

Aus der Klinik
für Angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie
Direktor: Professor Dr. med. H. H. Kramer
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Surfactanthärtung durch Inhibition der pulmonalen
Ceramidproduktion bei Lungenversagen im neonatalen
Ferkelmodell**

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Sabrina Stadelmann

aus Hamburg

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Krause
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med Burghard Bewig
Tag der mündlichen Prüfung: 10. Dezember 2012
Mündlicher Prüfer: Prof. Dr. med Heiner Mönig
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 10. Dezember 2012

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Einleitung:	8
2. Methoden:	16
2.1 Instrumentierung der Ferkel:.....	16
2.2 Schädigungsprotokolle:.....	20
2.2.1 Broncho-alveoläre Lavagen:.....	20
2.2.2 Lungen-schädigende Beatmung:.....	21
2.2.3 E.coli-LPS-Instillation:.....	21
2.3 Intervention nach Randomisierung:.....	22
2.4 Beendigung des Versuchs und Abrüsten der Tiere:.....	23
2.5 Lungenfunktionsmessungen:.....	24
2.6 Blutgasanalysen:.....	24
2.7 Maschinelle Beatmung:.....	24
2.8 Hämodynamisches Monitoring:.....	26
2.9 Durchflusszytometrie (FACS):.....	29
2.9.1 Messung:.....	30
2.9.2 Auswertung:.....	31
2.10 Gewebeproben:.....	34
2.10.1 Ceramid-Konzentration und aSMase-Aktivität:.....	34
2.10.2 Caspase-8-Konzentration in Lungengewebe: Western-blot und Immunhistochemie.....	34
2.10.3 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)- Färbung:.....	35
2.11 Messung der Oberflächenspannung:.....	36
2.12 Quantitative Echtzeit-PCR zur Bestimmung von Mediatoren im Lungengewebe:.....	37
2.13 Statistische Methoden:.....	38
2.14 Verwendung der statistischen Methoden:.....	39
3. Ergebnisse	41
3.1 Nicht ausgewertete Versuchstiere:.....	41
3.2 Baseline-Erhebung:.....	42
3.3 Lungenfunktion:.....	43
3.4 Herzkreislaufsystem:.....	45
3.5 Organdysfunktionen:.....	46
3.6 Differentialblutbild:.....	47
3.7 Bakterien in den Atemwegen:.....	48
3.8 Zellen in der BALF:.....	49
3.9 Messung der Oberflächenspannung:.....	51
3.10 Wachstumsfaktoren und Zytokine:.....	52
3.11 Saure Sphingomyelinase-Aktivität und Ceramid-Konzentration:.....	54
3.12 Caspase-8-Konzentration:.....	55
3.13 Epitheliale Apoptose:.....	57
3.14 Graphenanhang:.....	59

4. Diskussion	68
4.1 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse:	68
4.2 Modell-Beschreibung:	69
4.2.1 Broncho-alveoläre Lavagen:	69
4.2.2 Schädliche Beatmung:	70
4.2.3 LPS-Instillation:	71
4.2.4 Bakterien in den Atemwegen:	71
4.2.5 Wahl der Versuchstiere:	72
4.3 Eingesetzte Testsubstanzen in dieser Studie:	73
4.3.1 1D-myo-Inositol-1,2,6-trisphosphat (IP3):	73
4.3.2 Myo-Inositol:	73
4.4 Wertung der Surfactanttherapie bei neonatalem ALI:	75
4.5 Surfactanthärtung durch Inhibition von aSMase-Aktivität und Ceramidstoffwechsel:	77
4.6 Wirkmechanismus der Ceramide:	78
4.7 Bedeutung der alveolären Apoptose bei neonatalen Lungenerkrankungen:	79
4.8 Einfluss der Ceramide auf die Oberflächenspannung:	80
4.9 Interpretation der Zellkonzentrationen und Zelltypen in der BALF:	81
4.10 Veränderung der Genexpression der Mediatoren:	82
4.11 Wirkstoffvergleich zwischen Imipramin und IP3:	84
5. Methodenkritik	85
5.1 Dosierung und Kinetik:	85
5.2 Nebenwirkungen der eingesetzten Substanzen:	86
6. Zusammenfassung und Beantwortung der Hypothese	87
7. Literaturverzeichnis	88
8. Danksagung	94
9. Lebenslauf	95
10. Erklärung	96
11. Anhang	97
11.1 Zustimmung der Tierschutzbehörde beim Ministerium für Landwirtschaft:	97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Instrumentiertes Ferkel.....	18
Abbildung 2: Zeittafel	19
Abbildung 3: Hämodynamisches Monitoring.....	26
Abbildung 4: Markierung der Zellen mittels RIO.....	32
Abbildung 5: Punktwolkendarstellung	33
Abbildung 6: Übersicht über die Zellen in der BALF	50
Abbildung 7: Übersicht über die CD14+ und CD18+ Zellen in der BALF	50
Abbildung 8: Oberflächenspannung	51
Abbildung 9: Amphiregulin	52
Abbildung 10: TGF- β 1	53
Abbildung 11: Interleukin-6	53
Abbildung 12: aSMase-Aktivität.....	54
Abbildung 13: Ceramid-Konzentration	54
Abbildung 14: Caspase-8-Konzentration (18 kDa)	55
Abbildung 15: Caspase-8 western-blot	56
Abbildung 16: Apoptose-Score.....	57
Abbildung 17: Mikroskopische Darstellung des Lungengewebes	58
Abbildung 18: Extravaskulärer Lungenwasserindex.....	60
Abbildung 19: Resistance des respiratorischen Systems.....	61
Abbildung 20: Spezifische Compliance des respiratorischen Systems.....	62
Abbildung 21: Oxygenierungsindex.....	63
Abbildung 22: Ventilationseffizienzindex	64
Abbildung 23: Systemisch-vaskulärer Gefäßwiderstandindex	65
Abbildung 24: Herzindex.....	66
Abbildung 25: postmortale Herz-Lungen-Pakete.....	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Merkmale der Interventionsgruppen vor der baseline-Messung	42
Tabelle 2: Klinische Parameter zum Zeitpunkt der baseline-Messung	42
Tabelle 3: Beurteilung möglicher Organdysfunktionen	46
Tabelle 4: Differentialblutbild	47
Tabelle 5: Bakterien in den Atemwegen:.....	48

Abkürzungsverzeichnis:

ABE: aktueller Base-Exzess

AF: Atemfrequenz

ALI: acute lung injury

ANOVA: analysis of variance

ARDS: acute respiratory distress syndrome

aSMase: saure Sphingomyelinase

BAL: broncho-alveoläre Lavage

BGA: Blutgasanalyse

BTPS: Body Temperature and Pressure Saturated (standardisierte Messbedingungen)

C_{rs}: spezifische Compliance des respiratorischen Systems

CTP: Phosphocholin-Cytidylyltransferase

DAG: Diacylglycerin

DNA: Desoxyribonucleinsäure

DPPC: Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin

ER: endoplasmatisches Reticulum

E.coli LPS: Escherichia coli Lipopolysaccharid

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

EGF-Rezeptor: Endothelial Growth Factor-Rezeptor

EVLWI: extravaskulärer Lungenwasserindex

FACS: Durchflusszytometrie

FCS: Vorwärtsstreulicht

Fc-Rezeptor: Membranrezeptor für Immunglobuline

FiO₂: Sauerstoffgehalt in der Inspirationsluft

Flow: Atemfluss

GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

HI: Herzindex

HZV: Herzzeitvolumen

HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

IKK-NBD-Peptid: IκB-Kinase-NF-κB(NEMO)-Bindungsdomänenprotein

Il-6: Interleukin-6

IP3: 1D-myo-Inositol-1,2,6-trisphosphat

IT: Inspirationszeit

KCl: Kaliumchlorid

MAD: mittlerer arterieller Druck

NaCl: Natriumchlorid

NF- κ B: Nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-Cells

OI: Oxygenierungsindex

PAF: Plättchen-aktivierender Faktor

PaO₂/FiO₂: Quotient von arteriellem Sauerstoffpartialdruck und Sauerstoffkonzentration

PC: Phosphatidylcholine

PCHZV: kontinuierliches Herzzeitvolumen (Pulskontur)

PCR: Polymerase-Kettenreaktion

PE: Phosphatidylethanolamin

PEEP: positiver endexpiratorischer Beatmungsdruck

PF: Pulsfrequenz

PI: Phosphatidylinositol

PIP: positiver inspiratorischer Beatmungsdruck

PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PG: Phosphatidylglycerol

PKC: Proteinkinase C

PLC: Phospholipase C

RDS: respiratory distress syndrome

RIO: region of interest

R_{rs}: Resistance des respiratorischen Systems

SP-A: Surfactant-assoziiertes Protein A

%SPO₂: Sauerstoffsättigung

SSC: Seitwärtsstreulicht

SVRI: systemisch-vaskulärer Gefäßwiderstandsindex

S1P: Sphingosin-1-Phosphat

TLR4: Toll-like-Rezeptor 4

TNF- α : Tumor Nekrose Faktor alpha

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

VEI: Ventilationseffizienzindex

V_t: Tidalvolumen

ZVK: Zentralvenöser Katheter

ZnCl₂: Zinkchlorid

1. Einleitung

Nachfolgend wird eine prospektive, randomisierte, kontrollierte, tierexperimentelle Studie zum Thema „akuter Lungenschaden (acute lung injury = ALI) durch Entzündung bei Neugeborenen“ dargestellt. Die vollständige Studie wurde mit insgesamt 35 anästhesierten und beatmeten Ferkeln im Alter von 3-6 Tagen in dem wissenschaftlichen Labor der intensivmedizinischen Forschungsgruppe in der Kinderklinik des UKSH, Campus Kiel, durchgeführt.

Das Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS) des Neugeborenen ist gekennzeichnet durch eine Ateminsuffizienz infolge eines akuten Lungenschadens (ALI) durch schwere konnatale Pneumonien, Aspiration von (Mekonium-haltigen) Fruchtwasser, sekundäre Schäden durch maschinelle Beatmung oder im Rahmen einer Sepsis mit Multiorganversagen und Permeabilitätsstörungen. Eine einsetzende intraalveoläre Akkumulation von Plasma-proteinen und Entzündungszellen, die nach Schädigung von Endothel und Epithel in die Alveolen gelangen, inhibiert die Surfactant-Wirkung unter Ausbildung hyaliner Membranen. Auf der Basis einer schweren Entzündungsreaktion kommt es zu einer Ausweitung des Ödems, Störung des Gasaustausches und der Lungenmechanik (reduzierte Compliance und funktionelle Residualkapazität durch Atelektasebildung). Im weiteren Verlauf bildet sich binnen 2-3 Wochen eine Lungenfibrose aus. Das ARDS stellt eine der häufigsten Todesursachen der Neonatalperiode dar.

Die derzeitige Standardtherapie des neonatalen ALI besteht aus maschineller Beatmung, intravenöser Antibiotikagabe und repetitiver intratrachealer Substitution von Surfactant. Eine Verbesserung der Oxygenierung und des Gasaustausches konnte bisher in den meisten publizierten Studien unmittelbar nach intratrachealer Applikation des Surfactants beobachtet werden, jedoch auch ein rasch abklingender klinischer Effekt mit der Konsequenz einer sehr kostspieligen Therapie (eine Dosis von 120 mg Curosurf® liegt derzeit bei ca. 320 Euro). Die Inzidenz von ARDS im Kindesalter liegt in Deutschland bei 3,4 Patienten im Jahr/ 100.000 Einwohner (Bindl et al. 2005) mit einer Mortalitätsrate von ungefähr 26% bei ARDS und von 13% bei ALI (Flori et al. 2005). Konkrete Zahlen der Inzidenz und Mortalitätsrate von ARDS bei Neugeborenen sind für Deutschland leider nicht bekannt.

Verschiedene Forschungsgruppen beschäftigen sich seit einigen Jahren mit der Problematik der schnell nachlassenden Surfactant-Wirkung bei einer pulmonalen Inflammation. Es wird nach einem Lösungsansatz für die Möglichkeit einer „Surfactanthärtung“ gesucht. Der

Ansatz dieser Studie besteht in der Inhibition der sauren Sphingomyelinase durch die Gabe von Substanzen aus dem Intermediärstoffwechsel der Inositolphosphate (Myo-Inositol, IP3), wodurch die Ceramid-Produktion reduziert und die Wirksamkeit des Surfactants verbessert werden könnte.

Die Hauptfunktion des pulmonalen Surfactantfilms liegt darin, die Oberflächenspannung der Alveolen zu reduzieren und den alveolären Kollaps zu verhindern. Pneumozyten Typ II synthetisieren und recyceln endogenes Surfactant (surface-active-agent), welches zu 90% aus Phospholipiden und zu 10% aus Surfactant-assoziierten Proteinen (SP-A, -B, -C, -D) besteht. Der größte Anteil der Phospholipide sind mit 80% die Phosphatidylcholine (PC), wovon alleine 30-60% Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC = Lecithin) ist. Die anderen 20% der Phospholipide sind Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE) und Sphingomyelin ((Postle et al. 2001) und (Lang et al. 2005)).

Das Problem bei der Therapie des ALI liegt in der Inaktivierung des Surfactants durch eine Vielzahl von pro-inflammatorisch wirkenden Mediatoren und Zellen. Die Hauptinhibitoren von Surfactant sind Plasmaproteine, ungesättigte Membran-phospholipide, Lysophospholipide, freie Fettsäuren und Mekonium (Frerking et al. 2001 und Zuo et al. 2008). Im Rahmen einer pulmonalen Infektion kann es auch durch die vermehrte Expression von Phospholipasen und Proteasen zu einem beschleunigten Abbau der Surfactant-Proteine kommen (Gunther et al. 2001).

Zwei Forschungsgruppen (Taeusch et al. 1999 und Kobayashi et al. 1999) haben als Erste an dem Versuch der Surfactanthärtung durch günstige, nicht-ionische Polymere geforscht. Es wurde eine große Gruppe von Wasser-bindenden Polymeren getestet, unter anderem Polyethylen-Glycol (PEG) (Taeusch et al. 1999), Dextran (Kobayashi et al. 1999), Hyaluronsäure (Lu und Goerke 2005) und Chitosan (Zuo et al. 2006). Alle Substanzen haben gezeigt, dass es durch ihre Zugabe zu einer verbesserten Oberflächenaktivität und Stabilität gegenüber einer Inaktivierung aller vorhandenen klinischen Surfactantpräparate kommt. Allerdings mussten folgende Einschränkungen für dieses Therapiekonzept formuliert werden:

1. Die Wirksamkeit verschiedener Polymere scheint von dem Surfactantpräparat abhängig zu sein, da molekulare Interaktion zwischen dem Polymer und dem Phospholipid-Protein-Verhältnis im Surfactant von Bedeutung sind (Lu et al. 2005).

2. Der Effekt des Polymers zeigt auch eine Abhängigkeit von der Art der bestehenden Lungenschädigung (Puligandla et al. 2000).

Daher beschäftigt sich die vorliegende Studie mit einem neuen Ansatz der Surfactanthärtung durch eine lokale anti-inflammatorische Therapie durch Inhibition der pulmonalen Ceramidproduktion.

Eine zentrale Bedeutung bei diesem Forschungsansatz hat das Sphingomyelin, welches zur chemischen Gruppe der Phospholipide gehört und aufgrund seiner molekularen Struktur einen amphiphilen Charakter besitzt. Das Grundgerüst der Sphingomyeline bildet das Sphingosin, ein Aminoalkohol. Sphingolipide sind ubiquitäre Bausteine von Plasmamembranen.

Sphingomyelinasen spalten die Phosphodiesterbindung des Sphingomyelins, wobei Ceramid (= Fettsäure + Sphingosin) und Phosphorylcholin (= Phosphat + Cholin) entstehen (Zumbansen 2001). Der Sphingomyelin-Signalweg beeinflusst zahlreiche zelluläre Aktivitäten wie die Zelldifferenzierung, Mitose, Gentranskription und programmierten Zelltod (Mathias et al. 1998)

Das Sphingolipid Ceramid spielt eine wichtige Rolle als intrazellulärer Mediator für Zelldifferenzierung und Apoptose, wobei die Mechanismen der Signaltransduktion noch nicht vollständig verstanden sind. Es gibt Hypothesen über eine Stimulation, z.B. des TNF-, TRAIL-, FasL-Rezeptoren oder von CD95, mit Aktivierung der aSMase und anschließender Freisetzung von Ceramiden. Als intrazellulärer Botenstoff aktivieren Ceramide wiederum bestimmte Proteine, darunter die Ceramid-aktivierende Protein-Phosphatase (Dobrowsky und Hannun 1993), Protein-Kinase C (Muller et al. 1995), G-Proteine Ras und Rac (Gulbins et al. 1995) und (Brenner et al. 1997), Phospholipase A2 (Huwiler et al. 2001). Eine Studie von Thon et al. beweist, dass nach Aktivierung der TNF- α -Rezeptoren (TNF-R55 und mTRAIL-R2) Ceramide auch als Botenstoffe des Caspase-unabhängigen programmierten Zelltods fungieren (Thon et al. 2006).

Zu den pro-apoptotischen Mediatoren, welche das Enzym saure Sphingomyelinase (aSMase) aktivieren und somit zur Produktion von Ceramiden führen, gehören unter anderem CD95 (Cifone et al. 1994), PAF (Goggel et al. 2004), TNF- α (Obeid et al. 1993), IL-1 (Mathias et al. 1993), Lipopolysaccharid (Haimovitz-Friedman et al. 1997) sowie unspezifische Stress-Stimuli wie γ -Strahlung (Pena et al. 2000), UVA-Licht (Chatterjee und Wu 2001) und Ischämie (Yu et al. 2000). Studien mit aSMase-knock-out-Mäusen oder Zellen

von Patienten mit der Niemann-Pick Erkrankung Typ A haben die entscheidende Rolle für die Apoptose-Induktion durch den Ceramid-Stoffwechselweg bestätigt. Die Ausbildung von Ceramid-reichen Plattformen (rafts) in der Plasmamembran nach Zellstimulation durch CD95 führt zu einer intrazellulären Aktivierung zahlreicher Enzyme und erklärt die hohe Anzahl an Rezeptoren und Liganden, die zu einer Aktivierung der sMase beitragen (Grassme und Schwarz 2001, Grassme et al. 2001 und Gulbins 2003). Die saure Sphingomyelinase ist außerdem ein entscheidender Faktor bei der Aufnahme von pathogenen Erregern in die Zelle (Hauck et al. 2000) und reguliert durch die Ceramid-Produktion die Freisetzung der Zytokine zur Aktivierung des Immunsystems sowie den Zelltod nach Infektion der Zelle (Grassme et al. 2003).

Für die Therapie des ARDS ist es entscheidend, dass Ceramide die Synthese ungesättigter Phosphatidylcholins, welche das Hauptphospholipid des Surfactantfilms darstellen, inhibieren (Awasthi et al. 2001). Es wurde darüber hinaus nachgewiesen, dass die N-Acyl-Gruppe des Ceramids sich in die Phosphatidylcholin-Schicht des Surfactantfilms integriert und dadurch einen Anstieg der Oberflächenspannung bewirkt (Ryan et al. 2003). Somit wirken Ceramide der Reduktion der Oberflächenspannung durch natürliches Surfactant entgegen. Außerdem beeinflussen Ceramide und Sphingosine verschiedene Enzyme für den Erhalt des Sphingomyelin-Ceramid-Gleichgewichtes, unter anderem die Sphingomyelinase, welche durch Ceramid aktiviert wird, und die Sphingomyelin-Synthase, welche gehemmt wird (Vivekananda et al. 2001). Der Ceramid-Signaltransduktionsweg hat also einen selbststimulierenden Rückkopplungsmechanismus, welcher zu einer weiteren Produktion von Ceramid führt.

Mallampalli et al. haben bewiesen, dass die Synthese der Phosphatidylcholine durch Interaktion mit der Phosphocholin-Cytidyltransferase (CTP) durch TNF- α , Ceramide und Sphingosine gehemmt wird. Diese Studie zeigte weiterhin, dass Glukokortikoide (z.B. Betamethason) die Surfactant-Synthese durch Aktivierung der CTP stimulieren können. Da Betamethason gleichzeitig die saure Sphingomyelinase hemmt, kommt es zu einer Zunahme des Membran-ständigen Sphingomyelins und einer Abnahme des Sphingosins. Die Serin-Palmitoyltransferase-Aktivität (1. Enzym für die Sphingolipid-Biosynthese) wird durch Glukokortikoide nicht beeinflusst. Mit Glukokortikoiden kann man der Entstehung der hemmenden Metabolite aus der Sphingomyelin-Hydrolyse somit entgegen wirken und die Surfactant-Synthese wieder steigern (Mallampalli et al. 1996).

Ein mögliche Intervention stellen die trizyklischen Antidepressiva Amitriptylin (Teichgraber et al. 2008), Imipramin und Desipramin dar, welche als unspezifische aSMase-Hemmer eine Inhibition der Ceramid-Synthese bewirken. Desipramin induziert möglicherweise die Proteolyse der sauren Sphingomyelinase, indem es das Enzym aus seinen Membran-gebundenen Lipidsubstraten löst und es als einen Angriffspunkt für proteolytische Enzyme isoliert (Kolzer et al. 2004).

Von Bismarck et al. konnten 2008 in einem tierexperimentellen Versuch die Möglichkeit einer Surfactanthärtung durch Imipramin aufzeigen, da in den Lungen von maschinell beatmeten Ferkeln eine signifikante Reduktion der aSMase-Aktivität nach wiederholter Kochsalzlavage auftrat und somit die Oberflächenspannung von Surfactantfilmen infolge niedrigerer Ceramid-Konzentrationen verbessert werden konnte. Imipramin schwächte außerdem die Ödementstehung und die Bildung von pro-inflammatorischen Mediatoren ab (von Bismarck et al. 2008). Weiterhin konnte auch eine mäßige Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nachgewiesen werden, was wiederum zu einer reduzierten Aktivität der aSMase mit dem Ergebnis einer verbesserten Oberflächenspannung des Surfactants führte (von Bismarck et al. 2007), vermutlich indirekt durch die eingeschränkte Expression von Zytokinen und Chemokinen.

Eine Einschränkung der aSMase-Aktivität soll in dieser Studie jedoch nicht durch die unspezifische Wirkung trizyklischer Antidepressiva, sondern durch den Einsatz von Substanzen aus dem Intermediärstoffwechsel des Surfactants, wie den natürlich vorkommenden Phosphatidylinositolen, erreicht werden.

Myo-Inositol angereicherte Milch für Frühgeborene wird in experimentellen Studien seit den 80er-Jahren des letzten Jahrhunderts eingesetzt, um typische neonatale Erkrankungen mit inflammatorischem Auslöser wie die broncho-pulmonale Dysplasie, Frühgeborenen-Retinopathie und nekrotisierende Enterocolitis einzudämmen. Ein Cochrane-Review aus dem Jahr 2003 (Howlett und Ohlsson 2003) bestätigte auf dem Boden von drei randomisierten, kontrollierten Studien eine signifikante Abnahme des Auftretens von broncho-pulmonaler Dysplasie und empfahl die Durchführung einer multi-Center-Studie zur Bestätigung dieser Beobachtung. Obwohl nachgewiesen wurde, dass der prozentuelle Anteil von Phosphatidylinositol in Surfactantfilmen innerhalb von drei Tagen nach Beginn der Supplementierung bereits angestiegen war (Hallman 1987), konnte der zugrundeliegende Effekt des Myo-Inositols bisher leider nicht geklärt werden (Hallman 1992).

Myo-Inositol ist ein sechswertiger zyklischer Alkohol (Zyklohexanhexol), welcher als Bestandteil der Membranphospholipide vorkommt. Im menschlichen Körper tritt Inositol zumeist mit Phosphaten verestert auf. Phosphorylierte Inositole werden durch ein komplexes Netzwerk von Kinasen und Phosphatasen synthetisiert und verändert, wobei unterschiedliche Produkte wie Phosphoinositide, Inositolphosphate und Diphosphoinositol-Polyphosphate entstehen (Best 2010). Eine Myo-Inositol-Supplementierung könnte daher zu einer beschleunigten und bevorzugten Synthese von Substanzen führen, die mit einer verbesserten Lungenfunktion einhergehen. Neuere Forschungsergebnisse (Spyridakis 2010) haben jedoch gezeigt, dass der Anteil an Phosphatidylinositolen in Surfactantfilmen von erwachsenen ARDS-Patienten bereits auf das 4-fache der Konzentration von gesunden Probanden ansteigt. Das stellt den vorteilhaften Einfluss eines diätisch erhöhten Phosphatidylinositol-Pools als Ursache für verbesserte Lungenfunktion in Frage und schiebt einen erhöhten Inositolphosphat-Pool, aus dem sich eine Vielzahl von second messenger generieren, in den Vordergrund. Die vorliegende Studie setzte sich das Ziel, positive Effekte einer Myo-Inositol-Anreicherung von Surfactant zu bestätigen und eventuell biochemisch zu erklären.

D-myo-Inositol-1,2,6-Trisphosphat (1,2,6-IP₃, Synonyme: α -Trinositol, pp56) ist ein Isomer des second messengers D-myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat (1,4,5-IP₃), wird aber in den Zellen von Menschen und Säugetieren nicht synthetisiert. 1,2,6-IP₃ besitzt zahlreiche interessante pharmakologische Eigenschaften wie die Hemmung des transkapillären Serumproteinaustritts (Lund und Reed 1994), Reduktion der Ödembildung bei Inflammation (Lingnau et al. 1997) sowie analgetische Effekte (Malmberg et al. 1995). Die molekulare Ähnlichkeit des 1,2,6-IP₃ mit 1,4,5-IP₃ legt nahe, dass Interaktionen mit 1,4,5-IP₃ abhängigen Signaltransduktionen oder Rezeptorstimulationen möglich sein könnten. 1,4,5-IP₃ fungiert als second messenger bei der Signalübertragung. Zunächst wird das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) durch die Phospholipase C (PLC) hydrolytisch in Diacylglycerin (DAG) und 1,4,5-IP₃ gespalten. Die Aktivierung von 1,4,5-IP₃-Rezeptoren bewirkt die Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum. Ca²⁺ und DAG sind zusammen ein Aktivator der Ca²⁺-abhängigen Proteinkinase C (PKC). Sphingosin als Bestandteil von Ceramiden hingegen hemmt die PKC. Inositoltrisphosphat wird im Zellstoffwechsel durch die IP₃-Phosphatase zu Inositolbisphosphat deaktiviert. Eine weitere Phosphorylierung durch eine IP₃-Kinase führt zu weiteren, höher phosphorylierten Inositolphosphaten, die ebenfalls Funktionen in der

Regulation der Zelle erfüllen; z.B. beeinflusst Inositol-1,3,4,5-Tetrakisphosphat die Funktion der neutrophilen Granulozyten und der angeborenen Immunität (Jia et al. 2008).

Bell und McDermott postulierten 1998, dass sich die pharmakologischen Effekte von 1,2,6-IP₃ durch eine Interaktion mit dem Phosphatidylinositol-Signalweg (auf Höhe des Plasmamembran-gebundenen 1,3,4,5-IP₄-Rezeptors) erklären lassen. Es kommt zu einer Blockade des Rezeptors mit reduziertem Ca²⁺-Einstrom und zur selektiven Bindung von Ras-GTPase-aktivierenden Proteinen (Cullen et al. 1995). Eine direkte Interaktion mit dem IP₃-Signalweg wird jedoch ausgeschlossen (Bell und McDermott 1998), da eine erhöhte Ca²⁺-Permeabilität der Zellmembran über die Aktivierung der Ca²⁺-abhängigen Myosin-Leicht-Ketten-Kinase zur Kontraktion und somit zu einer reversiblen Öffnung der Zellzwischenräume führt, wodurch ein vermehrter Eintritt von Serumproteinen, z.B. ins Lungeninterstitium, und eine Ödementstehung erklärt werden können ((Lum et al. 1992) und (Goggel und Uhlig 2005)). Eine präklinische Studie mit instrumentierten Lämmern nach Rauchgasinhalation zeigte den günstigen Einfluss auf die Suppression der pulmonalen Ödementstehung durch α -Trinositol auf (Nakazawa et al. 1994).

