

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie  
(Direktor: Prof. Dr. Andreas Seekamp)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**QUANTITATIVE ERFASSUNG DER ALVEOLAREPITHELIALEN  
APOPTOSE MITTELS TUNEL-TECHNIK IN LUNGENGeweBE UND  
BRONCHOALVEOLÄREN LAVAGES VON NEUGEBORENEN  
FERKELN MIT LUNGENVERSAGEN**

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

vorgelegt von  
**MARIE DIEKÖTTER**  
aus Preetz

Kiel 2021

1. Berichterstatterin: Frau Prof. Dr. rer. nat. Sabine Fuchs, Klinik für Orthopädie und  
Unfallchirurgie

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Andreas Koch, Institut für Experimentelle Medizin

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 01.11.2022

gez.: Frau Prof. Dr. rer. nat. Sabine Fuchs (Vorsitzende der Prüfungskommission)

# **Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung.....	Seite 1
2. Methoden.....	Seite 4
2.1. Vorbereitung der Ferkel und Randomisierung.....	Seite 4
2.2. Protokoll zur Lungenschädigung.....	Seite 7
2.3. Applikation der Testsubstanzen.....	Seite 10
2.4. Messung und Bestimmung der klinischen Parameter .....	Seite 11
2.4.1. Spezifische Compliance und Resistance des respiratorischen Systems.....	Seite 11
2.4.2. Oxygenierungsindex.....	Seite 12
2.4.3. Ventilationseffizienzindex.....	Seite 12
2.4.4. Extravaskulärer Lungenwasserindex.....	Seite 13
2.5. Entnahme der Lungengewebeproben.....	Seite 14
2.6. Bestimmung der sauren Sphingomyelinase-Aktivität und der Ceramid-Konzentration im Lungengewebe.....	Seite 15
2.7. Aufbereitung der bronchoalveolären Lavages.....	Seite 16
2.8. TUNEL-Färbung.....	Seite 17
2.8.1. Lungengewebeschnitte.....	Seite 20
2.8.2. Bronchoalveoläre Lavages.....	Seite 27
2.9. Auswertung der gefärbten Zellen.....	Seite 30
2.9.1. Alveolarzellen.....	Seite 30
2.9.2. Zellen der bronchoalveolären Lavages.....	Seite 33
2.10. Statistische Methoden.....	Seite 35
3. Ergebnisse.....	Seite 37
3.1. Oxygenierungsindex.....	Seite 39
3.2. Ventilationseffizienzindex.....	Seite 40
3.3. Spezifische Compliance des respiratorischen Systems.....	Seite 42
3.4. Resistance des respiratorischen Systems.....	Seite 44
3.5. Extravaskulärer Lungenwasserindex.....	Seite 46
3.6. Lungengewicht.....	Seite 48
3.7. Zellzahl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	Seite 49
3.8. Aktivität der sauren Sphingomyelinase.....	Seite 51
3.9. Ceramid-Konzentration.....	Seite 52

3.10. Apoptotische Makrophagen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	Seite 53
3.11. Apoptotische Granulozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	Seite 54
3.12. Apoptotische Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	Seite 55
3.13. Apoptotische Alveolarepithelzellen.....	Seite 56
3.14. Apoptotische Zellen in dichtem Lungengewebe.....	Seite 58
4. Diskussion.....	Seite 60
4.1. Beschreibung des lungenschädigenden Protokolls.....	Seite 60
4.2. Wirkstoffe.....	Seite 60
4.3. Ceramid-Signalweg.....	Seite 64
4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	Seite 65
5. Zusammenfassung.....	Seite 71
6. Literaturverzeichnis.....	Seite 73
7. Abbildungsverzeichnis.....	Seite 77
8. Tabellenverzeichnis.....	Seite 79
9. Abkürzungen .....	Seite 80
10. Erklärung .....	Seite 82
11. Anhänge .....	Seite 83
12. Danksagung.....	Seite 87



# **1. Einleitung**

Das Krankheitsbild des Atemnotsyndroms oder Acute Respiratory Distress Syndroms (ARDS) ist eine der häufigsten Todesursachen in der Neonatalperiode. Ungefähr ein Prozent der Neugeborenen erkranken an einem Atemnotsyndrom. Von den etwa 6 Prozent Neugeborenen, die vor der abgeschlossenen 37. Schwangerschaftswoche als Frühgeborene zur Welt kommen, erkranken bis zu 60 Prozent unter der 30. Schwangerschaftswoche an einem Atemnotsyndrom (Muntau, 2009). Die Prävalenz von ARDS bei Kindern in den USA, Europa und Australien liegt bei 2-12,8 pro 100.000 Personen/Jahr, die Mortalität bei 18-27 Prozent (Smith et al., 2013). Im Jahr 2017 wurde die Montreux Definition des neonatalen ARDS (De Luca et al., 2017) ins Leben gerufen. Die Definition ähnelt zwar dem ARDS älterer Patienten, aber die Besonderheiten neugeborener Kinder wurden nun erstmals berücksichtigt. Diese Besonderheiten sind oftmals sowohl eine extensive Entzündung des Lungengewebes, bedingt durch eine bestehende Unreife des Immunsystems der Neugeborenen, als auch der Katabolismus des Surfactants, welcher zu einer Lungendysfunktion führt. Darüber hinaus sind ein quantitatives Surfactantdefizit und die noch nicht ausreichende Alveolarisation weitere Merkmale des neonatalen Atemnotsyndroms. Klinisch fallen die erkrankten Patienten mit einer Ateminsuffizienz auf. Unmittelbar bei oder kurz nach ihrer Geburt zeigen sich Dys- und Tachypnoe mit Nasenflügeln, expiratorischem Stöhnen und sternalen sowie intercostalen Einziehungen. Des Weiteren zeigen sich Mikrozirkulationsstörungen anhand eines blass-grauen Hautkolorits sowie Temperaturinstabilität und Zyanose. Ursächlich sind sowohl ein Surfactant-Mangel bei Unreife des Lungenparenchyms als auch entzündliche Prozesse durch Aspiration von mekoniumhaltigem Fruchtwasser, Pneumonie, Sepsis oder eine Lungenschädigung durch maschinelle Beatmung. Pathophysiologisch kommt es zu Atelektasen und folglich zur Abnahme der Lungencompliance. Diagnostisch sind eine Hypoxämie und ein Anstieg des Kohlenstoffdioxids in der Blutgasanalyse zu erkennen. Diese wiederum führen zu einer systemischen Hypotension und Vasokonstriktion der Lungengefäße mit nachfolgender pulmonaler Minderperfusion. Die daraus resultierende Bildung sowohl intrapulmonaler Shunts als auch Rechts-Links-Shunts auf Vorhofebene (Foramen ovale), die Azidose und Hypoxie und der veränderte Lungenstoffwechsel führen wiederum zu einer Hemmung der Neusynthese von Surfactant. Weiterhin kann es zu einer Blockierung der Surfactant-Wirkung durch die Bildung sogenannter hyaliner Membranen kommen.

Nach der Schädigung von Alveolarepithel und Kapillarendothel akkumulieren dabei intraalveolär Plasmaproteine und Entzündungszellen, sodass sich als Folge ein Lungenödem bildet. Komplikationen beim Atemnotsyndrom können oftmals nur abgeschwächt, nicht aber vermieden werden. Neben den akuten Komplikationen, wie Emphysem, Pneumothorax, Pneumomediastinum, Pneumoperitoneum, persistierender Ductus arteriosus oder persistierende fetale Zirkulation, gibt es zudem chronische Folgen, wie Lungenfibrose und bronchopulmonale Dysplasie. Die Behandlung der am ARDS erkrankten Patienten erfolgt überwiegend symptomatisch: Maschinelle Beatmung und Sauerstoff-Zufuhr über einen Nasen-CPAP (continuous positive airway pressure) oder einen trachealen Tubus, Kreislaufstabilisierung durch Infusionstherapie, gegebenenfalls Transfusionen, kontinuierliches Monitoring mit partialer Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxiddruckmessung sowie Pulsoxymetrie, Blutdruckkontrollen und Blutgasanalysen und auch die gezielte intravenöse Antibiotikatherapie bei Keimnachweis. Kausal wird Surfactant intrabronchial substituiert, um den Gasaustausch in der Lunge und somit die Oxygenierung zu verbessern (Muntau, 2009 und De Luca et al., 2017).

