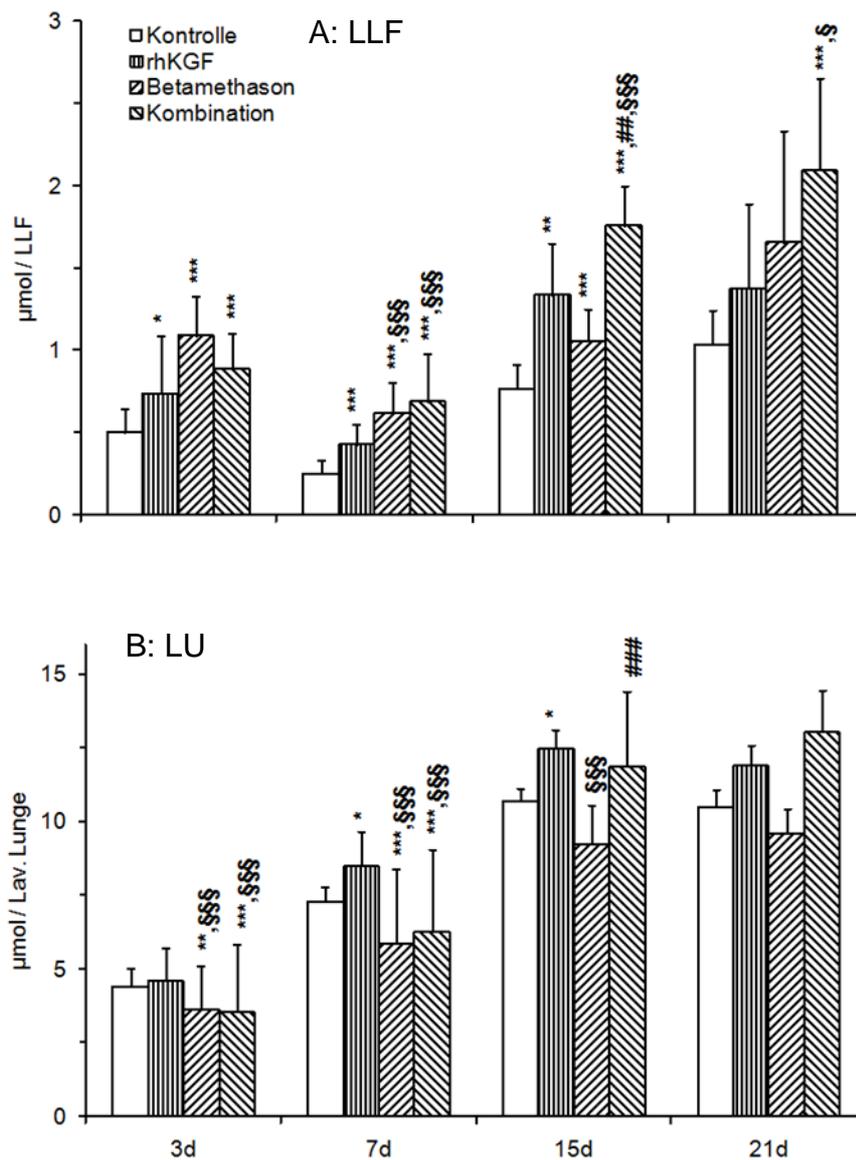


Abb. 4.2: **Phospholipidpools von Lungenlavage (A: LLF) und lavagiertem Lungengewebe (B: LU)**. Die Tiere wurden behandelt wie unter 3.3 beschrieben. LLF und Lungengewebe wurden mit Chloroform/Methanol extrahiert und die Phospholipidstoffmengen absolut und pro Gramm KGW bestimmt. Daten sind MW + SD, N=6-20. Abkürzungen: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ versus Kontrolle; ## $p < 0,01$ versus Betamethason; §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ versus rhKGF.

Alter / Behandlung	Sezernierte Fraktion (%LLF-PL von Gesamt-PL)			
	3d	7d	15d	21d
<i>Kontrolle</i>	10.4±0.9	3.6±0.2	6.3±0.6	9.4±0.9
<i>rhKGF</i>	15.9±1.3 *	5.3±0.3 *	8.2±0.7	10.5±0.6
<i>Betamethason</i>	20,76 ± 5,83 ***	10,08 ± 2,21 ***,§§§	12,20 ± 2,55 ***,§§§	11,73 ± 1,88
<i>Kombination</i>	20,87 ± 4,10 ***	11,23 ± 2,18 ***,§§§	12,65 ± 1,92 ***,§§§	14,41 ± 2,98 **,#

Tab. 4.2: **Sezernierte Fraktion (Anteil des Lavagephospholipids am Gesamtpospholipid der Lunge)**. Die Tiere wurden behandelt wie unter 3.3 beschrieben. LLF und Lungengewebe wurden mit Chloroform/Methanol extrahiert und die Phospholipidstoffmengen absolut bestimmt. Sekretionsfraktion ist der Anteil der LLF-Stoffmenge am Gesamtpospholipid von Lavage und Lunge. Daten sind MW ± SD. N=6-20. Abkürzungen: PL = Phospholipid; LLF = Lungenspülflüssigkeit; * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 versus Kontrolle; # p<0,05, versus Betamethason; §§§ p<0,001 versus rhKGF

4.3 Sphingomyelin in lavagiertem Lungengewebe und Lungenspülflüssigkeit

Abb. 4.3 zeigt, dass über die Zeit (d3-d21) der Anteil an SPH als Membranbaustein gegenüber Surfactant-Bestandteilen (PC-Spezies) zunimmt. Demgegenüber enthält LLF altersunabhängig unter 1% SPH. Die Konzentrationen von SPH in LLF und Lungengewebe werden durch die Behandlungen nicht wesentlich beeinflusst.

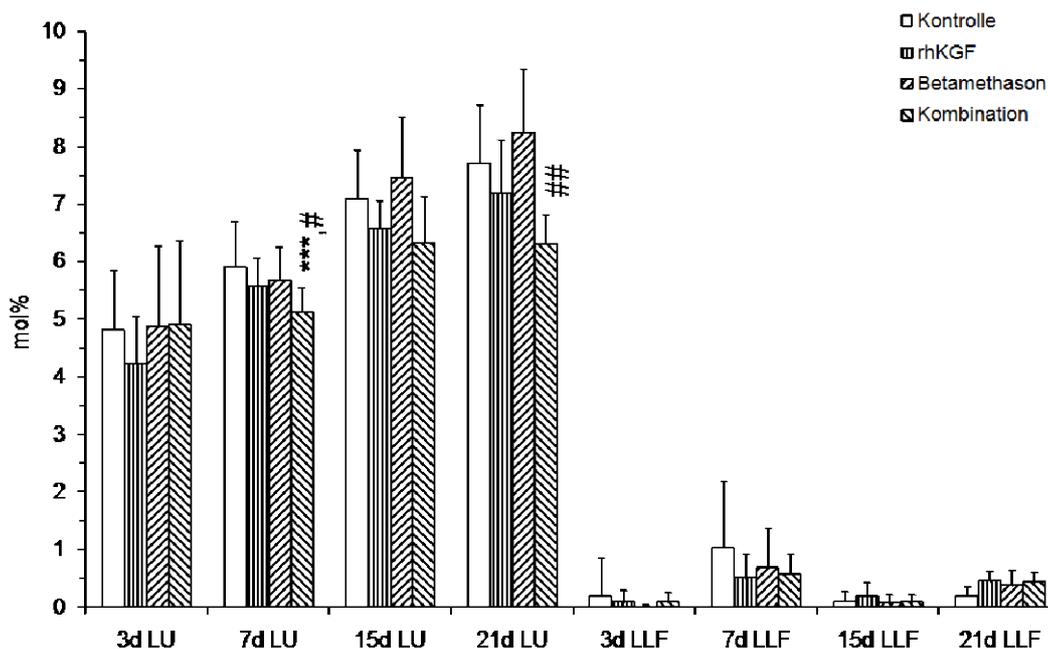


Abb. 4.3: **Spingomyelin in lavagiertem Lungengewebe (LU) und Lungenspülflüssigkeit (LLF)**. Die Tiere wurden behandelt wie unter 3.3 beschrieben. SPH wurde mittels HPLC gemessen wie unter 3.5.3 beschrieben. Werte sind % bezogen auf Gesamt-Phosphocholin in der Probe. Daten sind MW + SD, N=6-19 Tiere. Abkürzungen: LU = lavagiertes Lungengewebe; LLF=Lungenspülflüssigkeit; *** $p < 0,001$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ versus Betamethason.

4.4 Molekulare Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies in lavagierter Lunge und Lungenspülflüssigkeit

Die molekulare Zusammensetzung der einzelnen PC-Spezies erfolgte durch Auftrennung und Analyse mittels RP-HPLC (s. Kap. 3.5.3). Die Summe der Flächenintegrale aller Einzelspezies wurde gleich 100% gesetzt.

Zur besseren Verständlichkeit sind die Einzelspezies hinsichtlich ihrer vorzugsweisen Anreicherung im Surfactant (PC16:0/16:0, PC16:0/14:0, PC16:0/16:1) bzw. ihrer überwiegenden Retention im Gewebe (PC16:0/18:1, PC16:0/18:2, PC16:0/20:4, PC18:0/18:2, PC18:0/20:4) geordnet [14]. Die Auswertung wurde außerdem auf die wichtigen Einzelspezies beschränkt. Unter „andere PC“ wurden die quantitativ weniger wichtigen (PC18:1/18:2,

PC18:1/18:1) oder mit HPLC nicht identifizierbaren PC-Spezies subsummiert (s. Abb. 3.5).

4.4.1 Molekulare Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies in Lungengewebe und Lungenspülflüssigkeit

Abb. 4.4 und Abb. 4.5 zeigen die molekularen PC-Zusammensetzungen in Lunge und Lavageflüssigkeit der einzelnen Alters- und Behandlungsgruppen.

In der Kontrollgruppe konnte die PC-Zusammensetzung und der postnatale Entwicklungsverlauf, wie er in früheren Studien beschrieben wurde, bestätigt werden [12, 13]: Wichtigster Bestandteil im Gewebe und in der LLF ist PC16:0/16:0. Es ist initial nach Geburt hoch und fällt im Verlauf während der Alveolarisierung um ca. 1/3 des Ausgangswertes ab (s. Abb. 4.4, 4.5 *Kontrollen*). Im Gegensatz dazu verläuft die Entwicklung des PC16:0/14:0 umgekehrt. PC16:0/14:0 ist initial nach Geburt niedrig und verdreifacht seine Konzentration bis zum Abschluss der Alveolarisierung (s. Abb. 4.4, 4.5 *Kontrollen*). Bei beiden Lipiden war dieser Verlauf sowohl im Gewebe als auch in der Lavage nachzuweisen. Die anderen Bestandteile änderten sich bei den Kontrolltieren über den Entwicklungszeitraum nicht wesentlich.

In Abb. 4.5 sind die Ergebnisse der Untersuchungen der LLF dargestellt. Es zeigte sich, dass keine der angewandten Therapien einen Einfluss auf die generelle PC-Zusammensetzung des sezernierten Surfactants hatte.

Im Gewebe (Abb 4.4) waren demgegenüber sehr wohl Effekte nachzuweisen: RhKGF, Betamethason oder deren Kombination erhöhten den Anteil von Surfactant-PC (PC16:0/16:0, PC16:0/14:0, PC16:0/16:1) bei gleichzeitiger Verminderung der Gewebe-PC (PC16:0/18:1, PC16:0/18:2, PC16:0/20:4, PC18:0/18:2, PC18:0/20:4).

RhKGF wie auch Betamethason allein waren in der sich entwickelnden Lunge (3d-15d) effektiv und erhöhten die Surfactant-spezifischen PC zulasten der membran- bzw. gewebespezifischen und ubiquitären Komponenten (Abb. 4.4 A-D *Betamethason, rhKGF*).

Die Kombinationstherapie erwies hingegen auch in der alveolarisierten Lunge eine deutliche Zunahme des Anteils an PC16:0/16:0 und PC16:0/14:0.

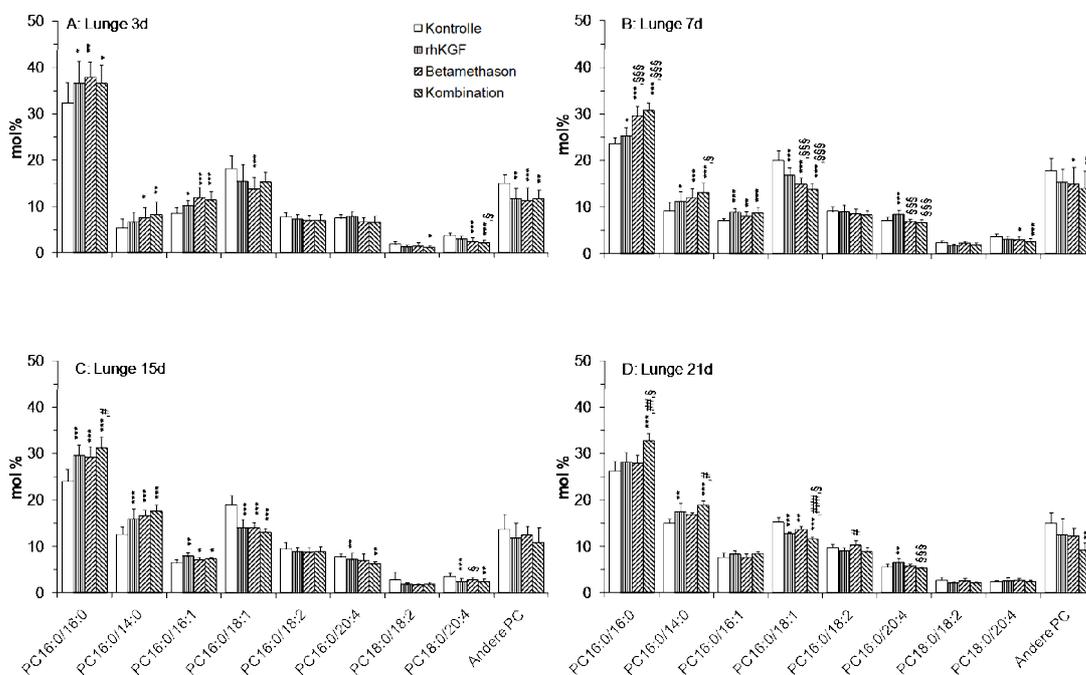


Abb. 4.4: Molekulare Zusammensetzung der PC-Spezies in lavagiertem Lungengewebe der 3-21d-Tiere (A-D) nach Behandlung mit rhKGF/Betamethason. Die Tiere wurden behandelt wie unter 3.3 beschrieben. Phosphatidylcholin wurde mittels RP-HPLC in seine molekularen Spezies aufgeteilt (s. Kap. 3.5.3). Angegeben sind nur PC-Spezies. „Andere PC“ ist die Summe aus PC 18:1/18:2, PC 18:1/18:1 und der nicht zu identifizierenden Spezies. Daten sind MW + SD, N=7-20. Abkürzungen: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ versus Betamethason; § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ versus rhKGF.