Die beschriebenen Erkenntnisse zum Einsatz von Inositol bzw. Inositolphosphaten bei Lungenerkrankungen führten zur Entwicklung und Durchführung einer tierexperimentellen Studie mit intensivmedizinischem Monitoring und anschließenden ex-vivo Untersuchungen der Lunge.

Die Instrumentierung der Ferkel umfasste die Intubation mit anschließender kontinuierlicher Beatmung über 72 Stunden, eine medikamentöse Analgosedierung und Muskelrelaxation, die Anlage eines venösen und arteriellen Zugangs mit Anschluss an einen Thermodilutionsmonitor sowie einer Magensonde und eines suprapubischen Katheters.

3 Lungenschädigungsprotokolle im Abstand von 24 Stunden wurden durchgeführt: wiederholte Kochsalzlavagen, eine lungenschädigende Beatmung sowie eine tracheale E.coli-Instillation. Die Interventionen mit Inositol oder IP₃ in exogenem Surfactant erfolgten jeweils 2 Stunden später.

Der Ansatz dieser Studie zum Thema der Surfactanthärtung bestand in der Inhibition der pulmonalen sauren Sphingomyelinase durch die eingesetzten Inositolphosphate, wodurch die Ceramid-Produktion reduziert und die Wirksamkeit des Surfactants verbessert werden sollte. Wir formulierten die Hypothese, dass die positiven Wirkungen der Surfactantgabe auf die Lungenfunktion (Gasaustausch, Lungenmechanik, Lungenödem) durch die Zugabe von

Myo-Inositol bzw. IP3 noch verbessert werden können und dies anhand der klinischen Parameter sowie molekularen und histologischen Auswertungen nachzuvollziehen ist.

2. Methoden

2.1 Instrumentierung der Ferkel:

Die Versuche fanden jede dritte Woche statt. Jeweils Montag- und Dienstagmorgen wurden 2 Ferkel im Alter von 3-6 Tagen und einem Gewicht von 1,9-3,2 kg aus der universitären Schweinezuchtanlage (Achterwehr) in einem Kleintiertransportkorb abgeholt. Nach dem Transport wurde den Tieren eine Ruhepause unter einer Wärmelampe gewährt.

Das Labor mit den 4 intensivmedizinischen Versuchsplätzen und dem Material für die Probengewinnung wurde schon jeweils in der Woche zuvor vorbereitet. Eine Kalibrierung des Lungenfunktionsmessplatzes, der Oxydigs (Dräger, Sauerstoffkonzentration in inspiratorischen Gasgemischen), der Neonatalen Volumen Monitore (NVM-1, Heinen & Löwenstein) sowie eine Testung der Beatmungsgeräte (Babylog 1, Dräger) fand als Check-up außerdem unmittelbar vor dem Versuch statt.

Vor der Instrumentierung erhielten die Versuchstiere nach Kontrolle ihres Gewichts die Prämedikation, bestehend aus 1,5 mg/kg Midazolam, 15 mg/kg Ketamin und 0,05mg/kg Atropin als intramuskuläre Injektion.

Nachdem die verabreichten Medikamente Wirkung zeigten, wurden die Ferkel auf die beheizten Versuchsplätze gelagert und ein peripherer Venenweg in eine Ohrvene gelegt. In wenigen Fällen musste auf eine oberflächige Bauchvene (V. mammaria) ausgewichen werden. Zeitgleich begann die kontinuierliche perkutane Kontrolle der Sauerstoffsättigung und Pulsfrequenz mittels Pulsoxymetrie. Sobald der venöse Zugang sicher befestigt war, wurde die Dauermedikation bestehend aus einer Stundendosis von 5 mg Ketanest, 0,4 mg Norcuron und 0,5 mg Midazolam angeschlossen.

In nächsten Schritt erfolgte nach einer Präoxygenierung mit 100% Sauerstoff die orotracheale Intubation mit einem 3,5 I.D.mm Doppellumen-Tubus. Einem Abfall der Sauerstoffsättigung wurde mit einer Unterbrechung der Intubation und Beutel-Masken-Beatmung mit 100% Sauerstoff entgegengewirkt. Die Gabe von ca. 10 mg Propofol erleichterte die Intubation, indem Abwehrreflexe reduziert wurden. Bei 2 von 80 Tieren musste aufgrund der anatomischen Verhältnisse der Tubus über ein Tracheostoma in der Trachea platziert werden. Unter kontinuierlicher Beatmung des Ferkels mit einem Beutel wurde eine 10 Ch. Magensonde gelegt. Die Ferkel wurden an die Beatmungsgeräte zur maschinellen Beatmung angeschlossen und das gemessene Zugvolumen und die

Atemfrequenz kontrolliert. Die Atemfrequenz betrug laut Protokoll zu Beginn des Versuchs 25/min, das Zugvolumen wurde durch Regulierung des PIP während des gesamten Versuchs bei 7ml/kg gehalten (PEEP 6 mbar, IT 0,5 sec, FiO₂ 0,5, Flow 8 l/min). Zusätzlich wurden die Frequenz und der Beatmungsdruck durch den Barolog (Dräger), und das Zugvolumen, Minutenvolumen und die Frequenz durch den Neonatalen Volumen Monitor (NVM-1) überwacht. Die Überprüfung des tatsächlichen FiO₂ der Beatmungsluft erfolgte durch das Gerät Oxydig.

Vor Beginn des Präparierens wurde zur Analgesie zusätzlich noch 10 µl/kg Fentanyl als Bolus über den peripheren Venenweg gegeben.

Unter sterilen Bedingungen erfolgten eine mediane Inzision der Haut unterhalb des Kehlkopfes und ein Spreizen der Muskeln, um eine Ligatur um die Trachea mit Hilfe eines breiten chirurgischen Bandes zu setzen und somit einer Leckage des Tubus bei der Messung von Lungenfunktionsparametern zu vermeiden. Im gleichen operativen Schritt wurden die Halsgefäße einer Seite frei präpariert und ein venöser Katheter mittels Seldinger-Technik in die Vena jugularis interna gelegt. Hatte der Katheter die richtige Lage im Gefäß, wurde er an der Haut festgenäht. Die Fäden, welche zur Unterbindung des Blutflusses um das Gefäß geschlungen waren, wurden um den Katheter im Gefäß zugeknotet und dienten als weitere Befestigung. Farbloses Octenisept® wurde in die Wunde getupft, um eine Entzündung zu verhindern. Die Wunde wurde mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Dieser zentralvenöse Zugang wurde nach Abschluss der Präparation an das PiCCO-System angeschlossen und durch einen kontinuierlichen Fluss (2 ml/h) aus einer NaCl-Heparin-Spülung (5000 IE Heparin/100ml 0,9%-NaCl-Lösung) offen gehalten.

Im Präparationsgebiet der Leiste wurde mit gleicher Vorgehensweise ein arterieller Katheter in die Arteria femoralis gelegt. Dieser Katheter diente sowohl für die Messung der hämodynamischen Parameter durch das PiCCO-System als auch der Entnahme von arteriellem Blut zur Bestimmung der Blutgaswerte. Ein Verschluss des Katheters wurde durch eine NaCl-Heparin-Infusion (5000 IE Heparin/100ml 0,9%-NaCl-Lösung) verhindert (Abbildung 1).



Abbildung 1: Instrumentiertes Ferkel

Mit dem Abschluss der Instrumentierung begann die Protokollierung der Blutgas-, Lungenfunktions- und Hämodynamik-Parameter der noch gesunden Tiere nach Vorgaben des Protokolls (Abbildung 2). Das Versuchsprotokoll umfasste wichtige Parameter wie die Atemfrequenz (AF), den Sauerstoffgehalt in der Inspirationsluft (FiO_2), das Tidalvolumen (V_t) sowie den positiven inspiratorischen Druck (PIP), um die Beatmung zu überwachen und gegebenenfalls auf Veränderung der Blutgaswerte reagieren zu können. Von den BGA-Werten wurden der pH, pCO_2 , pO_2 sowie der aktuelle Base-Exzess (ABE) notiert. Auch der Zeitpunkt der Lungenfunktionsmessung wurde im Protokoll festgehalten. Um eine Übersicht über das Sättigungsniveau und die Herz-Kreislauffunktion zu haben, waren die Sauerstoffsättigung ($\%SPO_2$), die Pulsfrequenz (PF) sowie alle Werte des hämodynamischen Monitorings wichtig. Zusätzlich folgten Notizen über die Zeit und Menge der Urinausscheidung, der Fütterung, der Antibiotikagabe, der Blutentnahmen und der Infusionsgeschwindigkeit der Dauermedikation. Während des gesamten Versuchs wurden die genannten klinischen Parameter zu festgelegten Zeitpunkten bestimmt, um kontinuierlich eine gute Übersicht über den Gesundheitszustand des Ferkels zu haben.

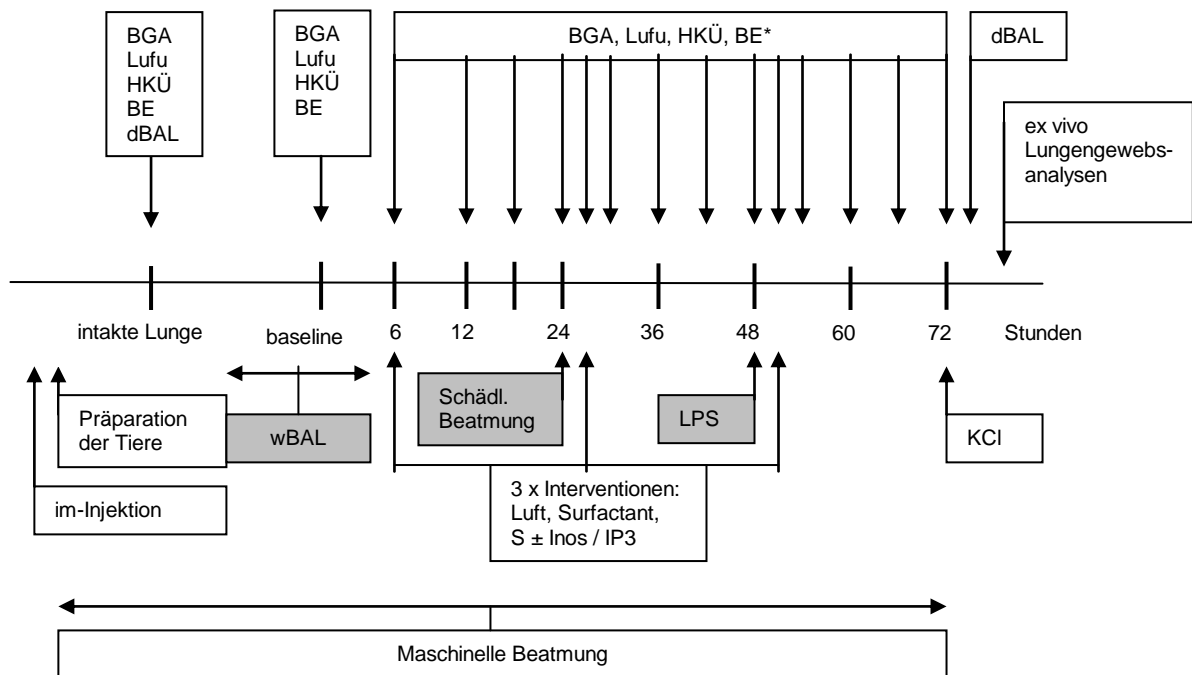


Abbildung 2: Zeittafel

Abbildungsverzeichnis: BGA = Blutgasanalyse; Lufu = Lungenfunktionsmessungen; HKÜ = Herzkreislaufüberwachung; BE = Blutentnahme (* zu den Zeitpunkten 0h, 24h, 48h, 72h); dBAL = diagnostische broncho-alveoläre Lavage; wBAL = wiederholte broncho-alveoläre Lavagen

Die Blutentnahmen erfolgten zur Bestimmung des großen Blutbildes, Elektrolyten (Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid), Kreatinin, GOT, Retikulozyten und zur manuellen Differenzierung der Blutzellen.

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

Ein Vermerk über das Urinvolumen und die Nahrungsmenge dienen der Kontrolle der Nierenfunktion und des Wasserhaushaltes. Die Ernährung erfolgte mit 25 ml/kg Körpergewicht Ferkelmilch (Panto FMS®) sechs Mal täglich über die Magensonde.

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

Falls die BGA-Werte eine Anpassung der Beatmung verlangten (PIP, AF, FiO₂), wurden die entsprechenden Parameter geändert, um anschließend mit dem ersten Schädigungsprotokoll, den wiederholten Kochsalzlavagen, fortzufahren.

2.2 Schädigungsprotokolle:

Während des Versuchs durchliefen die Tiere drei Schädigungsprotokolle im Abstand von jeweils 24 Stunden.

2.2.1 Broncho-alveoläre Lavagen:

Das erste Schädigungsprotokoll bestand aus wiederholten broncho-alveolären Lavagen mit körperwarmer 0,9%-NaCl-Lösung durch den Tubus bei Unterbrechung der maschinellen Beatmung. Die Lavagen wurden in verschiedenen Körperpositionen (Rechtslage, Linkslage, Rückenlage, Bauchlage) durchgeführt und nach einer Anpassung der Atemfrequenz auf 35/min alle 3-5 min wiederholt. Die Flüssigkeitsmenge pro Lavage betrug 30ml/kg Körpergewicht. Von jeder Lavage wurde das ausgewaschene Surfactant gesammelt und die zurückgewonnene Flüssigkeitsmenge in Millilitern zur prozentualen Feststellung der Verlustmenge festgehalten. Von der ersten Lavageflüssigkeit wurde außerdem die Zellzahl pro Mikroliter notiert und eine kleine Flüssigkeitsmenge zur Bestimmung prävalenter Atemwegserreger vor Beatmungsbeginn in das mikrobiologische Labor geschickt. Es erfolgte außerdem eine FACS-Analyse auf CD14+ und CD18+-Zellen.

Während der Lavage kam es zur Abnahme der Sauerstoffsättigung und der Herzfrequenz. Anhand der Erholungsdauer dieser zwei Parameter sowie der Einschränkung der Oxygenierung wurde der klinische Zustand der Tiere während der Lungenschädigung abgeschätzt. Bei Verlangsamung der Erholung kam es zu wiederholten Messungen der arteriellen Blutgaswerte. Wenn der arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO₂) unter 50 mmHg bei FiO₂ von 0,5 sank (PaO₂/FiO₂<100 mmHg), wurden die Lavagen für 20 Minuten unterbrochen. Lag der PaO₂/FiO₂-Quotient nach der Wartezeit weiterhin um 100 mmHg, kam es zur Beendigung des ersten Schädigungsprotokolls. Bei verbesserter Oxygenierung mit einem PaO₂/FiO₂ >120 mmHg wurden ein bis zwei weitere Lavagen durchgeführt und erneut die Blutgaswerte bestimmt. Wenn der Quotient danach ~100 mmHg betrug, wurden weitere 20 Minuten abgewartet. Dann erfolgte die baseline-Messung laut Protokoll (Abbildung 2).

2.2.2 Lungen-schädigende Beatmung:

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

Schritt 1: In den ersten 60 Minuten wurden die Tiere mit einem PEEP von 0 mbar und normalem Tidalvolumen von 7 ml/kg ventilert (Dreyfuss et al. 1988).

Schritt 2: In den folgenden 60 Minuten fand zwar wieder eine Beatmung mit einem PEEP von 6 mbar statt, jedoch mit einem doppelten Tidalvolumen von 15 ml/kg, welches den maximalen PIP von 35 mbar (zur Vermeidung eines Pneumothorax) nicht überschreiten sollte, und mit einer halbierten Atemfrequenz (Dreyfuss et al. 1995).

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

2.2.3 E.coli-LPS-Instillation:

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

2.3 Intervention nach Randomisierung:

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

1. Kontrolle Luft (2,5 ml/kg)
2. Intervention Surfactant (Curosurf[®] 50 mg/kg)
3. Intervention Surfactant (Curosurf[®] 50 mg/kg) + Myo-Inositol 40 mg
4. Intervention Surfactant (Curosurf[®] 50 mg/kg) + Myo-Inositol- 1,2,6-P3 2 mg

Die Kontrollgruppe bekam lediglich einen Luftbolus von 2,5 ml/kg unter einer Atemfrequenz von 35/min appliziert. Surfactant, ggf. mit Substituenten, wurde über 2 Minuten bei ununterbrochener Beatmung zwei Stunden nach den baseline-Messungen intratracheal über den zweiten Tubusschenkel gegeben und die Atemfrequenz anschließend auf 25/min zurückgestellt. Alle Substituenten waren in 1 ml 0,9%- NaCl gelöst und wurden zur Surfactantemulsion hinzugefügt. Sie wurden unabhängig vom individuellen Körpergewicht der Tiere für ein Ferkel von 2,5 Kilogramm Gewicht berechnet.

2.4 Beendigung des Versuchs und Abrüsten der Tiere:

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

Anschließend wurde der Thorax durch einen Schnitt durch das Sternum und entlang des Rippenbogens eröffnet und das Herz-Lungen-Paket herausgelöst. Die geschädigte Lunge beurteilten wir optisch. Die Anteile der geschädigten Lunge wurden für jeden Lungenlappen geschätzt und ins Protokoll aufgenommen. Es folgte die Entnahme von vierzehn Proben aus dem rechten Lungenunterlappen, welche zur späteren histologischen Untersuchung bei -80 °C eingefroren wurden. Außerdem wurde eine Probe aus dem rechten Lungenlappen für die Formalinfixierung entnommen.

Die linke Lungenhälfte wurde post mortem einer Lavage unterzogen. Wie bei der initialen Lavage kam es zur Bestimmung der Zellanzahl pro Mikroliter. Eine kleine Flüssigkeitsmenge wurde zum Ausschluss einer manifesten Infektion unter maschineller Beatmung trotz Antibiotikaprophylaxe an das mikrobiologische Labor geschickt. Das gewonnene Surfactant wurde gesammelt und eingefroren. Von der gewonnenen Lavageflüssigkeit wurde erneut eine FACS-Analyse durchgeführt.

2.5 Lungenfunktionsmessungen:

Die Messungen der spezifischen Compliance des respiratorischen Systems (C_{rs}) und der Resistance (R_{rs}) wurden mit Hilfe eines Lungenfunktionsmessgerätes durchgeführt. Dies besteht im Wesentlichen aus einem Differentialdrucktransducer, der über einen analog-digital-Wandler mit einem Computer in Verbindung steht. Die Lungenfunktionsparameter wie das Tidalvolumen (V_t), die spezifische Compliance (C_{rs}) und die Resistance (R_{rs}) wurden berechnet, indem das Flusssignal mit dem Differentialdrucktransducer (Fleisch Größe 00, Lausanne, Schweiz) am Endotrachealtubuskonnektor erfasst und über einen einzelnen Atemzug integriert wurde (single breath- least mean square Technik). Bei allen gemessenen Größen fand eine Umrechnung auf BTPS-Bedingungen statt.

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

2.6 Blutgasanalysen:

Für die Durchführung einer Blutgasanalyse kam es zu einer Blutprobenentnahme von 0,1 ml arteriellem Blut aus der Arteria femoralis. Anschließend wurde das entnommene Blut in das Blutgasanalysegerät (ABL5, Radiometer) geleitet.

Anhand dieser gemessenen Parameter (pH, PaO₂, PaCO₂ und ABE) erfolgte die Anpassung der Beatmung.

2.7 Maschinelle Beatmung:

Bei der maschinellen Beatmung kam es zur Anwendung von flusskonstanten, zeitgesteuerten und drucklimitierenden Beatmungsgeräten (Babylog 1, Dräger). Die gewählten Beatmungsparameter (Flow 8 l/min, IT 0,5 sec, PEEP 6 mbar, PIP und FiO₂ 0,5) wurden aus der klinischen Situation eines Neugeborenen mit Lungenversagen hergeleitet.

Im Zuge des zunehmenden Surfactantmangels durch die wiederholten Lavagen musste der inspiratorische Beatmungsdruck (PIP) Schritt für Schritt erhöht werden, um bei

abnehmender Compliance das Tidalvolumen bei 7 ml/kg konstant zu halten und somit einer alveolären Hypoventilation vorzubeugen.

Folgende Anpassungen sollten in regelmäßigen Abständen durchgeführt werden:

Atemfrequenz:

- + 5/min, wenn $\text{PaCO}_2 > 50 \text{ mmHg}$
- + 10/min, wenn $\text{PaCO}_2 > 60 \text{ mmHg}$
- 5/min, wenn $\text{PaCO}_2 < 35 \text{ mmHg}$
- 10/min, wenn $\text{PaCO}_2 < 30 \text{ mmHg}$

FiO₂:

- + 0,1, wenn $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 50 \text{ mmHg}$
- 0,1, wenn $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 > 150 \text{ mmHg}$

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

Berechnung des Ventilationseffizienzindex (VEI):

Der Ventilationseffizienzindex verbindet die alveoläre Ventilation mit der respiratorischen Zufuhr durch eine maschinelle Beatmung und erlaubt somit Vergleiche der respiratorischen Funktion, wenn die Werte für den Beatmungsdruck und den arteriellen CO₂-Gehalt variieren. Es handelt sich um einen guten Parameter zur Detektion von Veränderungen der Lungenfunktion, der sich wie folgt errechnet (Notter et al. 1985):

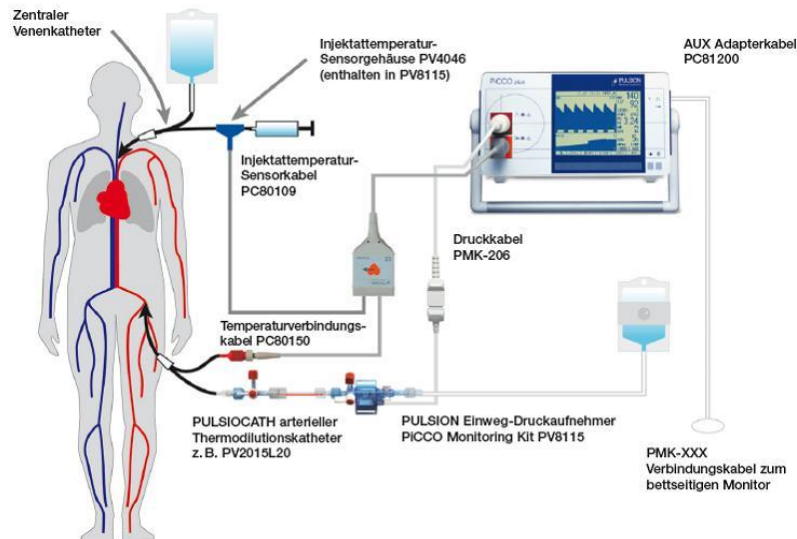
Ventilationseffizienzindex: alveoläre Ventilation / Beatmungsdruckdifferenz x Atemfrequenz

alveoläre Ventilation = CO₂-Produktion (~3800)/ arteriellen CO₂-Gehalt

Beatmungsdruckdifferenz = Druck Ende Inspiration (PIP) - Druck Ende Expiration (PEEP)

$$3800 / (\text{PIP}-\text{PEEP}) \times \text{Frequenz} \times \text{PaCO}_2$$

2.8 Hämodynamisches Monitoring:



<http://www.pulsion.com/index.php?id=2528>

Abbildung 3: Hämodynamisches Monitoring

Diese Abbildung zeigt den vollständigen Aufbau für das invasive hämodynamische Monitoring wie es für unseren Versuch genutzt wurde. In unserem Labor wurde das PiCCO-System der Firma Pulsion Medical Systems (München) verwendet, um verschiedene hämodynamische Parameter mittels Thermodilution zu bestimmen. Nach Eingabe der individuellen Ferkeldaten fand ein Nullabgleich statt. Dazu wurde der Druckaufnehmer zum Ferkel verschlossen und das System zur Raumluft geöffnet. Das PiCCO-Gerät führte selbstständig eine Kalibrierung der Druckmessung zum Umgebungsdruck durch und setzt den gemessenen Druck gleich Null (Nullabgleich). Nachdem die Eichung abgeschlossen war, konnte die erste Messung der hämodynamischen Parameter starten.

Die zu applizierende Menge an Kältebolus für die Bestimmungen der Thermodilution betrug 2 ml NaCl 0,9% bei 4°C, die möglichst gleichmäßig und schnell über den venösen Katheter injiziert werden musste. Nach der Passage der kalten Flüssigkeit durch die Lungenstrombahn wurden durch eine Thermoelektrode im arteriellen Katheter die Temperaturveränderungen registriert, um daraus die hämodynamischen Parameter abzuleiten. Auf dem Bildschirm zeichnete sich die Thermodilutionskurve ab. Mittels Stewart-Hamilton-Gleichung berechnete das Gerät nun aus der Fläche unter der Thermodilutionskurve das Herzzeitvolumen. Vorlast und Lungenwasser wurden aus der mittleren Durchgangszeit und Abfallzeit der Thermodilutionskurve ermittelt. Während der

Thermodilution kam es gleichzeitig zu einer Analyse der Pulskontur und Kalibrierung des Pulskonturalgorithmus durch das Gerät, wodurch im Anschluss eine kontinuierliche Erfassung jedes einzelnen Schlagvolumens erfolgen konnte. Daraus ließ sich wiederum das HZV mittels der Gleichung bestimmen: Herzzeitvolumen = Schlagvolumen x Herzfrequenz. Um eventuelle Ungenauigkeiten während der Durchführung und die damit verbundene Varianz zu minimieren, wurde der Messvorgang wiederholt und der Mittelwert aus zwei Messungen notiert.

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

- AD: arterieller systolischer und diastolischer Blutdruck (mmHg)
- HR: Herzfrequenz (1/min)
- SVRI: systemischer vaskulärer Widerstandindex ($\text{dyn} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^{-5} \cdot \text{m}^2$)
- HI: Herzindex aus Thermodilution ($\text{l}/\text{min}/\text{m}^2$)
- EVLWI: extravaskulärer Lungenwasserindex (ml/kg)
- TB: Körpertemperatur ($^{\circ}\text{C}$)

Die beurteilten Parameter dienten somit der Überwachung der Herz-Kreislaufsituation und des Flüssigkeithaushalts der Lunge. Bei wenigen Tieren wurde aufgrund einer Hypotonie eine Volumensubstitution mit Jonosteril[®] HD 5 zur Stabilisierung des Herzkreislaufsystems durchgeführt.

Lungenwasser:

Das extravaskuläre Lungenwasser setzt sich aus interstitiellem, intraalveolärem und intrazellulärem Gewebewasser in allen perfundierten Lungenarealen zusammen und gibt somit einen Hinweis auf die außerhalb der Lungenkapillaren gelegene eingelagerte Flüssigkeit. Dies ist ein diskontinuierlicher Parameter, welcher nur während der Thermodilution erfasst werden konnte und sich bei Zunahme der Flüssigkeitsmenge negativ auf die Compliance und die Oxygenierung auswirkte.

Nachlast:

Die Nachlast wurde durch die Bestimmung des systemischen vaskulären Widerstandsindex (SVRI) beurteilbar und war ein weiteres diagnostisches Mittel zur Abschätzung der kardiovaskulären Mitreaktion durch die wiederholte Lungenschädigung.