Wegen der sehr begrenzten als auch sehr teuren kausalen Therapiemöglichkeiten bei einem Krankheitsbild, wie dem des Atemnotsyndroms, ergibt sich also schnell die Frage, wie man die Therapie optimieren, gegebenenfalls auch individualisieren und Langzeitschäden und –folgen besser eingrenzen kann.

Neue Therapieansätze auf zellulärer und molekularer Ebene werden im Rahmen des übergeordneten Projektes „Verhinderung der Lungenfibrose durch epithelial-mesenchymale Transition und Inflammasom NLRP3-Interaktionen mittels Hemmung der sauren Sphingomyelinase und Phosphatidylglycerolsubstitution bei neonatalem ARDS“ untersucht.

In einer randomisierten und kontrollierten Studie wurden neugeborene Ferkel einem standardisierten lungenschädigenden Protokoll unterzogen, um einen ARDS-ähnlichen Zustand zu erreichen.

Da die übliche Behandlung der alleinigen Surfactantsubstitution nur eine zeitlich begrenzte Besserung der Oxygenierung bewirkt, aufgrund von Abbauprozessen und Inaktivierung des Surfactants, versucht man Ansätze zu finden, die Surfactantwirkung zu stabilisieren und zu optimieren.

Indem verschiedene Substanzgruppen, wie Inositle und Phosphatidylglycerine, mit Surfactant kombiniert appliziert werden, soll der Stoffwechsel von

Entzündungsmediatoren modifiziert und in die Signalwege der Entzündungsreaktionen eingegriffen werden, sodass das klinische Outcome bei Patienten mit Atemnotsyndrom verbessert und Langzeitschäden der Lunge verhindert oder zumindest reduziert werden.

Verglichen werden sechs unterschiedliche Interventionsgruppen. Die Ferkel wurden mit Surfactant 50mg/kg, Surfactant 200mg/kg, Surfactant plus Inositol-1,2,6-Triphosphat (IP3), Surfactant plus Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphat (PIP2), Surfactant plus 16:0/18:1Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylglycerol (POPG) oder Surfactant plus 18:1/18:1-Dioleoyl-Phosphatidylglycerol (DOPG) behandelt. Sowohl anhand klinischer Parameter, wie Oxygenierungsindex, Ventilationseffizienzindex, Compliance und Resistance des respiratorischen Systems, Extravaskulärer Lungenwasserindex, als auch anhand zellulärer und molekularer Marker wurden die Daten von gesunden Ferkeln und Ferkeln, die dem lungenschädigenden Protokoll zugeführt wurden, aber keiner Behandlung unterzogen wurden, und Ferkeln der Interventionsgruppen untersucht.

In dieser Arbeit wird zudem die Auswirkung der Behandlung der lungengeschädigten Ferkel in den verschiedenen Interventionsgruppen auf zellulärer Ebene näher untersucht. Die während des lungenschädigenden Protokolls gewonnenen Zellen der bronchoalveolären Lavages und die ex vivo entnommenen Lungengewebe der Ferkel wurden mittels TUNEL-Technik gefärbt und die so hervorgehobenen apoptotischen Zellen anschließend quantitativ ausgewertet.

Es wird die Hypothese formuliert, dass die quantitativ erfassten alveolarepithelialen Apoptosen im Lungengewebe und in den bronchoalveolären Lavages der lungengeschädigten neugeborenen Ferkel Unterschiede in den Interventionsgruppen (Surfactant 50mg/kg und 200mg/kg, Surfactant in Kombination mit IP3, PIP2, POPG oder DOPG) in Bezug auf die Gruppe der gesunden und der kranken, nicht behandelten Ferkel zeigen und sich zudem ein Zusammenhang zwischen den klinischen Parametern und der histologischen Auswertung mittels TUNEL-Technik herstellen lässt.

## **2. Methoden**

### **2.1. Vorbereitung der Ferkel und Randomisierung**

**Studiendesign.** Diese randomisierte und kontrollierte Studie wurde wie folgt durchgeführt.

Die in der Studie verwendeten Ferkel der deutschen Landrasse kamen jeweils im Alter von 2-6 Tagen aus der Schweinezucht des Instituts für Tierzucht und Tierhaltung in Achterwehr und wogen circa 2,5 kg. Sie wurden in Gruppen von drei Ferkeln über 76 Stunden im Labor überwacht, bevor die nächsten drei Ferkel abgeholt und vorbereitet sowie dem Protokoll zugeführt wurden. Die Zuordnung der Ferkel zu den sechs Interventionsgruppen (S50, S200, S+IP3, S+PIP2, S+DOPG, S+POPG – Details siehe 2.3.) sowie zur Kontrollgruppe C (Lungenschädigung ohne Behandlung) erfolgte durch zufällige Auswahl per Los. Die Gruppe der gesunden Ferkel HC waren eine gesonderte Gruppe von Ferkeln, die weder Lungenschädigung noch Behandlung erfuhren und nicht Teil der Randomisierung waren. Ihre erhobenen Parameter, untersuchten Lungengewebe und Broncho-alveolären Flüssigkeiten dienten als physiologische Referenzwerte in dieser Studie. Pro Gruppe wurden n = 8 Tiere untersucht, mit Ausnahme der S200-Gruppe, bei der die Anzahl auf drei Ferkel begrenzt wurde. Der Grund für diese Entscheidung war, dass das sehr teure Medikament nur eine mäßige klinische Wirkung bei hoher Dosis (200mg/kg) zeigte. So wurden 67 Ferkel dem lungenschädigenden Protokoll zugeführt, von denen 16 im Laufe des Protokolls oder nach Beendigung der Studie aus verschiedenen Gründen ausgeschlossen wurden (siehe dazu auch Tabelle 1: Ausschluss der Ferkel aus der Studie). Die ausgeschlossenen Tiere wurden durch weitere Ferkel während der laufenden Versuche ersetzt, die ebenfalls randomisiert den entsprechenden Gruppen zugeordnet wurden. Die Interventionen gemäß Protokoll, wie die intratracheale Gabe der verschiedenen Substanzen, erfolgte durch die Mitarbeitenden des Labors in einem verblindeten Verfahren.

Ausschluss der Ferkel aus der Studie (n=16)			
Zeitpunkt des Ausschlusses	Gruppenzugehörigkeit	Begründung	Ferkelnummer
<i>Während des Protokolls durch vorzeitigen Tod</i>			
49h	C	Akutes Nierenversagen, Hyperkaliämie	20
9h	C	Arterielle Katheterblutung, metabolische Azidose	25
50h	S50	Arterielle Katheterblutung	27
5h	S50	Schwere Anämie, metabolische Azidose	57
39h	S+IP3	Plötzlicher Herztod	21
50h	S+PIP2	Akutes Nierenversagen, Hyperkaliämie	32
14h	S+POPG	Lungenversagen durch zu niedrigen PEEP	51
15h	S+DOPG	Kreislaufschock, metabolische Azidose	19
54h	S+DOPG	Kreislaufschock	73
<i>Nach Beendigung des Studienprotokolls aufgrund des schlechten Gesundheitszustandes</i>			
72h	C	Kreislaufschock über 8h	79
72h	C	Blutige finale Lavage, reichlich Bakterien in der BALF	83
72h	S50	Kreislaufschock über 6h	80
72h	S+IP3	Blutige finale Lavage, reichlich Bakterien in der BALF	28
72h	S+POPG	Kreislaufschock, reichlich Bakterien in der BALF	53
<i>Nach Beendigung des Studienprotokolls aufgrund der Verletzung des Studienprotokolls</i>			
72h	S+IP3	Verwechslung der schädigenden Ventilation und der Gabe von LPS	72
72h	S+DOPG	Verwechslung der schädigenden Ventilation und der Gabe von LPS	71
BALF – Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit LPS – Lipopolysaccharid PEEP – Positive Endexpiratory Pressure			