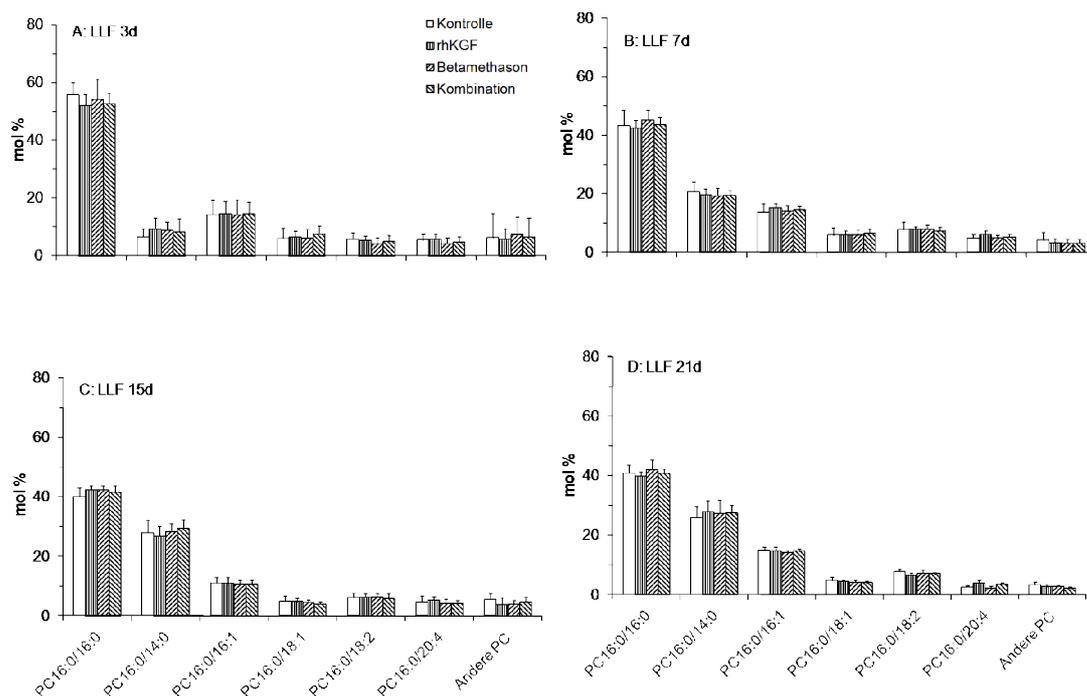


Abb. 4.5: Molekulare Zusammensetzung der PC-Spezies in Lungenlavageflüssigkeit der 3-21d-Tiere (A-D) nach Behandlung mit rhKGF/Betamethason. Die Tiere wurden behandelt wie unter 3.3 beschrieben. Phosphatidylcholin wurde mittels RP-HPLC in seine molekularen Spezies aufgeteilt (s. Kap. 3.5.3). Angegeben sind nur PC-Spezies. „Andere PC“ ist die Summe aus PC 18:1/18:2, PC 18:1/18:1 und der nicht zu identifizierenden Spezies. Daten sind MW + SD, N=7-20. Abkürzungen: LLF=Lungenlavageflüssigkeit; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ versus Betamethason; § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ versus rhKGF.

4.5 Größe des Phosphatidylcholin-Pools in Lunge und Lavageflüssigkeit

Der Anteil des Phosphatidylcholin am Gesamtphospholipid wurde in lavagiertem Lungengewebe und LLF als absolute Stoffmenge berechnet. Rechengrundlage zur Bestimmung des Anteils des Gesamt-PC in der Lavage bildete [16] (näheres s. Kap. 3.5.3.2).

4.5.1 Gesamt-Poolgrößen

In Tab. 4.3 ist der Gesamt-Pool der PC-Einzelspezies in Lavage und Lungengewebe dargestellt.

Alter / Behandlung	N	Gesamt-PC lav. Lunge (μmol)	Gesamt-PC LLF (μmol)
3d			
<i>Kontrolle</i>	19	1,66 \pm 0,41	0,43 \pm 0,13
<i>rhKGF</i>	13	1,89 \pm 0,22 ##	0,64 \pm 0,32
<i>Betamethason</i>	15	1,36 \pm 0,38	0,94 \pm 0,22 ***
<i>Kombination</i>	15	1,32 \pm 0,47 \$\$	0,77 \pm 0,19 ***
7d			
<i>Kontrolle</i>	20	2,89 \pm 0,62	0,21 \pm 0,07
<i>rhKGF</i>	17	3,38 \pm 0,51 *	0,37 \pm 0,11
<i>Betamethason</i>	20	2,33 \pm 0,46 **, \$\$\$	0,52 \pm 0,16 ***
<i>Kombination</i>	18	2,54 \pm 0,30 \$\$\$	0,58 \pm 0,25 ***, \$\$
15d			
<i>Kontrolle</i>	13	3,95 \pm 0,83	0,64 \pm 0,12
<i>rhKGF</i>	14	4,63 \pm 1,35 #	1,11 \pm 0,26 ***, #
<i>Betamethason</i>	12	3,42 \pm 0,73	0,88 \pm 0,17 *
<i>Kombination</i>	12	5,02 \pm 0,79 *, ##	1,47 \pm 0,21 ***, ###, \$\$\$
21d			
<i>Kontrolle</i>	6	3,94 \pm 0,85	0,86 \pm 0,18
<i>rhKGF</i>	6	4,77 \pm 1,19	1,14 \pm 0,43
<i>Betamethason</i>	6	3,41 \pm 1,06	1,37 \pm 0,57
<i>Kombination</i>	6	4,97 \pm 0,75	1,73 \pm 0,46 *

Tab. 4.3: **Phosphatidylcholin-Poolgrößen in lavagiertem Lungengewebe und LLF.** Die Tiere wurden behandelt wie unter 3.3 beschrieben. Phosphatidylcholin wurde mittels RP-HPLC in seine molekularen Einzelspezies aufgeteilt und mittels des internen Standards die Stoffmenge berechnet (s. Kap. 3.5.3). Die Summe der Einzelspezies ergab die Gesamt-Phosphocholinmenge. Zur Bestimmung der Phosphocholinstoffmenge in der LLF siehe Kap. 3.5.3.2. Daten sind MW \pm SD der angegeben Stückzahlen. Abkürzungen: PC = Phosphatidylcholin; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ versus Betamethason; \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$ versus rhKGF.

Postnatal stieg bei den Kontrollen analog zur Gesamtlipidmenge (s. Abb. 4.2 B) die Menge an Gesamt-PC bis 15d in der lavagierten Lunge an. Gleichzeitig verringerte sich im Entwicklungsverlauf die PC-Menge in der Lavage von 3d auf 7d und stieg dann wieder.

RhKGF erhöhte postnatal die intrazelluläre PC-Menge signifikant gegenüber Betamethason. Die alleinige rhKGF-Gabe erwies sich im Lungengewebe dabei auch bei den 7d-Tieren als effektiv. Zudem wurde auch der PC-Pool im Surfactant dieser Tiere absolut erhöht.

Betamethason erniedrigte die Gewebe-PC-Menge bei den 3d und 7d-Tieren und erhöhte gleichzeitig die Surfactant-PC-Menge dieser Tiere. In den Alterstufen 15d und 21d hatte Betamethason keinen nennenswerten Einfluss.

Die Kombination beider Stoffe unterschied sich von den Effekten der Einzelsubstanzen. Direkte postnatale Applikation führte zu einem leichten Abfall des intrazellulären Pools bei gleichzeitiger Erhöhung in der LLF. Bei den 7d-, 15d- und 21d-Tieren kam es, verglichen mit den Kontrolltieren, nach kombinierter Gabe zu einer Verdopplung der Poolgröße der PC in der LLF. Ein Abfall im Lungengewebe, wie nach Betamethason-Therapie, trat hingegen nicht auf, was auf einem antagonisierenden Effekt durch rhKGF beruht.

4.5.2 Einflüsse von rhKGF, Betamethason oder Kombination auf Poolgrößen der wichtigsten Surfactant-Bestandteile

Während die Pharmaka die PC-Zusammensetzung im Surfactant nicht änderten, induzierten sie eine altersabhängig differenzielle Umverteilung der intrazellulären PC-Spezies zugunsten „Surfactant-spezifischer“ (PC16:0/16:0, PC16:0/14:0, PC16:0/16:1) Komponenten und zulasten der „Nicht-Surfactant-spezifischen“ PC-Spezies (PC16:0/18:1, PC16:0/18:2, PC16:0/20:4, PC18:0/18:2, PC18:0/20:4) (Abb. 4.4 A-D). In Abb. 4.6 sind die Poolgrößenveränderungen dieser PC-Gruppen gegenübergestellt.

Auf die Surfactant-PC bezogen wird deutlich, dass alleinig rhKGF in den Altersgruppen 3d, 7d und 15d eine Poolgrößenvermehrung bewirkte. Unter

Betamethason alleine blieben die Konzentrationen im Vergleich mit Kontrollen lediglich stabil. Die Kombination beider Substanzen war bei den älteren Tiergruppen (15d und insbesondere 21d) deutlich überlegen.

Betamethason führte hingegen zu einem Abfall der Nicht-Surfactant-PC in allen Altersgruppen. Bei 3d und 7d war dieser Effekt auch in den Kombinationstieren nachzuweisen, jedoch nicht bei 15d und 21d. rhKGF hat somit in diesen Altersgruppen den Betamethason-Effekt antagonisiert.

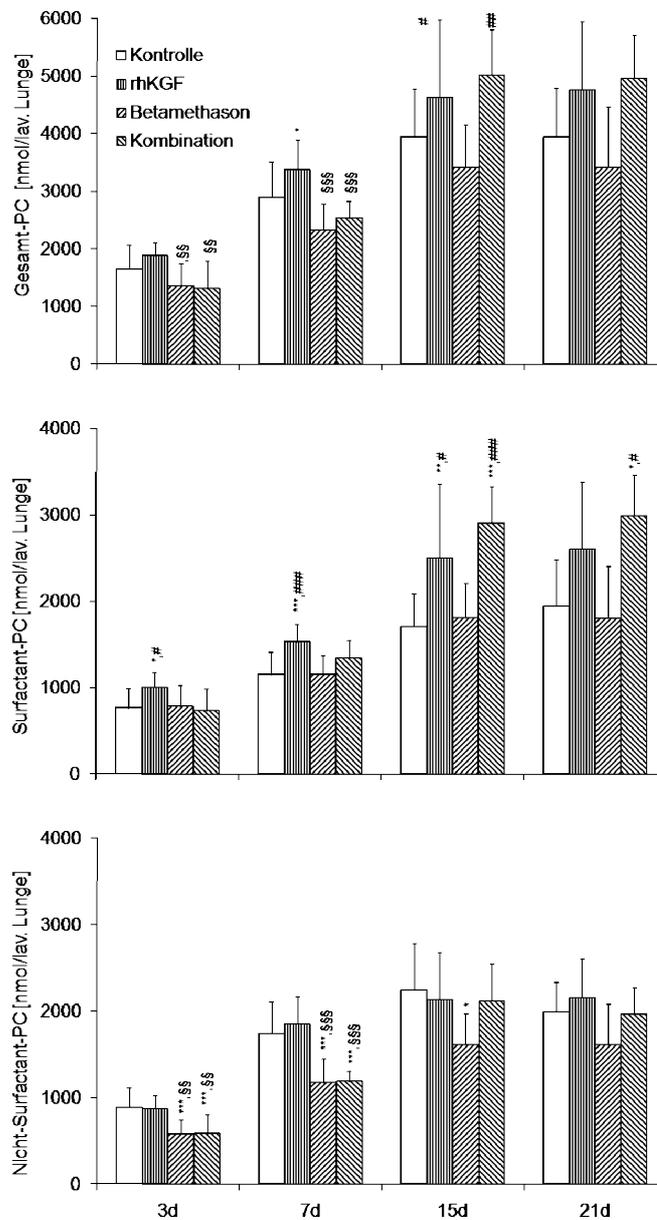


Abb. 4.6: Einflüsse von rhKGF, Betamethason oder Kombination auf Poolgrößen der wichtigsten Surfactantbestandteile in der lavagierten Lunge. Die Tiere wurden behandelt wie unter 3.3 beschrieben. Phosphatidylcholin wurde mittels RP-HPLC in seine molekularen Einzelspezies aufgeteilt und mittels des internen Standards die Stoffmenge berechnet (s. Kap. 3.5.3). Gesamt-PC ist Summe aller Einzelspezies. Surfactant-PC ist die Summe aus PC16:0/16:0, PC16:0/14:0, PC16:0/16:1. Nicht-Surfactant-PC ist die Summe aus PC16:0/18:1, PC16:0/18:2, PC16:0/20:4, PC18:0/18:2, PC18:0/20:4 und den nicht identifizierten Spezies. Daten sind MW + SD. N=6-20. Abkürzungen: PC = Phosphatidylcholin; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ versus Betamethason; §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ versus rhKGF.

4.6 Phospholipid-Poolgrößen in Leber und Blutplasma

Tab. 4.4 und Abb. 4.7 zeigen die Phospholipid-Poolgrößen von Leber und Plasma der 7d- und 21d-Tiere, was entwicklungsphysiologischen Zeitpunkten während und nach der pulmonalen Alveolarisierung entspricht. Gleichzeitig sind die Plasma-Stoffmengen pro ml Blutplasma der 7d- und 21d- Tiere angegeben.