Herzzeitvolumen:

Durch die Multiplikation des Schlagvolumens mit der Herzfrequenz konnte das kontinuierliche Herzzeitvolumen (PCHZV) bestimmt werden, das für jeden einzelnen Herzschlag angezeigt wurde. Im Protokoll wurde jedoch nur der Herzindex (HI) mittels Stewart-Hamilton-Gleichung zum Zeitpunkt der Thermodilution notiert.

2.9 Durchflusszytometrie (FACS):

In unserem Versuch wurden die initial und postmortal gewonnenen Zellen aus den bronchoalveolären Lavagen mittels Durchflusszytometrie analysiert (FACScan, Becton Dickinson). Für die Versuchsauswertung waren die CD14+ und die CD18+ (β 2-Integrin-positiven) Zellen, die durch ihre Antigenexpression phänotypisiert werden konnten, von Bedeutung.

Die Färbung der Lavageflüssigkeit geschah nach mehrmaligem Waschen der Zellen mit einem Waschpuffer (PBS, 1% Rinderserumalbumin, 0,1% Natriumazid). Die Röhrchen wurden mit einem Milliliter Waschpuffer aufgefüllt, die Zellen mit 300facher Erdanziehungskraft (g) bei Raumtemperatur sedimentiert und anschließend der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Dann folgte eine Resuspension der Zellpellets in Waschpuffer.

Zusätzlich wurden vor der Färbung die F_C -Rezeptoren, die vorwiegend auf Monozyten, Granulozyten und anderen Immunzellen zur Erkennung von Bakterien vorhanden sind, durch das Blockierungsreagenz abgesättigt. Dadurch konnte die Interaktion der F_C -Rezeptoren mit den Antikörpern, die auch einen F_C -Anteil besitzen und somit eine unspezifische Färbung bewirken würden, verhindert werden.

Dann wurden je 5 oder 10 μ l des jeweiligen Antikörpers in 50 μ l Zellsuspension gegeben und gründlich vermischt, um im Anschluss die Zellen mit den monoklonalen Antikörpern für 30 Minuten bei 4° C unter Lichtabschluss zu inkubieren.

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

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

Es gab vier Probenröhrchen pro Lavage mit folgenden Antikörpern:

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

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

2: Das CD14-Antigen wird vor allem auf Monozyten stark exprimiert. Es wird außerdem auch auf neutrophilen Granulozyten exprimiert. CD14-Antikörper (LS-C57417 CD14 (FITC), livespan biosciences) war im Versuch an den fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein-isothiocyanat (FITC, Beckman Coulter) gebunden.

3: Das CD18-Antigen wird vor allem auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert. Es wird jedoch auch auf Makrophagen, Zellen der myelo-monozytären Zelllinie sowie auf T- und B-Lymphozyten angetroffen. Integrine haben eine fundamentale Bedeutung bei der Pathogenese von Entzündungsprozessen. Es gehört zur Familie der Adhäsionsprotein (Untergruppe β_2 -Integrine) und ermöglicht eine feste Bindung der Zellen an das kapilläre Endothel und ihre Transmigration ins entzündete Gewebe (Siegenthaler 2006).

Der CD18-Antikörper (PE-CyTM5 mouse anti-human CD18) ist an eine Kombination der Fluoreszenzfarbstoffe PE (Phycoerythrin) und Cy5 (Cyanin-5) gebunden.

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

2.9.1 Messung:

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

Für die Messung wurden die Proben einzeln in die Messkapillare eingespannt. Durch den im Röhrchen erzeugten Überdruck wurde die Zellsuspension in die Messkapillare hineingedrückt. Anschließend wurde der Zellsuspension zusätzliche Trägerflüssigkeit hinzugefügt und stark beschleunigt. Dies hatte die hydraulische Fokussierung zur Folge, bei der die Zellen nacheinander aufgereiht den Laserstrahl in der Messkammer passieren konnten. Beim Passieren der einzelnen Zelle wurde der Strahl des Lasers durch ihre Eigenschaften (z.B. Größe, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile) in seiner Richtung, nicht jedoch in der Wellenlänge, verändert.

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

Zusätzlich zur Lichtbeugung wurde die Immunfluoreszenzmessung von FITC und PE-Cy5 durchgeführt. Ein eingebauter Argon-Laser mit der Wellenlänge von 488 nm regte die durch die Antikörper an die Zelloberfläche gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe an. Die verwendeten Farbstoffe lassen sich zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge von 488 nm anregen, verfügen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren. Die Emission verhält sich proportional zur Menge der gebundenen Antikörper. FITC emittiert ungefähr die Wellenlänge von 525 nm und PE-Cy5 von ungefähr 670 nm. Die Emissionen wurden durch vorgeschaltete Bandpassfilter von 20 nm (zur besseren optischen Trennung der Emissionsspektren) mit Photodetektoren im 90°-Winkel registriert. Diese wurden in elektrische Impulse umgewandelt, verstärkt und anschließend unter einer Datei-Nummer gespeichert. Bei der Lichtbrechung war eine lineare und bei monoklonalen Antikörpern eine logarithmische Verstärkung notwendig.

2.9.2 Auswertung:

Die Auswertung wurde mit Hilfe des Computerprogramms Cellquest pro[®] vorgenommen und erfolgte für jede Lavagemessung gleichermaßen nach einem voreingestellten Protokoll. Dieses Protokoll beinhaltete gewählte technische Messeinstellungen wie den Schwellenwert, die Kompensation und die Detektorensensibilität.

Der Schwellenwert („threshold“) ist die Grenze, bei deren Überschreitung das Abspeichern der Daten aktiviert wurde. Dadurch konnte das „Hintergrundrauschen“ durch nicht lysierte Erythrozyten und andere kleine Bestandteile minimiert werden. Die Kompensation der Daten korrigierte die Überlappung der Fluoreszenzen, da die Bandmaßfilter von 20 nm keine vollständige Trennung der Emissionsbereiche von FITC und PE-Cy5 erlaubten.

Bei der Auswertung wurden insgesamt 4 Parameter berücksichtigt: Größe, Granularität sowie die Fluoreszenzen FITC und PE-Cy5.

Die Parameter Größe und Granularität wurden in einem Streudiagramm dargestellt, wobei die Größe auf der y-Achse und die Granularität auf der x-Achse aufgetragen wurde. In dieser

Darstellung konnte ein Gate mit der „Region of interest“ (RIO)-Technik zur Eingrenzung der interessanten Zellen vorgenommen werden, so dass sehr kleine Zellen und tote Zellbestandteile in der unteren linken Ecke aus der Messung ausgeschlossen wurden.

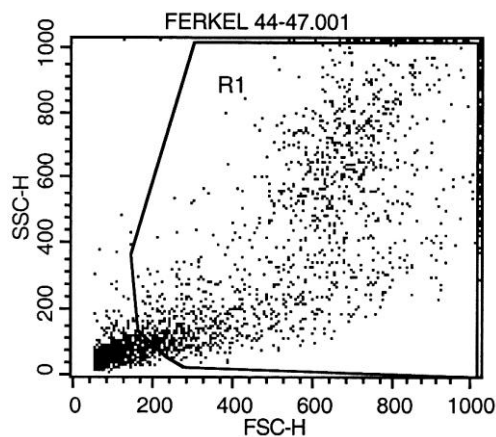


Abbildung 4: Markierung der Zellen mittels RIO

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

In einem Dot-Plot wurden auf den beiden Achsen jeweils die Messungen der Fluoreszenzintensitäten aufgetragen. Der Farbstoff Fluorescein-isothiocyanat (FITC) wurde als FL1 (gelb) auf der horizontalen Achse und Phycoerythrin-Cyanin-5 als FL3 (rot) auf der vertikalen Achse dargestellt.

Als ein Punkt (dot) wurde jede gemessene Zelle im Schnittpunkt entsprechend ihrer Fluoreszenzintensität aufgetragen. Somit konnten verschiedene Zellpopulationen, die entweder für jeweils einen oder beide Oberflächenmarker ein Signal zeigten, beurteilt werden.

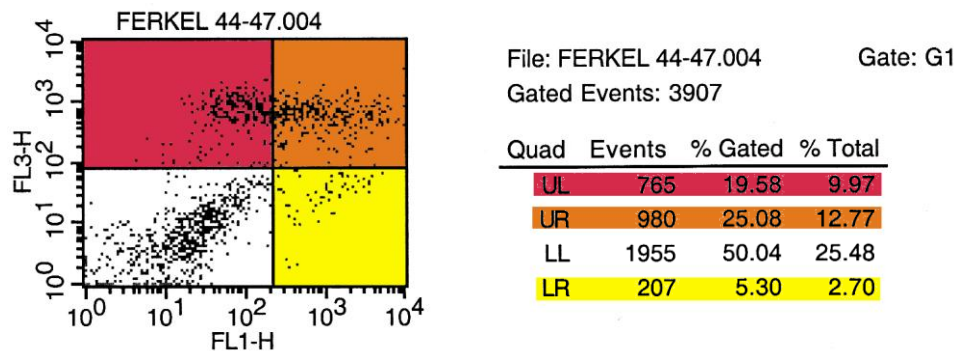


Abbildung 5: Punktwolkendarstellung

Die Abbildung 5 zeigt eine Punktwolkendarstellung (Dot-Plot) mit Quadrantenaufteilung der einzelnen Populationen. Der gelb markierte Bereich zeigt die FITC-markierten Zellen (LR = lower right), im roten Bereich befinden sich PE-Cy5 positiven Zellen (UL = upper left) und im orangenen Quadranten (UR = upper right) zeichnen sich die doppelt positive Population von β -Integrin-positiven Monozyten ab. In der Tabelle werden die prozentualen Anteile der Populationen angegeben.

Die Populationen wurden durch die Quadrantenanalyse definiert, indem für jede Fluoreszenz durch Schwellenwerte in Form eines Kreuzes die positiven und negativen Zellen nach der Isotypkontrolle unterteilt wurden. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der vier Populationen, in Bezug auf die im Gate gemessenen sowie die gesamten Ereignisse, ermittelt.

2.10 Gewebeproben:

Die entnommenen Proben aus den Ferkellungen wurden zur Messung der Ceramid- und Caspase-8-Konzentration und zur Aktivitätsbestimmung der sauren Sphingomyelinase verarbeitet.

2.10.1 Ceramid-Konzentration und aSMase-Aktivität:

Die Aktivität des Enzyms saure Sphingomyelinase (aSMase) wurde mittels markiertem Carbon¹⁴-Sphingomyelin als Substrat in einem in Vitro-Assay bestimmt. 10 µg pulverisiertes und geschmolzenes Lungengewebe zusammen mit 1,4 mM ZnCl₂ und einem Puffer bestehend aus 250 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA und 2,25 µg Sphingomyelin wurden zur Analyse verwendet. Das Phosphorylcholin als Produkt der aSMase wurde durch die Zugabe von 800 µl Chloroform/Methanol (2:1) und 250 µl H₂O aus dem Lungengewebe gelöst. Die Menge an radioaktivem Phosphorylcholin, welches durch die Hydrolyse des ¹⁴C-Sphingomyelins entstanden war, konnte anschließend in der wässrigen Phase mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt werden (Wiegmann et al. 1994).

Zur Bestimmung der Ceramid-Konzentration kam es, wie von Jensen et al. beschrieben, nach der Extraktion aus dem Lungengewebe durch Chloroform/Methanol zunächst zur Trennung einzelner Lipide durch die Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie. Anschließend erfolgte die Quantifizierung mittels der 2D-Laserdensitometrie (Jensen et al. 1999).

2.10.2 Caspase-8-Konzentration in Lungengewebe: Western-blot und Immunhistochemie

Die Caspase-8 Konzentrationen wurden mittels western-blot ermittelt. Pulverisiertes Lungengewebe wurde dabei mit 40 mM HEPES, 150 mM KCl und 0,1%igem Triton X-100 bei einem pH von 7,4 homogenisiert und die Proteinkonzentrationen mit der Bicinchoninsäure-Methode bestimmt. Die homogenisierten Lungen wurden dann unter Anwendung von 12,5%igem Natrium-Dodecylsulfat zur Polyacrylamid-Elektrophorese vorbereitet. Das Gel wurde auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen und die Immundetektion mit Hilfe eines primären Caspase-8 Antikörpers und des sekundären Meerrettichperoxidase-Antikörpers sichtbar gemacht (Santa Cruz Biotechnology,

Heidelberg). Die blots wurden dann mit ECL Erkennungsreagens (GE Healthcare, München) markiert und durch Autoradiographie auf Röntgenfilme aufgenommen. Die western-blot Quantifizierung wurde dann densitometrisch unter Anwendung eines Fuji-Film LAS-3000 Image Analyzers (FujiFilm, Kleve) und der Software AIDA V 4.04 (raytest, Straubenhardt) vorgenommen.

Immunhistochemie:

Das im Paraffin eingebettete Lungengewebe wurde für die immunhistochemischen Untersuchungen genutzt. Zunächst mussten die Lungengewebsabschnitte in RotiClear™ deparaffiniert und rehydriert werden, in gepufferter Kochsalzlösung gewaschen und für 10 Minuten in der Mikrowelle in frischem Zitratpuffer (pH 6) gekocht werden. Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde geblockt, um anschließend durch Inkubation in 0,3%-TritonX-100/1% Wasserstoffperoxidase für 20 Minuten durchlässig gemacht zu werden. Dann mussten die Lungengewebsabschnitte durch 10%-Esel-Serum (Dinova, Hamburg) für 1 Stunden bei Raumtemperatur geblockt werden, um eine Antikörper-Bindung gegen die Caspase-8 (Kaninchen-IgG; Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt) mittels Inkubation bei 4°C über Nacht zu ermöglichen. Die Signale durch die Antigen-Antikörper-Bindung wurde mittels Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain Peroxidase Versuchssatz, Vector Laboratories, Burlingame, USA) verstärkt und mittels Diaminobenzidin (Roche, München) sichtbar gemacht. Am Ende wurden eine Gegenfärbung mit Hämalaun (Sigma, München) und die Dehydrierung mit einer Reihe von Äthanolen durchgeführt, bevor die Präparate mit Eukitt™ (Kindler, Freiburg) auf Objektträger aufgetragen wurden und die Auswertung mittels Lichtmikroskopie durchgeführt werden konnte.

2.10.3 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)-Färbung:

Diese Methode dient der Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen durch die Visualisierung der entstehenden DNA-Fragmente (Roche, Mannheim). Die Lungengewebsabschnitte wurden, wie oben beschrieben, deparaffiniert, rehydriert, gekocht und in TritonX-100/Wasserstoffperoxidase eingetaucht. Eine unspezifische Anfärbung durch die TUNEL-Reaktionsmischung wurde durch eine Inkubation in 3% Schweineserumalbumin/gepufferter Kochsalzlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur verhindert. Nach dem Waschen schloss sich die Inkubation mit der Konverter-Peroxidase für 30 Minuten bei

37°C an. Die Kennzeichnung der apoptotischen Zellen gelang durch das Hinzufügen des DAB-Substrates (Roche, Mannheim) für 10 Minuten. Durch das Weglassen der TUNEL-Reaktionsmischung konnten negative Kontrollen durchgeführt werden, da keine spezifische Färbung resultierte. Die Bewertung der Lungengewebsabschnitte erfolgte mit Hilfe eines „alveolären-Apoptose-Score“ in der Lichtmikroskopie. 4-6 Alveolen wurden ausgewählt, um die Anzahl der apoptotischen Zellen in einer Reihe von 200 alveolären Epithelien als Referenz zu bewerten. Die ausführende Kollegin vollzog die Untersuchung ohne Wissen über die jeweilige Interventionsgruppenzugehörigkeit des analysierten Lungenabschnitts.

2.11 Messung der Oberflächenspannung:

Die Isolierung des Surfactants wurde durch Filterung und Zentrifugieren der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit für 5 Minuten bei 2500 rpm erreicht. Das Pellet wurde gewogen und in Kochsalzlösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml resuspendiert. 500 µl Surfactantlösung (5 mg) wurden auf die Oberfläche eines angewärmten Kochsalz-Bades gegeben, um die minimale (Oberfläche $12,8 \text{ cm}^2 = 20\%$) und maximale (Oberfläche $64 \text{ cm}^2 = 100\%$) Oberflächenspannung mit Hilfe einer modifizierten Wilhelmy-Waage (E. Biegler, Mauerbauch, Österreich) zu bestimmen.

Die Bestimmung der Oberflächenspannung nach der Wilhelmy-Plättchen-Methode beruht auf der Ablenkungskraft eines dünnen Metallplättchens, die nach Berührung mit der Oberfläche der zu untersuchenden Flüssigkeit (in Abhängigkeit von der Oberflächenspannung) gemessen wird.

Eine dünne Folie hängt dabei frei beweglich am Ende eines Waagebalkens und wird mit seiner unteren Kante senkrecht auf die Oberfläche einer benetzenden Flüssigkeit aufgesetzt. Durch zyklische Verkleinerung und Vergrößerung der mit Surfactantlösung benetzten Kochsalz-Oberfläche kommt es zur Ablenkung der eingetauchten Folie. Die damit verbundene Kraft wird durch die Waage registriert.

2.12 Quantitative Echtzeit-PCR zur Bestimmung von Mediatoren im Lungengewebe:

Die RNA-Isolierung konnte aus 30 mg Lungengewebspulver mit dem NucleoSpin RNA II Kit (Machery Nagel, Düren) automatisch durch den QIA Würfelroboter (Qiagen, Hilden) erfolgen. Das NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Fisher, Waltham, USA) wurde für die RNA-Quantifizierung und Qualitätskontrolle verwendet. 675 ng RNA- und 1 µl Oligo(dT)₁₅ Primer (0.5 µg/µl, Invitrogen, Karlsruhe) wurden zu 12 µl Wasser hinzugefügt. Nach 10 min Inkubation bei 65°C auf einem UNO II Thermocycler (Biometra, Göttingen) wurden zusätzlich fünf Mal 4 µl Puffer, 2 µl dNTP (10mM), 1 µl RNasin (40U/µl) und 1 µl M-MLV RT (H-) (200U/µl; alle Substanzen von Promega, Mannheim) hinzugefügt. Im Anschluss erfolgten 2 Inkubationszeiträume von je 90 min bei 40°C und 5 min bei 95°C auf dem UNO II Thermocycler.

Quantitative Echtzeit-PCR: 1 µl cDNA wurde als Schablone mit einem 312,5 nM Vorwärtsprimer (Eurofins, Ebersberg), 312,5 nM Rückwärtsprimer (248 nM für Il-6) und SYBR-Green I Mastermix (Roche Diagnostics, Mannheim) laut Herstellerangaben in einem LightCycler480 (Roche) inkubiert. Cp (crossing point) Werte wurden mittels Maximum-Likelihood-Methode erhoben. Die erweiterte relative Quantifizierung erfolgte ebenfalls mit Hilfe der LightCycler 480 Software 1.5 SP3 (Roche) und wurde anschließend durch die Standardkurven der „Roche Applied Science E-Methode“ korrigiert (Tellmann 2006). Als Referenz wurden die erhobenen Werte dem korrespondierenden β 2-Mikroglobulin (B2m)-Gen gegenübergestellt und auf den Mittelwert der C-Gruppe Werte normiert.

Zur Qualitätskontrolle der mitgelaufenen Negativkontrollen wurden die Profile einer Schmelzkurve mit Hilfe der LightCycler 480 Software ausgewertet und eine Produkttrennung auf Agarosegelen durchgeführt.

2.13 Statistische Methoden:

Um die Unterschiede in den vielen, erhobenen Messwerten darstellen zu können, kamen vor allem 2 Arten von Varianzanalysen (analysis of variance, ANOVA) zum Einsatz:

- one-way ANOVA: die einfaktorielle Analyse untersucht den Einfluss einer unabhängigen Variable auf die Zielgröße
- two-way ANOVA: die zweifaktorielle Analyse berücksichtigt den Einfluss von 2 unabhängigen Faktoren

Mit Hilfe der two-way ANOVA sollte der Einfluss der unabhängigen Variablen Zeit und Intervention auf die jeweilige Zielgröße (z.B. den Oxygenierungsindex als klinischen Parameter) überprüft werden. Wenn die Versuchsgruppen sich signifikant in der Zielgröße unterscheiden, kann angenommen werden, dass in den Gruppen unterschiedliche Gesetzmäßigkeiten wirken. So lassen sich die Wirkstoff-Einflüsse in mehreren Versuchsgruppen auf eine Zielgröße bestimmen.

Zur Erkennung der Unterschiede in den Langzeitwirkungen der Interventionen erfolgte zusätzlich eine Analyse der folgenden Zeitabschnitte:

- 12h-24h (erster Tag 12 bis 24 Stunden nach der baseline-Messung),
- 36h-48h (zweiter Tag 12-24 Stunden nach der Schädigung) sowie
- 60h-72h (dritter Tag 12-24 Stunden nach der Schädigung).

Der Gesamtvergleich aller 4 Gruppen bestand aus der Zusammenfassung der ANOVA zu den Zeitabschnitten 12h-24h, 36h-48h und 60h-72h.

Bei allen Messwerten handelt es sich um den Mittelwert \pm mittleren Fehler des Mittelwertes. Als signifikanter Unterschied wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ erachtet.

Auf die Verwendung der gewählten ANOVA für die einzelnen Ergebnisse wird noch im folgenden Kapitel eingegangen.

Für den Vergleich von 2 Gruppen kam der Dunnett post-Test bei der Bestimmung der sauren Sphingomyelinase-Aktivität sowie der Caspase-8- und Ceramid-Konzentration zum Einsatz. Dieser Test ist das Verfahren der Wahl für den Vergleich der Mittelwerte zweier normalverteilter Zufallsvariablen mit gleicher Varianz (Caliebe A. 2008).

Zur Auswertung der TUNEL-Färbungen wurden der Kruskal-Wallis-Test und der Mann-Whitney-Test genutzt.

Mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test lässt sich im Rahmen einer Varianzanalyse vergleichen, ob sich verschiedene unabhängige Versuchsgruppen hinsichtlich einer ordinalskalierten Variablen in ihrem Mittelwert unterscheiden.

Der Mann-Whitney-Test setzt ebenfalls nicht-parametrisch verteilte Daten voraus und dient der Überprüfung der Übereinstimmung zweier Verteilungen, also ob 2 unabhängige Variablen zu derselben Grundgesamtheit gehören.

Wenn man bei drei oder mehr Gruppen einen Gesamtvergleich gemacht und signifikante Differenzen berechnet hat (z.B. durch one-way ANOVA), wird der direkte Vergleich von zwei Gruppen anschließend mit einem sogenannten „post-test“ durchgeführt. Für diese Studie wurde bei parametrischen Daten der Dunnett post-test und bei nicht-parametrischen Daten der Dunn post-test genutzt.

2.14 Verwendung der statistischen Methoden:

Die one-way ANOVA wurde zum Vergleich von

- Merkmalen der Interventionsgruppen vor der baseline-Messung (Tabelle 1),
- klinischen Parameter zum Zeitpunkt der baseline-Messung (Tabelle 2),
- Organdysfunktionen (Tabelle 3),
- Differentialblutbildern (Tabelle 4),
- Zellen in der BALF initial und postmortal (Abbildung 6) und
- CD 14+ und CD 18+ Zellen initial und postmortal (Abbildung 7)

verwendet.

Die Analyse der klinischen Parameter während der 72-stündigen Beobachtungszeit erfolgte mit einer two-way ANOVA, wobei Zeit und Interventionen als unabhängige Faktoren benutzt wurden:

- Systemisch-vaskulärer Gefäßwiderstandsindex (Abbildung 23)
- Herzindex (Abbildung 24)

- Extravaskulärer Lungenwasserindex (Abbildung 18)
- Resistance (Abbildung 19)
- Spezifische Compliance (Abbildung 20)
- Oxygenierungsindex (Abbildung 21)
- Ventilationseffizienzindex (Abbildung 22)

Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der Dunnett post-Test in folgenden Analysen verwendet:

- saure Sphingomyelinase-Aktivität (Abbildung 12)
- Ceramid-Konzentration (Abbildung 13)
- Caspase-8-Konzentration (Abbildung 14)

Um die TUNEL-Färbungen auswerten zu können, wurden der Kruskal-Wallis-Test zum Vergleich aller Interventionsgruppen und der Dunn post-Test zum Vergleich von zwei Gruppen genutzt.

3. Ergebnisse:

Insgesamt wurden die Ergebnisse von 29 Ferkeln aus 4 verschiedenen Interventionsgruppen (Kontrolle (C), Surfactant (S), Myo-Inositol (S+Inos) und IP3 (S+IP3)) analysiert. Die Randomisierung der Tiere erfolgte nach den baseline-Messungen laut Studienprotokoll. Weitere 6 Tiere wurden aufgrund eines vorzeitigen Todes vor Versuchsende in der Ergebnisauswertung nicht berücksichtigt.

3.1 Nicht ausgewertete Versuchstiere:

Die Gründe für den Ausschluss dieser Versuchstiere waren folgende:

Kontrollgruppe: 1 Ausschluss: Tod des Ferkels nach 52 Stunden im Anschluss an eine schwere Hypoxämie mit niedrigen Blutdruckwerten. Der $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ nach den BAL betrug nur 70 mmHg (Zielwert = 100 mmHg), was zum Überstehen des Gesamtversuchs als zu schweren Lungenschaden gewertet wird.

Surfactantgruppe: 2 Ausschlüsse: 1 Ferkel starb nach 48 Stunden während der intratrachealen LPS-Gabe im Anschluss an einen längeren Zeitabschnitt mit hohen Werten für den Herzindex und niedrigen Werten für den Gefäßwiderstandsindex. Das 2. Ferkel wies eine Oligurie und erhöhte Serumkreatininwerte zum Zeitpunkt der 24-Stunden-Messung (167 $\mu\text{mol/l}$) auf. Während der schädlichen Beatmung mit einem PEEP von 0 kam es zu einer schweren Hypoxämie.

S + Myo-Inositol-Gruppe: 1 Ausschluss: Tod des Tieres nach 26 Stunden durch eine schwere Hypoxämie und Laktatazidose während der schädlichen Beatmung. Die Laborwerte zum Zeitpunkt der 24-Stunden-Messung ergaben zusätzlich erhöhte Leukozytenwerte (35/nl) sowie ein Serumkreatinin von 91 $\mu\text{mol/l}$.

S + IP3-Gruppe: 2 Ausschlüsse: 1 Ferkel starb nach 23 Stunden mit stark aufgeblähtem Bauch und klinischer Peritonitis in Verbindung mit einer Verschiebung des unreifen zu reifen Leukozyten-Verhältnis von 0,02 zu 2,45. Das 2. Ferkel zeigte einen kontinuierlich abnehmenden Herzindex und Gefäßwiderstandsindex und verstarb letztendlich nach 39 Stunden durch eine zunehmende Oligurie (Urinausscheidung von 1,8 ml/kg/h) und schwere Hyperkaliämie (9,6 mmol/l).

3.2 Baseline-Erhebung:

Sowohl die Messwerte zu den demographischen als auch zu den klinischen Parametern wiesen nur geringe Varianzen auf, so dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden konnten.