**Tabelle 1:** Ausschluss der Ferkel aus der Studie

**Studiendurchführung.** Bei Ankunft der Ferkel im Labor erhielten diese zur Sedierung 0,025 mg/kg Atropin, 15 mg/kg Ketamin und 1,5 mg/kg Midazolam intramuskulär in den Hinterlauf injiziert. Etwa 5 Minuten später wurde über einen venösen Zugang in der Ohrvene 5mg Propofol appliziert, um anschließend einen ungeblockten endotrachealen Tubus mit 3,5 mm Durchmesser anzulegen ohne die spontane Atmung zu unterbrechen. Nach der Intubation erhielten die Tiere einmalig 10 µg/kg

Fentanyl und kontinuierlich über eine Infusion 5 mg/kg/h Ketamin, 0,5 mg/kg/h Midazolam und 0,8 mg/kg/h Vecuronium bromid. Um die Messungen der Lungenfunktionsparameter sicherzustellen und ein Entweichen der Luft durch ein Leck zu verhindern, wurde eine mediane Inzision am Hals durchgeführt, um die Trachea zu präparieren und eng um den endotrachealen Tubus zu ligieren. Die Vena jugularis interna wurde katheterisiert, ebenso die Femoralarterie für die Überwachung des Blutdrucks und für die Entnahme von Blutproben zur Blutgasanalyse. Des Weiteren wurde circa 6 Stunden später ein suprapubischer Blasenkatheter für die Überwachung der Urinausscheidung angelegt. Diese chirurgischen Eingriffe wurden alle unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

Während des Studienablaufs erhielten die Ferkel über eine nasogastrale Sonde 6x25 ml/kg/Tag Panto Babygold (Hamburger Leistungsfutter, Hamburg, Deutschland), eine spezielle Milchnahrung für neugeborene Ferkel, sodass sie insgesamt 170 ml/kg/Tag Flüssigkeit und 129 kcal/kg/Tag an Kalorien erhielten. Außerdem wurde ihre Körpertemperatur über eine rektale Temperatursonde überwacht und mittels einer Wärmematte konstant im physiologischen Bereich zwischen 38 °C und 39 °C gehalten. Über den endotrachealen Tubus wurden die Tiere mit dem Babylog 1 von Dräger (Lübeck, Deutschland) maschinell beatmet. Zu Beginn wurde ein positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 6 mbar, ein Fluss von 8 Litern pro Minute, eine Inspirationszeit von 0,5 Sekunden, eine Frequenz von 25 Atemzügen pro Minute und eine Sauerstoffkonzentration in der Einatemluft (fraction of inspired oxygen =  $F_{iO_2}$ ) von 0,5 eingestellt. Das konstant aufrechterhaltene Tidalvolumen ( $V_T$ ) von 7 ml/kg wurde während der gesamten Studie durch Anpassen des maximal inspiratorischen Drucks (PIP = peak inspiratory pressure) erreicht.

Die Sauerstoffsättigung wurde während der Versuche kontinuierlich mit Hilfe der Pulsoximetrie überwacht. Alle 1-2 Stunden wurde eine Blutgasanalyse durchgeführt, um die mechanische Beatmung anzupassen: Der Zielbereich des arteriellen Kohlenstoffdioxidpartialdruck ( $paCO_2$ ) wurde auf 35-50 mmHg festgelegt, der Zielbereich des arteriellen Sauerstoffpartialdruck ( $paO_2$ ) auf 50-150 mmHg. Um den arteriellen Kohlenstoffdioxidpartialdruck ( $paCO_2$ ) im Zielbereich zu halten, wurde die Beatmungsfrequenz um -5/-10 Atemzüge pro Minute reduziert, wenn der partielle Kohlenstoffdioxiddruck im arteriellen Blut  $<35/<30$  mmHg lag, und wenn der partielle Kohlenstoffdioxiddruck  $>50/>60$  mmHg lag, wurde die Frequenz um +5/+10 Atemzüge pro Minute erhöht.

Um den arteriellen Sauerstoffpartialdruck ( $\text{paO}_2$ ) im Zielbereich zu halten, wurde die Sauerstoffsättigung in der Einatemluft ( $\text{F}_i\text{O}_2$ ) um +0,2 erhöht, wenn der arterielle Sauerstoffpartialdruck  $<50$  mmHg fiel und um -0,1 reduziert, wenn der arterielle Sauerstoffpartialdruck  $>150$  mmHg stieg.

Folgende weitere Parameter und Indizes wurden zur Bestimmung und zur Verlaufskontrolle der Lungenfunktion und der Kreislauffunktionen herangezogen: Tidalvolumen ( $V_T$ ), Compliance und Resistance der Lunge, Herzfrequenz, Blutdruck, Herzindex ( $\text{HI} = \text{Herzminutenvolumen}/\text{Körperoberfläche l/min/m}^2$ ), systemisch vaskulärer Widerstand Index ( $\text{SVRI} = \text{systemic vascular resistance index dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-5}\cdot\text{m}^2$ ) und extravaskulärer Lungenwasser Index ( $\text{EVLWI} = \text{extravascular lung water index ml/kg}$ ), sowie der Oxygenierungsindex ( $\text{OI} = \text{oxygenation index: MAP} \times \% \text{O}_2/\text{paO}_2$ ) ( $\text{MAP} = \text{mean airway pressure} - \text{mittlerer Atemwegsdruck}$ ) und der Ventilationseffizienzindex ( $\text{VEI} = \text{ventilation efficiency index } 3,800/(\text{peak pressure} - \text{PEEP}) \times f \times \text{paCO}_2$ ).

Um Infektionen insbesondere Atemwegsinfektionen mit *Escherichia coli* und gram-negativen *Enterobacteriaceae* vorzubeugen, erhielten die neugeborenen Ferkel eine antibiotische Prophylaxe mit 100 mg/kg Ampicillin/Sulbactam zweimal pro Tag. Mit diesen Keimen sind die Ferkel physiologisch durch ihre Aufzucht im Stall besiedelt.

## 2.2. Protokoll zur Lungenschädigung

Nach Einleitung von Sedierung, Analgesie, Intubation und Legen der arteriellen und venösen Zugänge wird die Überwachung der oben genannten Parameter gestartet und dokumentiert. Danach wird die Lungenschädigung durch drei sukzessiv eingesetzte, klinisch relevante Schädigungsmodi wie folgt ausgelöst. Dieses Triple-hit lung injury – Protokoll wurde bereits in früheren Publikationen beschrieben (Preuss et al., Aug 2012 und Preuss et al., Nov 2012)

### 1. Bronchoalveoläre Lavages:

Mit dieser ersten Lungenschädigung wurde der Zeitpunkt 0 des Studienprotokolls festgelegt. Um eine Atemnotsyndrom-ähnliche Lungenschädigung zu erhalten, wurden bei den neugeborenen Ferkeln wiederholte bronchoalveoläre Lavages mit 30ml/kg warmer Natrium/Chlorid-Lösung durchgeführt. Dabei wurde eine 100ml Spritze direkt an den endotrachealen Tubus gesetzt und darauf geachtet, dass der

Druck in den Atemwegen 20cmH<sub>2</sub>O nicht überschritt. Um eine schwere Desoxygenierung und Bradykardien zu verhindern, wurde höchstens 20 Sekunden lang die Lavageflüssigkeit injiziert und aspiriert. Die aspirierte Flüssigkeitsmenge wurde dokumentiert, um die in den Atemwegen verbliebene Menge und somit ein iatrogen gesetztes Lungenödem abzuschätzen. Im Durchschnitt wurden 16 Lavages im Abstand von 5 Minuten durchgeführt, um eine stark eingeschränkte Oxygenierung mit  $\text{paO}_2/\text{F}_\text{I}\text{O}_2$  von 100-120mmHg zu erreichen. Nach einer 20-minütigen Ruhepause der Ferkel, wurden die Werte der unter Abschnitt 2.1. genannten Parameter bestimmt.