Es stellte sich heraus, dass lediglich die Kombinationstherapie entwicklungsabhängig bei älteren Tieren (21d) signifikant Einfluss auf den Leber-Gesamtpool hatte. An d7 erhöhten sowohl rhKGF als auch Betamethason die Plasma-Phospholipide signifikant (s. Abb. 4.6 **B**) während das - wie bei der Abwesenheit von Einzeleffekten auf Lungen- und LLF-Phospholipide - bei 21d nicht der Fall war. Analog der Wirkung einer kombinierten Behandlung auf die Lunge erhöhte die Kombination jedoch an beiden Zeitpunkten die Phospholipidkonzentration im Plasma.

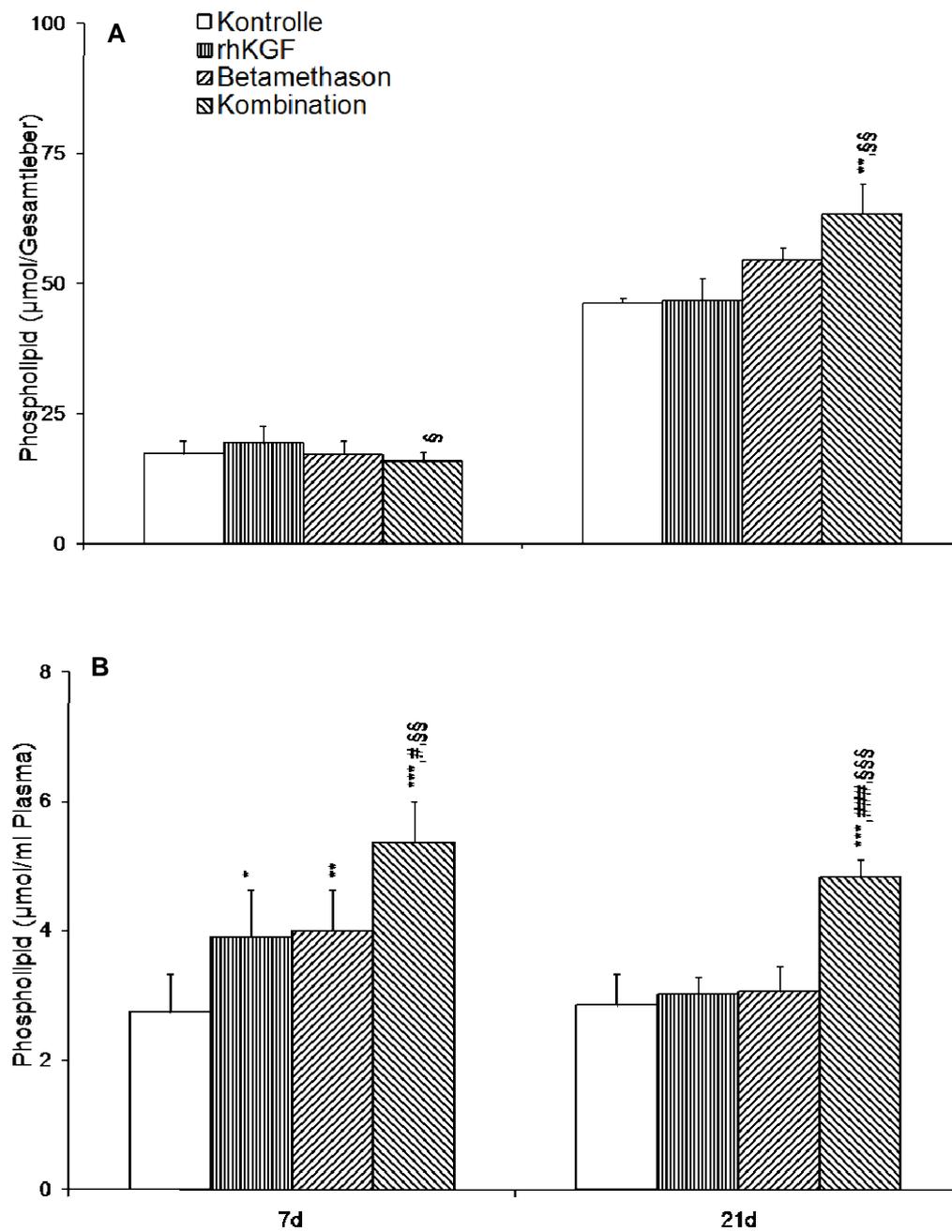


Abb. 4.7: **Phospholipidstoffmengen von Lebergewebe (A) und Blutplasma (B)**. Die Tiere wurden behandelt wie unter 3.3 beschrieben. Plasma und Lebergewebe wurden mit Chloroform/Methanol extrahiert und die Phospholipidstoffmengen pro Gesamtleber und pro ml Blutplasma bestimmt. Daten sind MW + SD. N=3-9. Abkürzungen: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ versus Betamethason; § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ versus rhKGF.

	n	Organ- gewicht (g)	PL / Leber (μmol)	PL / ml Plasma ($\mu\text{mol/ml}$)
7d				
<i>Kontrolle</i>	8	0,53 \pm 0,04	17,36 \pm 2,47	2,74 \pm 0,60
<i>rhKGF</i>	9	0,55 \pm 0,06	19,50 \pm 3,11	3,91 \pm 0,72 **
<i>Betamethason</i>	8	0,48 \pm 0,06	17,27 \pm 2,57	3,99 \pm 0,63 *
<i>Kombination</i>	9	0,64 \pm 0,09 *,#,§§§	15,83 \pm 1,79 §	5,37 \pm 0,64 ***,#,§§
21d				
<i>Kontrolle</i>	3	1,46 \pm 0,04	46,19 \pm 1,13	2,85 \pm 0,49
<i>rhKGF</i>	3	1,44 \pm 0,10	46,78 \pm 5,76	3,02 \pm 0,28
<i>Betamethason</i>	3	1,74 \pm 0,07	54,59 \pm 2,44 **	3,06 \pm 0,40
<i>Kombination</i>	3	2,16 \pm 0,39 *,§	63,56 \pm 5,76 **,§§	4,84 \pm 0,26 ***,###,§§§

Tab. 4.4: **Phospholipidstoffmengen von Lebergewebe und Blutplasma.** Die Tiere wurden behandelt wie unter 3.3 beschrieben. Plasma und Lebergewebe wurden mit Chloroform/Methanol extrahiert und die Phospholipidstoffmengen absolut und pro Gramm KGW (für Lebergewebe) und pro ml Blutplasma (für Blutplasma) bestimmt. Daten sind MW \pm SD der angegebenen Stückzahlen. Abkürzungen: PL = Phospholipid; KGW = Körpergewicht; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ versus Betamethason; § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ versus rhKGF.

4.7 Molekulare Zusammensetzung von PC in Leber und Blutplasma

Die molekulare Zusammensetzung der PC-Spezies in Leber und Blutplasma unterschied sich fundamental von derjenigen der Lungen- und Lavageextrakten (vgl. Abb. 4.4, 4.5 und 4.8 A-D).

Mengenmäßig standen in der Leber die PC-Spezies mit polyunsaturierten Fettsäuren (PUFA) wie Arachidonsäure (20:4) und Docosahexaensäure (22:6), in der sn-2-Position des PC im Vordergrund. Wichtigste Vertreter waren Palmitoylarachidonoyl-PC (PC16:0/20:4), Palmitoyldocosahexaenoyl-PC (PC16:0/22:6), Steaorylarachidonoyl-PC (PC18:0/20:4) und Steaoryldocosahexaenoyl-PC (PC18:0/22:6). Diese sind in den folgenden

Abbildungen als erste beschrieben. Danach folgen Komponenten, die die Hauptmenge der Zellmembranen ausmachen (PC16:0/18:2, PC16:0/18:1, PC18:0/18:2, PC18:1/18:2). Unter „andere PC“ wurden nicht identifizierbare und quantitativ hier eher unbedeutende Komponenten (PC16:0/14:0, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1) subsumiert.

4.7.1 Molekulare Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies in Leber und Blutplasma

Die wichtigen polydesaturierten Fettsäuren (PC16:0/20:4, PC16:0/22:6, PC18:0/20:4, PC18:0/22:6) machten bei den 7d-Kontrolltieren ca. 68% des Gesamtanteils der PC aus. Bei den 21d-Kontrolltieren sank der Anteil auf insgesamt ca. 44% (s. Abb 4.8 A, B). Auch im Plasma war der PUFA-Anteil an 7d mit ca. 40% gegenüber ca. 26% an 21d wesentlich höher. Im Lebergewebe der unreifen Tiere senkte Betamethason alleine oder in Kombination mit rhKGF den PUFA-Anteil gegenüber Kontrollen auf ca. 50% Gesamtanteil. rhKGF hingegen zeigte keine Verringerung der PUFA (s. Abb. 4.8 A).

Bei den 21d-Tieren führte Betamethason zu einer Erhöhung des PC18:0/20:4 bei gleichzeitiger Verringerung des PC16:0/22:6. rhKGF alleine oder die Kombination hatten keine wesentlichen Auswirkungen in dieser Altersklasse.

Im Plasma der 7d- und 21d-Tiere waren nur geringe Veränderungen messbar. Lediglich Kombinationsgabe bei den 7d-Tieren führte zu einer Verringerung der PUFA bei gleichzeitiger leichter Erhöhung der eher membranständigen Anteile.

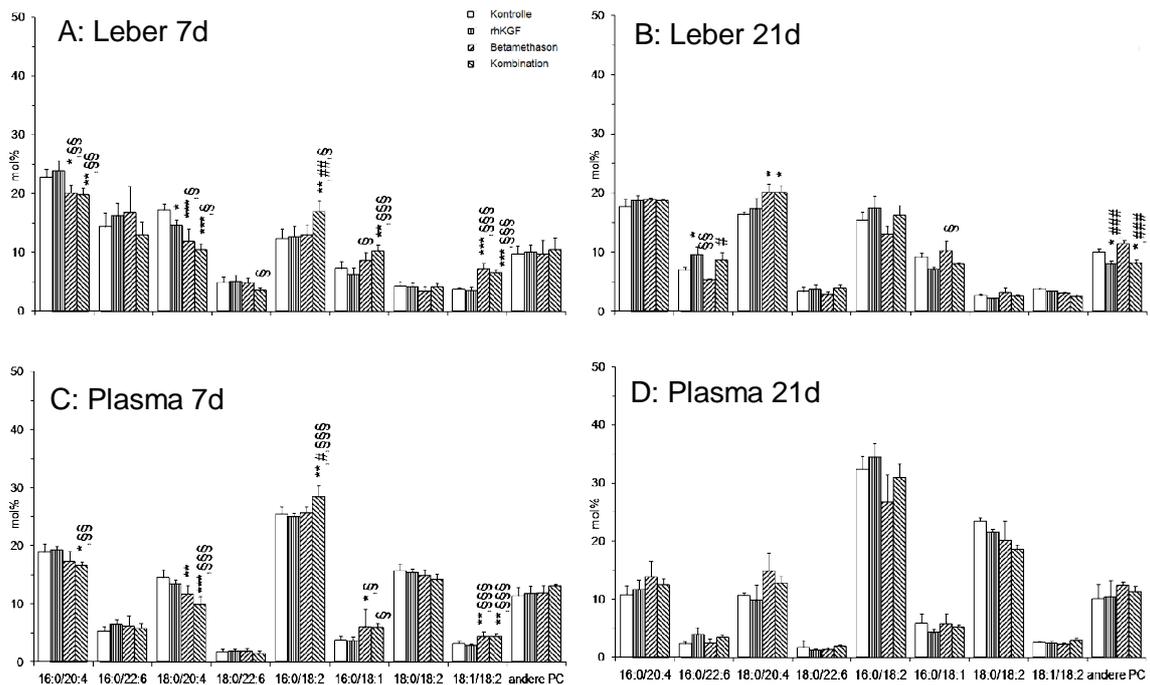


Abb. 4.8: **Prozentuale molekulare Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies in Lebergewebe und Plasma bei 7d und 21d alten Ratten.** Die Tiere wurden behandelt wie unter 3.3 beschrieben. Phosphatidylcholin wurde mittels RP-HPLC in seine molekularen Einzelspezies aufgeteilt (s. Kap. 3.5.3). Angegeben sind nur PC-Spezies. „Andere PC“ ist die Summe aus PC 16:0/14:0, PC 16:0/16:0, PC 16:0/16:1 und der nicht zu identifizierenden Spezies. Daten sind MW + SD, N=3-8. Abkürzungen: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ versus Betamethason; § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ versus rhKGF.

4.8 Größe des Phosphatidylcholin-Pools in Leber und Plasma

4.8.1 Gesamt-Poolgrößen

In Tab. 4.5 sind die Gesamt-Poolgrößen der PC aus Gesamtleber und Plasma dargestellt.

	Gesamt-PC Leber (μmol)	Gesamt- PC Plasma ($\mu\text{mol/ml}$)
7d		
<i>Kontrolle</i>	7,02 \pm 1,02	1,48 \pm 0,32
<i>rhKGF</i>	7,61 \pm 1,21	2,27 \pm 0,42 ***
<i>Betamethason</i>	6,71 \pm 0,98	2,28 \pm 0,36 ***
<i>Kombination</i>	6,57 \pm 0,74	2,92 \pm 0,35 ***,##,§§
21d		
<i>Kontrolle</i>	19,44 \pm 0,48	1,59 \pm 0,27
<i>rhKGF</i>	21,01 \pm 2,60	1,85 \pm 0,17
<i>Betamethason</i>	22,75 \pm 1,02	1,75 \pm 0,23
<i>Kombination</i>	29,71 \pm 2,69 **,#,§§	3,01 \pm 0,16 ***,###,§§§

Tab. 4.5: **Phosphatidylcholin-Poolgrößen in Leber und Plasma.** Die Tiere wurden behandelt wie unter 3.3 beschrieben. Phosphatidylcholin wurde mittels RP-HPLC in seine molekularen Einzelspezies aufgeteilt und mittels des internen Standards die Stoffmenge berechnet (s. Kap. 3.5.3). Die Summe der Einzelspezies ergab die Gesamt-Phosphocholinmenge. Daten sind MW \pm SD. N=3-9. Abkürzungen: PC = Phosphatidylcholin; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ versus Betamethason; §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ versus rhKGF.