Merkmale	Kontrolle (n=8)	Surfactant (n=7)	Inositol (n=7)	IP3 (n=7)	p-Wert
Alter (Tage)	4,5 ± 0,2	4,4 ± 0,5	5,2 ± 0,1	4,4 ± 0,5	0,41
Gewicht (kg)	2,5 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,5 ± 0,1	0,25
Weiblich (n)	2	1	1	-	-
PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	342 ± 33	448 ± 40	312 ± 23	384 ± 44	0,07
Spitzendruck (mbar)	14,0 ± 0,7	12,5 ± 0,7	14,8 ± 1,1	12,7 ± 0,6	0,2
Lavagen (n)	13,7 ± 0,9	16,4 ± 1,2	13,1 ± 1,2	16,0 ± 2,9	0,47
Verlust von Lavageflüssigkeit (%)	10,9 ± 0,8	9,6 ± 1,1	12,6 ± 1,6	8,9 ± 1,1	0,17

Tabelle 1: Merkmale der Interventionsgruppen vor der baseline-Messung

Klinische Parameter	Kontrolle (n=8)	Surfactant (n=7)	Inositol (n=7)	IP3 (n=7)	p-Wert
OI (MAD x %O ₂ / PaO ₂)	10,4 ± 1,3	9,7 ± 0,8	10,5 ± 0,7	8,6 ± 0,5	0,51
VEI (3800/(Peak-PEEP) x f x PaCO ₂)	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,32
EVLWI (ml/kg)	30,5 ± 4,4	32,7 ± 4,8	30,0 ± 3,4	32,4 ± 3,9	0,95
C _{rs} (ml/mbar/kg)	0,33 ± 0,05	0,35 ± 0,05	0,34 ± 0,06	0,29 ± 0,04	0,87
R _{rs} (mbar/ml/s)	86 ± 7	87 ± 11	88 ± 9	93 ± 10	0,94
HI (l/min/m ²)	3,6 ± 0,2	3,6 ± 0,2	4,1 ± 0,1	3,8 ± 0,1	0,28
SVRI (dyne*s*cm ⁻⁵ *m ²)	1613 ± 123	1548 ± 104	1260 ± 82	1499 ± 80	0,12

Tabelle 2: Klinische Parameter zum Zeitpunkt der baseline-Messung

3.3 Lungenfunktion:

Zur Beurteilung der Lungenfunktion wurden der extravaskuläre Lungenwasserindex, die Resistance, die spezifische Compliance sowie der Oxygenierungsindex und der Ventilationseffizienzindex als klinische Parameter über 72 Stunden beobachtet, was zu unterschiedlichen Ergebnissen in Bezug auf die Wirkung der Interventionen führte:

Die Messungen des extravaskulären Lungenwasserindex (EVLWI) zeigten ab dem zweiten Tag vier Stunden nach der Lungenschädigung signifikant niedrigere Werte für die Intervention mit IP3 im Vergleich zur Kontroll-, Surfactant- und Myo-Inositol-Gruppe. Während die drei letztgenannten Gruppen eine kontinuierliche Zunahme des EVLWI aufwiesen, blieben die im Vergleich zur intakten Lunge sogar niedrigeren Messwerte für das EVLWI in der IP3-Gruppe bis zum Ende des Versuchs bestehen (Abbildung 18). Zum Zeitpunkt 72h wurden folgende Werte gemessen: C= 23,5 ml/kg \pm 12,5; S= 25,9 \pm 12,7; S+Inos= 25,1 \pm 10,7 und S+ IP3=16,4 \pm 6,6 (Mittelwert \pm MFM). Der p-Wert betrug 0,03.

Für die Resistance des respiratorischen Systems (R_{rs}) konnte zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des gesamten Versuchs kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden, jedoch lagen die Messwerte von allen vier Gruppen nach der 1. und 2. Lungenschädigung auf einem erhöhten Niveau im Vergleich zum Ausgangswert vor der jeweiligen Schädigung (Abbildung 19). Die Höchstwerte zum Zeitpunkt 25h lassen sich durch die Lungen-schädigende Beatmung mit einem PEEP von 0 und normalem Tidalvolumen erklären.

Die Analyse der Messwerte für die spezifische Compliance des respiratorischen Systems (C_{rs} , Abbildung 20) zeigte im zeitlichen Verlauf, über alle 4 Interventionsgruppen gesehen, eine stetige Abnahme. Lediglich die Beatmung mit doppeltem Tidalvolumen und halbiertes Atemfrequenz zum Zeitpunkt 26h erzielt eine Besserung. Die Interventionen nach der 1. Lungenschädigung führten zu einer kurzfristigen Verbesserung der Compliance. Dieser Effekt trat jedoch nach den weiteren Interventionen nicht mehr auf.

Der Oxygenierungsindex (OI) der vier Interventionsgruppen entwickelte sich während des Versuchs unterschiedlich (Abbildung 21). Nach der ersten Intervention kam es zur kurzfristigen Verbesserung des Oxygenierungsindex aller Interventionsgruppen. Es blieben jedoch nur die Messwerte der IP3-Gruppe, trotz dreifacher Schädigung, auf einem konstant niedrigem Niveau, während die Werte der anderen Interventionsgruppen im zeitlichen

Verlauf deutlich schlechter wurden. Die Werte der IP3-Gruppe konnten jedoch nicht das Ausgangsniveau der gesunden Lunge erreichen, so dass ein Restschaden der Lunge zu erkennen ist. Zum Zeitpunkt 25h zeigten sich zum Beispiel folgende Werte: $C= 12,1$ $MADx\%O_2/PaO_2 \pm 5,5$; $S= 7,8 \pm 5,3$; $S+Inos= 13,7 \pm 8,6$; $S+IP3= 3,2 \pm 2,1$ (Mittelwert \pm MFM). Im Gesamtvergleich ergibt sich ein p-Wert $< 0,0001$.

Von den anderen Interventionsgruppen ist die Myo-Inositol-Gruppe in Bezug auf den Oxygenierungsindex besonders auffällig, da sie im gesamten Verlauf den höchsten Grad an Verschlechterung erreichte.

Bei der Betrachtung der Messwerte für den Ventilationseffizienzindex (VEI) ist erkennbar, dass trotz der Wirkstoffgabe nach jeder Schädigung eine tendenzielle Verschlechterung in allen 4 Gruppen auftrat (Abbildung 22). In der IP3-Gruppe fällt jedoch auf, dass nach der ersten Wirkstoffgabe noch eine Verbesserung der Messwerte erzielt wurde und bis zur zweiten Schädigung erhalten blieb, während sich die Messwerte der anderen Interventionsgruppen bereits deutlich verschlechterten.

Nach der zweiten Schädigung verschlechterten sich die Messwerte aller Interventionsgruppen, wobei aus den Werten der IP3-Gruppe ein relativ besserer Verlauf abzuleiten ist. Damit sind vor allem in der Langzeitwirkung die Unterschiede signifikant. Der p-Wert des Gesamtvergleichs beträgt $< 0,0001$.

3.4 Herzkreislaufsystem:

Während der 72 Stunden Beobachtungszeit erfolgte die Überwachung des Herzkreislaufsystems mit den beiden Parametern systemisch-vaskulärer Gefäßwiderstandindex (SVRI) und Herzindex (HI):

Die gemessenen Werte des SVRI (Abbildung 23) zeigten in allen 4 Gruppen einen gleichartigen zyklischen Verlauf. Die drei 24-Stunden-Zyklen waren geprägt von den Schädigungen und den nachfolgenden Interventionen. Es kam im Verlauf zum wiederholtem Abfall und erneutem Anstieg der Messwerte, wobei die Differenz zwischen maximalem und minimalem Wert geringer wurde. Die Höchstwerte des SVRI zeigten sich jeweils im Anschluss an die 3 Lungenschädigungen.

Die two-way ANOVA ergab, dass die Zeit der entscheidende Faktor in der Veränderung des SVRI war, wenn zum Beispiel S vs S+IP3 und S+Inos vs S+IP3 an den 3 Tagen zwischen den 12-Stunden- und 24-Stunden-Messungen verglichen wurden.

Der Herzindex (HI, Abbildung 24) zeigte in allen 4 Gruppen wiederkehrende Veränderungen der Messwerte im Bereich von 3,5-5 l/min/m². Nach jeder Lungenschädigung kam es zu einem Tiefpunkt des Parameters und anschließendem Anstieg für jeweils 12-16 Stunden auf höherem Niveau verglichen mit dem Ausgangswert.

Auffällig war der Herzindex in der IP3-Gruppe, da die Werte fast den gesamten Verlauf niedriger ausgeprägt waren als in den anderen 3 Gruppen. Im Vergleich zur Myo-Inositol-Gruppe konnte in der two-way ANOVA 3x 12h-24h sogar ein signifikant niedrigerer HI für die IP3-Gruppe festgestellt werden. Zum Zeitpunkt 72h lagen die HI-Werte für S+Inos bei 4,8 l/min/m² ± 1,2 und für IP3 bei 4,2 ± 0,8 (Mittelwert ± Standardabweichung). Der p-Wert für diesen Vergleich betrug 0,02.

3.5 Organdysfunktionen:

In der Beurteilung des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts sowie der hepatischen und renalen Funktionen wurden signifikante Unterschiede zwischen den 4 Gruppen für Natrium, Chlorid, Calcium und Kreatinin gefunden. Die Leber- und Nierenwerte zeigten von dem Zeitpunkt vor den baseline-Messungen (gesunde Lunge) zu den erneuten Messungen nach 24 und 48 Stunden einen sprunghaften Anstieg, bevor es bei den 72-Stunden-Messungen wieder zu einer Normalisierung der Werte kam. Urinausscheidung und Gewichtszunahme zeigten keine signifikanten Gruppenunterschiede, weshalb die Schlussfolgerung gezogen wird, dass die Interventionen keinen Einfluss auf die glomeruläre Funktion hatten.

	C (n=8)	S (n=7)	S+Inos (n=7)	S+IP3 (n=7)	p
Natrium (mmol/l)					
gesunde Lunge	140±0,5	143±1,2	138±0,8	141±0,9	<0,05
24 Std.	140±0,9	138±0,9	137±1,6	138±0,3	0,3
48 Std.	140±0,7	140±0,4	138±1,2	142±0,6	<0,05
72 Std.	141±0,4	141±0,8	138±0,9	144±0,5	<0,01
Kalium (mmol/l)					
gesunde Lunge	3,2±0,2	3,0±0,3	3,4±0,1	3,1±0,1	0,62
24 Std.	4,5±0,1	4,9±0,2	4,6±0,2	5,4±0,3	0,07
48 Std.	4,3±0,1	4,6±0,1	4,4±0,1	4,4±0,1	0,34
72 Std.	4,0±0,1	4,0±0,1	3,9±0,1	4,1±0,1	0,56
Chlorid (mmol/l)					
gesunde Lunge	106±0,7	107±0,6	105±1,0	105±0,6	0,35
24 Std.	105±1,0	104±1,1	104±0,9	104±1,1	0,95
48 Std.	102±1,1	102±0,8	101±1,2	103±0,8	0,5
72 Std.	101±0,7	99±0,9	98±0,5	102±0,4	<0,01
Calcium (mmol/l)					
gesunde Lunge	2,5±0,04	2,6±0,04	2,6±0,01	2,6±0,05	0,33
24 Std.	2,5±0,04	2,5±0,05	2,5±0,02	2,6±0,05	0,22
48 Std.	2,6±0,03	2,6±0,03	2,5±0,03	2,7±0,05	<0,05
72 Std.	2,7±0,03	2,6±0,03	2,5±0,01	2,7±0,03	<0,01
SGOT (U/l)					
gesunde Lunge	27±1	33±2	27±2	31±1	0,11
24 Std.	38±6	53±17	32±2	47±6	0,44
48 Std.	33±6	58±24	31±4	60±13	0,34
72 Std.	22±4	26±9	19±2	31±7	0,6
Kreatinin (µmol/l)					
gesunde Lunge	45±1	50±3	43±1	49±3	0,27
24 Std.	49±2	50±3	56±10	69±5	0,16
48 Std.	45±1	49±2	48±1	63±3	<0,01
72 Std.	40±1	41±2	36±1	52±3	<0,01
Urinausscheidung (ml/kg/h)	5,7±0,4	4,8±0,5	4,8±0,4	5,2±0,5	0,53
Gewichtszunahme (kg/kg/72 h)	0,32±0,01	0,31±0,01	0,32±0,05	0,33±0,03	0,99

Tabelle 3: Beurteilung möglicher Organdysfunktionen

3.6 Differentialblutbild:

Die Auswertung des Differentialblutbildes ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den 4 Interventionsgruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Auffällig waren lediglich ein Anstieg der Leukozyten in den 24 Stunden-Messungen aller 4 Gruppen mit anschließendem Abfall und eine stetige Abnahme des prozentualen Anteils der neutrophilen Granulozyten. Dies kann als Hinweis für eine Migration dieser Zellen vom Blut ins Lungeninterstitium gewertet werden.

	C (n=8)	S (n=7)	S+Inos (n=7)	S+IP3 (n=7)	p
Hämoglobin (g/dl)					
gesunde Lunge	8,2±0,3	7,3±0,4	8,1±0,3	8,0±0,2	0,3
24 Std.	7,8±0,2	7,2±0,4	8,3±0,2	8,4±0,6	0,21
48 Std.	7,8±0,1	7,4±0,3	8,1±0,1	7,8±0,2	0,17
72 Std.	7,4±0,2	7,8±0,4	8,1±0,1	7,5±0,2	0,45
Leukozyten (Zellen/nl)					
gesunde Lunge	12,5±0,7	12,9±2,6	13,6±1,4	9,9±0,9	0,39
24 Std.	13,6±1,9	15,1±2,1	15,7±1,8	10,2±1,8	0,21
48 Std.	8,9±1,3	11,3±1,9	12,2±1,1	8,5±0,8	0,19
72 Std.	8,0±0,5	11,0±1,4	8,7±1,2	8,7±0,9	0,25
Thrombozyten (Zellen/nl)					
gesunde Lunge	369±21	399±31	405±21	461±28	0,1
24 Std.	415±33	402±27	455±33	446±41	0,66
48 Std.	395±38	417±21	458±22	380±38	0,36
72 Std.	434±47	427±24	461±24	410±24	0,75
Granulozyten (%)					
gesunde Lunge	7,8±2,3	3,6±1,0	4,7±1,8	9,7±2,4	0,14
24 Std.	8,5±3,3	6,8±2,4	6,5±2,1	7,1±2,1	0,94
48 Std.	3,8±1,1	4,5±3,1	7,7±3,5	4,5±1,2	0,67
72 Std.	6,3±1,8	7,7±3,5	8,1±2,9	10,0±3,1	0,84
Neutrophile Granulozyten (%)					
gesunde Lunge	70±1	76±4	73±3	70±4	0,71
24 Std.	69±5	67±2	71±3	73±3	0,73
48 Std.	69±2	68±4	69±4	66±2	0,92
72 Std.	62±3	62±6	59±4	57±5	0,87
Lymphozyten (%)					
gesunde Lunge	13±2	14±4	15±2	16±2	0,8
24 Std.	16±2	20±2	14±2	16±2	0,51
48 Std.	22±2	21±4	21±3	25±2	0,71
72 Std.	25±2	26±4	26±2	27±2	0,95
Monozyten (%)					
gesunde Lunge	7,5±2,5	5,6±1,4	6,1±1,7	2,8±1,0	0,32
24 Std.	4,8±0,9	4,6±1,7	6,8±1,6	2,8±1,2	0,27
48 Std.	3,6±1,3	4,1±1,2	2,0±0,7	3,1±1,0	0,61
72 Std.	3,8±1,4	2,2±0,7	4,2±2,2	3,2±0,5	0,77

Tabelle 4: Differentialblutbild

3.7 Bakterien in den Atemwegen:

Über 80% der Ferkel hatten schon in der initialen Lavage ein Wachstum von einem oder mehreren Bakterien auf der Agar-Kulturplatte. Der Grund liegt in dem ständigen Bodenkontakt und somit einer bakteriellen Besiedelung der oberen Atemwege. Die postmortal durchgeführten Lavagen zeigten hingegen ein überwiegendes Wachstum an E.coli. Die kombinierte Prophylaxe aus Ampicillin und Sulbactam zeigte somit offensichtlich ihre Wirkung und verhinderte eine sekundär durch die maschinelle Beatmung bedingte Lungenentzündung.

	C (n=8)	S (n=7)	S+Inos (n=7)	S+IP3 (n=7)
<u>initiale Lavage</u>				
Bakterien positiv	6 von 8	6 von 7	6 von 7	6 von 7
Spezies:				
Streptokokken	3 x +	1 x +	1 x +++	2 x+
Enterokokken	1 x +	1 x +	1 x +, 3 x ++	1 x +
Staph. aureus	1 x +, 1 x ++	1 x +	1 x ++	
Staph. diverse	3 x +	1 x +	1 x +, 1 x ++	1 x +, 1 x ++
E. coli	1 x +		2 x +, 3 x ++	2 x +
Enterobacter spec.		1 x +		
Sporenbildner		3 x +		
Diverse*	1 x +, 1 x ++		2 x ++	1 x +
<u>postmortale Lavage</u>				
Bakterien positiv	6 von 8	4 von 7	5 von 7	6 von 7
Spezies:				
Streptokokken				
Enterokokken			1 x +	
Staph. aureus				
Staph. diverse		1 x ++		
E. coli	4 x ++	1 x +, 1 x ++	1 x +, 1 x ++, 1 x +++	1 x +, 4 x ++, 1 x +++
Enterobacter spec.		2 x +		
Sporenbildner		1 x +	1 x ++	
Diverse†	5 x ++, 1 x +++	2 x +	1 x ++	1 x +, 3 x ++

Tabelle 5: Bakterien in den Atemwegen:

Die Quantifizierung des Wachstums der Mikroorganismen erfolgte semi-quantitativ: durch Anreicherung(+), spärlich (++) , mittel (+++), stark (++++).

* die folgenden Mikroorganismen konnten isoliert werden: C-Gruppe: Haemophilus spec. +, Gemella morbillorum ++; S+Inos-Gruppe: Leucostonoc spec. ++, Proteus mirabilis ++; S+IP3-Gruppe: pharyngeale Flora +.

† die folgenden Mikroorganismen konnten isoliert werden: C-Gruppe: Proteus mirabilis 1 x ++, 1 x ++++, Leucostonoc spec. 2 x ++, Pediococcus pentosaceus 2 x ++; S-Gruppe: Pediococcus pentosaceus +, Sphingomonas paucimobilis +; S+Inos-Gruppe: pharyngeale Flora ++; S+IP3-Gruppe: Proteus mirabilis 1 x +, 1 x ++, Pediococcus pentosaceus ++, Candida krusei ++

3.8 Zellen in der BALF:

Die initial und postmortal gewonnene broncho-alveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) wurde mittels FACS auf ihre Veränderungen in der Anzahl und Art der Zellen analysiert. Die Gesamtzahl der Zellen konnte durch IP3 nur im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant gesenkt werden (Abbildung 6). Der Dunnett post-Test für unverbundene Stichproben zwischen S und S+IP3 sowie S+Inos und S+IP3 zeigte beide Male keine signifikante Abnahme der Zellen in den postmortal durchgeführten broncho-alveolären Lavagen.

Die Auswertung der CD14+ und CD18+ Zellen (Abbildung 7) durch eine one-way ANOVA der 3 Interventionsgruppen ergab für die Kontrollgruppe einen leichten Anstieg bei den CD14+/CD18- Zellen (ortsständige Monozyten/Makrophagen) sowie eine deutlich signifikante Vermehrung der Zellzahl bei den CD14-/CD18+ Zellen (β -Integrin positive Zellen) und CD14+/CD18+ Zellen (β -Integrin positive Makrophagen). Der p-Wert zum Vergleich der Zellanzahl in der initial und postmortal gewonnenen BALF ist $< 0,0001$.

In der Surfactant- und IP3-Gruppe kam es ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg der Zellanzahl bei den CD14+/CD18- und CD14-/CD18+ Zellen, die Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen für diese Zellarten sind jedoch nicht signifikant.

Lediglich die CD14+/CD18+ Zellen, welche sich aus migrierten Makrophagen monozytären oder granulozytären Ursprungs zusammen setzen, zeigten eine starke Zellvermehrung in allen 3 Gruppen mit signifikanten Unterschieden im Ausmaß. Der Anstieg in der IP3-Gruppe fiel wesentlich geringer aus und ergab einen p-Wert $< 0,001$ bei dem jeweiligen Vergleich zur Kontroll- und Surfactantgruppe. Diese Zellvermehrung lässt sich auf eine Migration der Zellen in den Alveolarraum zurückführen, da das β -Integrin zur Familie der Adhäsionsproteine gehört und eine entscheidende Bedeutung bei der Transmigration von Zellen ins entzündete Gewebe darstellt.

Die CD14-/CD18- Zellen sind für diese Studie nicht relevant, da es sich um eine heterogene Zellgruppe aus, z.B. Lymphozyten, handelt.

Für die Inositol-Gruppe gab es postmortal nur Werte von zwei Versuchstieren, weshalb man diese Gruppe in der Graphik der CD14+ und CD18+ Zellen nicht berücksichtigen konnte.

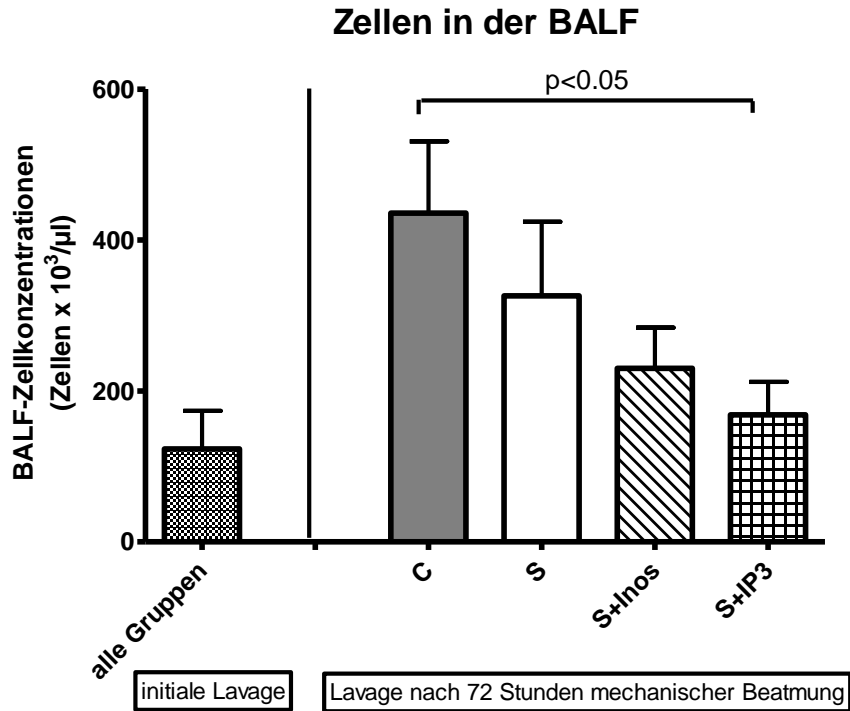


Abbildung 6: Übersicht über die Zellen in der BALF

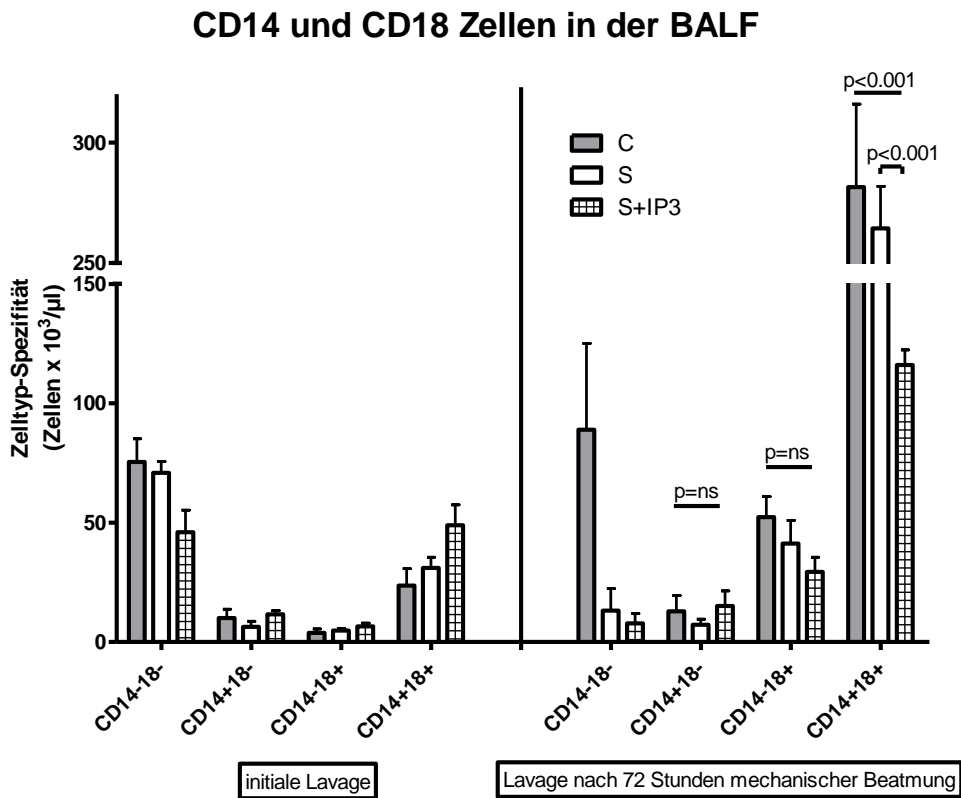


Abbildung 7: Übersicht über die CD14⁺ und CD18⁺ Zellen in der BALF

3.9 Messung der Oberflächenspannung:

Die Messung der Oberflächenspannung des Surfactants aus der BALF nach der Wilhelmy-Plättchen-Methode zeigte einen deutlichen Anstieg für alle 4 Versuchsgruppen in der post-mortalen Lavageflüssigkeit im Vergleich zur initialen Lavageflüssigkeit. Die Auswirkungen der Lungenschädigungen auf die Surfactant-Oberflächenspannung fallen in der S+IP3-Gruppe im Vergleich zu den anderen 3 Gruppen geringer aus, jedoch ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Der p-Wert beträgt 0,37.

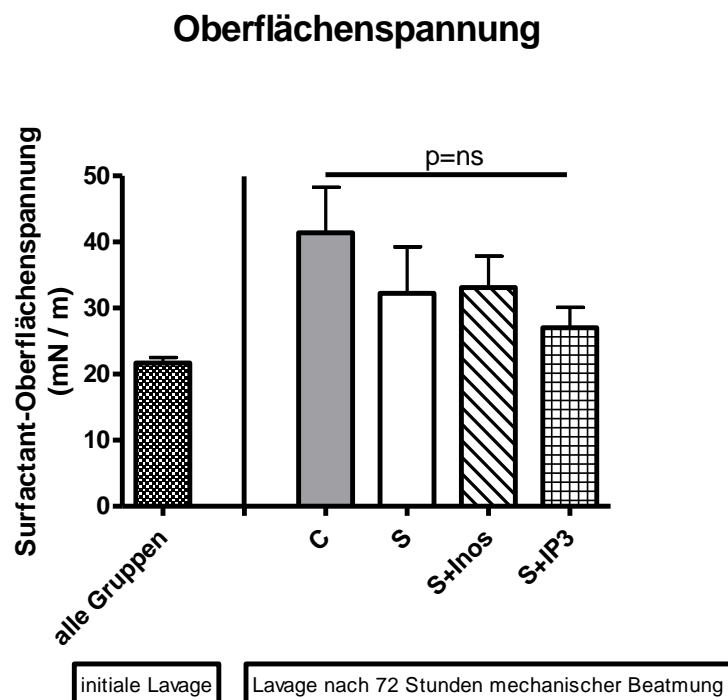


Abbildung 8: Oberflächenspannung

3.10 Wachstumsfaktoren und Zytokine:

Um die Auswirkungen der Lungenschädigung auf das Immunsystem und die Wachstumsfaktoren beurteilen zu können, wurden Amphiregulin, TGF- β 1 und Il-6 durch eine Echtzeit-PCR untersucht. Es zeigten sich für alle 3 Mediatoren signifikante Gruppenunterschiede.