## 2. Beatmung:

Die schädigende Beatmung wurde 24 Stunden nach Protokollstart mit doppeltem Tidalvolumen  $V_\text{T}=15\text{ml/kg}$  über zwei Stunden durchgeführt. Das Ziel war die Schädigung des Alveolarepithels durch eine Überdehnung des Lungengewebes. Zusätzlich wurde der positive endexpiratorische Druck (PEEP) auf 0 mbar gesetzt, um einen Kollaps der Alveolen am Ende der Expiration herbeizuführen und in Folge dessen durch wiederholtes Zusammenfallen und Öffnen der Alveolen ein Trauma zu setzen. Der Spitzeneinatmungsdruck (PIP) wurde zeitgleich auf 35 mbar begrenzt. Die Atemfrequenz wurde halbiert, um eine Hypokapnie zu verhindern. Um eine Hypoxie durch den eingestellten PEEP von 0 mbar entgegenzusteuern, wurde die  $\text{F}_\text{I}\text{O}_2$  entsprechend erhöht.

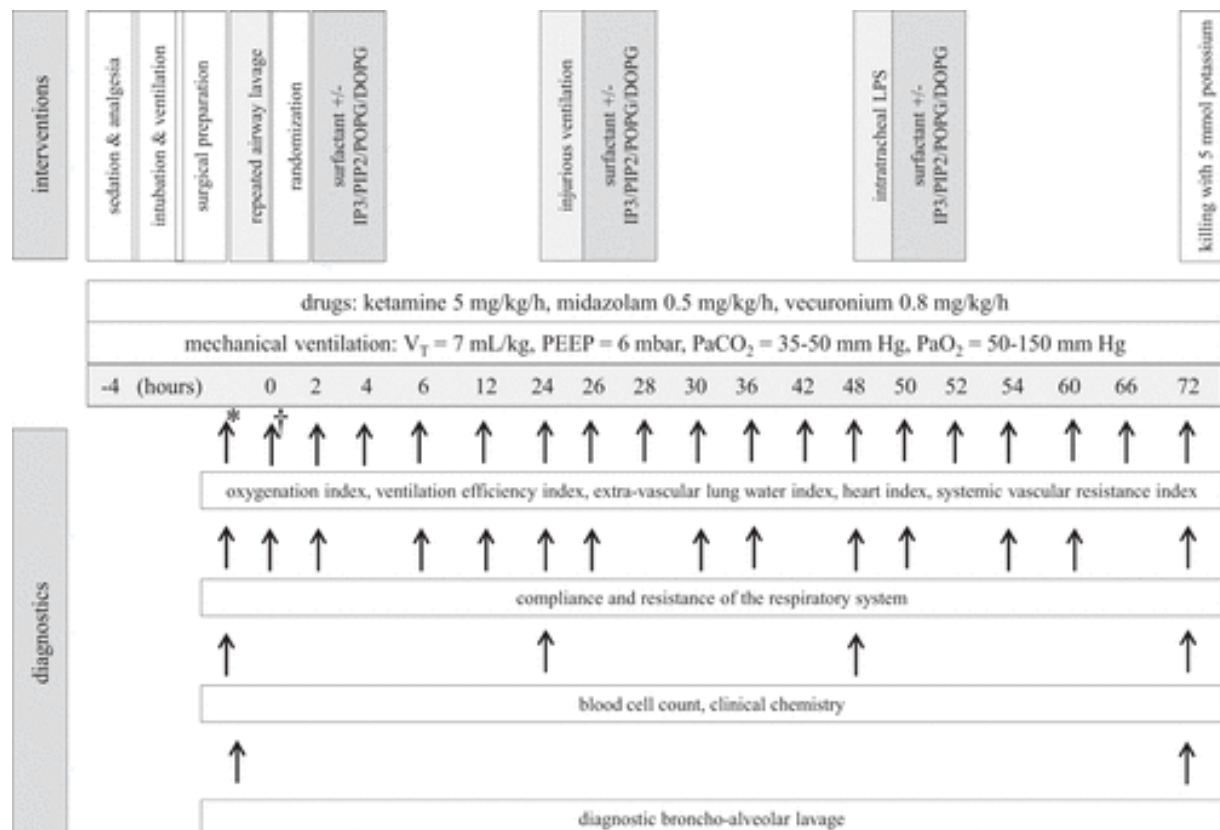
## 3. LPS-Gabe:

Die Ferkel erhielten 48 Stunden nach Protokollstart 2,5mg bakterielles Lipopolysaccharid (LPS: E. coli Serotyp O127:B8, L5668; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) in 1ml 0,9%-Natrium-Chlorid-Lösung intratracheal appliziert.

Am Ende des Studienprotokolls wurden die Ferkel in tiefer Narkose mit einer intravenösen Injektion von 5ml KCl 7,45% getötet.

Für die Übersicht über den Ablauf des Studienprotokolls siehe Abbildung 1.





**Abbildung 1:** Studienprotokoll (Fig. 1. study protocol, Novel therapeutic roles for surfactant-inositols and -phosphatidylglycerols in a neonatal piglet ARDS model: a translational study, Krause et al., 2017)

Studienprotokoll. Alle Ferkel (mit Ausnahme der gesunden Kontrollferkel) erhielten eine mechanische Beatmung mit Hilfe von kontinuierlicher Sedierung, Analgesie und Muskelrelaxation durch die Gabe von Ketamin, Midazolam und Vecuronium Bromid.

Die dreifache Lungenschädigung (hellgraue Kästen) wurde herbeigeführt durch

- 1) wiederholte bronchoalveoläre Lavage zum Zeitpunkt 0h [ $\sim 16$  Lavagen mit 30 ml/kg warmer Natrium-Chlorid-Lösung bis der arterielle partielle  $\text{O}_2$  Druck ( $\text{PaO}_2$ )/ $\text{FiO}_2 = 100 - 120 \text{ mmHg}$ ],
- 2) schädigende Beatmung zum Zeitpunkt 24 – 26h [0 positiver end-expiratorischer Druck (PEEP), Tidalvolumen ( $V_T$ ) = 15 ml/kg], und
- 3) intratracheale LPS Instillation zum Zeitpunkt 48h (2,5 mg *E. coli* LPS), gefolgt von drei Interventionen mit Surfactant (poractant alfa) oder Surfactant + Inositol-1,2,6-Triphosphat (IP3), Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphat (PIP2), Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerol (POPG), oder Dioleoyl-Phosphatidylglycerol (DOPG) 2 h später (zu den Zeitpunkten 2, 26, und 50h; mittelgraue Kästen).

\*Die ersten diagnostischen Messungen werden als „vor der Lungenschädigung“ bezeichnet und †die Messungen zum Zeitpunkt 0h werden als „Baseline Messungen“ bezeichnet und spiegeln die Veränderungen in der Lungenfunktion durch wiederholte bronchoalveoläre Lavage (erste Lungenschädigung) wider.

## 2.3. Applikation der Testsubstanzen

Nach der zufälligen Zuteilung (Randomisierung) der Ferkel in die sieben verschiedenen Interventions-Gruppen und der Vorbereitung der Tiere wie oben beschrieben, erhielten die Ferkel zu den Zeitpunkten 2, 26 und 50 Stunden des Studienprotokolls die verschiedenen Testsubstanzen wie folgt:

In der Kontrollgruppe C (Ferkel mit Lungenschädigung, ohne Applikation von Surfactant oder weiteren Substanzen) erhielten die Tiere zu den oben genannten Zeitpunkten jeweils 2,5ml/kg Luft über den Applikationsschenkel des endotrachealen Tubus.

In der S50-Gruppe erhielten die Ferkel jeweils 50mg/kg Surfactant (entspricht 2,5ml/kg Flüssigkeit) intratracheal ebenfalls über den Applikationsschenkel des Endotrachealtubus innerhalb von 2 Minuten ohne die maschinelle Beatmung zu pausieren.