Bei den eher unreifen Tieren hatten rhKGF, Betamethason oder deren Kombination keinen Einfluss auf den Gesamtpool der PC in der Leber. Im Plasma dieser Tiere erhöhten rhKGF und Betamethason gleichermaßen die PC-Konzentration um das 1,5-fache. Die Kombination beider Substanzen verdoppelte sogar das Gesamt-PC.

Bei den 21d-Tieren war - im Gegensatz zu den unreifen Tieren - auch ein Effekt in der Leber nachzuweisen: Die Kombination erhöhte den Pool um nahezu 50%. Im Plasma dieser Altersgruppe verdoppelte die kombinierte Gabe die PC-Konzentration. Die alleinige Gabe von rhKGF oder Betamethason hatten bei den reifen Tieren keinen Effekt auf den Gesamt-Pool im Plasma.

4.8.2 Einfluss von rhKGF, Betamethason oder Kombination auf den Arachidonoyl-PC-Pool

Abb. 4.8 zeigt den Pool aus der Summe von Palmitoylarachidonoyl-PC (PC16:0/20:4) und Steaorylarachidonoyl-PC (PC18:0/20:4) pro Gesamtleber und pro ml Plasma bei 7d und 21d alten Ratten.

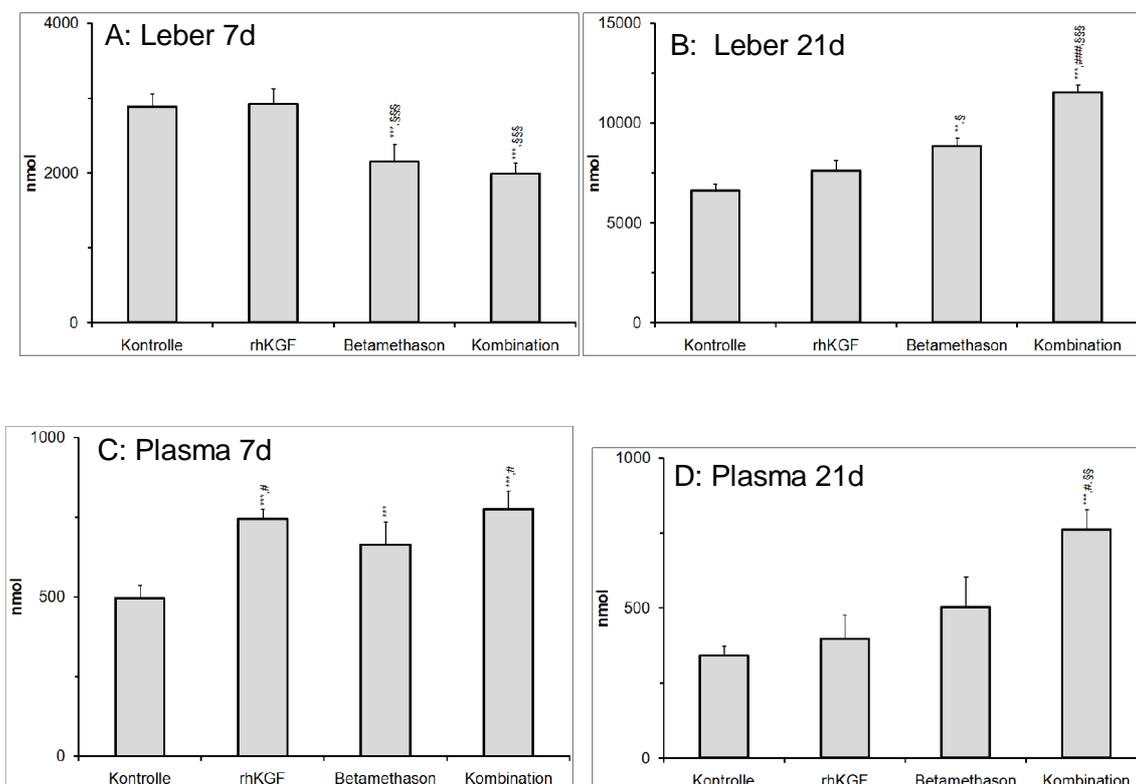


Abb. 4.9: Einflüsse von rhKGF, Betamethason oder Kombination auf die Poolgröße des Arachidonoyl-PC-Pools in Leber (A, B) und Plasma (C, D) bei 7d und 21d alten Ratten. Die Tiere wurden behandelt wie unter 3.3 beschrieben. Phosphatidylcholin wurde mittels RP-HPLC in seine molekularen Einzelspezies aufgeteilt und mittels des internen Standards die Stoffmenge berechnet (s. Kap. 3.5.3). Die Summe aus PC16:0/20:4 und PC18:0/20:4 ergab den Arachidonoyl-PC-Pool. Daten sind MW + SD. N=3-9. Abkürzungen: PC = Phosphatidylcholin; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ versus Betamethason; §§ $p < 0,01$, §§§ $p < 0,001$ versus rhKGF.

Im Lebergewebe zeigte sich nach Betamethasongabe, ob alleinig oder in Kombination, ein Abfall der 20:4-PUFA um nahezu 30% bei den unreifen Tieren. Gleichzeitig stieg bei diesen Tieren die Plasmakonzentration der 20:4 an (s. Abb. 4.9 A, C).

Im Gegensatz dazu blieb der 20:4-PUFA-Pool unter rhKGF alleine in der Leber konstant und die Plasma-Konzentration wurde erhöht (s. Abb. 4.9 A, C).

In den reiferen Tieren hatte nur die Kombination nennenswert Einfluss: Im Vergleich zu den Kontrollen verdoppelte sie die 20:4-Konzentrationen in Leber und Plasma.

5 Diskussion

5.1 Klinischer Kontext

Ein voll entwickeltes und an die physiologischen Bedingungen angepasstes Surfactant-System ist Grundvoraussetzung für die Lungenatmung. Surfactant erfüllt dabei sowohl stabilisierende, als auch immunologische Aufgaben im Rahmen angeborener und adaptiver Abwehrmechanismen. Klinisch vorrangiges Problem in der Neonatologie ist jedoch das akute respiratorische Versagen Frühgeborener aufgrund Mangel an Surfactant (Atemnotsyndrom Frühgeborener=ANS bzw. infant respiratory distress syndrome=IRDS) durch Unreife der Lunge.

Surfactantmangel und IRDS stehen im Kontext von Erkrankungen die zur Frühgeburtlichkeit führen, d. h. insbesondere amniotische Infektionen, Plazenta- und Zervixanomalien und Mehrlingsschwangerschaften, pränataler Behandlung mit Glucocorticoiden (Betamethason) und postnataler Behandlung mit toxischen Sauerstoffkonzentrationen, letzteres um eine ausreichende Oxygenierung des Blutes und Sauerstoffversorgung der Organe Neugeborener zu erreichen.

In die Überwindung der vitalen Bedrohung des z. T. hochgradig unreifen Organismus von lediglich 24 Wochen Gestationsalter hinein entwickelt sich als Spätfolge häufig eine chronische Lungenerkrankung (Bronchopulmonale Dysplasie=BPD), die heutzutage weniger eine Fibrose vom Typus des klassischen Beatmungsschadens ist („old BPD“), als vielmehr eine Entwicklungsstörung der Lunge („developmental arrest“) mit alveolärer Rarefizierung, verringerter Gasaustauschfläche und verkleinerten Atemwegen, die im errechneten Alter von 36 Schwangerschaftswochen einen erhöhten inspiratorischen Sauerstoffbedarf bedingen („new BPD“) [50, 55]. Diese Entwicklungsstörung steht im Kontext von medikamentöser Behandlung, Apoptose durch endogene inflammatorische Prozesse sowie iatrogener Einflüsse wie Sauerstoff und Beatmung. Zudem ist die BPD eine klinische

Diagnose, deren Abwesenheit nicht besagt, dass eine ehemalige „Frühchen-Lunge“ strukturell unauffällig ist [7, 28, 55, 87, 128].

Die normalerweise zur „Lungenreifeinduktion“ eingesetzte antenatale Gabe von Glukokortikoiden erwies sich in den vergangenen Jahrzehnten bezüglich der Überlebensrate sehr unreifer Frühgeborener wegen der „Lungenreifeinduktion“ als erfolgreich [50, 56, 59]. Die Nebenwirkungen und pulmonalen und neuronalen Spätfolgen implizierten aber gleichzeitig die Suche nach Alternativen. Zudem konnte sie die Entwicklung einer Bronchopulmonalen Dysplasie nicht verhindern [128].

Im Kontext einer erfolgreichen IRDS-Prophylaxe und -Therapie durch Glukokortikoide, jedoch unter Persistenz krankheitsspezifischer und iatrogener chronischer Lungenschädigung, erschien es naheliegend, nach einer surfactantstimulierenden, epithelprotektiven und anabolen Alternative zu Glukokortikoiden zu suchen, die auch die Option einer BPD-Prophylaxe beinhaltet. Glucocorticoide wirken generell katabol und lösen das „BPD-Problem“ nicht, während die pulmonalen Konzentrationen spezifischer Faktoren (wie rhKGF) invers mit der Rate der BPD-Entwicklung korrelieren [33].

Als vielversprechender Ansatz erscheint hier die Verwendung von Keratinozytenwachstumsfaktor. In einer Reihe experimenteller Studien konnten an fetalen Zellen proliferative, antiapoptotische, Surfactant-Protein-mRNA-induzierende und Lipid-Synthese-steigernde Wirkungen gezeigt werden [19, 29, 78, 84, 128]. Fehrenbach und Mitarbeiter haben in einer tierexperimentellen Arbeit an adulten Rattenlungen *in vivo* nach intratrachealer Instillation von rhKGF eine Proliferation der Typ-II-Pneumozyten festgestellt. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass die intrazellulären Speichervesikel (Lamellar-Körperchen) nach rhKGF-Gabe an Größe abnahmen. Daraus wurde geschlossen, dass rhKGF eine Proliferation induziert, der Absolutgehalt an Surfactant pro Lunge aber unverändert bleibt [39].

Im Gegensatz zu den Vorarbeiten von Fehrenbach et al., die adulte Versuchstiere mit voll entwickelter Lunge verwendet haben, wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal *in vivo* die Effekte von rekombinatem humanem Keratinozyten-

Wachstumsfaktor (rhKGF; Palifermin®) auf das Surfactant-System bei unreifen Rattenlungen vor, während und nach der Alveolarisierungsphase untersucht. Außerdem wurde zum ersten Mal die Standardtherapie zur „Lungenreifeinduktion“ durch Glukokortikoide direkt mit rhKGF an der sich entwickelnden Lunge verglichen.

Im Vergleich zu und in Kombination mit Betamethason wurden die Einflüsse einer 2-tägigen systemischen Vorbehandlung mit rhKGF auf die Gesamtlipidmenge sowie die molekulare Zusammensetzung der individuellen Phosphatidylcholin-Spezies in LLF, lavagiertem Lungengewebe, Leber und Blutplasma zu unterschiedlichen Zeitpunkten an dem sich entwickelnden Rattenneugeborenen untersucht.

5.2 Methodenkritik

5.2.1 Tiermodell der sich entwickelnden Lunge am Beispiel der Ratte

Bei allen Tiermodellen bestehen generell Schwierigkeiten in der direkten Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen. Das einzige Modell für den Menschen, auch in experimenteller Hinsicht, ist letztlich der Mensch, während Tiermodelle bei vergleichend physiologisch korrekter Einordnung sowohl in ihren Ähnlichkeiten als auch in den Unterschieden konzeptionell und interpretatorisch hilfreich sind. Vorteil dieses Rattenmodells ist jedoch, dass eine Untersuchung des Surfactants in Abhängigkeit der strukturellen Reifung der Lungen bei Spontanatmung, d. h. ohne artifizielle Beatmung, stattfinden kann. Die neugeborenen Tiere befinden sich an Tag 3 noch in der sacculären Phase. Verglichen mit humanen Lungen entspricht dies etwa dem Reifegrad in der 28. Gestationswoche. Neugeborene Ratten sind zu diesem Entwicklungszeitpunkt aber lebensfähig. An Tag 4-14 findet bei Ratten die Hauptphase der Alveolenbildung statt, der die Ausbildung des einschichtigen Kapillarnetzes in der dritten Lebenswoche folgt. Eine Besonderheit der Ratte ist, dass sie ca. an d5-7 einen extrem niedrigen Pool an sezerniertem Surfactant aufweist [16], was dieses Modell bei suffizienter Spontanatmung als

Approximation eines Surfactantmangels zulässt. In diesem Kontext ist dieses Rattenmodell ohne hohen apparativen Aufwand, sowie ohne Störfaktoren wie Intubations- und Beatmungsschäden und -artefakte, anwendbar.

5.2.2 Labormethoden der Phospholipid- und Phosphocholinalyitik

Die angewandten Methoden der Phospholipidanalytik gehören zur etablierten Methodik. Sie ermöglichen einen Vergleich mit früheren Publikationen. Die HPLC-Analytik zur Separation der einzelnen PC-Spezies in Lunge, Leber, Plasma oder LLF ist zudem valide für diese einzelnen Proben. Wie in Kap. 2 schon angesprochen, weisen sie ein bestimmtes Pattern an PC-Spezies auf, welches für diese Gewebe hochspezifisch ist.

Nachteil insbesondere der HPLC-Methode ist der hohe apparative Aufwand und die Notwendigkeit der Verwendung organischer Lösungsmittel für alle lipidanalytischen Techniken.

5.2.3 Systemische Applikation von rhKGF und Betamethason

Wie sich schon in früheren Puplicationen [39, 54] zeigte, haben sowohl rhKGF als auch Betamethason nachweisbaren Einfluss auf die Surfactanthomöostase. Das Besondere dieser Arbeit ist, das erstmalig ein *in vivo*-Vergleich an unreifen Lungen auf differenziertem lipidanalytischem Niveau durchgeführt wurde, um die klinische potenz von rhKGF gegenüber Betamethason auszuloten. Ein Einfluss der Trägersubstanzen (PBS) zur Pharmakonapplikation konnte durch Vergleich mit einer Kontrollgruppe, welche lediglich reines PBS bekommen hatte, ausgeschlossen werden.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Effekte von rhKGF und Betamethason auf den Surfactant-Pool

Eine Reihe Faktoren, die den Surfactant-Metabolismus beeinflussen, wurden bislang identifiziert. Dies sind z. B. Atemfrequenz, Entwicklungsalter, körperliche

Belastung und eine Reihe von Erkrankungen (s. Kap. 2). Die Halbwertszeit von Surfactant ist zudem bei Neugeborenen wesentlich höher, als bei erwachsenen Organismen. Neugeborene Lungen führen verbrauchte Surfactant-Bestandteile vorrangig einem Recycling-Prozess zu, während adulte und unreife Lungen diese eher verstoffwechseln [64].