Amphiregulin als Mitglied der epithelialen Wachstumsfaktorenfamilie (z.B. EGF, TGF- α) bindet an den EGF-Rezeptor (Dolinay et al. 2006), um das Wachstum von Epithelzellen zu stimulieren und zeigte in diesem Versuch deutliche Gruppenunterschiede in der Genexpression. Der Vergleich zwischen der Surfactant-Gruppe und IP3-Gruppe ergab sogar einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von 0,02.

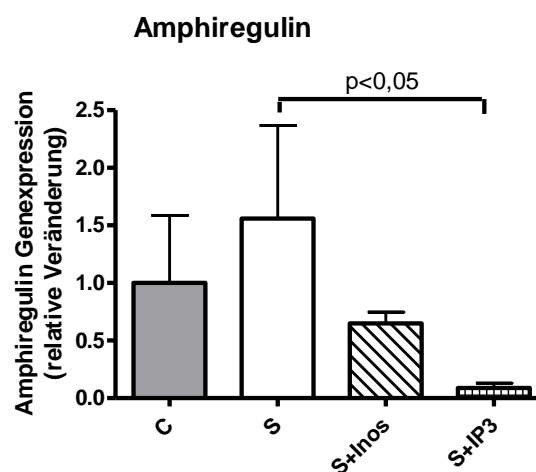


Abbildung 9: Amphiregulin

Das Protein TGF- β 1, welches von Makrophagen, Lymphozyten etc. exprimiert wird, hat zahlreiche Funktionen in der Zellproliferation und Zelldifferenzierung sowie in der Aktivierung des Immunsystems. Durch die Induktion einer chemotaktischen Antwort und der gesteigerten Expression von Integrin-Rezeptoren, fördert TGF- β 1 außerdem die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut ins entzündete Gewebe. Die TGF- β 1-Expression spielt jedoch nicht nur im inflammatorischen Geschehen eine wichtige Rolle, sondern über die Stimulation von mesenchymalen Zellen auch in dem Entstehungsprozess einer pulmonalen Gewebsfibrose (Letterio und Roberts 1998).

In der Betrachtung der Genexpression fielen deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen auf und zeigten vor allem für die IP3-Gruppe einen fast nicht messbaren Wert. Der Vergleich

zwischen der IP3-Gruppe und den anderen 3 Gruppen zeigte jeweils signifikante Abweichungen mit einem p-Wert von jeweils $< 0,01$. Die Inositol-Gruppe zeigte die stärkste Genexpression von TGF- β 1.

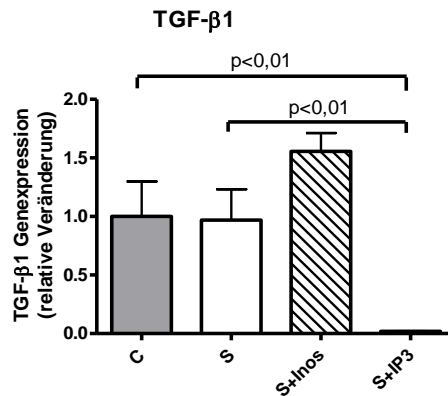


Abbildung 10: TGF- β 1

Das Interleukin-6 als pro-inflammatorischer Faktor mit vielen Funktionen spielt eine entscheidende Funktion in der Regulation des Immunsystems bei Entzündungsreaktionen und zeigte in der Beurteilung der Genexpression auffällige Unterschiede. Die Surfactant- und Inositol-Gruppe wiesen die höchsten Werte mit einer zusätzlichen signifikanten Abweichung zur IP3-Gruppe auf. Der p-Wert liegt jeweils $< 0,05$. Die Il-6-Expression in der Kontrollgruppe fiel deutlich geringer aus und ist somit im Direktvergleich zur IP3-Gruppe auch nicht signifikant (p-Wert = 0,05).

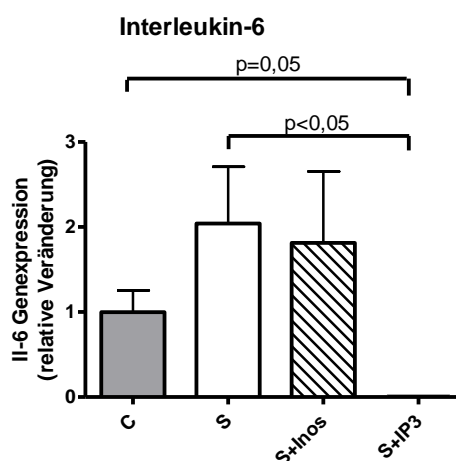


Abbildung 11: Interleukin-6

3.11 Saure Sphingomyelinase-Aktivität und Ceramid-Konzentration:

Die Aktivitätsbestimmungen der sauren Sphingomyelinase ebenso wie die Messungen der Ceramid-Konzentration ergaben im Dunnett post-Test eine signifikante Reduktion in allen Gruppenvergleichen mit S+IP3 (Abbildung 12 und Abbildung 13).

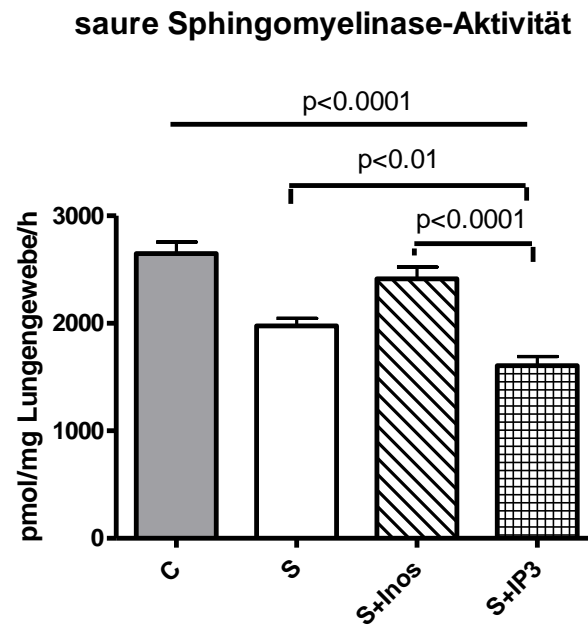


Abbildung 12: aSMase-Aktivität

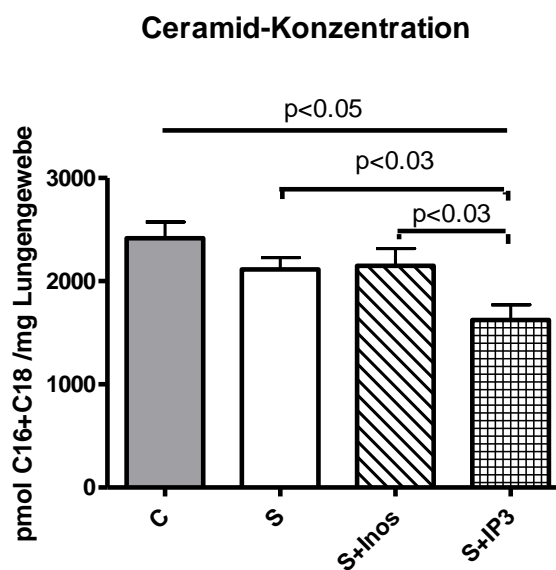


Abbildung 13: Ceramid-Konzentration

3.12 Caspase-8-Konzentration:

Die Analyse der Caspase-8-Konzentration in Lungengewebe nach einer maschinellen Beatmung von 72 Stunden zeigte ähnliche Ergebnisse wie die Messungen der Ceramid-Konzentration: Es konnten signifikante Unterschiede im Dunnett post-Test zwischen der S+IP3-Gruppe und den anderen 3 Interventionsgruppen dargestellt werden (Abbildung 14).

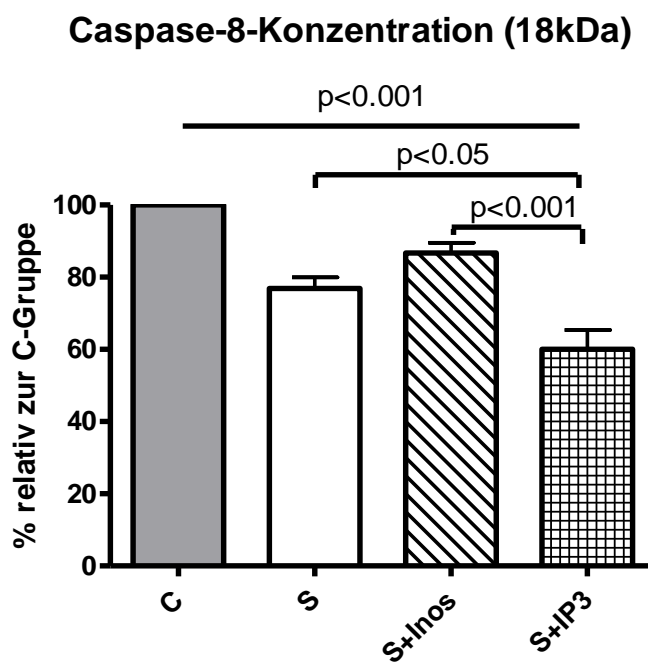


Abbildung 14: Caspase-8-Konzentration (18 kDa)

Der Caspase-8 western-blot, der mit Lungengewebs-Homogenaten nach 72 Stunden maschineller Beatmung durchgeführt wurde, zeigte in jeder Versuchsgruppe 3 verschiedene Banden: 1. aktive Caspase-8 (18 kDa), 2. gespaltene Caspase-8 (43-41 kDa) und 3. Pro-Caspase-8 (55-52 kDa). Zum Nachweis identischer Proteinkonzentrationen in den Blots wurde als Kontrollprotein Aktin mitgemessen.

Im western-blot der verschiedenen Caspase-8-Formen ließ sich eine vermehrte Anzahl der Pro-Caspase-8 in der Surfactantgruppe, eine reduzierte Anzahl der gespaltene Caspase-8 in der Inositol-Gruppe und ebenso eine reduzierte Anzahl der aktiven Caspase-8 in der Surfactant- und IP3-Gruppe darstellen. Die Kontrollbande Aktin ist in allen 4 Gruppen positiv.

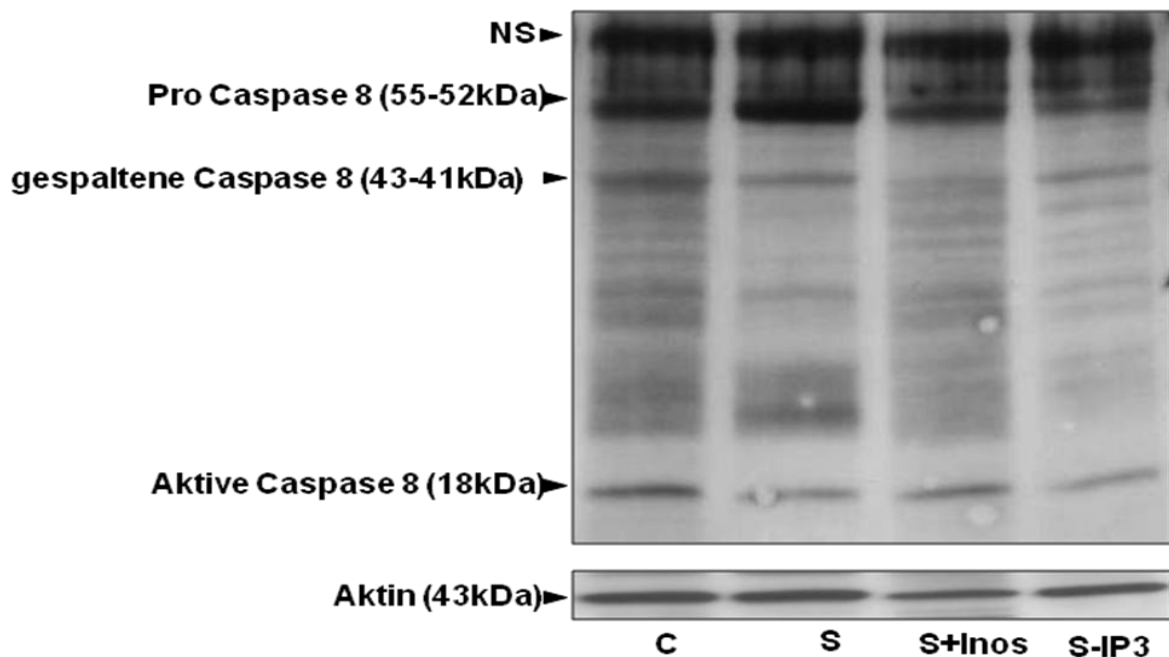


Abbildung 15: Caspase-8 western-blot

3.13 Epitheliale Apoptose:

Um den alveolären Zelluntergang nach den 3 Lungenschädigungen und der maschinellen Beatmung besser beurteilen zu können, wurde ein Apoptose-Score ermittelt: Nach den TUNEL-Färbungen wurde die Anzahl an apoptotischen Zellen pro 200 alveolären Epithelzellen in einem Zellverband gezählt, wobei mind. 4 und max. 6 Alveolen für eine semi-quantitative Evaluation für jedes Präparat genutzt wurden (Abbildung 16). Für den Vergleich aller 4 Interventionsgruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet und ergab einen signifikanten Unterschied von p -Wert = 0,0057. Um einen Gruppenvergleich für unverbundene Stichproben durchzuführen, kam der Dunn post-Test zum Einsatz und zeigte erneut eine signifikante Abnahme der apoptotischen Zellen im Gruppenvergleich von S vs. S+IP3 und S+Inos vs. S+IP3.

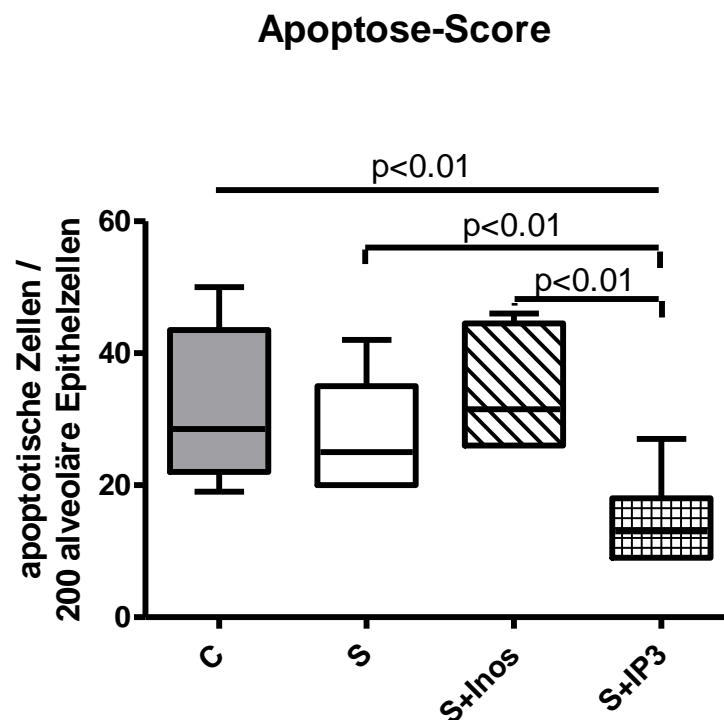


Abbildung 16: Apoptose-Score

Neben der TUNEL-Färbung erfolgte außerdem eine immunhistochemische Darstellung der aktiven Caspase-8 in identischen Lungengewebsabschnitten, um mit einer weiteren Technik den Nachweis von Caspase-8-Aktivität in epithelialen Zellen zu erbringen (Abbildung 17).

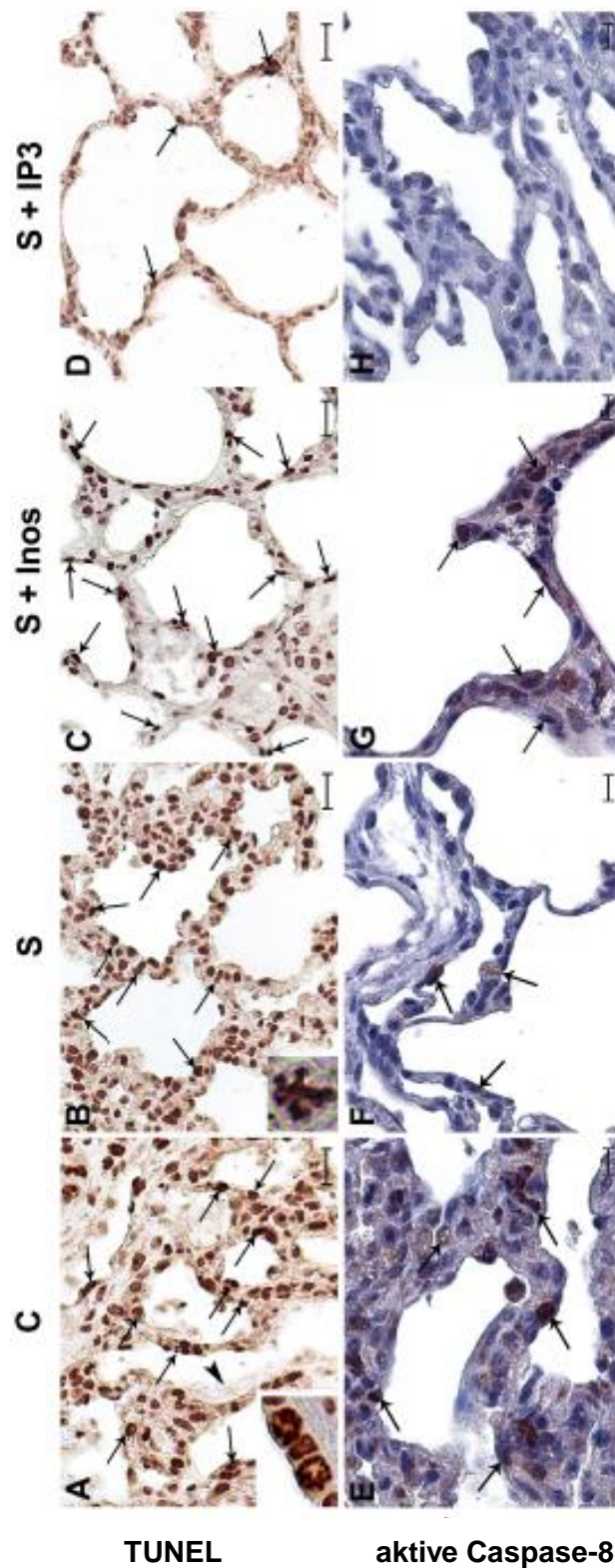


Abbildung 17: Mikroskopische Darstellung des Lungengewebes

A-D: TUNEL-Färbung, Skala = 20µm; Pfeile sind die apoptotischen Alveolarzellen, dicker Pfeil: hyaline Membran;
 E-H: Immunhistochemische Darstellung der aktiven Caspase 8, Skala = 10 µm, Pfeile zeigen die Caspase-positiven Alveolarzellen

3.14 Graphenanhang:

Die Graphen 18-25 zeigen die verschiedenen klinischen Parameter im experimentellen Verlauf vom Zeitpunkt der gesunden Lunge über die baseline-Messungen bis zu den letzten Messungen nach 72 Stunden.

Die Abkürzungen der Interventionsgruppen lauten:

- C = Kontrolle
- S = Surfactant
- S + Inos = Surfactant + Myo-Inositol
- S + IP3 = Surfactant + D-Myo-Inositol-1,2,6-Trisphosphat

Alle Messwerte sind Mittelwerte \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes (MFM). Um vor allem die mittelfristigen Wirkungen der Interventionen beurteilen zu können, wurden wiederholte two-way ANOVA mit den unabhängigen Variablen Zeit und Intervention zu den Zeitpunkten 1. Tag 12 bis 24 Stunden nach Intervention (12h-24h), 2.Tag 12 bis 24 Stunden nach Intervention (36h-48h) und 3.Tag 12 bis 24 Stunden nach Intervention (60h-72h) durchgeführt (siehe p-Werte für Zeit und Intervention (Interv.) in den jeweiligen Graphen). Der Gesamtvergleich beinhaltet die Summe aller 3 Intervalle von insgesamt 36 Stunden für alle 4 Interventionsgruppen. Außerdem wurden ausgewählte Gruppen miteinander verglichen (siehe Kasten im Graphen). Interaktionen zwischen den unabhängigen Faktoren Zeit und Intervention waren bei keinem der Parameter signifikant.

Die Abbildung 25 zeigt repräsentative Fotos von postmortalen Herz-Lungen-Paketen der Ferkel aus den 4 Interventionsgruppen. Die Unterschiede im Ausmaß der subpleuralen und parenchymatösen Atelektasenausbildung („Hepatisierung“) sowie der normalen Belüftung sind deutlich zu erkennen.