In der S200-Gruppe wurden jeweils 200mg/kg Surfactant intratracheal (entspricht 2,5ml/kg Flüssigkeit) appliziert.

In der Interventionsgruppe S+IP3 wurden jeweils 50mg/kg Surfactant plus 2,5mg Myo-Inositol-1,2,6-Triphosphat gelöst in 1ml Wasser verabreicht.

In der S+PIP2-Gruppe erhielten die Ferkel intratracheal jeweils 50mg/kg Surfactant plus 2,5mg Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat gelöst in 1ml PBS (= Phosphate Buffered Saline).

In der S+POPG-Gruppe wurde den Tieren 50ml/kg Surfactant plus 7,5mg 16:0/18:1-Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylglycerol gelöst in 1ml PBS intratracheal appliziert.

In der S+DOPG-Gruppe erhielten die Ferkel jeweils 50mg/kg Surfactant plus 7,5mg 18:1/18:1-Di-Oleoyl-Phosphatidylglycerol-Natrium gelöst in 1ml PBS.

### Testsubstanzen:

Surfactant: Poractant Alfa wurde gelöst in 0,9% Natrium-Chlorid-Lösung zu 20 mg/ml, Chiesi Farmaceutici, Parma, Italien

IP3: D-myo-inositol 1,2,6-trisphosphate sodium salt, No. 10007780, Cayman Europe, Tallinn, Estland

PIP2: 1-(1,2R-dipalmitoyl)phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate trisodium salt, No. 10008398, Cayman Europe, Tallinn, Estland

POPG: 16:0/18:1-PG, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'rac-glycerol) sodium salt, No. 840457, Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama

DOPG: 18:1-( $\Delta^9$ -cis)-PG, 1,2-dioeoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) sodium salt, No. 840475, Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama

## 2.4. Messung und Bestimmung der klinischen Parameter

Die Messung und Bestimmung der klinischen Parameter erfolgte durch Mitarbeitende des übergeordneten Projektes „Verhinderung der Lungenfibrose durch epithelial-mesenchymale Transition und Inflammasom NLRP3-Interaktionen mittels Hemmung der sauren Sphingomyelinase und Phosphatidylglycerolsubstitution bei neonatalem ARDS“.

### 2.4.1. Spezifische Compliance und Resistance des respiratorischen Systems

Die Bestimmung der spezifischen Compliance und der Resistance des respiratorischen Systems erfolgte durch Messung der Lungenfunktion wie folgt. Das Signal des Luftstroms wurde über einen Differentialdrucktransducer und ein Pneumotachometer Fleisch Nr. 00 (Fleisch, Lausanne, Schweiz), welcher am Konnektor des Endotrachealtubus angebracht war, erfasst. So konnten die Volumenstromstärke und der intrapulmonale Druck bestimmt werden.

Die Compliance ist die passive Dehnbarkeit der Lunge und wird durch Volumenänderung pro Druckänderung berechnet und entspricht damit der Steilheit der Ruhedehnungskurve. Die Resistance ist der Atemwegswiderstand, der von der Atemluft beim Fluss durch die Atemwege überwunden werden muss und der sich aus dem intrapulmonalen Druck pro Volumenstromstärke berechnet.

Die spezifische Compliance und die Resistance des respiratorischen Systems wurden mit der Methode der kleinsten Quadrate (least squares method) berechnet unter der Berücksichtigung der BTPS-Bedingungen (body temperature, pressure, saturated). Die Signale für den Luftstrom (flow) und den Druck wurden bei einer Frequenz von 200Hz aufgezeichnet, digitalisiert und für weitere Analysen auf einem Computer gespeichert.

### 2.4.2. Oxygenierungsindex

Der Oxygenierungsindex nach Hallmann dient der Einschätzung des Ausmaßes einer Oxygenierungsstörung im Neugeborenenalter. Dieser Index berechnet sich aus dem Produkt des Mittleren Atemwegsdrucks (MAP – mean airway pressure) und dem des Quotienten der inspiratorischen Sauerstofffraktion in Prozent ( $F_iO_2 \times 100$  oder  $\%O_2$ ) und des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks ( $PaO_2$ ).

$$OI = MAP \times \%O_2 / PaO_2$$

Der Mittlere Atemwegsdruck (MAP) berechnet sich wie folgt:

$$MAP = PEEP + (Peak - PEEP) \times IT / IT + ET$$

(PEEP – Positiver endexpiratorischer Druck, Peak – Inspirationsspitzenndruck, IT – Inspirationszeit, ET – Expirationszeit)

Bei einer Oxygenierungsstörung infolge einer pulmonalen Schädigung mit  $O_2$  – Diffusionsstörung ist der Oxygenierungsindex erhöht, beispielsweise beim ARDS oder einer Pneumonie. Der physiologische Bereich liegt bei einem Wert  $<15$  (Hübler, Axel et al., 2019 und Spengler et al., 2017).

### 2.4.3. Ventilationseffizienzindex

Der Ventilationseffizienzindex (VEI) wurde entwickelt, um die Lungenfunktion von Tieren, deren Beatmungsparameter untereinander variieren, vergleichen zu können. Des Weiteren erkennt der Index bei einem Versuchstier wertvolle Messwertveränderungen der Beatmungsdrücke über die Zeit. Der Ventilationseffizienzindex ordnet die alveoläre Ventilation der respiratorischen Zufuhr durch maschinelle Beatmung zu, wenn keine spontane Atmung vorhanden ist und ist wie folgt definiert (Notter et al., 1985):

$$VEI = \text{Alveoläre Ventilation} / \text{Beatmungsdruckdifferenz} \times \text{Atemfrequenz}$$

$$\text{Alveoläre Ventilation} = CO_2 - \text{Produktion} (\sim 3800 \text{ ml} \times \text{torr} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}) / \text{arteriellen } CO_2 - \text{Gehalt}$$

$$\text{Beatmungsdruckdifferenz} = \text{Druck am Ende der Inspiration (PIP)} - \text{Druck am Ende der Expiration (PEEP)}$$

$$\rightarrow VEI = 3800 / (PIP - PEEP) \times \text{Atemfrequenz} \times PaCO_2$$

Der Ventilationseffizienzindex nimmt an Wert zu, wenn sich die Lungenfunktion verbessert.

#### 2.4.4.Extravaskulärer Lungenwasserindex

Das hämodynamische Monitoring während des Protokollablaufs erfolgte mit Hilfe des PiCCO®-Systems der Firma Pulsion Medical Systems SE (München) mittels der transpulmonalen Thermodilutionstechnik. Neben den Parametern arterieller systolischer und diastolischer Blutdruck (AD, mmHg), Herzfrequenz (HR, 1/min), systemischer vaskulärer Widerstandsindex (SVRI,  $\text{dyn} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^{-5} \cdot \text{m}^2$ ), Herzindex (HI,  $\text{l/min/m}^2$ ) und Körpertemperatur (TB, °C) wurde auch der extravaskuläre Lungenwasserindex (EVLWI) bestimmt.

Das extravaskuläre Lungenwasser dient der Abschätzung des Schweregrads des Lungenödems. Es setzt sich aus den Gewebeflüssigkeiten außerhalb der Lungenkapillaren zusammen, aus denen des Interstitiums des Lungengewebes, der Alveolen und aus denen des intrazellulären Raums. Das extravaskuläre Lungenwasser wird als diskontinuierlicher Parameter während der transpulmonalen Thermodilution gemessen. Nimmt die Menge des extravaskulären Lungenwassers zu, wird die Oxygenierung und Compliance abnehmen.

Das extravaskuläre Lungenwasser (EVLW) wird berechnet, indem das intrathorakale Blutvolumen (ITBV) vom intrathorakalen Thermovolumen (ITTV) subtrahiert wird:  
$$\text{EVLW} = \text{ITTV} - \text{ITBV}.$$

Das intrathorakale Thermovolumen berechnet man, indem die Mittlere Durchgangszeit (Mean Transit time, MTt) und das Herzzeitvolumen multipliziert werden:

$$\text{ITTV} = \text{MTt} \times \text{HZV}.$$

Die Mittlere Durchgangszeit ist die Zeit, nach der die Hälfte des Indikators den Detektionsort (zentrale Arterie) passiert hat. Sie wird durch die Halbierungslinie der Fläche unter der Kurve bestimmt.