Die postnatale Entwicklung des Gesamtphospholipid-Pools in der Lunge unterliegt dabei gewissen Gesetzmäßigkeiten. Dem initial hohen Anteil an intrazellulär gespeicherten und sezernierten Phospholipid folgen postnatal - bei Ratten mit Beginn der Alveolarisierung - ein Abfallen der Poolgrößen und ein Wiederansteigen zum Ende der Alveolen-Bildung [118]. In dieser Arbeit konnte dieser generelle entwicklungsabhängige Verlauf anhand der Kontrolltiere bestätigt werden (s. Kap. 4.5.1 und Tab. 4.3).

Wirkungen von rhKGF und Betamethason bei unreifen Tieren (3d und 7d) waren eine Verdopplung des Gesamtpools (Betamethason) bzw. eine 46%ige Erhöhung durch rhKGF in der Lungenspülflüssigkeit, d. h. im sezernierten Surfactant. In den Lungen dieser Tiere erniedrigte Betamethason jedoch den pulmonalen Pool von Gesamt-PL und Gesamt-PC um jeweils ca. 20%. Hier zeigte rhKGF eindeutige Vorteile (insbesondere bei den 7d-Tieren): Sowohl Gewebe-PC-Pools als auch Lavage-PC-Pools waren um 17 bzw. 14% erhöht (s. Tab. 4.3). In reiferen Lungen (15d und 21d) bewirkte nur noch die Kombination beider Substanzen eine Poolerhöhung.

Diese Ergebnisse bedeuten, dass es unter Betamethasongabe zwar zu einer PC-Vermehrung im extrazellulären Surfactant kommt, diese aber zulasten des intrazellulären Anteiles geschieht. Insbesondere der Anteil der „Nicht-Surfactant-spezifischen“ PC wird durch Betamethason im Gewebe vermindert (s. Abb. 4.6). Insgesamt ist somit kein „Plus“ an Surfactant und PL vorhanden, was das Konzept stützt, dass Betamethason zwar eine Differenzierung des Typ-II-Pneumozyten induziert, dieses aber im Rahmen seiner allgemein katabolen Wirkungen auf Kosten der pulmonalen Gesamthomöostase abläuft.

Im Gegensatz dazu erhöhte rhKGF den sezernierten und intrazellulären Speicherpool. Insbesondere bei den 7d-Tieren führte die rhKGF-Gabe zu einem

deutlichen „Plus“ an Gewebephospholipid bei gleichzeitigem Anstieg der PL-Stoffmenge in der LLF. Es fand also nur nach rhKGF-Gabe eine echte zumindest biochemische „Lungenreifeinduktion“ statt.

Bezüglich einer zukünftigen klinischen Anwendung von rhKGF sind die Ergebnisse der Gesamphospholipidanalytik und der Phosphatidylcholin-Poolgrößenberechnung interessant: Derzeit wird Frühgeborenen (bzw. deren Müttern) antenatal Betamethason zur Steigerung der alveolären Surfactant-Stoffmenge appliziert. Die hier vorgestellten Daten zeigen jedoch, dass eine rhKGF-Gabe vor und während der Alveolarisierung den PC-Pool steigern kann, ohne die systemischen Nebenwirkungen einer Cortisontherapie zu riskieren. Unter Berücksichtigung der starken Gewichtsabnahme der mit Betamethason behandelten Tiere als Ausdruck des generellen Katabolismus erscheint dieser Aspekt wesentlich (s. Abb. und Tab 4.1).

Kombinierte Gabe beider Stoffe spiegelt bei den jüngeren Tieren (bis 7d-Tiere) den Betamethasoneffekt wieder. Hier war rhKGF nicht in der Lage die katabolen Effekte der Betamethasontherapie zu antagonisieren. Ab 15d scheinen jedoch ausgeprägte additive Wirkungen vom Betamethason und rhKGF wirksam zu werden und nach abgeschlossener Alveolarisierung (21d-Tiere) ist nur die Kombination signifikant wirksam im Sinne einer Poolgrößenerhöhung von PL und PC in Lungengewebe und sezerniertem Surfactant.

Die, z. T. deutliche Poolgrößen-Zunahme bei den älteren Kombinationstieren kann damit am ehesten eine klinische Bedeutung in der Behandlung pulmonaler Erkrankungen älterer Kinder und Erwachsener mit akuten Lungenerkrankungen gewinnen, die mit einer Schädigung des Surfactantsystems einhergehen (ARDS). Im klinischen Kontext bedeutet dies, dass eine alleinige Gabe von rhKGF bei nicht völlig entwickelten Lungen in Betracht gezogen werden muss, während die kombinierte Gabe bei entwickelter Lunge zukünftig eine Rolle spielen könnte.

5.3.2 Effekte von rhKGF und Betamethason auf die Surfactant-Zusammensetzung

Hauptbestandteile der LLF von Säugetierlungen bilden die disaturierten Phosphatidylcholine Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/16:0) und Palmitoylmyristoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/14:0) sowie die einfach ungesättigten Palmitoylpalmitoleoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/16:1) und Palmitoyloleoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/18:1). Eine spezifische Leistung der Typ-II-Pneumozyten ist die selektive Anreicherung des Surfactant mit PC16:0/16:0, PC16:0/14:0 und PC16:0/16:1 [13, 15].

Im Lungengewebe sind außer den palmitinsäurehaltigen (16:0-) PC-Spezies auch Steaoryl-(18:0-) Derivate und die mehrfach ungesättigten arachidon-(20:4-) und linolsäure- (18:2-) haltigen Fettsäuren zu finden [13, 14, 16]. Postnatal sind hohe Konzentrationen an PC16:0/16:0 und PC16:0/14:0 wichtig, um niedrige Oberflächenspannungen zu garantieren. Insofern sind diese in der genaueren Betrachtung der Zusammensetzung am wichtigsten. Da 20:4 gleichzeitig als Synthesestufe für Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene und Prostazykline bei entzündlichen Reaktionen gilt, wurden die mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Auswertung ebenfalls berücksichtigt.

Generell gilt, dass der PL-Anteil des Surfactant-Komplexes in der LLF zu 80-85% aus Phosphatidylcholinen besteht. Im lavagierten Lungengewebe macht der Anteil an PC nur ca. 40-45% aus. In diesem Anteil sind allerdings PC-Spezies aller Lungenzellmembranen und die PC-Anteile der intrazellulären Surfactantspeicher, die ebenfalls aus 80-85% PC bestehen (Lamellarkörperchen) zusammengerechnet.

Kernaussage der hier präsentierten Daten zur molekularen Zusammensetzung der PC-Spezies nach Kurztherapie mit rhKGF, Betamethason oder Kombination aus beiden ist, dass sich die PC-Zusammensetzung des extrazellulären Surfactant über die postnatale Entwicklung nicht verändert, d. h. keine Therapieform verändert die Lipidkomposition bzw. -qualität des funktionell aktiven Surfactants im Alveolarraum. Im Gewebe hingegen, in dem rhKGF oder Betamethason direkt auf Typ-II-Pneumozyten einwirken, veränderte sich das

PC-Profil zum Teil erheblich zu Gunsten der surfactantspezifischen Komponenten:

Betrachtet man Abb. 4.4 genauer, fällt die Zunahme der surfactantspezifischen Einzelkomponenten (PC16:0/16:0, PC16:0/14:0, PC16:0/16:1, s. Abb. 4.4 A-D) nach Pharmakongabe auf. Es handelt sich hierbei um relative Werte bezogen auf den Gesamt-PC-Pool. Der Gesamt-PC-Pool selbst wurde jedoch durch Betamethason-Gabe erniedrigt (zwischen 13% und 24%, s. Tab. 4.3: *Gesamt-PC lav. Lunge [μmol]*). Unter Betamethasonbehandlung steht dem relativen Anstieg der Surfactant-PC-Spezies also ein Abfall der Absolutmenge an Gesamt-PC und anderer „Gewebe“-PC-Spezies gegenüber.

RhKGF führte hingegen zu einem Ansteigen der Absolutmenge an Gesamt-PC. Eine relative Erhöhung der Einzelspezies resultierte demnach auch in einer absoluten Stoffmengensteigerung. Insbesondere bei den 3d- und 7d-Tieren führte rhKGF-Gabe zu einem echten Anstieg der surfactant-spezifischen Komponenten im Lungengewebe, der jedoch nicht zu Lasten anderer Gewebe-PC- und -PL-Komponenten ging (s. Abb. 4.6). Die kombinierte Gabe von Betamethason und rhKGF wirkte sich nur nach abgeschlossener Alveolarisierung positiv auf die Surfactant-spezifischen Komponenten aus. Zu den früheren Messzeitpunkten (3d-Tiere und 7d-Tiere) spiegelte die PC-Zusammensetzung der Kombinationstiere den Betamethasoneffekt wieder.

Als Besonderheit in der PC-Zusammensetzung der Lunge nach rhKGF-Gabe stellte sich die Erhöhung des PC16:0/20:4 bei den 7d- und 21d-Tieren dar. Normalerweise fällt die Konzentration arachidonsäurehaltiger PC-Spezies bei den meisten Säugetieren kurz vor Geburt ab. Bei der Ratte ist ein Ansteigen des PC16:0/20:4 während der Alveolarisierung physiologisch [16], möglicherweise zum Zweck der postnatalen ZNS-Entwicklung. RhKGF verstärkte diesen Verlauf. Dieser Zusammenhang könnte zukünftig Bedeutung für die postnatalen Versorgung frühgeborene Kinder gewinnen, da diese zum Zeitpunkt der Geburt ebenfalls einen erhöhten Anteil an PC16:0/20:4 aufweisen [14]. Hier müssen noch nähere Untersuchungen folgen.

Die unterschiedliche Zusammensetzung der PC-Spezies im Lungengewebe hat verschiedene Ursachen: Während Betamethason aufgrund der katabolen Effekte zu einem Abfall der Gesamt-PC vorrangig zulasten der „nicht-surfactant-spezifischen PC (s. Abb. 4.6) führt, führt rhKGF zu einem Anstieg der wichtigen Komponenten (s. Abb. 4.6 „Surfactant-PC“), ohne die sonstigen PC zu beeinträchtigen. Dies kann auf Einflüsse auf die Lipogenese und zellproliferative Effekte zurückzuführen. RhKGF selbst ist ein direkter Proliferationsreiz für den Typ-II-Pneumozyten. Dies wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in vielen Studien bestätigt [19, 27, 29, 107, 129]. Letztlich bewirkt rhKGF, wegen einer Verstärkung der Speicherkapazität und einer Verbesserung des Recycling-Prozesses, ein Ansteigen der PC16:0/16:0-Konzentration im Gewebe. Eine gleichzeitige Erhöhung des wichtigen PC16:0/16:1 kann mit der Enzyminduktion der Stearyl-CoA-Desaturase in Verbindung stehen [29, 78]. Es kommt somit zu einer Anreicherung von Surfactant-spezifischen Komponenten im Gewebe.

Dass sich diese Anreicherung nicht im extrazellulären Surfactant wiederfindet, liegt offenbar daran, dass die Typ-II-Pneumozyten selektiv nach der Fettsäurenkettenlänge der Einzelspezies die Zusammensetzung sortieren, um ein möglichst effektives Gemisch extrazellulär zur Verfügung zu stellen [14].

5.3.3 Einflüsse von Betamethason und rhKGF auf den Lipid-Pool in Leber und Blutplasma

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch in der Leber rhKGF und Betamethason entwicklungsabhängig in den Lipidmetabolismus eingreifen können. Jedoch hatten weder die Einzelsubstanzen noch die Kombination bei den 7d-Tieren einen Einfluss auf den Phospholipid-Gesamtpool. Analog zu den Wirkungen auf die Lunge zeigte nur die Kombination beider Substanzen bei den reiferen Tieren eine Zunahme des PL-Pools. Warum eine alleinige rhKGF-Gabe zu keiner, die kombinierte Gabe beider Stoffe aber zu Erhöhungen der PL-Stoffmenge im Lebergewebe um bis zu 40% (s. Tab. 4.4) führte, bleibt derzeit noch offen.

Der isolierte Anstieg der PL-Konzentration im Blutplasma (ohne Zunahme der Stoffmenge im Lebergewebe) nach alleiniger Betamethason-Gabe bei den 7d-Tieren kann verschiedene Ursachen haben, z. B. Cortikosteroid-induzierte Apoptose lymphatischer Organe, vermehrte hepatische Sekretion von Lipoproteinen bis hin zur verminderten peripheren Aufnahme in die Gewebe, wie z. B. das ZNS. In unseren Untersuchungen wiesen die Betamethason-behandelten Tiere eine deutlich verkleinerte Milz und einen fast unauffindbaren Thymus auf. Dem stehen die rhKGF-Effekte auf die Plasma-PL gegenüber: in Verbindung mit seinen antiapoptotischen Effekten [113, 135] kann die Hyperphospholipidämie hier im Kontext seiner trophischen Effekte stehen. Zur Klärung der Mechanismen der Betamethason- und rhKGF-induzierten Hyperphospholipidämie sind kinetische Untersuchungen mit z. B. stabiler Isotopenmarkierung notwendig.

5.3.4 Molekulare Zusammensetzung der PC-Spezies in Leber und Blutplasma

Aus den hier gezeigten Ergebnissen zur PC-Zusammensetzung in Leber und Blutplasma lassen sich keine eindeutigen Schlüsse über die Wirkungen von Betamethason und rhKGF entnehmen. Eine weitergehende Untersuchung dieser und anderer Organsysteme, nicht nur hinsichtlich der molekularen Zusammensetzung, ist im Rahmen der differentiellen Funktionen der PC-Spezies wichtig.