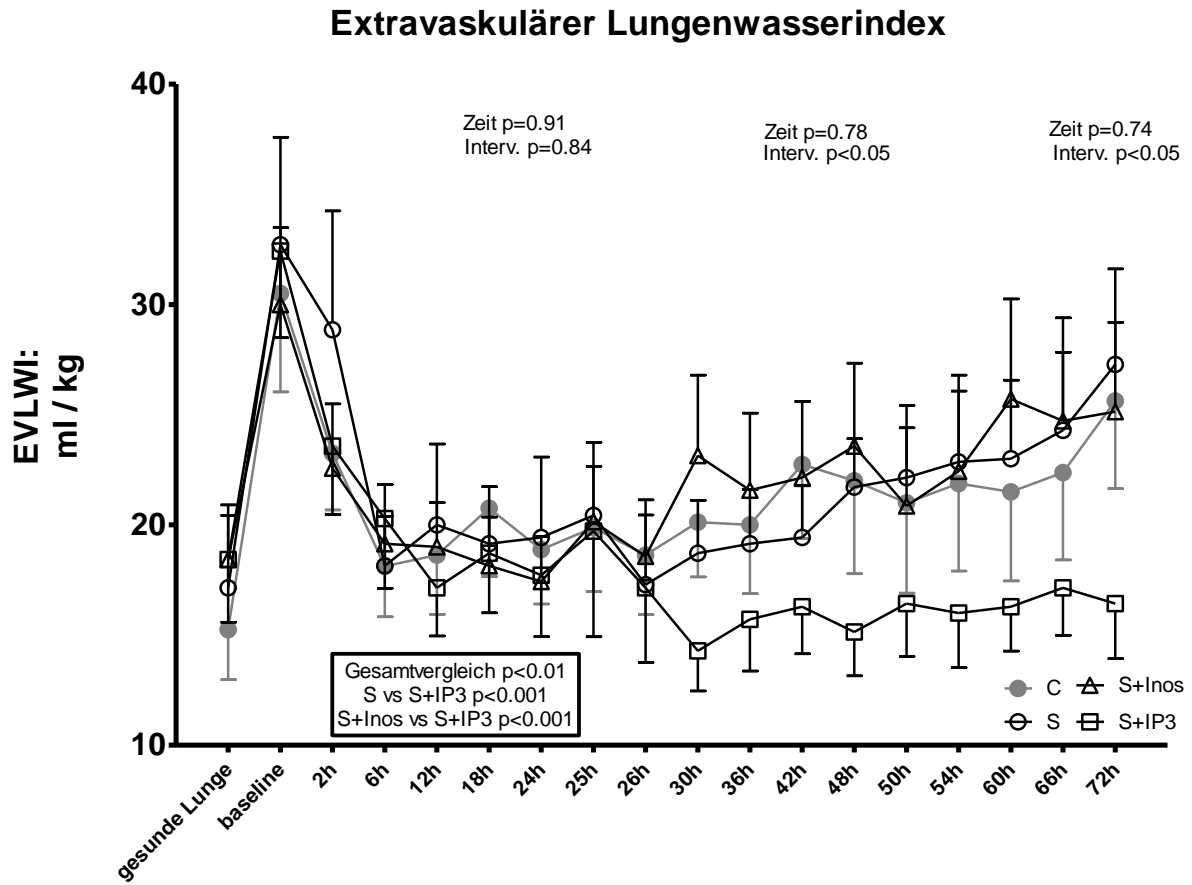


Abbildung 18: Extravaskulärer Lungenwasserindex

Resistance

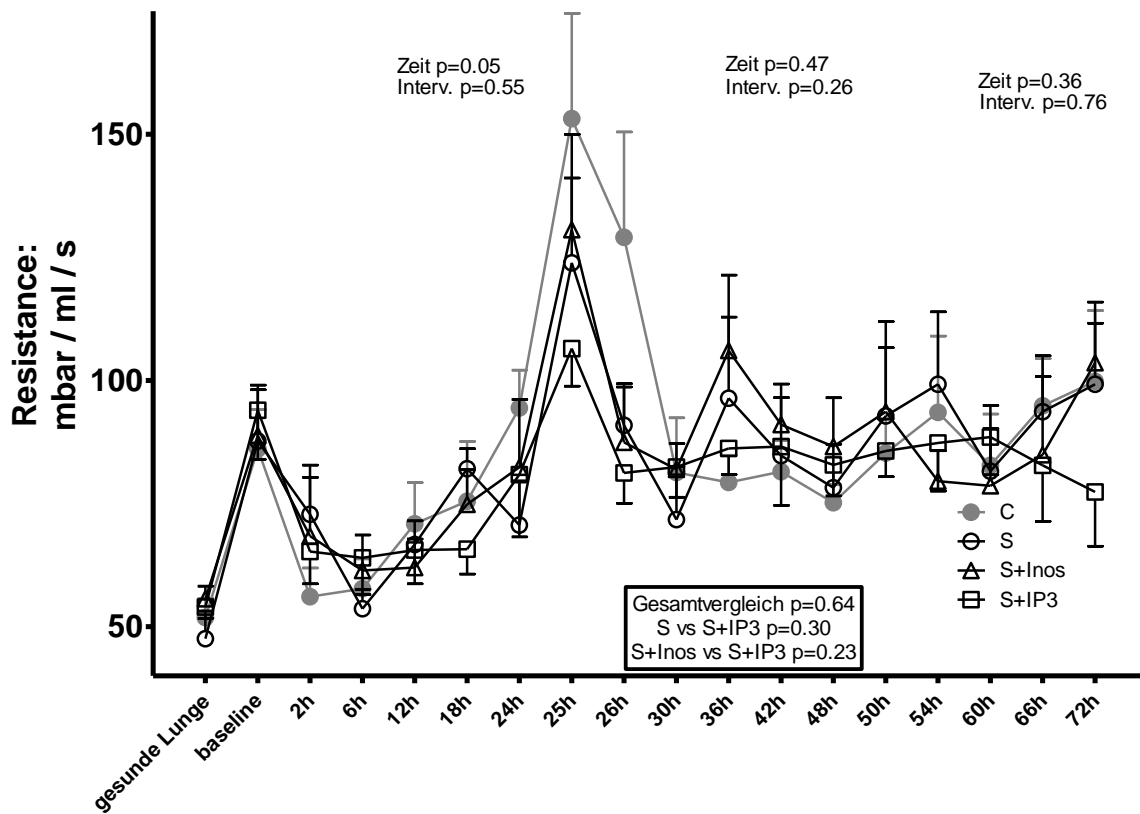


Abbildung 19: Resistance des respiratorischen Systems

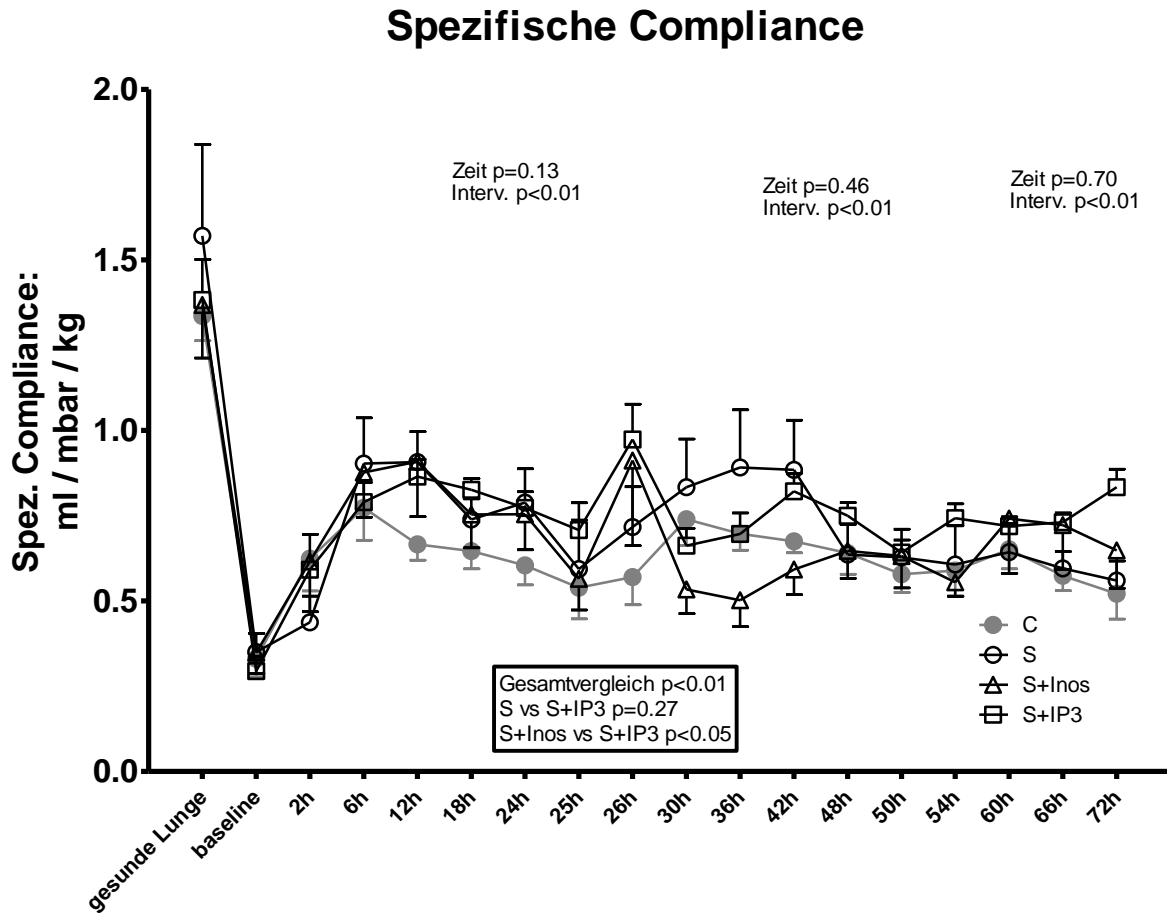


Abbildung 20: Spezifische Compliance des respiratorischen Systems

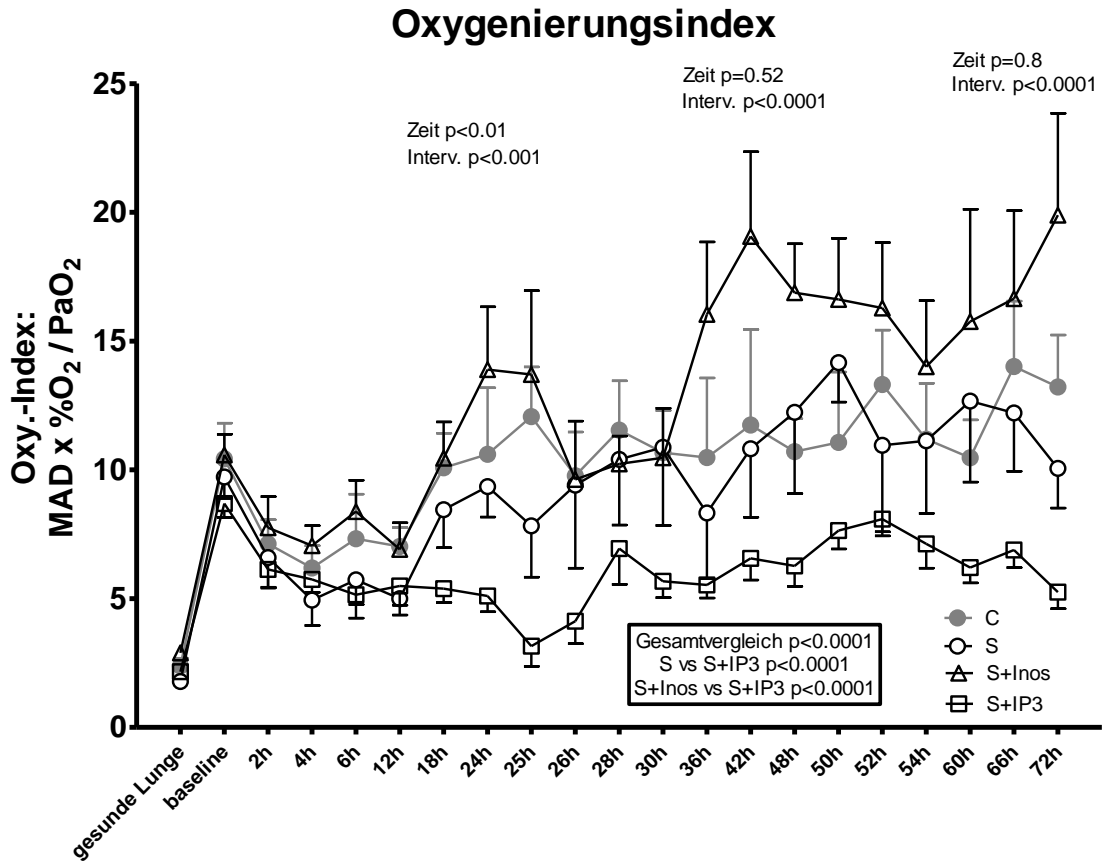


Abbildung 21: Oxygenierungsindex

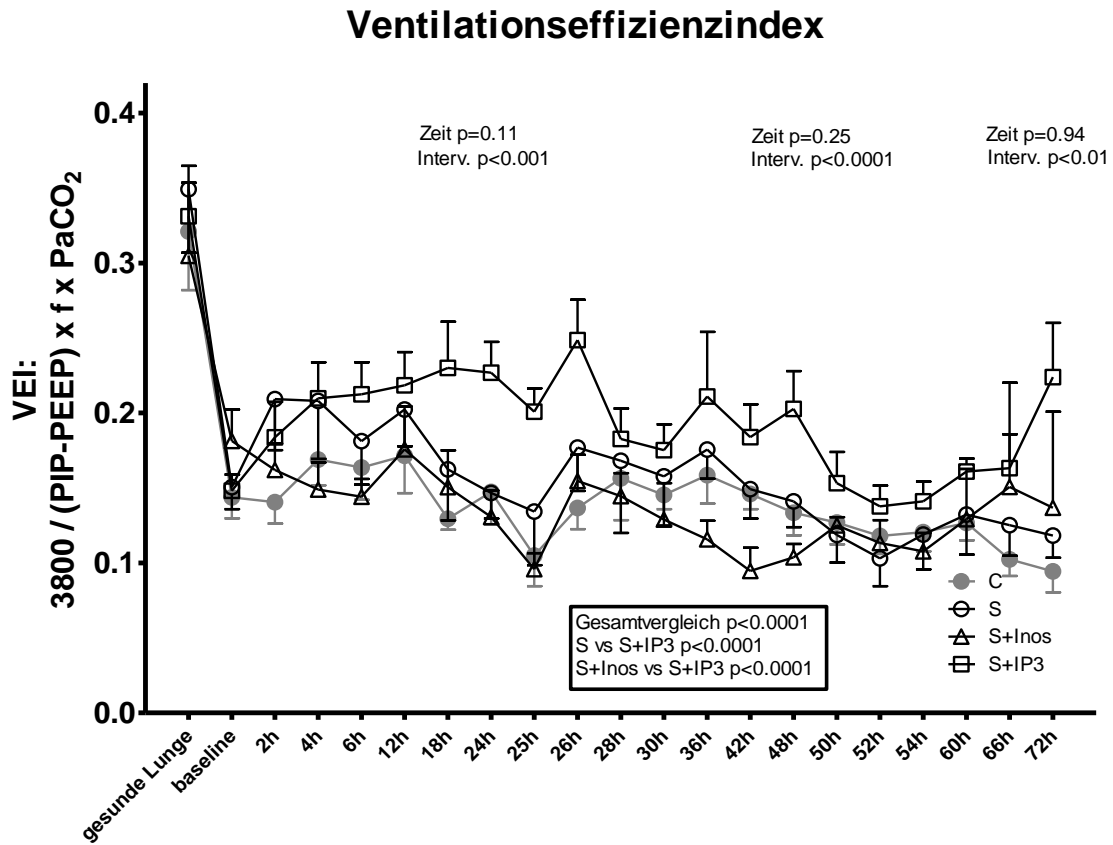


Abbildung 22: Ventilationseffizienzindex

Systemisch-vaskulärer Gefäßwiderstandindex

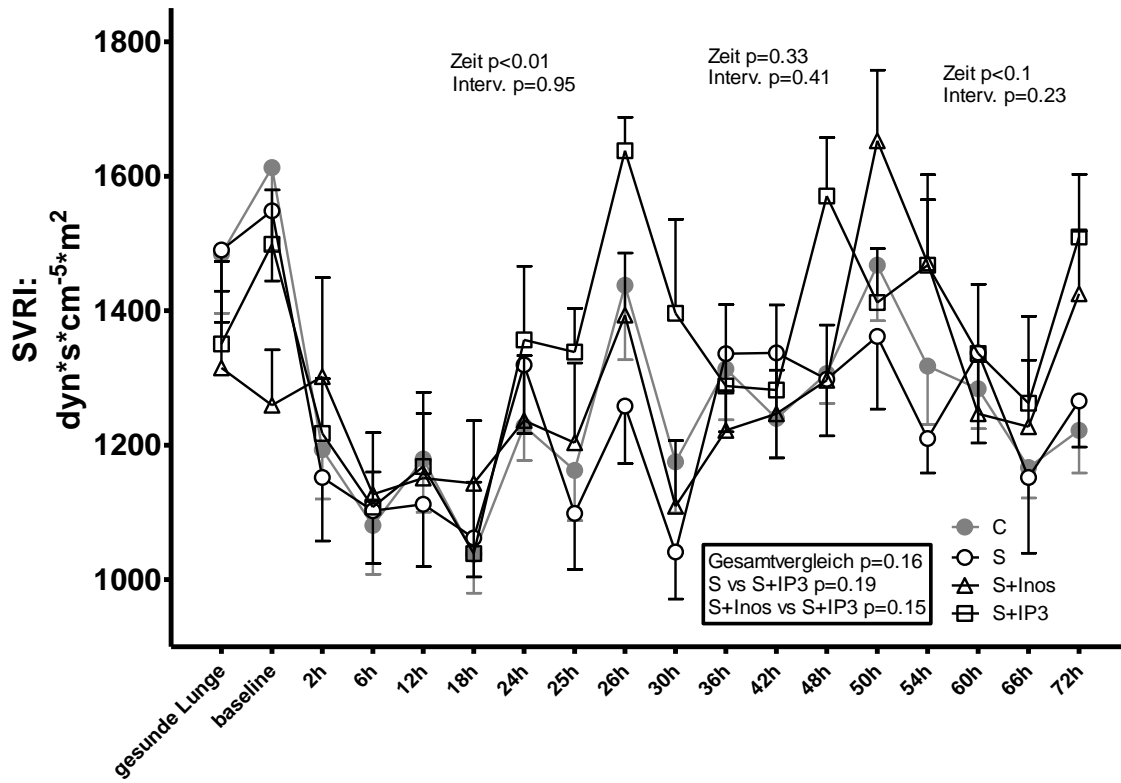


Abbildung 23: Systemisch-vaskulärer Gefäßwiderstandindex

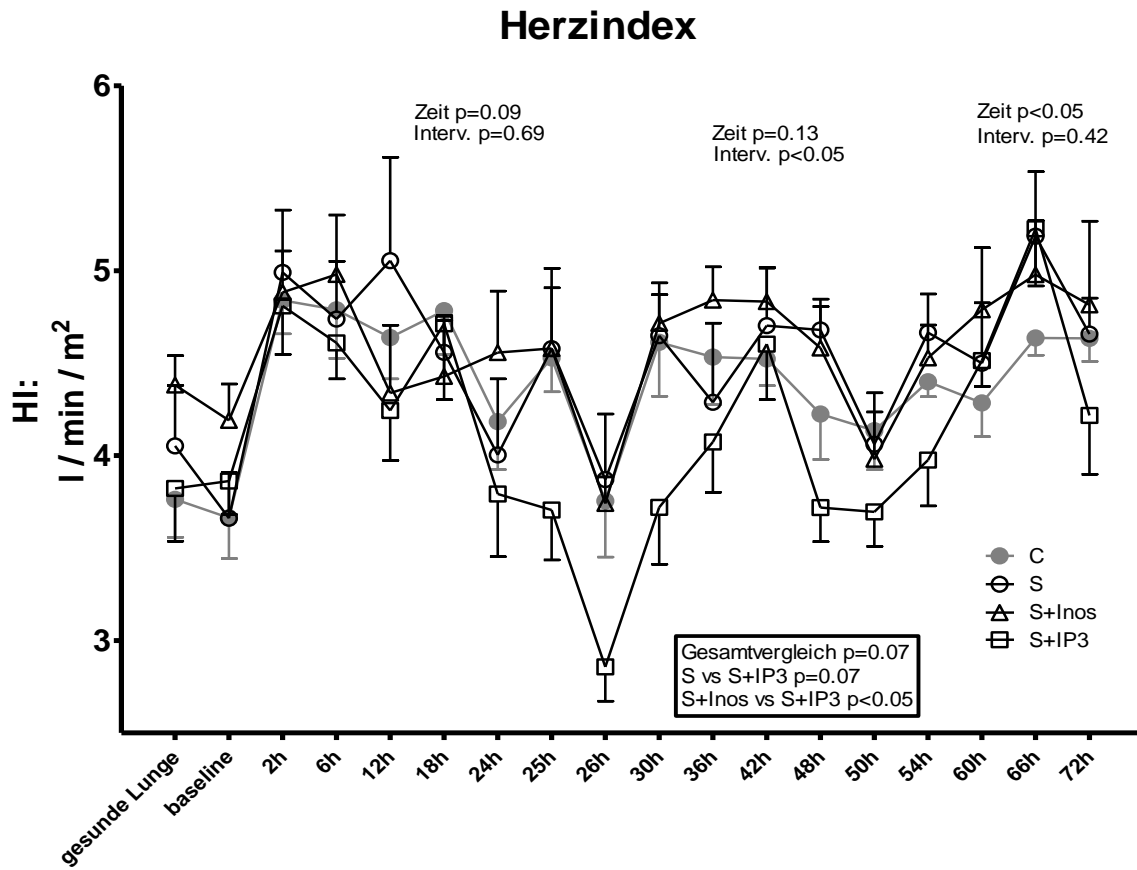


Abbildung 24: Herzindex

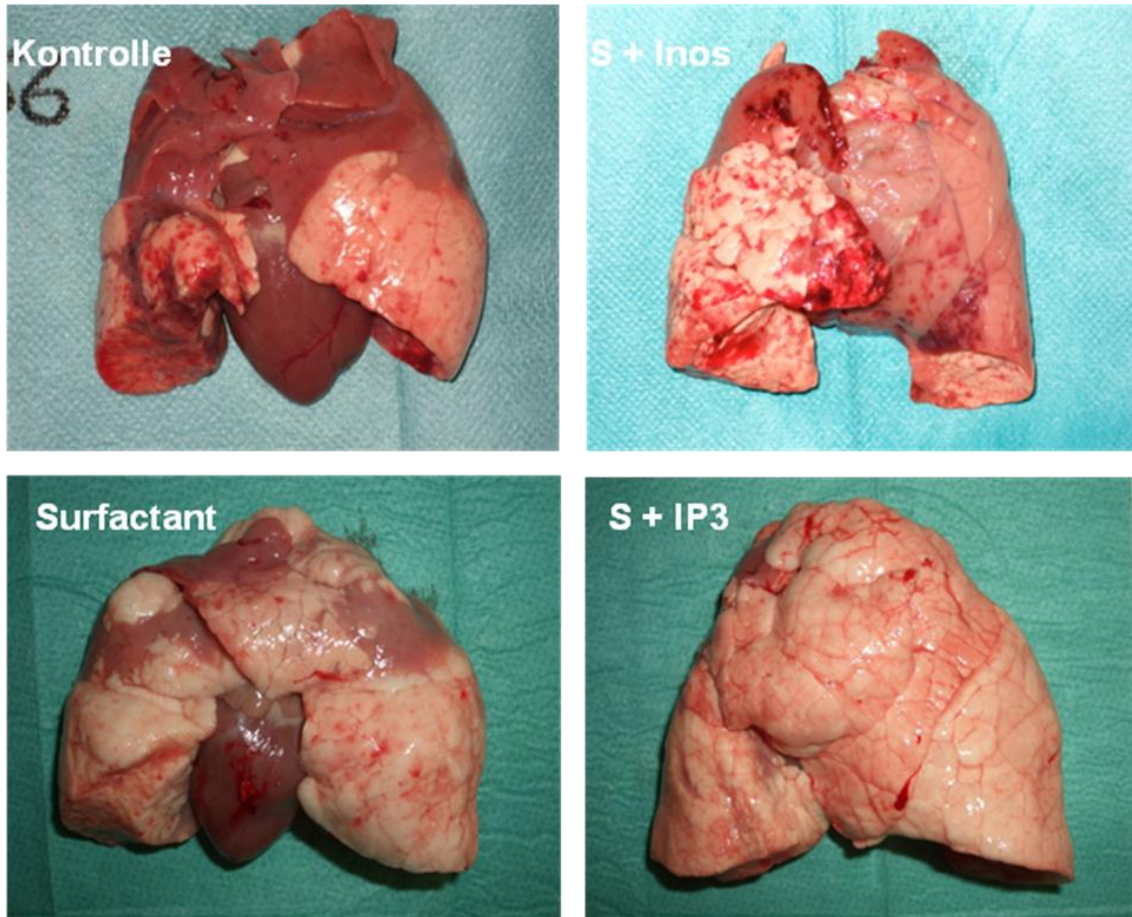


Abbildung 25: postmortale Herz-Lungen-Pakete

4. Diskussion:

4.1 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse:

In der Auswertung der Ergebnisse erlangten vor allem der extravaskuläre Lungenwasserindex, der Oxygenierungsindex, die Konzentration der Mediatoren, die Aktivität der sauren Sphingomyelinase sowie die Ceramid-Konzentration an Bedeutung, da alle diese Parameter für die IP3-Gruppe eine signifikante Verbesserung im Vergleich zu den anderen 3 Versuchsgruppen aufwiesen. Es ließ sich außerdem ein quantitativer Zusammenhang zwischen der aSMase-Aktivität, der Ceramid- und der Caspase 8-Konzentration darstellen. Insgesamt ließ sich für die IP3-Gruppe in den analysierten Daten oft ein signifikanter Unterschied zu den anderen Gruppen beobachten, weshalb diese Substanz nachweislich einen Einfluss auf das inflammatorische Geschehen in diesem translationalen Modell hat.

Für das Inositol, welches als weitere Testsubstanz und molekularer Bauteil von IP3 in dieser Studie eingesetzt wurde, konnten keine positiven Effekte ermittelt werden. Im Bezug auf den Oxygenierungsindex als wichtigsten Parameter zur Beurteilung der Lungenfunktion ergaben sich für die Inositol-Gruppe sogar die schlechtesten Werte über den gesamten Versuchsverlauf hinweg.

Alles in allem lieferten klinische und nicht-klinische Daten eine gute Grundlage, um Rückschlüsse auf die Wirkweise der verwendeten Substanzen zu ziehen und die Arbeitshypothese dieser Studie beantworten zu können.

4.2 Modell-Beschreibung:

Es handelt sich um ein tierexperimentelles Modell zur Erforschung der Surfactant“härtung“ bei einem induzierten akuten Lungenschaden (ALI). Das Acute Respiratory Distress Syndrom wird definiert als schwere Lungenerkrankung mit akutem Beginn, bilateralen Infiltraten auf der Röntgendarstellung des Thorax, abwesendem linksatrialen Hochdruck (bzw. PCWP) <17 mmHg (bei erwachsenen Patienten) und einem $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Quotienten von <200 . ARDS kommt bei Patienten aller Altersklassen vor und wird als universeller Endzustand einer schweren pulmonalen Inflammation mit gestörter alveolärer Kapillardurchlässigkeit, eingeschränkter Surfactantsynthese und –funktion sowie Störungen der epithelialen und endothelialen Integrität und Funktion gesehen.

Bei diesem experimentellen Versuch handelt es sich um ein neu entwickeltes Modell, welches wegen seiner Versuchsdauer und der multifaktoriellen Lungenschädigung einzigartig ist. Da Ferkel im Alter von 3-6 Tagen als Studientiere genutzt wurden, lassen sich die erhobenen Ergebnisse auf (menschliche) Neugeborene übertragen. Dies ist ein wichtiger Aspekt in der Beurteilung der Studie, da die Anzahl an neonatalen Modellen mit klinischer Relevanz gering ist.

Hinsichtlich der Lungenschädigung (BAL, schädliche Beatmung und LPS-Instillation) wurden aus Gründen der klinischen Relevanz verschiedene inflammatorische Reize gesetzt, und die Tiere über einen Zeitraum von 72 Stunden intensivmedizinisch überwacht.

4.2.1 Broncho-alveoläre Lavagen:

Zu Beginn der Versuchsreihe erfolgten wiederholte broncho-alveoläre Lavagen, da ein experimentelles Modell mit Meerschweinchen von Lachmann und Vogel bereits 1980 ergab, dass die durch wiederholte Lungenlavagen bedingte Entfernung des alveolären Surfactants in Bezug auf die Blutgase, die Lungenmechanik sowie die histologischen und elektronenmikroskopischen Befunde einen Lungenschaden induziert, der dem Zustand des ARDS ähnlich ist. Diese Studie kam somit erstmals zu dem Ergebnis, dass diese Technik zur Testung von pharmakologischen Wirkstoffen und verschiedener Formen der maschinellen Beatmung zur Behandlung des ARDS geeignet ist (Lachmann et al. 1980).

Zusätzlich zeigte eine Studie aus dem Jahre 2005, dass wiederholte broncho-alveoläre Lavagen zu einer Abnahme und Funktionsstörungen des Surfactants sowie einer

transpulmonalen Zellmigration mit Zunahme der pro-inflammatorischen Aktivität durch Chemokine wie IL-8 und LTB4 führen (Krause et al. 2005).

4.2.2 Schädliche Beatmung:

Am 2. Tag erfolgte die schädliche Beatmung in 2 Stufen: 1. PEEP 0 mbar, V_t 7 ml/kg für 60 min; 2. PEEP 6 mbar, V_t 15 ml/kg für 60 min. Anhand des Tidalvolumens und des PEEP lassen sich verschiedene Herangehensweisen an die maschinelle Beatmung bei ARDS unterscheiden (Bouadma et al. 2004):

- Konventionell: moderates V_t (10 ml/kg), niedriger PEEP (3 mbar), normale Atemfrequenz
- Protektiv: niedriges V_t (6 ml/kg), normaler PEEP (6 mbar), normale Atemfrequenz
- Schädlich: hohes V_t (30 ml/kg), PEEP = 0 mbar, niedrige Atemfrequenz

Eine Beatmung mit hohem Tidalvolumen oder einem deutlich erhöhten Beatmungsdruck führte in einer experimentellen Studie von Dreyfuss et al. (1988) zu einem Permeabilitätsödem als Folge einer Alveolenschädigung mit erhöhter epithelialer Durchlässigkeit. Dieses Ödem war bei niedrigem Beatmungsdruck und hohem Volumen noch stärker ausgeprägt. Ein positiver endexpiratorischer Beatmungsdruck (PEEP) konnte jedoch das Ödem deutlich reduzieren und darüber hinaus auch die Ultrastruktur der Alveolarepithelzellen erhalten. Dies stand in starkem Kontrast zu dem sonst vorkommenden, diffusen alveolären Schaden bei einem Permeabilitätsödem. Eine PEEP-Beatmung zeigte somit einen protektiven Effekt auf die Entwicklung eines Permeabilitätsödems, wohingegen ein hohes Tidalvolumen als schädlicher Faktor eingestuft wurde (Dreyfuss et al. 1988).

Weitere Studien bestätigten diese Ansicht. Eine alleinige Beatmung mit erhöhtem Tidalvolumen führte auch in einer 1995 durchgeführten Studie zu der Entwicklung eines Permeabilitätsödems in den Lungenalveolen, wobei die Schwere der Ödementwicklung von der Größe des Tidalvolumens abhängig war (Dreyfuss et al. 1995). Exzessive Lungenüberblähung durch schädliche Beatmung führt folglich zu einer Veränderung der Durchlässigkeit sowohl der Endothelzellen als auch der Epithelzellen.

Eine Studie von Bouadma beschäftigte sich zusätzlich mit der Fragestellung, ob durch die schädliche Beatmung inflammatorische Reize gesetzt werden, die anhand der veränderten

Zytokinexpression aufgezeigt werden könnten. Es stellte sich heraus, dass eine schädliche Beatmung allein (mit hohem V_t und 0 PEEP) bei gesunden Ratten zu keiner lokalen pulmonalen Expression von Zytokinen führte, sondern die Expression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF- α , Il-6, Il-10) nur in einem entzündlichen Kontext (mesenteriale Ischämie als Ursache für systemische Inflammation) gefördert wurde (Bouadma et al. 2004). Es handelte sich bei dieser Studie um eine gegenseitig bedingte Zytokinvermehrung im Rahmen eines „two-hit“-Mechanismus.

4.2.3 LPS-Instillation:

Ein weiterer Entzündungsreiz wurde am 3. Tag durch eine LPS-Instillation gesetzt, denn mehrere Studien (z.B. (Guo et al. 2010)) an Tieren ergaben, dass bronchoalveoläre Makrophagen im Anschluss an eine Lipopolysaccharid-Inhalation (LPS) vermehrt in den Lavagen nachweisbar sind. Aus diesem Grund wurde eine weitere Studie an männlichen Erwachsenen durchgeführt, die sich einer BAL 3 Stunden nach Inhalation von 100 mg E. coli LPS, aufgelöst in 2 ml Kochsalzlösung, unterzogen. Die individuellen Daten wurden mit einer 6 Wochen zuvor durchgeführten Kontroll-BAL verglichen.

In den BAL nach Inhalation zeigten sich im Vergleich zur Kontroll-BAL eine Verhundertfachung der neutrophilen Granulozyten, die somit als Hauptkomponente der zellulären Immunantwort auf den Entzündungsreiz durch die Lipopolysaccharide bestätigt werden konnten. Die Anzahl an Lymphozyten war im Durchschnitt verdreifacht. Die LPS-Inhalation führte somit nachweislich zu einer verstärkten Immunantwort im Lungengewebe mit Veränderung der Zellzusammensetzung (Sandstrom et al. 1992).

4.2.4 Bakterien in den Atemwegen:

Als zusätzlicher Entzündungsreiz wirkten die Atemwegskolonisatoren, die bei 82% aller Ferkel nachgewiesen werden konnten. Das bedeutet, dass schon vor den Schädigungen eine pulmonale Inflammation mit Aktivierung des Immunsystems bestand.