Das intravasale Volumen, hier intrathorakales Blutvolumen (ITBV), wird berechnet, indem man das globale enddiastolische Volumen (GEDV) mit dem Faktor 1,25 multipliziert:

$$\text{ITBV} = \text{GEDV} \times 1,25.$$

Diese Berechnung ergibt sich, da man in klinischen Studien (Sakka SG et al., 2000) festgestellt hat, dass das intrathorakale Blutvolumen gleichbleibend um 25 Prozent höher ist als das globale enddiastolische Volumen.

Das globale enddiastolische Volumen wird durch Subtraktion des pulmonalen Thermovolumens (PTV) vom intrathorakalen Thermovolumen berechnet:  
$$\text{GEDV} = \text{ITTV} - \text{PTV}.$$

Es gibt die Höhe des Vorlastvolumens an.

Den extravaskulären Lungenwasserindex in ml/kg erhält man, indem man das extravaskuläre Lungenwasser auf das Körpergewicht bezieht.

Die präzise Funktion und den Aufbau des PiCCO® – Systems sind auf der Webseite des Herstellers dargestellt (Getinge, 2018).

## 2.5. Entnahme der Lungengewebeproben

Die Entnahme der Lungengewebeproben erfolgte durch Mitarbeitende des übergeordneten Projektes „Verhinderung der Lungenfibrose durch epithelial-mesenchymale Transition und Inflammasom NLRP3-Interaktionen mittels Hemmung der sauren Sphingomyelinase und Phosphatidylglycerolsubstitution bei neonatalem ARDS“.

Nach Durchführung des 72-stündigen Versuchsprotokolls wurden die Ferkel mit 5ml Kaliumchlorid 7,45% in tiefer Sedierung getötet, bevor der Thorax zur en bloc Entnahme von Herz und Lunge geöffnet wurde. Über eine Kanüle im rechten Ventrikel wurden zweimal 50ml PBS unter leichtem Druck injiziert, um das Blut aus der Lungenzirkulation zu entfernen. Die Lungen wurden durch Ligatur der rechten bzw. linken Pulmonalarterie und Absetzen des Hauptbronchus getrennt. Beide Lungen wurden gewogen und das Verhältnis von Lungengewicht zu Körpergewicht berechnet. Nach der Kanülierung des linken Hauptbronchus wird ein Flüssigkeitsdruck von 25cmH<sub>2</sub>O über dem höchsten Punkt der Lunge für die Instillation von 4%-igem Formaldehyd erzeugt. Nach 30 Minuten wurde der Hauptbronchus ligiert und die Lunge bei +4°C in 4%-iges Formaldehyd gegeben, um sie zu fixieren. Nach 24 Stunden wurde das Formaldehyd durch PBS ersetzt, die Lunge weiter bei +4°C gelagert. Es wurden jeweils von der rechten Lunge Teile des rechten unteren Lungenlappens mit identischer Position entnommen und das Lungengewebe in Paraffin eingebettet.

Um beeinflussende Faktoren an anderen Organen, außer den Lungen, ausschließen zu können, wurden während der Durchführung des Studienprotokolls regelmäßig die Blutzellen analysiert, Elektrolyte, wie Calcium, Chlorid, Kalium und Natrium bestimmt, ebenso wie die Enzyme Aspartataminotransferase und Kreatinin (für die Leber- und Nierenfunktion) und die Überwachung der Urinproduktion und Gewichtszunahme der Ferkel sowie Monitoring der Herz-Kreislauffunktion über den Herzindex (HI: Herzindex

= Herzminutenvolumen / Körperoberfläche in  $\text{m}^2$ ) und den systemisch vaskulären Widerstandsindex (SVRI: Systemisch vaskulärer Widerstandsindex =  $\text{dyn} \times \text{s} \times \text{cm}^{-5} \times \text{m}^{-2}$ ) durchgeführt.

## 2.6. Bestimmung der sauren Sphingomyelinase-Aktivität und der Ceramid-Konzentration im Lungengewebe

Die Bestimmung der sauren Sphingomyelinase-Aktivität und der Ceramid-Konzentration im Lungengewebe erfolgte durch Mitarbeitende des übergeordneten Projektes „Verhinderung der Lungenfibrose durch epithelial-mesenchymale Transition und Inflammasom NLRP3-Interaktionen mittels Hemmung der sauren Sphingomyelinase und Phosphatidylglycerolsubstitution bei neonatalem ARDS“.

Die Aktivität der sauren Sphingomyelinase wurde mit Hilfe eines  $^{14}\text{C}$ -markierten Sphingomyelin (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) als Substrat in einem in vitro assay analysiert. Die gefrorenen Lungengewebeproben wurden pulverisiert und aufgetaut. Für die Bestimmung der Aktivität wurden  $10\mu\text{g}$  dieser Gewebeproben zusammen mit  $1,4\text{mM}$   $\text{ZnCl}_2$  in einem Puffer (insgesamt  $50\mu\text{l}$ ), der aus  $250\text{mM}$  Natriumacetat,  $1\text{mM}$  EDTA (pH 5,0) und  $2,25\mu\text{l}$  N-methyl- $^{14}\text{C}$ -Sphingomyelin besteht, verwendet. Das Phosphorylcholin aus der sauren Sphingomyelinase wurde aus dem Lungengewebe durch die Zugabe von  $800\mu\text{l}$  Chloroform/Methanol (2:1) und  $250\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  extrahiert. Die Menge an radioaktivem Phosphorylcholin, das bei der Hydrolyse von  $^{14}\text{C}$ -Sphingomyelin erzeugt wurde, konnte in der wässrigen Phase mit Hilfe der Szintillationszählung erfasst werden (Wiegmann et al., 1994).

Die Bestimmung der Ceramid-Konzentration erfolgte nach dem Extrahieren aus dem Lungengewebe durch ein Chloroform/Methanol-Gemisch, anschließender Auftrennung der Lipide durch die Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatografie und zuletzt der Quantifizierung mit Hilfe der Zwei-Dimensionalen-Laserdensitometrie.

Die Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatografie (High-performance thin-layer chromatography = HPTLC) wurde vorbereitet mit einem flüssigen System zusammengesetzt aus Chloroform/Methanol 1:1 und die Platten wurden für 30 Minuten bei  $80^\circ\text{C}$  getrocknet. Die HPTLC Kammern wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur equilibriert mit einem Gemisch aus Dichlormethan/Methanol/Essigsäure (100/2/5 vol/vol) bei neutralen Lipiden oder Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser

(100/60/20/5 vol/vol) bei Phospholipiden: 50µl von jeder Probe wurden in Chloroform/Methanol (9:1) gelöst und auf die HPTLC Platten gegeben. Nach der Chromatografie wurden die HPTLC Platten bei 180°C für 10 Minuten getrocknet und fixiert. Bei Raumtemperatur wurden die HPTLC Platten für 10 Sekunden in ein Bad aus Kupfersulfat/Phosphorsäure (10%/8%) eingetaucht und anschließend erhitzt bis 160°C. Die Spots wurden mit Hilfe der Zwei-D-Laser-Densitometrie analysiert. Verschiedene Ceramide, die C<sub>24</sub>- verglichen mit C<sub>16</sub>- mit Estern verbundene Fettsäuren enthalten, werden identifiziert, indem diese mit kommerziell erhältlichen Standards verglichen werden (Jensen et al., 1999).

## 2.7. Aufbereitung der bronchoalveolären Lavages

Die Aufbereitung der bronchoalveolären Lavages erfolgte durch Mitarbeitende des übergeordneten Projektes „Verhinderung der Lungenfibrose durch epithelial-mesenchymale Transition und Inflammasom NLRP3-Interaktionen mittels Hemmung der sauren Sphingomyelinase und Phosphatidylglycerolsubstitution bei neonatalem ARDS“.