Insbesondere wegen morphologischer Unterschiede, die schon makroskopisch in unserer Studie durch deutlich höhere Leberorgangewichte nach rhKGF-Gabe auffielen (s. Tab. 4.4), müssen weitere Untersuchungen folgen.

rhKGF kann in adulten Ratten schon kurz nach Applikation erhöhte Serum-Triglyceride und eine kurzzeitige Hypercholesterinämie bewirken [86]. Inwiefern dieser Zusammenhang auch für neonatale Organismen zutrifft, bzw. inwiefern die Organgewichtszunahme nach rhKGF-Gabe zur Entwicklung einer Steatose beiträgt, war nicht Thema dieser Arbeit. Auch hier ist noch unklar, ob eine erhöhte Sekretion, Resorption oder verminderte periphere Aufnahme vorliegt.

Im klinischen Kontext ist interessant, dass es nach Betamethason-Gabe bei den 7d-Tieren im Gegensatz zu rhKGF zu einem Abfall der arachidonsäurehaltigen PC-Spezies in der Leber kam. Zur postnatalen Entwicklung des ZNS sind polydesaturierte PC zur Myelin-Entwicklung essentiell. Da die Leber Hauptsyntheseort der sezernierten PC (als Lipoproteinbausteine) ist, ist Betamethason-Gabe in der Entwicklungsphase somit nicht nur wegen seiner lipolytischen Eigenschaften fragwürdig, sondern auch wegen einer möglichen ZNS-Entwicklungsstörung. Die hier erhobenen Daten zeigen nicht eindeutig, ob Betamethason im Rahmen katabolischer Prozesse eine Entleerung der Leberspeicher bewirkt. Andererseits könnte es sich um eine Uptake-Hemmung zirkulierender PC-Spezies durch Betamethason handeln. Hierzu müssen noch genauere Untersuchungen folgen, z. B. mit stabiler Isotopenmarkierung, um die Stoffflüsse *in vivo* zu klären.

5.4 Zusammenfassung und Beurteilung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Wirkungen von Betamethason und rhKGF auf die Phospholipid-Homöostase von Lunge, Plasma und Leber entwicklungsabhängig sind. Dies ergänzt und vervollständigt die Ergebnisse früherer Arbeiten, bei denen rhKGF lediglich an adulten Versuchstieren getestet wurde [39], um den wichtigen neonatologischen Aspekt.

In der Neonatologie ist Betamethason als Pharmakon nicht ungefährlich. Neben bekannten frühen Nebenwirkungen wie erhöhtes Risiko für intestinale Perforationen, gastrointestinale Blutungen, Hyperglykämien und eine arterielle Hypertension, können neurologische Spätfolgen, insbesondere Zerebralparesen auftreten [38, 50]. Bei unseren Versuchstieren ist nach systemischer 2-tägiger Glukokortikoid-Gabe eine Verringerung des Ausgangsgewichtes zwischen 16% und 26% gemessen worden. Zudem waren die Lebern der Betamethason-Tiere signifikant kleiner.

Gleichzeitige rhKGF-Gabe konnte diesen Effekt in allen Altersgruppen teilweise kompensieren. Bei den adulten Tieren zeigten sich zudem bei gleichzeitiger Gabe additive Effekte hinsichtlich der Lipidpoolgrößen von Lunge und Leber.

In der Literatur wurde in der Vergangenheit ein Zusammenhang zwischen pathologischer KGF-Erhöhung und angeborener Organmalformationen hergestellt. So scheint eine erhöhte KGF- und KGF-Rezeptor-Expression pathogenetisch bedeutsam in der Entstehung einiger Nierenerkrankungen, wie der autosomal-dominanten polyzystischen Nierenmalformation [83, 85] und der segmentalen renalen Dysplasie [114] zu sein. Auch in der sich entwickelnden Lunge beeinflusst KGF Morphogenese und „Branching“ der Alveolen [115]. Dem steht die inverse Beziehung zwischen pulmonaler KGF-Konzentration und BPD gegenüber. Die Entstehung oben genannter Erkrankungen ist zudem mit einer chronisch hohen Exposition mit KGF verbunden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine kurzfristige rhKGF-Gabe über 2 Tage deutliche Effekte auf die Lungenentwicklung haben, für die die langfristigen Folgen eher nicht gelten.

Fehrenbach et al. hatte an adulten Rattenlungen nach intratrachealer Instillation von rhKGF *in vivo* keine Poolgrößen-Zunahme der PL-Stoffmenge bestimmen können [39]. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass nach systemischer Applikation von rhKGF an der sich entwickelnden Rattenlunge die pulmonale Stoffmenge des Surfactant erhöht wird. Insofern ist davon auszugehen, dass der Surfactant-Metabolismus der neonatalen Ratte anderen Regelmechanismen als der bei adulten Tieren unterliegt.

Eine additive Wirkung von Betamethason und rhKGF wurde bei adulten Tieren auf Ebene der Surfactant-Proteine nachgewiesen. Dass sich dieser Zusammenhang auch auf den Lipidmetabolismus *in vivo* bezieht, ist bisher noch nicht untersucht worden. Die Daten zeigen zudem, dass die gewünschten Glukokortikoidwirkungen auf die PL-Homöostase nicht ausschließlich KGF-vermittelt sind. In der Literatur wurde bisher davon ausgegangen, dass KGF ein Mediator der Cortison-Wirkung sei [84, 89]. Da in diesen Ergebnissen die adulten Tieren keine Effekte auf Gabe der Einzelsubstanzen, jedoch z. T. hochsignifikante Poolgrößensteigerungen nach kombinierter Gabe zeigten,

muss dies angezweifelt und postuliert werden, dass KGF und Cortison über teilweise getrennte bzw. komplementäre Regelmechanismen an Lunge und Leber wirken. Der Stellenwert der Applikationsform (topisch oder systemisch) muss noch untersucht werden.

5.5 Fazit und Ausblick

Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass rhKGF perspektivisch eine Alternative zur gegenwärtigen Standardtherapie der „Lungenreifeinduktion“ mit Betamethason ist. In den unreifen Lungen der 3d- und 7d-Tiere waren seine Effekte auf den sezernierten Phospholipidpool vergleichbar mit denen von Betamethason. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass die Erhöhung des sezernierten Surfactant-Pools durch rhKGF nicht zu Lasten der Gewebe-Phospholipid-Speicher wie nach Betamethason-Gabe geht. Die kombinierte Gabe hatte bei den 3d- und 7d-Tieren keine additiven Effekte.

Im Gegensatz zu den Einzelsubstanzen hatte bei den älteren Tiergruppen (nach 15d und 21d) nur die kombinierte Gabe von Betamethason und rhKGF signifikant Einfluss auf den Lipidpool.

Die molekulare Zusammensetzung des sezernierten Surfactants wurde weder durch rhKGF noch durch Betamethason oder Kombinationsbehandlung verändert. Das heisst, die lipidomische Qualität des spezifischen Surfactantkomplexes wird durch rhKGF weder verbessert noch verschlechtert. Im Lungengewebe kam es durch rhKGF, im Gegensatz zu Betamethason, zur Mengenzunahme der funktionell wichtigen Einzelkomponenten PC16:0/16:0, PC16:0/14:0 und PC16:0/16:1.

In Leber und Blutplasma hatte die Einzelgabe der Stoffe keinen wesentlichen Einfluss auf die Homöostase der Phospholipidpools und PC-Zusammensetzung. Allein die kombinierte Gabe, insbesondere bei den reifen Tieren (21d) führte zu signifikanten Steigerungen der PL-Stoffmenge, dessen molekulare Ursache weiter untersucht werden sollte.

Schlussfolgernd implizieren die vorliegenden Ergebnisse den Einsatz von rhKGF insbesondere bei Frühgeborenen zur Verbesserung des Surfactantstatus, ohne die katabolen Nebenwirkungen von Glucocorticoiden in Kauf nehmen zu müssen. Bei älteren pädiatrischen oder adulten internistischen Patienten, z. B. mit ARDS könnte die kombinierte Gabe beider Substanzen eine Perspektive in der Behandlung bieten. Hier müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Viele Fragen zum Einsatz von rhKGF sind noch ungeklärt: Neben den hier offen gebliebenen Ursachen zu lipidmetabolischen Nebenwirkungen in Kombination mit Betamethason müssen noch rein praktische Untersuchungen beispielsweise zu Dosierung, Dauer und Wiederholung der Anwendung sowie Applikationsformen folgen. Wenngleich sich aus dieser Arbeit noch kein endgültiges Konzept zur standardmäßigen Therapie Frühgeborener mit rhKGF ableiten lässt, zeigen weiterführende bisher unpublizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe, dass rhKGF seine Wirksamkeit auch nach Epithelschädigung, z. B. durch nach oxidativem Stress durch hohe Sauerstoffkonzentrationen, behält und auch bei Co-Therapie mit Indometacin - als Standard zum Verschluss eines persistierenden Ductus arteriosus Botalli - wirksam bleibt. Das lässt rhKGF bei Frühgeborenen als postnatale Option zur Verbesserung von Surfactantstatus und pulmonalen, bei systemischer Gabe sogar intestinalen Apoptoseschutz zu. Die vorliegende Arbeit liefert demnach entscheidende Voruntersuchungen, die einen klinischen Einsatz dieses vielversprechenden Stoffes über die derzeitige Indikation zur Therapie von Mukosiden hinaus [8] ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Die Entwicklung eines Respiratory Distress Syndroms bei Frühgeborenen mit funktioneller Lungenunreife gehört zu den wichtigsten behandlungsbedürftigen Erkrankungen in der Neonatologie. Wesentlicher pathogenetischer Aspekt dieser Erkrankung ist der Surfactant-Mangel, der in der Folge durch erhöhte Oberflächenspannung zur Atelektasenbildung und respiratorischer Insuffizienz führt. Zwar konnten in den vergangenen Jahrzehnten immense Fortschritte in der Therapie und eine deutliche Reduktion des Mortalitätsrisikos erreicht werden, präventiv eingesetzt wird derzeit nur die ante- bzw. perinatale Gabe von Cortikosteroiden mit vielen systemischen Nebenwirkungen. In dieser Arbeit wurde im tierexperimentellen Ansatz an der sich entwickelnden Rattenlunge getestet, inwiefern sich rekombinanter humaner Keratinozyten-Wachstumsfaktor im Vergleich zur Betamethason-Gabe, der derzeitigen Standardtherapie der „Lungenreifeinduktion“, als therapeutische Alternative anbietet.

Hierzu wurden neugeborenen Sprague-Dawley-Ratten zu unterschiedlichen Zeitpunkten postnatal (nach 1, 5, 13 und 19 Tagen) über 2 Tage gewichtsadaptierte Mengen an rhKGF, Betamethason oder eine Kombination aus beiden appliziert und die Auswirkungen der Substanzgabe auf die Phospholipidzusammensetzung in Lunge, Leber und Blutplasma mittels analytisch-biochemischer Methoden untersucht. Es wurden dabei die wichtigsten Unterschiede in der postnatalen Lungenentwicklung der Ratte vor, während und nach der Alveolarisierung herausgearbeitet und untersucht, inwiefern eine Intervention mit rhKGF und Betamethason oder die Kombination aus beidem zu einer Veränderung führte.

Insbesondere bei der frühpostnatalen Tieren an der Grenze zwischen sacculärer Phase (3 Tage nach Geburt) und früher Alveolarisierungsphase (7 Tage) zeigte eine Kurzzeittherapie über 2 Tage mit rhKGF vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Menge an extrazellulär zur Verfügung stehendem Surfactant verglichen mit den Betamethason-behandelten Tieren. Während bei letzteren die Zunahme an extrazellulärem Surfactant mit gleichzeitiger

Abnahme an intrazellulär gespeichertem Surfactant einherging, vergrößerte sich der intrazelluläre Anteil bei den mit rhKGF vorbehandelten Tieren sogar noch. Bei den älteren Tiergruppen (nach 15d bzw. 21d) konnte dieser Zusammenhang nicht mehr gesehen werden. Hier erwies sich vorrangig die Kombinationsgabe als effektiv. Das lipidomische Profil des Surfactants wurde jedoch weder durch Betamethason noch durch rhKGF verändert.

Die Auswirkung auf den Lipidhomöostase in Leber und Blutplasma sind weniger eindrücklich. Hier zeigten vorrangig die älteren Tiere nach kombinierter Gabe von rhKGF und Betamethason auffällig erhöhte Werte in der Gesamtlipidanalytik.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Applikation von Keratinozyten-Wachstumsfaktor sich zukünftig als therapeutische Alternative ohne die systemischen Nebenwirkungen einer Glukokortikoidtherapie anbietet und das die vorliegenden Untersuchungen detailliertere Studien implizieren.

7 Literaturverzeichnis

1. Ablow RC: **Respiratory distress syndrome (hyaline membrane disease)**. *Crit Rev Diagn Imaging* 1981, **14**:321-363.
2. Ambalavanan N, Carlo WA: **Ventilatory strategies in the prevention and management of bronchopulmonary dysplasia**. *Semin Perinatol* 2006, **30**:192-199.
3. Andreeva AV, Kutuzov MA, Voyno-Yasenetskaya TA: **Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells**. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, **293**:L259-271.
4. Aslam M, Panjvani Z, Rajegowda BK: **Outcome of infants born at 21-28 weeks' gestation in an inner-city hospital over an eight-year period**. *J Perinat Med* 2007, **35**:151-154.
5. Avery ME, Mead J: **Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease**. *AMA J Dis Child* 1959, **97**:517-523.
6. Ballard RA, Ballard PL, Granberg JP, Sniderman S: **Prenatal administration of betamethasone for prevention of respiratory distress syndrome**. *J Pediatr* 1979, **94**:97-101.
7. Bancalari E, Abdenour GE, Feller R, Gannon J: **Bronchopulmonary dysplasia: clinical presentation**. *J Pediatr* 1979, **95**:819-823.
8. Barasch A, Epstein J, Tilashalski K: **Palifermin for management of treatment-induced oral mucositis in cancer patients**. *Biologics* 2009, **3**:111-116.
9. Barrington KJ: **The adverse neuro-developmental effects of postnatal steroids in the preterm infant: a systematic review of RCTs**. *BMC Pediatr* 2001, **1**:1.
10. Bartlett GR: **Phosphorus assay in column chromatography**. *J Biol Chem* 1959, **234**:466-468.
11. Bartmann P, Bamberger U, Pohlandt F, Gortner L: **Immunogenicity and immunomodulatory activity of bovine surfactant (SF-RI 1)**. *Acta Paediatr* 1992, **81**:383-388.
12. Batenburg JJ, Elfring RH: **Pre-translational regulation by glucocorticoid of fatty acid and phosphatidylcholine synthesis in type II cells from fetal rat lung**. *FEBS Lett* 1992, **307**:164-168.
13. Bernhard W, Haslam PL, Floros J: **From birds to humans: new concepts on airways relative to alveolar surfactant**. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004, **30**:6-11.
14. Bernhard W, Hoffmann S, Dombrowsky H, Rau GA, Kamlage A, Kappler M, Haitsma JJ, Freihorst J, von der Hardt H, Poets CF: **Phosphatidylcholine molecular species in lung surfactant: composition in relation to respiratory rate and lung development**. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001, **25**:725-731.