Anhand der erhobenen klinischen Messwerte lässt sich nun bestimmen, in welcher Ausprägung ein akutes Lungenversagen (ALI) durch die verwendeten

Schädigungsprotokolle induziert wird. In der Klinik äußert sich das ALI durch Ödembildung, Abnahme der spezifischen Compliance des Lungengewebes und vor allem durch Hypoxämie.

Die Analyse der Ergebnisse für den extravaskulären Lungenwasserindex (EVLWI) ergab vor allem im Anschluss an die broncho-alveolären Lavagen (BAL) einen drastischen Anstieg, welcher nach der 2. und 3. Schädigung wesentlich geringer ausfiel. Die Messwerte für die spezifische Compliance ließen ebenfalls nach den BAL eine Induktion eines akuten Lungenschadens erkennen, da es im Anschluss in allen Versuchsgruppen zu einer anhaltenden Reduktion der Lungencompliance kam.

Zusammenfassend zeigte sich in der Auswertung der Versuchsergebnisse, dass durch die broncho-alveolären Lavagen, die schädliche Beatmung und die LPS-Instillation nicht nur eine Schädigung im Surfactant-Stoffwechsel entstanden ist, sondern auch eine Induktion einer pulmonalen Inflammation mit Ödembildung stattgefunden hat.

4.2.5 Wahl der Versuchstiere:

In diesem Studienmodell kamen neugeborene Ferkel als Versuchstiere zum Einsatz, da sie unter anderem, genau wie der Mensch, ein Vorkommen an Monozyten/Granulozyten in der Lungenstrombahn haben, dem Ort der transpulmonalen Migration und gesteigerten Produktion von pro-inflammatorischen Mediatoren (Matute-Bello et al. 2008). Außerdem reagieren Schweine sensibel auf das inhalativ verabreichte LPS und zeigen eine hohe Übereinstimmung mit der hypervariablen Region des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR 4) des Menschen, dessen Komplexbildung und Aktivierung im Anschluss an eine LPS-Stimulation nur in Abhängigkeit mit der Synthese von Ceramiden durch die saure Sphingomyelinase stattfindet (Cuschieri et al. 2007).

4.3 Eingesetzte Testsubstanzen in dieser Studie:

4.3.1 1D-myo-Inositol-1,2,6-trisphosphat (IP3):

Der Wirkstoff 1,2,6-IP3 besitzt zahlreiche interessante pharmakologische Eigenschaften wie die Hemmung des Serumproteinaustritts (Lund und Reed 1994), Reduktion der Ödembildung bei Inflammation (Lingnau et al. 1997) sowie analgetische Effekte (Malmberg et al. 1995). Bell und McDermott postulierten 1998, dass sich die pharmakologischen Effekte von 1,2,6-IP3 durch Rezeptorbindung höhergradig phosphorylierter Inositele (z.B. durch Aktivierung des Plasmamembran-gebundenen 1,3,4,5-IP4-Rezeptors) erklären lassen (Bell und McDermott 1998).

Eine präklinische Studie mit instrumentierten Lämmern nach Rauchgasinhalation bewies ebenfalls den günstigen Einfluss auf die Suppression der pulmonalen Ödementstehung durch 1,2,6-IP3 (Nakazawa et al. 1994).

Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die positiven Effekte des IP3 auf das inflammatorische Geschehen nach Lungenschädigung mit Hilfe von Surfactant als Transportmedium zu bestätigen und biochemisch zu erklären. Denn die bereits bekannten klinischen Effekte der Verringerung eines immunologischen pulmonalen Ödems und der Surfactantfunktionsminderung ließen daran denken, dass durch Anwendung von IP3 der Ceramid-Stoffwechselweg der eigentliche pharmakologische Ansatzpunkt ist.

4.3.2 Myo-Inositol:

Das Cyclohexan Myo-Inositol wird in experimentellen Studien seit den 80er-Jahren des letzten Jahrhunderts in angereicherter Milch für Frühgeborene eingesetzt, um typische neonatale Erkrankungen mit inflammatorischem Auslöser wie broncho-pulmonale Dysplasie, Frühgeborenen-Retinopathie und nekrotisierende Enterocolitis einzudämmen. Eine signifikante Abnahme des Auftretens von broncho-pulmonaler Dysplasie konnte durch eine Cochrane-Review aus dem Jahr 2003 (Howlett und Ohlsson 2003) auf dem Boden von drei randomisierten, kontrollierten Studien bestätigt werden.

Schon Hallman et al. postulierten 1990, dass Myo-Inositol das Wachstum von Endothelzellen fördert, die Glukokortikoid-vermittelte Zelldifferenzierung der Alveolarepithelien steigert und als Antioxidans dienen könnte. Myo-Inositol sollte laut dieser Studie als Ergänzung zur

Nahrung von Neugeborenen mit reduziertem Geburtsgewicht eingesetzt werden (Hallman et al. 1990).

Eine Erklärung für den Effekt des Myo-Inositols könnte in der Annahme liegen, dass eine Supplementierung zu einer beschleunigten und bevorzugten Synthese von Substanzen aus dem Inositolstoffwechsel der Lunge führen könnte, die mit einer verbesserten Lungenfunktion einhergehen. Neuere Forschungsergebnisse (Spyridakis et al. 2010) haben jedoch gezeigt, dass der Anteil an Phosphatidylinositolen (phosphorylierte Inositole mit langen Fettsäuresubstituenten) in Surfactantfilmen von erwachsenen ARDS-Patienten auf das 4-fache der Konzentration von gesunden Probanden ansteigt. Das stellt den vorteilhaften Einfluss eines diätetisch erhöhten Phosphatidylinositol-Pools als Ursache für verbesserte Lungenfunktion in Frage und schiebt einen erhöhten Inositolphosphat-Pool, das heißt mehrfach-phosphorylierte Abkömmlinge des Inositols, aus dem sich eine Vielzahl von second messenger generieren, in den Vordergrund (Best et al. 2010).

Aus diesen Gründen setzte sich die vorliegende Studie das Ziel, positive Effekte einer Inositol-Anreicherung von Surfactant zu bestätigen und zu klären, ob eine Beeinflussung des Ceramidstoffwechselwegs auftritt.

4.4 Wertung der Surfactanttherapie bei neonatalem ALI:

Die Wirksamkeit einer Surfactant-Therapie des neonatalen ALI unter Zuhilfenahme von maschineller Beatmung ist, auch durch zahlreiche Studien bestätigt (Lotze et al. 1998), nur von einer Dauer von wenigen Stunden. Doch der Behandlungsansatz mit der Gabe von Surfactant hat sich grundlegend als effektiv erwiesen und würde von Faktoren profitieren, die den Behandlungseffekt verlängern. Da die primäre Funktion des Surfactants in der Reduktion der Oberflächenspannung liegt, sollte diese Wirkung anhand unserer Studienergebnisse nachvollzogen werden.

Eine Verbesserung der spezifischen Compliance trat durch die Gabe des Surfactants im Vergleich zur Kontrollgruppe nach der 1. und 2. Wirkstoffgabe auf, was auf die Wirkweise des Surfactants (Reduktion der Oberflächenspannung der Alveolen) zurückzuführen ist.

Bei der Auswertung einiger klinischer Parameter wie dem EVLWI, Resistance, Oxygenierungsindex und Ventilationseffizienzindex ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Surfactantgruppe. Auch ein Vergleich der Messwerte für die Zellen in der BALF, den Apoptose-Score und die Ceramid-Konzentration zeigte keine signifikanten Unterschiede. Lediglich eine (nicht-signifikante) Abnahme der aSMase-Aktivität und Caspase-8-Konzentration durch Surfactant allein konnte aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse bestätigten unsere Hypothese, dass die pulmonale Inflammation nur einen kurzfristigen Surfactanteffekt zulässt.

Als Konsequenz dieser Beobachtungen ergaben sich somit die Überlegungen einer lokalen anti-inflammatorischen Therapie durch die additive Gabe von Substanzen aus dem Intermediärstoffwechsel der Inositolphosphate (IP3, Myo-Inositol), die durch „Härtung“ des Surfactants die positiven Effekte auf die Lungenfunktion verlängern sollten. Für den eingesetzten Wirkstoff IP3 als Beigabe zum Surfactant konnte durch die Beeinflussung der pro-apoptischen Signalkaskade über die aSMase, Ceramid und Caspase-8 und die damit verbundene immunmodulierende Wirkung, der gewünschte prolongierte Effekt der Surfactantgabe, erreicht werden.

Für den zweiten Wirkstoff, das Nahrungs-Supplement Myo-Inositol, konnte dieser anti-apoptische Einfluss nicht aufgezeigt werden. Diese Studie kam somit zu dem Ergebnis, dass die Hypothese einer anti-inflammatorischen Wirkung durch die Zugabe von Myo-

Inositol zum Surfactant verbunden mit einer verlängerten Wirksamkeit des Surfactants, zumindest für einen Beobachtungszeitraum von 72 Stunden, nicht bestätigt werden kann.

4.5 Surfactanthärtung durch Inhibition von aSMase-Aktivität und Ceramidstoffwechsel:

Bei der Beantwortung unserer Hypothese muss (wie im vorherigen Abschnitt schon angedeutet) anhand unserer Studienergebnisse zwischen den beiden Testsubstanzen Myo-Inositol und IP3 unterschieden werden. Das Myo-Inositol führte nämlich weder zu einer reduzierten Aktivität der sauren Sphingomyelinase noch zu einer signifikanten Abnahme der Ceramid-Konzentration im Vergleich zur Kontroll- und Surfactantgruppe. Im Bezug auf die Aktivität des Enzyms zeigten sich für die Gabe des Myo-Inositols im Gegensatz zur alleinigen Gabe des Surfactants sogar etwas höhere Messwerte.

Das IP3 verursachte hingegen eine signifikante Abnahme sowohl der aSMase-Aktivität (p -Wert $< 0,0001$) als auch der Ceramid-Konzentration (p -Wert $< 0,05$) im direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Messwerte für die Surfactant- und IP3-Gruppe unterschieden sich im Bezug auf diese beiden Parameter ebenfalls signifikant.

Die beschriebenen Wirkungen des Surfactants auf die Verbesserung der spezifischen Compliance lassen sich im Vergleich der IP3-Gruppe mit der Kontrollgruppe ebenfalls darstellen. Im Rahmen der Beeinflussung der aSMase und Ceramid-Konzentration durch das IP3 ließen sich zusätzlich Veränderungen der klinischen Parameter, die von einer verbesserten Surfactantfunktion profitieren, aufzeigen. Es kam unter anderem zu signifikanten Verbesserungen des Oxygenierungsindex und des extravaskulären Lungenwasserindex. Das heißt, die Lungenfunktion konnte nachweislich durch die Zugabe von IP3 zum Surfactant verbessert werden, da sich gleichzeitig die Surfactantfunktion durch die Inhibition von aSMase-Aktivität und Ceramidstoffwechsel durch die IP3-Gabe verlängern ließ.

4.6 Wirkmechanismus der Ceramide:

Es gibt mehrere Hypothesen, über welchen Signalweg die Ceramide als intrazelluläre Mediatoren die Zelldifferenzierung oder den programmierten Zelltod induzieren (z.B. Signaltransduktion via TNF-, TRAIL-, FasL-Rezeptoren). Zunächst muss aber die Aktivierung der aSMase erfolgen, woraufhin es dann zur Bildung von Ceramiden kommt.

Eine Zellstimulation, z.B. durch CD95, führt zu einer Fusion von intrazellulären, mit aSMase beladenen Vesikeln mit der Zellmembran und somit zu einer Translokation des Enzyms auf die Außenseite der Membran. Dort kommt es zur Ausbildung sogenannter Rezeptor-Rafts, deren Aktivierung eine Hydrolyse des Sphingomyelins mit Freisetzung von Ceramid bedingt. Innerhalb der lipidhaltigen Plasmamembran bilden sich nun Ceramid-reiche Plattformen aus, die eine entscheidende Rolle bei der Signalweiterleitung des programmierten Zelltods spielen. Ceramid-reiche Plattformen bedingen auch die hohe Anzahl an Rezeptoren und Liganden, die zu einer Aktivierung der aSMase beitragen (Gulbins 2003).

Um nun die Funktion der Ceramide als pro-apoptotische, intrazelluläre Mediatoren zu bestätigen, wurden Messungen der (aktiven) Caspase-8-Konzentration im aufbereiteten Lungengewebe durchgeführt, da der Caspase-8-Signalweg ein gut erforschter, intrazellulärer, pro-apoptotischer Signalweg ist.

Die Abhängigkeiten der Signalkaskade aSMase → Ceramide → Caspase-8 → Apoptose lassen sich durch unsere Ergebnisse gut darstellen. Man kann im Vergleich der Balkendiagramme für die aSMase-Aktivität, Ceramid- und Caspase-8-Konzentration, z.B. der Kontrollgruppe, sehr deutlich erkennen, dass eine erhöhte Aktivität des Enzyms saure Sphingomyelinase mit einer erhöhten Konzentration der Ceramide als Abbauprodukt des Sphingomyelins einhergeht. Dies hat einen dementsprechenden Anstieg des Apoptose-Scores zur Folge, was die Funktion der Ceramide als pro-apoptotische, intrazelluläre Mediatoren unterstützt. Ein Zusammenhang zwischen der Ceramid-Konzentration und der Aktivität der pro-apoptotischen Caspase-8 lässt sich ebenfalls deutlich erkennen, weshalb die Ceramide über diesen intrazellulären Weg die Apoptose induzieren.

Es konnte also nachgewiesen werden, dass die Aktivitätsbeeinflussung der aSMase, z.B. durch IP3, mit äquipotenten Veränderungen der abhängigen Faktoren (Ceramide, Caspase-8, Apoptose) einhergeht. Dies ist ein Argument für die Dominanz der aSMase im Konzept der Entzündungsreaktion von alveolärem Epithel.

4.7 Bedeutung der alveolären Apoptose bei neonatalen Lungenerkrankungen:

Während der kindlichen Lungenentwicklung spielt die Apoptose eine wichtige Rolle in der normalen Regulation der Organogenese und Morphogenese und trägt wesentlich zur Oberflächengestaltung der Alveolen, zur Atemwegsentwicklung und zur Differenzierung der Lungenstrombahn bei (Del Riccio et al. 2004). Die Organentwicklung ist somit ein komplexes Zusammenspiel aus Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Zur gleichen Zeit ist die Zellapoptose jedoch mit der Pathogenese des neonatalen akuten Lungenschadens (nALI) assoziiert und führt bei diesem Krankheitsbild zum Integritätsverlust der alveolaren Kapillarbarriere mit der Folge der Ödementwicklung und Surfactantfunktionsstörung. Eine normale Lungenentwicklung wird somit durch eine Unterbrechung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Apoptose gestört (Bem et al. 2007). Obwohl die Anzahl an Studien mit Langzeitdaten gering ist, führten Nachuntersuchungen zu dem Ergebnis, dass ein Großteil der an ARDS erkrankten Kinder eine reduzierte Lungenfunktion und sowohl restriktive als auch obstruktive Lungenerkrankungen noch einige Jahre später aufwiesen (z.B. (Fanconi et al. 1985)).

Die Gabe von Surfactant konnte in der Studie von Bem et al. 2007 die Zellapoptose senken, wohingegen die Behandlung mit Sauerstoff und maschineller Beatmung zu einem vermehrten Zelluntergang führte und somit den Lungenschaden verstärkte (Bem et al. 2007). Die Ergebnisse unserer Studie zeigten jedoch, dass die alleinige Gabe von Surfactant die Apoptose im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant senken konnte. Die additive Gabe des Wirkstoff IP3 führte hingegen zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose im Vergleich zur Surfactantgruppe. Dies gilt als weiterer Beweis dafür, dass durch die Inhibition der pulmonalen Inflammation durch das IP3 ein längerfristiger Surfactanteffekt möglich ist.

4.8 Einfluss der Ceramide auf die Oberflächenspannung:

Eine Studie zur Zusammensetzung des Surfactantfilms und Veränderung der Oberflächenspannung kam schon 1984 zu dem Ergebnis, dass in broncho-alveolärer Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten eine höhere Konzentration an Glykolipiden im Vergleich zu gesunden Patienten vorhanden ist. Gleichzeitig wurde eine gesteigerte Oberflächenspannung nachgewiesen, weshalb ein Zusammenhang zwischen abnehmender Surfactantaktivität und erhöhten Ceramidkonzentrationen in Surfactantfilmen postuliert wurde (Rauvala und Hallman 1984).

Wenn man nun die Abbildungen der Ceramid-Konzentration und der Oberflächenspannung dieser Studie vergleicht, dann fallen in beiden Graphiken jeweils die höchsten Werte für die Kontrollgruppe und die niedrigsten Werte für die IP3-Gruppe auf. Die Surfactant- und Inositol-Gruppe liegen jeweils auf gleichem Niveau. Im Gruppenvergleich sind die Unterschiede für die Oberflächenspannung jedoch im Gegensatz zur Ceramid-Konzentration nicht signifikant. Da die Veränderungen von Ceramid-Konzentration und Oberflächenspannung jedoch in Bezug auf die einzelnen Gruppen parallel verlaufen, kann von einer Abhängigkeit dieser beiden Faktoren ausgegangen werden. Bei der Messung der Oberflächenspannung wurden jedoch alle Surfactantproben auf 10 mg/ml standardisiert, weshalb sich das Problem ergab, dass Variationen des individuellen Surfactantpools nicht erfasst werden konnten.

4.9 Interpretation der Zellkonzentrationen und Zelltypen in der BALF:

Da sich die Zellkonzentrationen in den broncho-alevolären Lavagen zwischen der Kontroll- und der IP3-Gruppe nach 72 Stunden maschineller Beatmung signifikant unterschieden, ist dieses Ergebnis als Zeichen des immunmodulierenden Effekts durch IP3 zu werten. Neben dem nur leichten Anstieg der gesamten Zellzahl von initialer zu postmortaler Lavage, führt die Gabe von IP3 zusätzlich noch zu einer reduzierten Zellkonzentration an CD14+/CD18+-Zellen (Makrophagen monozytären oder granulozytären Ursprungs) im Gegensatz zu den anderen Studiengruppen. Die Anzahl der CD14-/CD18+-Zellen (β -Integrin positive Leukozyten) und CD14+/CD18+-Zellen (β -Integrin positive Makrophagen) lässt sich durch die Gabe von IP3 deutlich reduzieren, weshalb von einer anti-inflammatorischen Wirkung durch das IP3 ausgegangen werden kann.

Eine Reduktion von β -Integrin positiven Makrophagen und Granulozyten im Alveolarraum ist positiv für die Lungenfunktion, da durch diese Zellen die lokale pulmonale Inflammation getriggert wird. Es kommt zur Inaktivierung des Surfactants, Freisetzung von Mediatoren, Proteasen und reaktiven Oxidantien, Fibrin- und Flüssigkeitsanreicherung, Apoptose sowie Integritäts- und Funktionsverlust der Zellverbände (Ware und Matthay 2000). All diese Faktoren werden durch die IP3-Gabe reduziert, da eine Veränderung der Parameter Oxygenierungsindex, EVLWI, Ceramidkonzentration, Apoptose-Score und Zellinfiltration im Vergleich zu den anderen 3 Studiengruppen auftrat. Die reduzierte Parenchyminfiltration mit Entzündungszellen nach transpulmonaler Migration ist sicherlich ein entscheidender Faktor in der Entstehung und Behandlung des nALI.

4.10 Veränderung der Genexpression der Mediatoren:

Die Messungen von Amphiregulin, TGF- β 1 und Il-6 wurden im Rahmen dieser Studie durchgeführt, da erhöhte Konzentrationen aller 3 Mediatoren beim Lungenschaden beschrieben sind (z.B. (Spieth et al. 2009)).

Aus den erhobenen Studienergebnissen lässt sich das Fazit ziehen, dass die Genexpression von Zytokinen (Il-6) und epithelialen Wachstumsfaktoren (TGF- β 1, Amphiregulin) durch das IP3 stark gesenkt wird (jeweils signifikant niedrigere Werte für alle 3 Mediatoren im Vergleich zu den anderen Studiengruppen). Für die Hypothese der Beeinflussung der Zytokinfreisetzung, z.B. im Rahmen einer NF- κ B-Aktivierung mit vermehrter Transkription von Zytokinen, spricht die Überlegung, dass der Ceramid-Signaltransduktionsweg über weitere Metaboliten, insbesondere das Sphingosin-1-Phosphat (S1P), verläuft. Das S1P stimuliert zahlreiche intrazelluläre Kinasen und Phosphatasen, welche wiederum den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren. Dies führt zur Expression zahlreicher pro-inflammatorischer Proteine mit Verstärkung des inflammatorischen Prozesses (Barnes 2004).

In der isoliert perfundierten Lunge der Maus konnten Dolinay et al. zudem beweisen, dass eine Vielzahl an inflammatorischen und pro-apoptotischen Genen durch eine schädigende Beatmung mit Lungenüberblähung oder eine LPS-Inhalation vermehrt exprimiert werden. Die Versuchsgruppe mit kombinierter Lungenüberblähung und LPS-Gabe zeigte die höchsten Genexpressionen. Es handelte sich bei den stärker exprimierten Genen um funktionelle Regulatorgene in den Bereichen Immunantwort, Rezeptorbindung, Apoptose und Zytokinaktivität, weshalb es zu einer vermehrten Expression von Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Zytokinen kam. Die identifizierten Gene gehörten alle zum FAS-Liganden- und Caspase-Signalweg (Dolinay et al. 2006). In dieser Studie wurde das Amphiregulin ebenfalls untersucht und wies eine vermehrte Expression durch Überbeatmung (Volutrauma) auf.

Eine vorangegangene Studie dieser Arbeitsgruppe konnte für die wiederholten bronchoalveoläre Lavagen als drittes Schädigungsmuster dieser Studie ebenfalls eine Veränderung der Genexpression über den Transkriptionsfaktor NF- κ B nachweisen. Es zeigte sich, dass die Gabe des selektiven NF- κ B-Inhibitors IKK-NBD-Peptid (I κ B-Kinase-NF- κ B-Bindungsdomänenprotein) zu einer Reduktion der Chemokin-Expression (Il-8, Leukotrien B₄) und Migration von Makrophagen/Granulozyten ins Lungenparenchym führte und somit eine

Verbesserung im Gasaustausch, in der Lungenfunktion und in der Ödembildung auftrat (von Bismarck et al. 2009).

4.11 Wirkstoffvergleich zwischen Imipramin und IP3:

Das Antidepressivum Imipramin als nicht spezifischer Hemmstoff der aSMase führte in einer 2008 durchgeführten Studie unserer Arbeitsgruppe bei einem Beobachtungszeitraum von 24 Stunden zu einer Verbesserung der Oberflächenspannung des Surfactantfilms durch Reduktion der Ceramid-Konzentration. Imipramin schwächte außerdem die Ödementstehung und die Bildung von pro-inflammatorischen Mediatoren ab (von Bismarck et al. 2008).

In der genannten Studie führte die Gabe von Surfactant + Imipramin verglichen mit der alleinigen Surfactantgabe oder der Kontrollgruppe zu einer signifikanten Verbesserung der spezifischen Compliance, des extravaskulären Lungenwasserindex und des $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Quotienten vor allem in den 12-24 Stunden nach Lungenschädigung. Ein vermehrter Anstieg der aSMase-Aktivität und der Ceramid-Konzentration konnte ebenfalls durch die kombinierte Gabe dieser Wirkstoffe verhindert werden. Das Ergebnis der Studie war somit eine für mindestens 24 Stunden anhaltende Surfactanthärtung durch Imipramin. Als Wirkmechanismus wurde eine Hemmung der Aktivität der sauren Sphingomyelinase und eine niedrigere Ceramidkonzentration nachgewiesen.

Um die Aussagekraft der Studienergebnisse für den Wirkstoff IP3 besser beurteilen zu können, wurde nun (im gleichen Modell) ein Vergleich ausgewählter Parameter für die Imipramin- und IP3-Gruppe durchgeführt, da beide Substanzen einen ähnlichen Wirkmechanismus in Bezug auf die aSMase und den Ceramidstoffwechsel aufweisen. Es zeigte sich, dass die Effekte des IP3 eine gleiche Potenz wie die Wirkung des Imipramins aufweisen. Die aSMase-Aktivität lag für Imipramin bei 1552 ± 223 pmol/mg/h und für IP3 bei 1606 ± 225 pmol/mg/h (p-Wert = 0,65, t-Test). Die Ceramidkonzentration für Imipramin betrug 1659 ± 320 pmol/mg und für IP3 1625 ± 413 pmol/mg (p-Wert = 0,86, t-Test).

Die Substanzen Imipramin und IP3 können somit anhand der bekannten oder in dieser Studie nachgewiesenen Wirkungen hinsichtlich des Ceramidstoffwechsels für die Anwendung bei neugeborenen Ferkeln als äquipotent eingestuft werden.

5. Methodenkritik:

5.1 Dosierung und Kinetik:

Das in älteren klinischen Studien eingesetzte Myo-Inositol zur Behandlung des kindlichen Atemnotsyndroms und zur Prävention der broncho-pulmonalen Dysplasie wurde mit einer Dosis von 80 mg/kg/Tag intravenös (Hallman et al. 1992) oder 160 mg/kg/Tag enteral (Hallman et al. 1987) appliziert, um die Inositol-Plasma-Konzentrationen für eine präferentielle Phosphorylierung in der Lunge zu steigern. Durch die unterschiedlich lange Applikationszeit ergaben sich Gesamtdosen von 400 mg/kg bzw. 1280 mg/kg, im Vergleich zu einer lokal-trachealen Gesamtdosis von 120 mg/kg (3 x 40 mg/kg) in unserer Studie.

Myo-Inositol kann entweder über die intestinale Schleimhaut mittels Natrium-abhängiger Transportsysteme aufgenommen oder in der Zelle aus Glucose synthetisiert werden. Die Plasma-Konzentration von Säuglingen liegt bei 170 $\mu\text{mol/l}$, und die Plasma-Clearance beträgt 8 ml/kg/min (Brown et al. 2009). Eine intratracheale Applikation wurde in Studien noch nie verwendet, weshalb die hier eingesetzte Myo-Inositol-Dosis nur deduktiv bestimmt werden konnte.

Die verwendete IP3-Dosis wurde aus 2 vorherigen Studien abgeleitet, in denen ein akuter Lungenschaden bei Schafen durch Rauchgasinhalation (Nakazawa et al. 1994) bzw. *Pseudomonas aeruginosa* Infusion (Lingnau et al. 1997) induziert wurde. Zunächst wurden 2 mg/kg intravenös im Sinne eines pretreatment und dann 3,5 mg/kg/h kontinuierlich während des gesamten Versuchs appliziert. Die theoretische alveoläre Konzentration in unserer Studie lag wahrscheinlich bei 0,27 mg/ml (2 mg IP3/7,25 ml Surfactant) vorbehaltlich von Verdünnungsphänomenen durch „lining fluid“ oder restlicher Lavage-Flüssigkeit.

Die erste Plasma-Halbwertszeit von IP3 (bei Ratten) liegt bei 5-10 min, gefolgt von einer zweiten mit $1,6 \pm 0,9$ Stunden. Bei der zweiten Halbwertszeit handelt es sich hauptsächlich um den Abbau von IP3 zu IP2 und IP1 als Zwischenprodukte der Dephosphorylierung (Lennernäs H. 1997).

Die Beimischung des IP3 zum exogenen Surfactant (durchschnittliche Einzeldosis in dieser Studie: 0,8 mg/kg) zeigte anhand der klinischen Effekte eine ausreichend anhaltende Wirkung für die 24-stündigen Applikationsintervalle. Eine Integration des IP3 in den Surfactantfilm könnte außerdem zu einem langsameren Substanzabbau als im Plasma geführt haben, weshalb bei den klinischen und laborchemisch erstellten Daten dieser Studie

auch mittelfristige (> 10 Stunden nach Wirkstoffgabe) Effekte des IP3 belegt werden konnten.