Für die folgenden Untersuchungen wurde die jeweils erste bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit verwendet. So wurde die Bakterienanzahl in der ersten Lavageflüssigkeit bestimmt, um eine vorbestehende sehr starke bakterielle Kolonisation der Luftwege zu erkennen und entsprechende Ferkel von der Studie auszuschließen. Dafür wurden 5ml der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit auf Agarplatten aufgebracht und semiquantitativ untersucht. Die Stärke des Bakterienwachstums wurde folgendermaßen eingeteilt:

Kategorie 1: einzelne Kolonien

Kategorie 2: spärliches Wachstum

Kategorie 3: intermediäres Wachstum

Kategorie 4: starkes Wachstum.

Drei Ferkel wurden aufgrund von sehr starkem Bakterienwachstums trotz antibiotischer Prophylaxe von der Studie ausgeschlossen, zwei von ihnen zeigten in der abschließenden bronchoalveolären Lavage zum Zeitpunkt 72h eine blutige Lavageflüssigkeit, die ein weiterer Ausschlussgrund gewesen wäre. Des Weiteren wurde eine Bestimmung der Zellkonzentration durchgeführt und ein Zelldifferentialbild mit Einteilung in Makrophagen, Granulozyten mit segmentiertem Zellkern (PMNL –



polymorphonuclear leucocytes) und Lymphozyten erstellt. Dafür wurde die zuerst gewonnene bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit mit 0,2 ml Protease Inhibitor-Mischung (cOmplete mini)/10ml Lavageflüssigkeit gemischt. Anschließend wurde die Zellkonzentration mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Für das Zelldifferentialbild wurden die Objektträger zuerst für 500rpm (rounds per minute) 5 Minuten lang zentrifugiert und danach mit der Diff-Quick-Lösung (Labor & Technik, Berlin, Deutschland) wie folgt gefärbt: 5mal für 1 Sekunde die Objektträger in der Fixierungslösung schwenken, 5mal für 3 Sekunden in die rote Farblösung und 1mal für 1 Sekunde in die blaue Farblösung tauchen. Pro Objektträger wurden anschließend 300 Zellen ausgewertet und in polymorphonukleäre Leukozyten (PMNL), Makrophagen und Lymphozyten differenziert.

Die restliche bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit wurde mit 1500rpm 10 Minuten lang zentrifugiert, um Surfactant als Überstand der flüssigen Phase zu trennen. Das Zell-Pellet wurde mit einem 70µm-Zellfilter (Corning, Durham, North Carolina) gefiltert und anschließend auf drei Behälter mit jeweils 10ml PBS aufgeteilt. Nach einer weiteren Zentrifugierung mit 1500rpm über 10 Minuten wurde das Zell-Pellet wiederum für weitere Untersuchungen aufgeteilt. Für die Untersuchungen der apoptotischen Zellen wurde ein Teil des Zell-Pellets in 3ml 1%-igem Paraformaldehyd gelöst. Anschließend wurde das Gefäß 5 Minuten lang auf Eis inkubiert, danach der Inhalt in 10ml PBS gelöst und wiederholt mit 1500rpm 10 Minuten lang zentrifugiert, um ein gewaschenes Zell-Pellet zu erhalten. Dieses wurde in 3ml 70%-igen Ethanol gegeben und bei -20°C gelagert.

## 2.8. TUNEL-Färbung

Die TUNEL – (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) Färbung wurde angewendet, um apoptotische Zellen mittels Nachweis freier 3'-OH-Enden, wie sie für DNA-Einzel- oder Doppel-Strangbrüche typisch sind, sichtbar zu machen.

Die freien 3'-OH-Enden der DNA-Einzel- oder Doppel-Strangbrüche werden mit modifizierten Nukleotiden enzymatisch gekennzeichnet. Diese neuen DNA-Enden, die durch Fragmentierung von DNA entstanden sind, sind typischerweise in durch Apoptose morphologisch veränderten Zellkernen und apoptotischen Körpern, sogenannten apoptotic bodies, lokalisiert. Dagegen werden normale nicht-apoptotische oder proliferative Zellkerne, welche geringfügig freie 3'-OH-Enden der

DNA aufweisen, gewöhnlich nicht mit dieser Methode gefärbt. Diese Methode macht insbesondere frühe Apoptose-Stadien sichtbar, in denen die Chromatin-Kondensation beginnt und DNA-Strangbrüche vorhanden sind, sogar bevor der Zellkern große morphologische Veränderungen zeigt.

Davon abzugrenzen sind Zellen, die durch Nekrose oder den unprogrammierten Zelltod zugrunde gegangen sind. Diese lassen sich durch morphologische und biochemische Kriterien beim Zelluntergang unterscheiden und werden normalerweise bei der TUNEL-Färbung nicht angefärbt. So zeigen durch Nekrose untergegangene Zellen eine Ruptur von Plasmamembranen und lysosomalen Membranen mit Austritt von lysosomalen Enzymen und ein Anschwellen der Zelle und Lyse. Dies geht einher mit einer signifikanten Entzündungsreaktion und einer ungeordneten Aggregation des Chromatins (Millipore.com, 2013).

Die Färbung erfolgte mittels ApopTag® Peroxidase in Situ Apoptosis Detection Kit von Millipore®. In dem Kit sind enthalten:

Anti-Digoxigenin-Peroxidase

Equilibration Buffer (Equilibrationspuffer)

Reaction Buffer (Reaktionspuffer)

Stop/Wash Buffer (Stop/Wasch-Puffer)

Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT-Enzyme).

Der Reaktionspuffer enthält laut Millipore® Nukleotide, die enzymatisch mittels Terminal deoxynucleotidyl Transferase an die DNA 3'OH-Enden gebunden werden. Diese Digoxigenin-konjugierten Nukleotide bilden ein Oligomer an den DNA-Fragmenten. Die natürliche Quelle des Digoxigenin ist die Pflanze Digitalis.

Die Terminal deoxynucleotidyl Transferase katalysiert die Bindung von den Triphosphat-Nukleotiden an die 3'OH-Enden der DNA-Einzel- und Doppelstränge unabhängig vom kodogenen DNA-Strang.

Die Anti-Digoxigenin-Peroxidase enthält Anti-Digoxigenin Antikörper, die an ein Peroxidase Molekül gebunden sind. Diese binden an die Digoxigenin-gebundenen Nukleotide, die an die 3'OH-Enden der DNA-Fragmente gebunden sind. Der gebundene Peroxidase Antikörper erlaubt eine permanente, konzentrierte und lokalisierte Färbung mittels eines chromogenen Substrats. Der Antikörper ist ein polyklonaler Schaf-Antikörper, der weniger als 1% Kreuz-Reaktivität mit den Hauptsteroiden der Wirbeltiere zeigt und dessen Fc-Region proteolytisch abgespalten

wurde, um eine nicht-spezifische Adsorption mit zellulären Fc-Rezeptoren zu verhindern (Millipore.com, 2013).

Des Weiteren werden für die Färbung folgende Substanzen und Lösungen benötigt:

DAB (Diaminobenzidin in Tris-HCL) lichtgeschützt!

dH<sub>2</sub>O Millipore® (deionized Water)

PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4)

Tris HCL 50mM

Xylol

Ethanol 100%, 95%, 70% (verdünnt mit dH<sub>2</sub>O)

1-Butanol 100%

Fixiermedium (Entellan)

Hydrogen Peroxide 30%

Proteinase K

0,5% methyl green (free of crystal violet)

Herstellung der benötigten Lösungen:

Phosphate Buffered Saline (PBS):

55,0g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 13,5g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 117,0g NaCl in 800ml dH<sub>2</sub>O

Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 mittels Zugabe von Salzsäure (HCl) und Natronlauge (NaOH).