15. Bernhard W, Linck M, Creutzburg H, Postle AD, Arning A, Martin-Carrera I, Sewing KF: **High-performance liquid chromatographic analysis of phospholipids from different sources with combined fluorescence and ultraviolet detection.** *Anal Biochem* 1994, **220**:172-180.
16. Bernhard W, Schmiedl A, Koster G, Orgeig S, Acevedo C, Poets CF, Postle AD: **Developmental changes in rat surfactant lipidomics in the context of species variability.** *Pediatr Pulmonol* 2007, **42**:794-804.
17. Bligh EG, Dyer WJ: **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Can J Biochem Physiol* 1959, **37**:911-917.
18. Borok Z, Lubman RL, Danto SI, Zhang XL, Zabski SM, King LS, Lee DM, Agre P, Crandall ED: **Keratinocyte growth factor modulates alveolar epithelial cell phenotype in vitro: expression of aquaporin 5.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, **18**:554-561.
19. Bottaro DP, Rubin JS, Ron D, Finch PW, Florio C, Aaronson SA: **Characterization of the receptor for keratinocyte growth factor. Evidence for multiple fibroblast growth factor receptors.** *J Biol Chem* 1990, **265**:12767-12770.
20. Bourbon JR: **Development of the surfactant system.** *Pediatr Pulmonol Suppl* 1995, **11**:94-95.
21. Bruder ED, Lee PC, Raff H: **Dexamethasone treatment in the newborn rat: fatty acid profiling of lung, brain, and serum lipids.** *J Appl Physiol* 2005, **98**:981-990.
22. Bunt JE, Carnielli VP, Darcos Wattimena JL, Hop WC, Sauer PJ, Zimmermann LJ: **The effect in premature infants of prenatal corticosteroids on endogenous surfactant synthesis as measured with stable isotopes.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **162**:844-849.
23. Bunt JE, Carnielli VP, Seidner SR, Ikegami M, Darcos Wattimena JL, Sauer PJ, Jobe AH, Zimmermann LJ: **Metabolism of endogenous surfactant in premature baboons and effect of prenatal corticosteroids.** *Am J Respir Crit Care Med* 1999, **160**:1481-1485.
24. Burdge GC, Kelly FJ, Postle AD: **Synthesis of phosphatidylcholine in guinea-pig fetal lung involves acyl remodelling and differential turnover of individual molecular species.** *Biochim Biophys Acta* 1993, **1166**:251-257.
25. Burri PH, Dbaly J, Weibel ER: **The postnatal growth of the rat lung. I. Morphometry.** *Anat Rec* 1974, **178**:711-730.
26. Canpolat FE, Yurdakok M, Korkmaz A, Yigit S, Tekinalp G: **Birthweight discordance in twins and the risk of being heavier for respiratory distress syndrome.** *Twin Res Hum Genet* 2006, **9**:659-663.
27. Cardoso WV, Itoh A, Nogawa H, Mason I, Brody JS: **FGF-1 and FGF-7 induce distinct patterns of growth and differentiation in embryonic lung epithelium.** *Dev Dyn* 1997, **208**:398-405.

28. Catanzarite V, Willms D, Wong D, Landers C, Cousins L, Schrimmer D: **Acute respiratory distress syndrome in pregnancy and the puerperium: causes, courses, and outcomes.** *Obstet Gynecol* 2001, **97**:760-764.
29. Chelly N, Mouhieddine-Gueddiche OB, Barlier-Mur AM, Chailley-Heu B, Bourbon JR: **Keratinocyte growth factor enhances maturation of fetal rat lung type II cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999, **20**:423-432.
30. Chelly N, Henrion A, Pinteur C, Chailley-Heu B, Bourbon JR: **Role of keratinocyte growth factor in the control of surfactant synthesis by fetal lung mesenchyme.** *Endocrinology* 2001, **142**:1814-1819.
31. Clements JA: **Surface tension of lung extracts.** *Proc Soc Exp Biol Med* 1957, **95**:170-172.
32. Creuwels LA, van Golde LM, Haagsman HP: **The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects.** *Lung* 1997, **175**:1-39.
33. Danan C, Franco ML, Jarreau PH, Dassieu G, Chailley-Heu B, Bourbon J, Delacourt C: **High concentrations of keratinocyte growth factor in airways of premature infants predicted absence of bronchopulmonary dysplasia.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **165**:1384-1387.
34. den Breejen JN, Batenburg JJ, van Golde LM: **The species of acyl-CoA in subcellular fractions of type II cells isolated from adult rat lung and their incorporation into phosphatidic acid.** *Biochim Biophys Acta* 1989, **1002**:277-282.
35. Diamond MP, Shah DM, Hester RA, Vaughn WK, Cotton RB, Boehm FH: **Complication of insulin-dependent diabetic pregnancies by preeclampsia and/or chronic hypertension: analysis of outcome.** *Am J Perinatol* 1985, **2**:263-267.
36. Dietl P, Frick M, Mair N, Bertocchi C, Haller T: **Pulmonary consequences of a deep breath revisited.** *Biol Neonate* 2004, **85**:299-304.
37. Dombrowsky H, Tschernig T, Vieten G, Rau GA, Ohler F, Acevedo C, Behrens C, Poets CF, von der Hardt H, Bernhard W: **Molecular and functional changes of pulmonary surfactant in response to hyperoxia.** *Pediatr Pulmonol* 2006, **41**:1025-1039.
38. Doyle LW, Halliday HL, Ehrenkranz RA, Davis PG, Sinclair JC: **Impact of postnatal systemic corticosteroids on mortality and cerebral palsy in preterm infants: effect modification by risk for chronic lung disease.** *Pediatrics* 2005, **115**:655-661.
39. Fehrenbach A, Bube C, Hohlfield JM, Stevens P, Tschernig T, Hoymann HG, Krug N, Fehrenbach H: **Surfactant homeostasis is maintained in vivo during keratinocyte growth factor-induced rat lung type II cell hyperplasia.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **167**:1264-1270.

40. Fehrenbach H, Kasper M, Tschernig T, Pan T, Schuh D, Shannon JM, Muller M, Mason RJ: **Keratinocyte growth factor-induced hyperplasia of rat alveolar type II cells in vivo is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis.** *Eur Respir J* 1999, **14**:534-544.
41. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.** *J Biol Chem* 1957, **226**:497-509.
42. Frerking I, Gunther A, Seeger W, Pison U: **Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options.** *Intensive Care Med* 2001, **27**:1699-1717.
43. Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T: **Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease.** *Lancet* 1980, **1**:55-59.
44. Gille C, Spring B, Bernhard W, Gebhard C, Basile D, Lauber K, Poets CF, Orlikowsky TW: **Differential effect of surfactant and its saturated phosphatidylcholines on human blood macrophages.** *J Lipid Res* 2007, **48**:307-317.
45. Gregory GA, Kitterman JA, Phibbs RH, Tooley WH, Hamilton WK: **Treatment of the idiopathic respiratory-distress syndrome with continuous positive airway pressure.** *N Engl J Med* 1971, **284**:1333-1340.
46. Grier DG, Halliday HL: **Effects of glucocorticoids on fetal and neonatal lung development.** *Treat Respir Med* 2004, **3**:295-306.
47. Griese M: **Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art.** *Eur Respir J* 1999, **13**:1455-1476.
48. Haagsman HP, Diemel RV: **Surfactant-associated proteins: functions and structural variation.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001, **129**:91-108.
49. Haagsman HP, van Golde LM: **Synthesis and assembly of lung surfactant.** *Annu Rev Physiol* 1991, **53**:441-464.
50. Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW: **Early (< 8 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants.** *Cochrane Database Syst Rev* 2009:CD001146.
51. Hallman M, Haataja R: **Surfactant protein polymorphisms and neonatal lung disease.** *Semin Perinatol* 2006, **30**:350-361.
52. Hallman M, Marttila R, Pertile R, Ojaniemi M, Haataja R: **Genes and environment in common neonatal lung disease.** *Neonatology* 2007, **91**:298-302.
53. Hunt AN, Clark GT, Neale JR, Postle AD: **A comparison of the molecular specificities of whole cell and endonuclear phosphatidylcholine synthesis.** *FEBS Lett* 2002, **530**:89-93.
54. Ikegami M, Jobe AH, Havill AM: **Keratinocyte growth factor increases surfactant pool sizes in premature rabbits.** *Am J Respir Crit Care Med* 1997, **155**:1155-1158.

55. Jobe AH: **Antenatal factors and the development of bronchopulmonary dysplasia.** *Semin Neonatol* 2003, **8**:9-17.
56. Jobe AH, Newnham J, Willet K, Sly P, Ikegami M: **Fetal versus maternal and gestational age effects of repetitive antenatal glucocorticoids.** *Pediatrics* 1998, **102**:1116-1125.
57. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: **Atmungsorgane.** In *Histologie*. 5. edition. Berlin: Springer-Verlag; 2002: 289-309
58. Kaempf JW, Campbell B, Sklar RS, Arduza C, Gallegos R, Zabari M, Brown A, McDonald JV: **Implementing potentially better practices to improve neonatal outcomes after reducing postnatal dexamethasone use in infants born between 501 and 1250 grams.** *Pediatrics* 2003, **111**:e534-541.
59. Kari MA, Hallman M, Eronen M, Teramo K, Virtanen M, Koivisto M, Ikonen RS: **Prenatal dexamethasone treatment in conjunction with rescue therapy of human surfactant: a randomized placebo-controlled multicenter study.** *Pediatrics* 1994, **93**:730-736.
60. Kaza AK, Kron IL, Leuwerke SM, Tribble CG, Laubach VE: **Keratinocyte growth factor enhances post-pneumonectomy lung growth by alveolar proliferation.** *Circulation* 2002, **106**:1120-124.
61. Kazzi SN, Schurch S, McLaughlin KL, Romero R, Janisse J: **Surfactant phospholipids and surface activity among preterm infants with respiratory distress syndrome who develop bronchopulmonary dysplasia.** *Acta Paediatr* 2000, **89**:1218-1225.
62. King RJ, Klass DJ, Gikas EG, Clements JA: **Isolation of apoproteins from canine surface active material.** *Am J Physiol* 1973, **224**:788-795.
63. Kotecha S: **Lung growth for beginners.** *Paediatr Respir Rev* 2000, **1**:308-313.
64. Kramer BW, Ikegami M, Jobe AH: **Surfactant phospholipid catabolic rate is pool size dependent in mice.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **279**:L842-848.
65. Kramer BW, Speer CP: **[Surfactant proteins A and D: major factors of the immune response of the lung].** *Z Geburtshilfe Neonatol* 2003, **207**:41-47.
66. Krantz ME, Wennergren M, Bengtson LG, Hjalmarson O, Karlsson K, Sellgren U: **Epidemiological analysis of the increased risk of disturbed neonatal respiratory adaptation after caesarean section.** *Acta Paediatr Scand* 1986, **75**:832-839.
67. Kunstyr I: *Diagnostic microbiology for laboratory animals, GV-SOLAS.* first edn. Stuttgart: Gustav Fischer-Verlag; 1992.
68. Kuroki Y, Takahashi M, Nishitani C: **Pulmonary collectins in innate immunity of the lung.** *Cell Microbiol* 2007, **9**:1871-1879.

69. Lang CJ, Postle AD, Orgeig S, Possmayer F, Bernhard W, Panda AK, Jurgens KD, Milsom WK, Nag K, Daniels CB: **Dipalmitoylphosphatidylcholine is not the major surfactant phospholipid species in all mammals.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, **289**:R1426-1439.
70. Laplace P, (1798-1827): **Traite de Mechanique Celeste. 5 Vols, Crapelet, Courcier, Paris.**
71. LeVine AM, Bruno MD, Huelsman KM, Ross GF, Whitsett JA, Korfhagen TR: **Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection.** *J Immunol* 1997, **158**:4336-4340.
72. LeVine AM, Gwozdz J, Stark J, Bruno M, Whitsett J, Korfhagen T: **Surfactant protein-A enhances respiratory syncytial virus clearance in vivo.** *J Clin Invest* 1999, **103**:1015-1021.
73. LeVine AM, Kurak KE, Bruno MD, Stark JM, Whitsett JA, Korfhagen TR: **Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to Pseudomonas aeruginosa infection.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, **19**:700-708.
74. LeVine AM, Whitsett JA, Gwozdz JA, Richardson TR, Fisher JH, Burhans MS, Korfhagen TR: **Distinct effects of surfactant protein A or D deficiency during bacterial infection on the lung.** *J Immunol* 2000, **165**:3934-3940.
75. Liggins GC, Howie RN: **A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants.** *Pediatrics* 1972, **50**:515-525.
76. Mason RJ: **Biology of alveolar type II cells.** *Respirology* 2006, **11 Suppl**:S12-15.
77. Mason RJ, Lewis MC, Edeen KE, McCormick-Shannon K, Nielsen LD, Shannon JM: **Maintenance of surfactant protein A and D secretion by rat alveolar type II cells in vitro.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, **282**:L249-258.
78. Mason RJ, Pan T, Edeen KE, Nielsen LD, Zhang F, Longphre M, Eckart MR, Neben S: **Keratinocyte growth factor and the transcription factors C/EBP alpha, C/EBP delta, and SREBP-1c regulate fatty acid synthesis in alveolar type II cells.** *J Clin Invest* 2003, **112**:244-255.
79. Mason RJ, Voelker DR: **Regulatory mechanisms of surfactant secretion.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1408**:226-240.
80. McCormack FX, Pattanajitvilai S, Stewart J, Possmayer F, Inchley K, Voelker DR: **The Cys6 intermolecular disulfide bond and the collagen-like region of rat SP-A play critical roles in interactions with alveolar type II cells and surfactant lipids.** *J Biol Chem* 1997, **272**:27971-27979.
81. McCormack FX, Whitsett JA: **The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung.** *J Clin Invest* 2002, **109**:707-712.