5.2 Nebenwirkungen der eingesetzten Substanzen:

Gruppenvergleich der Nierenwerte: Die Ferkel der IP3-Versuchsgruppe wiesen eine durchschnittliche Urinausscheidung, jedoch höhere Werte für das Serum-Kreatinin und fast signifikant erhöhte Kalium-Werten nach 24 Stunden auf. Da es jedoch nach dem initialen Kreatinin-Anstieg innerhalb der ersten 24 Versuchsstunden im Verlauf wieder zu einer Abnahme der Werte kam, ist ein primär nephrotoxischer Effekt als Nebenwirkung des IP3 eher unwahrscheinlich. Die wiederholte IP3-Gabe im Verlauf des Versuchs hätte dann zu einer kontinuierlichen Schädigung der Nierenfunktion mit Oligurie und kontinuierlich ansteigenden Nierenretentionsparametern führen müssen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei erwachsenen Schafen beschrieben, welche nach 48 Stunden kontinuierlicher IP3-Gabe eine leicht reduzierte Kreatinin-Clearance und eine erhöhte Natrium-Ausscheidung aufwiesen (Lingnau et al. 1997).

Gruppenvergleich der Leberwerte: Die Ferkel der Surfactant- und IP3-Gruppe wiesen jeweils nach 24 und 48 Stunden einen erhöhten GOT-Wert im Serum auf, welcher sich jedoch zur Blutentnahme nach 72 Stunden normalisierte. Insgesamt zeigten sich für die GOT-Werte keine statistisch signifikanten Differenzen. Es könnte also lediglich von einem Trend ausgegangen werden.

Gruppenvergleich der Herz-Kreislaufparameter: In der Analyse des SVRI zeigte sich kein Einfluss der verschiedenen Wirkstoffe. Auffällig war lediglich der Herzindex in der IP3-Gruppe (Abbildung 24), da die Werte fast den gesamten Verlauf niedriger ausgeprägt waren als in den anderen 3 Gruppen. Dieser Effekt ist aber nicht signifikant im Gesamtvergleich.

6. Zusammenfassung und Beantwortung der Hypothese:

Unser neu entwickeltes Ferkelmodell mit dreifacher Lungenschädigung bestätigt, dass die Gabe von Surfactant allein im Vergleich zur Kontrollgruppe (Luftbolus als Intervention) zu keiner dauerhaften Verbesserung der Lungenfunktion inklusive Ödembildung, epithelialer Apoptose und transpulmonaler Zellmigration führt.

Der eingesetzte Wirkstoff Myo-Inositol hatte ebenfalls keinen Einfluss auf das inflammatorische Geschehen oder den aSMase- und Ceramidstoffwechsel als pro-apoptotischen Signalweg.

Im starken Kontrast dazu stehen die beschriebenen Effekte des IP3. Es konnte eine positive Beeinflussung der aSMase-Aktivität und somit der Ceramidkonzentration nachgewiesen werden. Das Ergebnis war eine Verbesserung der Lungenfunktion und des pulmonalen Sauerstoffaustausches sowie eine Reduktion der Ödembildung und der epithelialen Apoptose für mindestens 22 Stunden nach Wirkstoffgabe. Als systemische Nebenwirkung kam es lediglich zu einer verzögerten Kreatinin-Ausscheidung.

Zusammenfassend bietet sich IP3 als Zusatz zu exogenem Surfactant durch die Inhibition der aSMase-Aktivität und Ceramid-Produktion als eine erfolgsversprechende Behandlungsoption in der Therapie von Neugeborenen mit akutem inflammatorischen Lungenschaden an.

7. Literaturverzeichnis:

- Awasthi, S., Vivekananda, J., Awasthi, V., Smith, D., King, R.J. (2001): CTP:phosphocholine cytidyltransferase inhibition by ceramide via PKC- α , p38 MAPK, cPLA2, and 5-lipoxygenase. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 281, L108-118
- Barnes, P. J. (2004): Ceramide lances the lungs. Nat Med, 10, 130-131
- Bell, D., McDermott, B. J. (1998): D-myo inositol 1,2,6, triphosphate (alpha-trinositol, pp56): selective antagonist at neuropeptide Y (NPY) Y-receptors or selective inhibitor of phosphatidylinositol cell signaling? Gen Pharmacol, 31, 689-696
- Bem, R. A., Bos, A. P., Matute-Bello, G., van Tuyl, M., van Woensel, J.B. (2007): Lung epithelial cell apoptosis during acute lung injury in infancy. Pediatr Crit Care Med, 8, 132-137
- Best, M. D., Zhang, H., Prestwich, G.D. (2010): Inositol polyphosphates, diphosphoinositol polyphosphates and phosphatidylinositol polyphosphate lipids: structure, synthesis, and development of probes for studying biological activity. Nat Prod Rep, 27, 1403-1430
- Bindl, L., Dresbach, K., Lentze, M.J. (2005): Incidence of acute respiratory distress syndrome in German children and adolescents: a population-based study. Crit Care Med, 33, 209-312
- Bouadma, L., Schortgen, F., Richard, J.D., Martet, G., Dreyfuss, D., Saumon, G. (2004): Ventilation strategy affects cytokine release after mesenteric ischemia-reperfusion in rats. Crit Care Med, 32, 1563-1569
- Brenner, B., Koppenhoefer, U., Weinstock, C., Linderkamp, O., Lang, F., Gulbins, E. (1997): Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153. J Biol Chem, 272, 22173-22181
- Brown, L. D., Cheung, A., Harwood, J.E., Battaglia, F.C. (2009): Inositol and mannose utilization rates in term and late-preterm infants exceed nutritional intakes. J Nutr, 139, 1648-1652
- Caliebe A., F. S., Fritzer E., Neumann P., Hedderich J., Krawczak M. (2008): Methodik des wissenschaftlichen Arbeitens. Vorlesungsskript des Instituts für Medizinische Informatik und Statistik der CAU Kiel.
- Chatterjee, M., Wu, S. (2001): Involvement of Fas receptor and not tumor necrosis factor- α receptor in ultraviolet-induced activation of acid sphingomyelinase. Mol Carcinog, 30, 47-55
- Cifone, M. G., De Maria, R., Roncaioli, P., Rippo, M.R., Azuma, M., Lanier, L.L., Santoni, A., Testi, R. (1994): Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. J Exp Med, 180, 1547-1552
- Cullen, P. J., Hsuan, J. J., Truong, O., Letcher, A.J., Jackson, T.R., Dawson, A.P., Irvine, R.F. (1995): Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P₄-binding protein as a member of the GAP1 family. Nature, 376, 527-530
- Cuschieri, J., Bulger, E., Billgrin, J., Garcia, I., Maier, R.V. (2007): Acid sphingomyelinase is required for lipid Raft TLR4 complex formation. Surg Infect (Larchmt), 8, 91-106
- Del Riccio, V., van Tuyl, M., Post, M. (2004): Apoptosis in lung development and neonatal lung injury. Pediatr Res, 55, 183-189

- Dobrowsky, R. T., Hannun, Y. A. (1993): Ceramide-activated protein phosphatase: partial purification and relationship to protein phosphatase 2A. Adv Lipid Res, 25, 91-104
- Dolinay, T., Kaminski, N., Felgendreher, M., Kim, H.P., Reynolds, P., Watkins, S.C., Karp, D., Uhlig, S., Choi, A.M. (2006): Gene expression profiling of target genes in ventilator-induced lung injury. Physiol Genomics, 26, 68-75
- Dreyfuss, D., Soler, P., Basset, G., Saumon, G. (1988): High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. Am Rev Respir Dis, 137, 1159-1164
- Dreyfuss, D., Soler, P., Saumon, G. (1995): Mechanical ventilation-induced pulmonary edema. Interaction with previous lung alterations. Am J Respir Crit Care Med, 151, 1568-1575
- Duale Reihe (2009): Innere Medizin. 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- Fanconi, S., Kraemer, R., Weber, J., Tschaeppler, H., Pfenninger, J. (1985): Long-term sequelae in children surviving adult respiratory distress syndrome. J Pediatr, 106, 218-222
- Flori, H. R., Glidden, D. V., Rutherford, G.W., Matthay, M.A. (2005): Pediatric acute lung injury: prospective evaluation of risk factors associated with mortality. Am J Respir Crit Care Med, 171, 995-1001
- Frerking, I., Gunther, A., Seeger, W., Pison, U. (2001): Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options. Intensive Care Med, 27, 1699-1717
- Goggel, R., Uhlig, S. (2005): The inositol trisphosphate pathway mediates platelet-activating-factor-induced pulmonary oedema. Eur Respir J, 25, 849-857
- Goggel, R., Winoto-Morbach, S., Vielhaber, G., Imai, Y., Lindner, K., Brade, L., Brade, H., Ehlers, S., Slutsky, A.S., Schutze, S., Gulbins, E., Uhlig, S. (2004): PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide. Nat Med, 10, 155-160
- Grassme, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., Gulbins, E. (2001): CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. J Biol Chem, 276, 20589-20596
- Grassme, H., Jendrossek, V., Riehle, A., von Kurthy, G., Berger, J., Schwarz, H., Weller, M., Kolesnick, R., Gulbins, E. (2003): Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. Nat Med, 9, 322-330
- Grassme, H., Schwarz, H., Gulbins, E. (2001): Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering. Biochem Biophys Res Commun, 284, 1016-1030
- Gulbins, E. (2003): Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. Pharmacol Res, 47, 393-399
- Gulbins, E., Bissonnette, R., Mahboubi, A., Martin, S., Nishioka, W., Brunner, T., Baier, G., Baier-Bitterlich, G., Byrd, C., Lang, F. (1995): FAS-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway. Immunity, 2, 341-351
- Gunther, A., Ruppert, C., Schmidt, R., Markart, P., Grimminger, F., Walmrath, D., Seeger, W. (2001): Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. Respir Res, 2, 353-364
- Guo, Z. L., Liang, Y. J., Lu, G.P., Wang, J.C., Ren, T., Zheng, Y.H., Gong, J.Y., Yu, J. (2010): Tracheal gas insufflation with partial liquid ventilation to treat LPS-induced acute lung injury in juvenile piglets. Pediatr Pulmonol, 45, 700-707

- Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., Bayoumy, S., Garzotto, M., McLoughlin, M., Gallily, R., Edwards, C.K., 3rd, Schuchmann, E.H., Fuks, Z., Kolesnick, R. (1997): Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. J Exp Med, 186, 1831-1841
- Hallman, M., Arjomaa, P., Hoppu, K. (1987): Inositol supplementation in respiratory distress syndrome: relationship between serum concentration, renal excretion, and lung effluent phospholipids. J Pediatr, 110, 604-610
- Hallman, M., Bry, K., Hoppu, K., Lappi, M., Pohjavuori, M. (1992): Inositol supplementation in premature infants with respiratory distress syndrome. N Engl J Med, 326, 1233-1239
- Hallman, M., Pohjavuori, M., Bry, K. (1990): Inositol supplementation in respiratory distress syndrome. Lung, 168 Suppl, 877-882
- Hauck, C. R., Grassme, H., Bock, J., Jendrossek, V., Ferlinz, K., Meyer, T.F., Gulbins, E. (2000): Acid sphingomyelinase is involved in CEACAM receptor-mediated phagocytosis of *Neisseria gonorrhoeae*. FEBS Lett, 478, 260-266
- Howlett, A.Ohlsson, A. (2003): Inositol for respiratory distress syndrome in preterm infants. Cochrane Database Syst Rev, CD000366
- Huwiler, A., Johansen, B., Skarstad, A., Pfeilschifter, J. (2001): Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A2 and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release. FASEB J, 15, 7-9
- Jensen, J. M., Schutze, S., Forl, M., Kronke, M., Proksch, E. (1999): Roles for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier. J Clin Invest, 104, 1761-1770
- Jia, Y., Schurmans, S., Luo, H.R. (2008): Regulation of innate immunity by inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate. Cell Cycle, 7, 2803-2808
- Kobayashi, T., Ohta, K., Tashiro, K., Nishizuka, K., Chen, W.M., Ohmura, S., Yamamoto, K. (1999): Dextran restores albumin-inhibited surface activity of pulmonary surfactant extract. J Appl Physiol, 86, 1778-1784
- Kolzer, M., Werth, N., Sandhoff, K. (2004): Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine. FEBS Lett, 559, 96-98
- Krause, M. F., Wiemann, T., Reisner A., Orłowska-Volk, M., Kohler, H., Ankermann, T. (2005): Surfactant reduces extravascular lung water and invasion of polymorphonuclear leukocytes into the lung in a piglet model of airway lavage. Pulm Pharmacol Ther, 18, 129-139
- Lachmann, B., Robertson, B., Vogel, J. (1980): In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. Acta Anaesthesiol Scand, 24, 231-236
- Lang, C. J., Postle, A. D., Orgeig, S., Possmayer, F., Bernhard, W., Panda, A.K., Jurgens, K.D., Milsom, W.K., Nag, K., Daniels, C.B. (2005): Dipalmitoylphosphatidylcholine is not the major surfactant phospholipid species in all mammals. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 289, R1426-1439
- Lennernäs H., L. T., Authi K.S., Lindahl A., Okkola S., Gustafsson T.O. (1997): The pharmacokinetics and metabolism of alpha-trinositol (D-myo-inositol 1,2,6-trisphosphate). European Journal of Pharmaceutical Sciences, 5, 267-275

- Letterio, J. J., Roberts, A. B. (1998): Regulation of immune responses by TGF-beta. Annu Rev Immunol, 16, 137-161
- Lingnau, W., McGuire, R., Booke, M., Traber, L.D., Traber, D.L. (1997): Effects of alpha-trinositol on systemic inflammation and renal function in ovine bacterial sepsis. Shock, 8, 179-185
- Lotze, A., Mitchell, B. R., Bulas, D.I., Zola, E.M., Shalwitz, R.A., Gunkel, J.H. (1998): Multicenter study of surfactant (beractant) use in the treatment of term infants with severe respiratory failure. Survanta in Term Infants Study Group. J Pediatr, 132, 40-47
- Lu, K. W., Goerke, J., Clements, J.A., Taeusch, H.W. (2005): Hyaluronan decreases surfactant inactivation in vitro. Pediatr Res, 57, 237-241
- Lu, K. W., Robertson, B., Taeusch, H.W. (2005): Dextran or polyethylene glycol added to curosurf for treatment of meconium lung injury in rats. Biol Neonate, 88, 46-53
- Lum, H., Barr, D. A., Shaffer, J.R., Gordon, R.J., Ezrin, A.M., Malik, A.B. (1992): Reoxygenation of endothelial cells increases permeability by oxidant-dependent mechanisms. Circ Res, 70, 991-998
- Lund, T., Reed, R. K. (1994): Alpha-Trinositol inhibits edema generation and albumin extravasation in thermally injured skin. J Trauma, 36, 761-765
- Mallampalli, R. K., Mathur, S. N., Warnock, L.J., Salome, R.G., Hunninghake, G.W., Field, F.J. (1996): Betamethasone modulation of sphingomyelin hydrolysis up-regulates CTP:cholinephosphate cytidyltransferase activity in adult rat lung. Biochem J, 318, 333-341
- Malmberg, A. B., Fallgren, B., Hedner, T. (1995): Antinociceptive effect of alpha-trinositol, a novel D-myo-inositol phosphate derivative, in the formalin test in rats. Eur J Pharmacol, 294, 609-615
- Mathias, S., Pena, L. A., Kolesnick, R.N. (1998): Signal transduction of stress via ceramide. Biochem J, 335, 465-480
- Mathias, S., Younes, A., Kan, C.C., Orlov, I., Joseph, C., Kolesnick, R.N. (1993): Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 beta. Science, 259, 519-522
- Matute-Bello, G., Frevert, C. W., Martin, T.R. (2008): Animal models of acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 295, L379-399
- Muller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D., Pfizenmaier, K. (1995): PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. EMBO J, 14, 1961-1969
- Nakazawa, H., Gustafsson, T. O., Traber, L.D., Herndon, D.N., Traber, D.L. (1994): alpha-Trinositol decreases lung edema formation after smoke inhalation in an ovine model. J Appl Physiol, 76, 278-282
- Notter, R. H., Egan, E. A., Kwong, M.S., Holm, B.A., Shapiro, D.L. (1985): Lung surfactant replacement in premature lambs with extracted lipids from bovine lung lavage: effects of dose, dispersion technique, and gestational age. Pediatr Res, 19, 569-577
- Obeid, L. M., Linardic, C. M., Karolak, L.A., Hannun, Y.A. (1993): Programmed cell death induced by ceramide. Science, 259, 1769-1771

- Pena, L. A., Fuks, Z., Kolesnick, R.N. (2000): Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. Cancer Res, 60, 321-327
- Postle, A. D., Heeley, E. L., Wilton, D.C. (2001): A comparison of the molecular species compositions of mammalian lung surfactant phospholipids. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 129, 65-73
- Puligandla, P. S., Gill, T., McCaig, L.A., Yao, L.J., Veldhuizen, R.A., Possmayer, F., Lewis, J.F. (2000): Alveolar environment influences the metabolic and biophysical properties of exogenous surfactants. J Appl Physiol, 88, 1061-1071
- Rauvala, H., Hallman, M. (1984): Glycolipid accumulation in bronchoalveolar space in adult respiratory distress syndrome. J Lipid Res, 25, 1257-1262
- Ryan, A. J., McCoy, D. M., McGowan, S.E., Salome, R.G., Mallampalli, R.K. (2003): Alveolar sphingolipids generated in response to TNF-alpha modifies surfactant biophysical activity. J Appl Physiol, 94, 253-258
- Sandstrom, T., Bjermer, L., Rylander, R. (1992): Lipopolysaccharide (LPS) inhalation in healthy subjects increases neutrophils, lymphocytes and fibronectin levels in bronchoalveolar lavage fluid. Eur Respir J, 5, 992-996
- Siegenthaler W., H. E. B. (2006): Klinische Pathophysiologie. Thieme Verlag, Stuttgart
- Spieth, P. M., Carvalho, A. R., Pelosi, P., Hoehn, C., Meissner, C., Kasper, M., Hubler, M., von Neindorff, M., Dassow, C., Barrenschee, M., Uhlig, S., Koch, T., de Abreu, M. (2009): Variable tidal volumes improve lung protective ventilation strategies in experimental lung injury. Am J Respir Crit Care Med, 179, 684-693
- Spyridakis, S., Leonarditis, G., Nakos, G., Lekka, M.E., Galanopoulou, D. (2010): A specific phospholipase C activity regulates phosphatidylinositol levels in lung surfactant of patients with acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Cell Mol Biol, 42, 357-362
- Taeusch, H.W., Lu, K. W., Goerke, J., Clements, A.J. (1999): Nonionic polymers reverse inactivation of surfactant by meconium and other substances. Am J Respir Crit Care Med, 159, 1391-1395
- Teichgraber, V., Ulrich, M., Endlich, N., Riethmuller, J., Wilker, B., De Oliveira-Munding, C.C., van Heeckeren, A.M., Barr, M.L., von Kurthy, G., Schmid, K.W., Weller, M., Tummler, B., Lang, F., Grassme, H., Doring, G., Gulbins, E. (2008): Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. Nat Med, 14, 382-391
- Tellmann, G. (2006): The E-method: a highly accurate technique for gene-expression analysis. Nat Meth,
- Thon, L., Mathieu, S., Kabelitz, D., Adam D. (2006): The murine TRAIL receptor signals caspase-independent cell death through ceramide. Exp Cell Res, 312, 3808-3821
- Vivekananda, J., Smith, D., King, R.J. (2001): Sphingomyelin metabolites inhibit sphingomyelin synthase and CTP:phosphocholine cytidyltransferase. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 281, L98-L107
- von Bismarck, P., Klemm, K., Garcia Wistadt, C.F., Winoto-Morbach, S., Schutze, S., Krause, M.F. (2009): Selective NF-kappaB inhibition, but not dexamethasone, decreases acute lung injury in a newborn piglet airway inflammation model. Pulm Pharmacol Ther, 22, 297-304

von Bismarck, P., Klemm, K., Wistadt, C.F., Winoto-Morbach, S., Uhlig, U., Schutze, S., Uhlig, S., Lachmann, B., Krause, M.F. (2007): Surfactant "fortification" by topical inhibition of nuclear factor-kappaB activity in a newborn piglet lavage model. Crit Care Med, 35, 2309-2318

von Bismarck, P., Wistadt, C. F., Klemm, K., Winoto-Morbach, S., Uhlig, U., Schutze, S., Adam, D., Lachmann, B., Uhlig, S., Krause, M.F. (2008): Improved pulmonary function by acid sphingomyelinase inhibition in a newborn piglet lavage model. Am J Respir Crit Care Med, 177, 1233-1241

Ware, L. B., Matthay, M. A. (2000): The acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med, 342, 1334-1349

Wiegmann, K., Schutze, S., Machleidt, T., Witte, D., Kronke, M. (1994): Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. Cell, 78, 1005-1015

Yu, Z. F., Nikolova-Karakashian, M., Zhou, D., Cheng, G., Schuchman, E.H., Mattson, M.P. (2000): Pivotal role for acidic sphingomyelinase in cerebral ischemia-induced ceramide and cytokine production, and neuronal apoptosis. J Mol Neurosci, 15, 85-97

Zumbansen, M. (2001): Biochemische und molekularbiologische Studien zur Charakterisierung der murinen neutralen Sphingomyelinase in vitro und in vivo. Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität zu Köln.

Zuo, Y. Y., Alolabi, H., Shafiei, A., Kang, N., Policova Z., Cox, P.N., Acosta, E., Hair, M.L., Neumann, A.W. (2006): Chitosan enhances the in vitro surface activity of dilute lung surfactant preparations and resists albumin-induced inactivation. Pediatr Res, 60, 125-130

Zuo, Y. Y., Veldhuizen, R. A., Neumann, A.W., Petersen, N.O., Possmayer, F. (2008): Current perspectives in pulmonary surfactant--inhibition, enhancement and evaluation. Biochim Biophys Acta, 1778, 1947-1977

8. Danksagung:

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen ein herzliches Dankeschön. Mein Dank für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geht vor allem an meinen Doktorvater Prof. Dr.med Martin Krause, denn er zeigte beim Korrigieren dieser Arbeit sehr viel Geduld und sorgte mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen der Dissertation. Ihm gilt außerdem der Dank für die Planung und Durchführung eines solch umfangreichen Forschungsprojektes.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Fachärztin Dr.med Stefanie Preuß bedanken, denn ohne ihren unermüdlichen Einsatz während der „Ferkelwochen“ wäre dieses Projekt und somit die Erstellung meiner Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Meinen beiden Mitdotorandinnen Julia Scheiermann und Friede Oman möchte ich ebenfalls danken, denn die gute Zusammenarbeit während des gesamten Forschungsprojektes führte letztendlich zu dessen Gelingen.

Ein großer Dank geht ebenfalls an meine Eltern, ohne die ein Studium und eine Dissertation niemals möglich geworden wäre. Zusätzlich stand mein Vater mir mit viel Geduld bei der Interpretation der Ergebnisabbildungen zur Seite und war eine große Hilfe bei der Durchführung der endgültigen Formatierung.

Insgesamt gilt mein Dank von ganzem Herzen meiner Familie, bestehend aus meinem Vater Kurt, meiner Mutter Gaby, meinem Bruder Jan sowie meinem Freund Jonas, für die unermüdliche Unterstützung während meines gesamten Studiums– vielen Dank!

9. Lebenslauf:

Sabrina Stadelmann

Maßmannstraße 8

24118 Kiel

geboren am 14.12.1986 in Hamburg

Schulischer Werdegang:

August 1997 – Juli 2006	Dietrich-Bonhoeffer Gymnasium Quickborn
Juli 2003 – Juni 2004	De Soto High School De Soto, Kansas

Studium:

Oktober 2006	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Fachbereich Medizin
Dezember 2012	voraussichtlicher Abschluss Staatsexamen

Famulaturen:

4 Wochen	Kinderkardiologie, UKSH Campus Kiel
3 Wochen	Innere Medizin, Imland-Klinik Rendsburg
4 Wochen	Kinderchirurgie, Praxisklinik Kronshagen
3 Wochen	Neurologie, Universitätsklinik Wien
4 Wochen	Emergency Department, Northeast Health Wangaratta, Australia

10. Erklärung:

„Ich, Sabrina Stadelmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Sabrina Stadelmann

11. Anhang:

11.1 Zustimmung der Tierschutzbehörde beim Ministerium für Landwirtschaft:

Ministerium für Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume
des Landes Schleswig-Holstein

Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 7151 | 24171 Kiel

Herrn
Prof. Dr. Martin Krause
Klinik für Allgemeine Pädiatrie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Kiel
Schwanenweg 20
24105 Kiel

Ihr Antrag vom: 24.03.2009
Mein Zeichen: V 312-72241.121-24 (40-3/09)

Herr Buttchereit
Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:
Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
Tierschutzbeauftragter der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Olshausenstraße 40
24098 Kiel

5. Juni 2009

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Prof. Krause,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 18. Dezember 2007 (BGBl. I S. 3001), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens:

Surfactant"härtung" durch Inhibition der pulmonalen Ceramidproduktion
bei Lungenversagen im neonatalen Ferkelmodell

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 8 Ferkel verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Mai 2011 befristet.
Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.
3. Leiter des Versuchsvorhabens:
Herr Prof. Dr. Martin Krause

4. Sein Stellvertreter:
Herr Dr. Philipp von Bismarck
5. Wechselt der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
6. Verantwortlicher Tierarzt nach § 9 Abs. 2 Nr. 8 Tierschutzgesetz:
Herr Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
7. Weitere Nebenbestimmungen:
Die Genehmigung beschränkt sich zunächst auf die Etablierung des Modells. Danach ist ein Zwischenbericht vorzulegen. Darin ist insbesondere auch das weitere Vorgehen in den einzelnen Versuchsgruppen ausführlich zu erläutern (klare Darstellung des Ablaufs und der damit jeweils einhergehenden Belastungen für die Tiere, Zuordnung der jeweiligen Versuchsgruppe zur Fragestellung). Außerdem ist zu erklären, wie eine lückenlose Beobachtung und Betreuung der Tiere während der langen Narkosedauer von 72 Stunden sichergestellt wird.

Die Bestimmungen der §§ 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVOBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 9 Abs. 1 Tierschutzgesetz genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Irmer

Ministerium für Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume
des Landes Schleswig-Holstein

Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 7151 | 24171 Kiel

Herrn
Prof. Dr. Martin Krause
Klinik für Allgemeine Pädiatrie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Kiel
Schwanenweg 20
24105 Kiel

Ihr Antrag vom: 09.09.2009

Mein Zeichen: V 312-72241.121-24 (40-3/09)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:

Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
Tierschutzbeauftragter der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Olshausenstraße 40
24098 Kiel

10. November 2009

Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken

Sehr geehrter Herr Prof. Krause,

aufgrund Ihres o. a. Antrages können im Rahmen meiner Genehmigung vom 5. Juni 2009 für das Versuchsvorhaben „Surfactant“härtung“ durch Inhibition der pulmonalen Ceramidproduktion bei Lungenversagen im neonatalen Ferkelmodell“ weitere 72 Ferkel verwendet werden.

Gegen die angezeigten Modifikationen im Versuchsprotokoll erhebe ich keine Einwände. Über die Mitwirkung von weiteren, nicht im ursprünglichen Antrag benannten Beteiligten (Doktoranden) bitte ich mich künftig rechtzeitig vorher zu unterrichten.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Imer

Dr. Imer

*d. h. Gesamtzahl
80*