82. Meban C: **Effect of lipids and other substances on the adsorption of dipalmitoyl phosphatidylcholine.** *Pediatr Res* 1981, **15**:1029-1031.
83. Mei C, Mao Z, Shen X, Wang W, Dai B, Tang B, Wu Y, Cao Y, Zhang S, Zhao H, Sun T: **Role of keratinocyte growth factor in the pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease.** *Nephrol Dial Transplant* 2005, **20**:2368-2375.
84. Mouhieddine-Gueddiche OB, Pinteur C, Chailley-Heu B, Barlier-Mur AM, Clement A, Bourbon JR: **Dexamethasone potentiates keratinocyte growth factor-stimulated SP-A and SP-B gene expression in alveolar epithelial cells.** *Pediatr Res* 2003, **53**:231-239.
85. Nguyen HQ, Danilenko DM, Bucay N, DeRose ML, Van GY, Thomason A, Simonet WS: **Expression of keratinocyte growth factor in embryonic liver of transgenic mice causes changes in epithelial growth and differentiation resulting in polycystic kidneys and other organ malformations.** *Oncogene* 1996, **12**:2109-2119.
86. Nonogaki K, Pan XM, Moser AH, Staprans I, Feingold KR, Grunfeld C: **Keratinocyte growth factor increases fatty acid mobilization and hepatic triglyceride secretion in rats.** *Endocrinology* 1995, **136**:4278-4284.
87. Northway WH, Jr., Rosan RC, Porter DY: **Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia.** *N Engl J Med* 1967, **276**:357-368.
88. Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, Knudsen L, Voigt M, Wahlers T, Richter J, Gundersen HJ: **The number of alveoli in the human lung.** *Am J Respir Crit Care Med* 2004, **169**:120-124.
89. Oshika E, Liu S, Ung LP, Singh G, Shinozuka H, Michalopoulos GK, Katyal SL: **Glucocorticoid-induced effects on pattern formation and epithelial cell differentiation in early embryonic rat lungs.** *Pediatr Res* 1998, **43**:305-314.
90. Patel NV, Acarregui MJ, Snyder JM, Klein JM, Sliwkowski MX, Kern JA: **Neuregulin-1 and human epidermal growth factor receptors 2 and 3 play a role in human lung development in vitro.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000, **22**:432-440.
91. Pattle RE: **Properties, function and origin of the alveolar lining layer.** *Nature* 1955, **175**:1125-1126.
92. Patton GM, Fasulo JM, Robins SJ: **Separation of phospholipids and individual molecular species of phospholipids by high-performance liquid chromatography.** *J Lipid Res* 1982, **23**:190-196.
93. Perez-Gil J: **Molecular interactions in pulmonary surfactant films.** *Biol Neonate* 2002, **81 Suppl 1**:6-15.
94. Perez-Gil J, Keough KM: **Interfacial properties of surfactant proteins.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1408**:203-217.
95. Phizackerley PJ, Town MH, Newman GE: **Hydrophobic proteins of lamellated osmiophilic bodies isolated from pig lung.** *Biochem J* 1979, **183**:731-736.

96. Pian MS, Dobbs LG: **Evidence for G beta gamma-mediated cross-talk in primary cultures of lung alveolar cells. Pertussis toxin-sensitive production of cAMP.** *J Biol Chem* 1995, **270**:7427-7430.
97. Piknova B, Schief WR, Vogel V, Discher BM, Hall SB: **Discrepancy between phase behavior of lung surfactant phospholipids and the classical model of surfactant function.** *Biophys J* 2001, **81**:2172-2180.
98. Possmayer F: **A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins.** *Am Rev Respir Dis* 1988, **138**:990-998.
99. 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**:209-220.
100. Post M: **Maternal administration of dexamethasone stimulates choline-phosphate cytidyltransferase in fetal type II cells.** *Biochem J* 1987, **241**:291-296.
101. Postle AD: **Method for the sensitive analysis of individual molecular species of phosphatidylcholine by high-performance liquid chromatography using post-column fluorescence detection.** *J Chromatogr* 1987, **415**:241-251.
102. Postle AD, Gonzales LW, Bernhard W, Clark GT, Godinez MH, Godinez RI, Ballard PL: **Lipidomics of cellular and secreted phospholipids from differentiated human fetal type II alveolar epithelial cells.** *J Lipid Res* 2006, **47**:1322-1331.
103. Postle AD, Heeley EL, Wilton DC: **A comparison of the molecular species compositions of mammalian lung surfactant phospholipids.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001, **129**:65-73.
104. Rau GA, Vieten G, Haitsma JJ, Freihorst J, Poets C, Ure BM, Bernhard W: **Surfactant in newborn compared with adolescent pigs: adaptation to neonatal respiration.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004, **30**:694-701.
105. Rooney SA, Gobran LI, Wai-Lee TS: **Stimulation of surfactant production by oxytocin-induced labor in the rabbit.** *J Clin Invest* 1977, **60**:754-759.
106. Rooney SA, Young SL, Mendelson CR: **Molecular and cellular processing of lung surfactant.** *FASEB J* 1994, **8**:957-967.
107. Rubin JS, Bottaro DP, Chedid M, Miki T, Ron D, Cheon G, Taylor WG, Fortney E, Sakata H, Finch PW: **Keratinocyte growth factor.** *Cell Biol Int* 1995, **19**:399-411.
108. Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA: **Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**:802-806.
109. Sanchez-Esteban J, Wang Y, Gruppuso PA, Rubin LP: **Mechanical stretch induces fetal type II cell differentiation via an epidermal growth factor receptor-extracellular-regulated protein kinase signaling pathway.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004, **30**:76-83.

110. Schacke H, Docke WD, Asadullah K: **Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids.** *Pharmacol Ther* 2002, **96**:23-43.
111. Schmidt RF, Thews G, Lang F: **Atmung.** In *Physiologie des Menschen*. 28. edition. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2000: 565-587
112. Schmiedl A, Vieten G, Muhlfeld C, Bernhard W: **Distribution of intracellular and secreted surfactant during postnatal rat lung development.** *Pediatr Pulmonol* 2007, **42**:548-562.
113. Senaldi G, Shaklee CL, Simon B, Rowan CG, Lacey DL, Hartung T: **Keratinocyte growth factor protects murine hepatocytes from tumor necrosis factor-induced apoptosis in vivo and in vitro.** *Hepatology* 1998, **27**:1584-1591.
114. Shima H, Tazawa H, Puri P: **Increased expression of fibroblast growth factors in segmental renal dysplasia.** *Pediatr Surg Int* 2000, **16**:306-309.
115. Simonet WS, DeRose ML, Bucay N, Nguyen HQ, Wert SE, Zhou L, Ulich TR, Thomason A, Danilenko DM, Whitsett JA: **Pulmonary malformation in transgenic mice expressing human keratinocyte growth factor in the lung.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:12461-12465.
116. Stark AR, Frantz ID, 3rd: **Respiratory distress syndrome.** *Pediatr Clin North Am* 1986, **33**:533-544.
117. Sugahara K, Rubin JS, Mason RJ, Aronsen EL, Shannon JM: **Keratinocyte growth factor increases mRNAs for SP-A and SP-B in adult rat alveolar type II cells in culture.** *Am J Physiol* 1995, **269**:L344-350.
118. Thannhauser S.J. BH, Boncoddio N.F.: **Isolation and properties of hydrolecithin (dipalmityl lecithin) from lung, its occurrence in the sphingomyelin fraction of animal tissues.** *J Biol Chem* 1946, **166**:669-675.
119. Valcamonico A, Accorsi P, Sanzeni C, Martelli P, La Boria P, Cavazza A, Frusca T: **Mid- and long-term outcome of extremely low birth weight (ELBW) infants: an analysis of prognostic factors.** *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007, **20**:465-471.
120. van Rozendaal BA, van Spruel AB, van De Winkel JG, Haagsman HP: **Role of pulmonary surfactant protein D in innate defense against *Candida albicans*.** *J Infect Dis* 2000, **182**:917-922.
121. Vance JE, Vance DE: **Phospholipid biosynthesis in mammalian cells.** *Biochem Cell Biol* 2004, **82**:113-128.
122. Veldhuizen EJ, Batenburg JJ, van Golde LM, Haagsman HP: **The role of surfactant proteins in DPPC enrichment of surface films.** *Biophys J* 2000, **79**:3164-3171.
123. Veldhuizen EJ, Haagsman HP: **Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1467**:255-270.

124. Veldhuizen R, Nag K, Orgeig S, Possmayer F: **The role of lipids in pulmonary surfactant.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1408**:90-108.
125. Volpe MV, Nielsen HC, Archavachotikul K, Ciccone TJ, Chinoy MR: **Thyroid hormone affects distal airway formation during the late pseudoglandular period of mouse lung development.** *Mol Genet Metab* 2003, **80**:242-254.
126. Von Neergard K: **Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen.** *Z Gesamte Exp Med* 1929, **66**:373-394.
127. Walfisch A, Hallak M, Mazor M: **Multiple courses of antenatal steroids: risks and benefits.** *Obstet Gynecol* 2001, **98**:491-497.
128. Walsh MC, Szefer S, Davis J, Allen M, Van Marter L, Abman S, Blackmon L, Jobe A: **Summary proceedings from the bronchopulmonary dysplasia group.** *Pediatrics* 2006, **117**:S52-56.
129. Ware LB, Matthay MA: **Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, **282**:L924-940.
130. Weaver TE, Conkright JJ: **Function of surfactant proteins B and C.** *Annu Rev Physiol* 2001, **63**:555-578.
131. Whitsett JA, Nogee LM, Weaver TE, Horowitz AD: **Human surfactant protein B: structure, function, regulation, and genetic disease.** *Physiol Rev* 1995, **75**:749-757.
132. Whitsett JA, Weaver TE: **Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease.** *N Engl J Med* 2002, **347**:2141-2148.
133. Wilsher ML, Hughes DA, Haslam PL: **Immunoregulatory properties of pulmonary surfactant: effect of lung lining fluid on proliferation of human blood lymphocytes.** *Thorax* 1988, **43**:354-359.
134. Wright SM, Hockey PM, Enhorning G, Strong P, Reid KB, Holgate ST, Djukanovic R, Postle AD: **Altered airway surfactant phospholipid composition and reduced lung function in asthma.** *J Appl Physiol* 2000, **89**:1283-1292.
135. Wu KI, Pollack N, Panos RJ, Sporn PH, Kamp DW: **Keratinocyte growth factor promotes alveolar epithelial cell DNA repair after H₂O₂ exposure.** *Am J Physiol* 1998, **275**:L780-787.
136. Xu X, McCormick-Shannon K, Voelker DR, Mason RJ: **KGF increases SP-A and SP-D mRNA levels and secretion in cultured rat alveolar type II cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, **18**:168-178.
137. Yano T, Mason RJ, Pan T, Deterding RR, Nielsen LD, Shannon JM: **KGF regulates pulmonary epithelial proliferation and surfactant protein gene expression in adult rat lung.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **279**:L1146-1158.

138. Yu S, Harding PG, Smith N, Possmayer F: **Bovine pulmonary surfactant: chemical composition and physical properties.** *Lipids* 1983, **18**:522-529.
139. Zimmermann LJ, Hogan M, Carlson KS, Smith BT, Post M: **Regulation of phosphatidylcholine synthesis in fetal type II cells by CTP:phosphocholine cytidyltransferase.** *Am J Physiol* 1993, **264**:L575-580.

8 Danksagung

Diese Arbeit entstand unter der Betreuung von Herrn PD Dr. med. Dr. rer. physiol. Wolfgang Bernhard. Auf diesem Wege möchte ich mich zuerst bei ihm für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, die Anleitung im Labor, die vielen konstruktiven Diskussionen und seine Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Poets bedanken, in dessen Abteilung diese Arbeit entstanden ist.

Frau Verena Müller gilt mein besonderer Dank, die vielen Versuche wären ohne ihre tatkräftige Hilfe nicht durchführbar gewesen.

Herrn Dr. rer. nat. Christopher Pynn und Herrn Jens Gesche danke ich für die vielen anregenden Gespräche und die gute Zusammenarbeit im Labor.

Der Firma Amgen danke ich für die freundliche Bereitstellung des rhKGF.

Herrn Dr. med. Martin Heni danke ich für das Korrekturlesen, seine Anregungen und Motivation, die mich immer wieder zum Weiterarbeiten gebracht haben.

Meiner Lebensgefährtin Eva Edelman danke ich besonders für ihre Geduld, Ruhe und ihr Verständnis für die vielen Stunden, die ich im Labor und am Verfassen dieser Arbeit verbracht habe.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, Michael und Christa Ohler bedanken. Ohne ihre Unterstützung in allen Lebenslagen wäre diese Arbeit sicher nie zustande gekommen.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Florian Michael Ohler
 Geburtsdatum / -ort: 08.04.1981 in Bietigheim-Bissingen

Schulische Ausbildung:

1987-1991 Grund- und Hauptschule Bietigheim-Bissingen
 1991-1996 Gymnasium Bietigheim-Bissingen
 1996-2000 Ev. kirchl. Aufbaugymnasium Michelbach/Bilz
 2000 Abitur

Zivildienst:

2000-2001 DRK Schwäbisch Hall

Studium:

2001-2003 Vorklinischer Studienabschnitt der Humanmedizin an der Universität Ulm, 2003 Physikum
 2003-2008 Klinischer Studienabschnitt der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
 08.05.2008 Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen)
 2008 Approbation als Arzt

Weiterbildung:

seit 2008 Assistenzarzt an der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie Villingen-Schwenningen (Ärztlicher Direktor PD Dr. med. Friedrich Thielemann)