Methyl Green:

0,5% Methyl Green in 0,1M Natriumacetat, pH 4,0

1. Herstellung von 1M Natriumacetat (M=136,08g/mol):

34,02g Natriumacetat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) in 200ml dH<sub>2</sub>O lösen, pH-Einstellung mittels Essigsäure auf den pH-Wert 4,0 und anschließend die Lösung auf 250ml auffüllen

2. 1:10 Verdünnung von 1M auf 100mM Natriumacetatlösung:

25ml 1M Natriumacetatlösung + 225ml dH<sub>2</sub>O (pH-Wert wiederholt überprüfen und gegebenenfalls korrigieren)

3. 1,25g Methyl Green + 250ml 100mM Natriumacetatlösung ergibt die fertige Lösung zum Färben

Tris HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan):

0,05M Tris HCl, pH 7,4

1:20 Verdünnung von 1M auf 50mM Tris HCl:

10ml 1M Tris + 190ml dH<sub>2</sub>O (pH-Wert überprüfen und gegebenenfalls korrigieren)

### 2.8.1. Lungengewebeschnitte

Von den in Paraffin eingebetteten Lungengewebeproben wurden am Mikrotom (Microm HM 355S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) 1,5µm dicke Gewebeschnitte gefertigt. Anschließend wurden diese auf Star Frost Objektträger aufgezogen (bei einfachen Objektträgern kam es zu einem Ablösen und Verlust des aufgetragenen Gewebes durch das Schwenken in den Flüssigkeiten). Über Nacht wurden die Objektträger mit dem Gewebe bei 37°C im Trockenschrank getrocknet.

Die Färbung folgte dem nachstehenden Protokoll:

Während der folgenden Schritte durften die Proben nicht austrocknen.

#### 1. Entparaffinierung

Die Objektträger wurden in sogenannte Schiffchen gehängt und in die folgenden Küvetten getaucht (siehe Abbildung 2 und 3).

Zuerst wurde zweimal zwölf Minuten in Xylol entparaffiniert, als nächstes zweimal fünf Minuten in 100% Ethanol, einmal fünf Minuten in 96% Ethanol und einmal fünf Minuten in 70% Ethanol rehydriert. Zuletzt wurden die Objektträger einmal in Leitungswasser gespült.

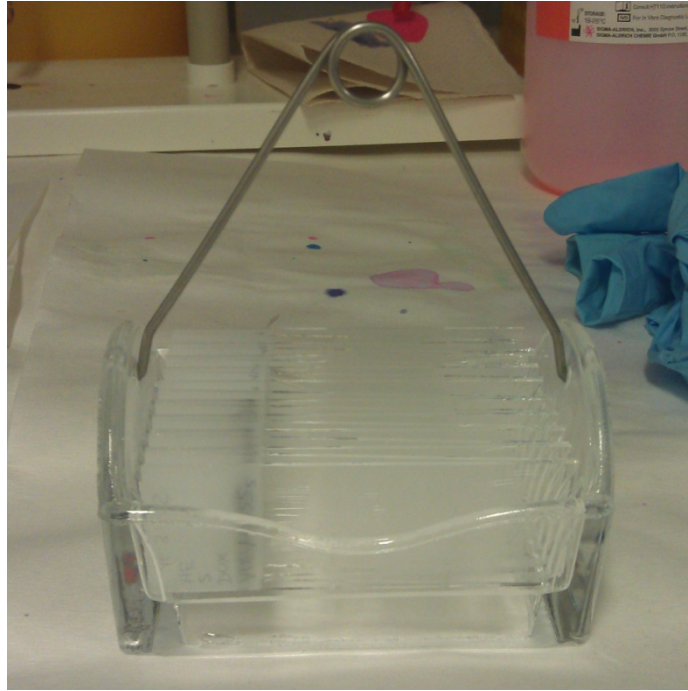


Abbildung 2: Schiffchen für Objektträger



Abbildung 3: Entparaffinierung der Objektträger in Küvetten

## 2. Proteinase K

Im zweiten Schritt wurden die Objektträger in einer Proteinase K-Lösung mit der Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Zur Vorbehandlung des Gewebes mit Freilegung der DNA wurden 62,45ml PBS und 62,5µl Proteinase K in einer Küvette zusammengefügt und die Objektträger für 15 Minuten bei Raumtemperatur in der

Lösung belassen. Anschließend wurden die Objektträger zweimal zwei Minuten in dH<sub>2</sub>O Millipore Küvetten gewaschen (siehe Abbildung 4).

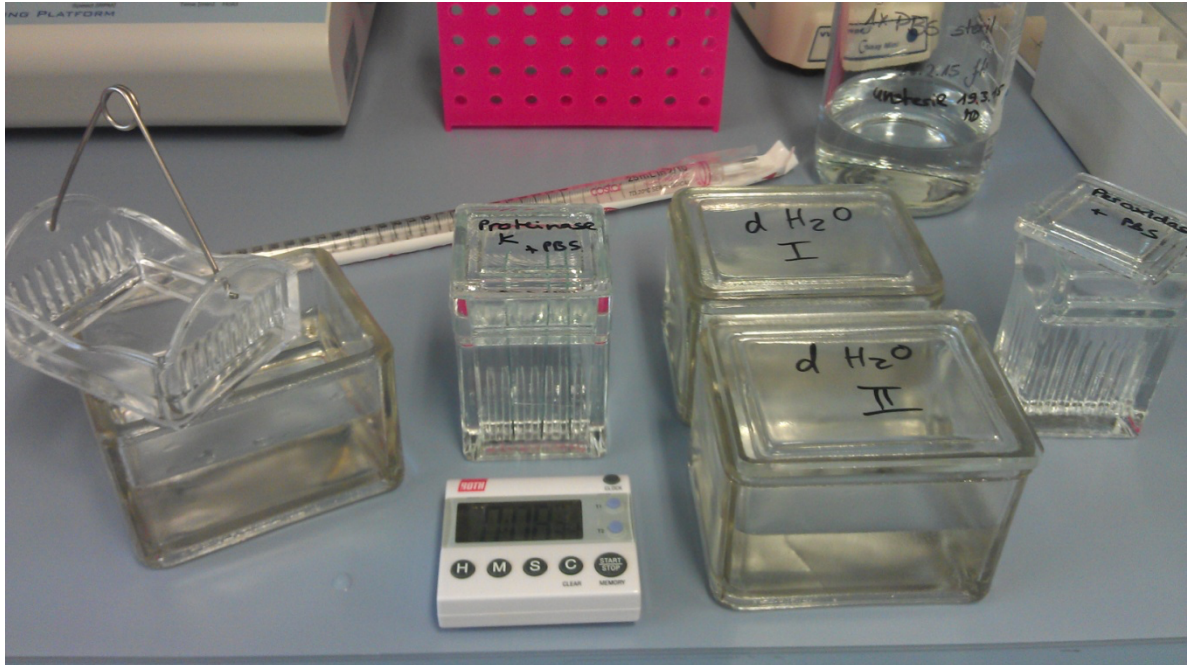


Abbildung 4: Inkubation der Objektträger in der Proteinase K-Lösung

### 3. Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Im nächsten Schritt wurden die Objektträger bei einer Verdünnung von 1:10 in 3%-iger Peroxidase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) inkubiert, um die endogene Peroxidase zu neutralisieren. Die Küvette wurde mit 63ml PBS und 7ml 30%-iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> befüllt, um die Arbeitskonzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> herzustellen. Für fünf Minuten wurden die Objektträger bei Raumtemperatur inkubiert und im Folgenden zweimal fünf Minuten in einer PBS-Küvette gewaschen.

### 4. Coverplates

Die Coverplates dürfen nur mit Handschuhen angefasst werden, um das Fließverhalten durch Verschmutzungen und insbesondere Fettspuren im Folgenden nicht zu beeinflussen.

Die Objektträger wurden mit jeweils 700µl PBS auf die Coverplates aufgezogen, sodass die Gewebeseite des Objektträgers ohne Lufteinschlüsse auf die Flüssigkeit gesetzt werden konnte. Die Coverplates wurden weiter in die Feuchte Kammer eingespannt (siehe Abbildung 5). Es wurde wiederholt PBS aufgetragen, um das



Fließverhalten beobachten zu können. Dieses sollte bei allen Coverplates gleichmäßig langsam sein.

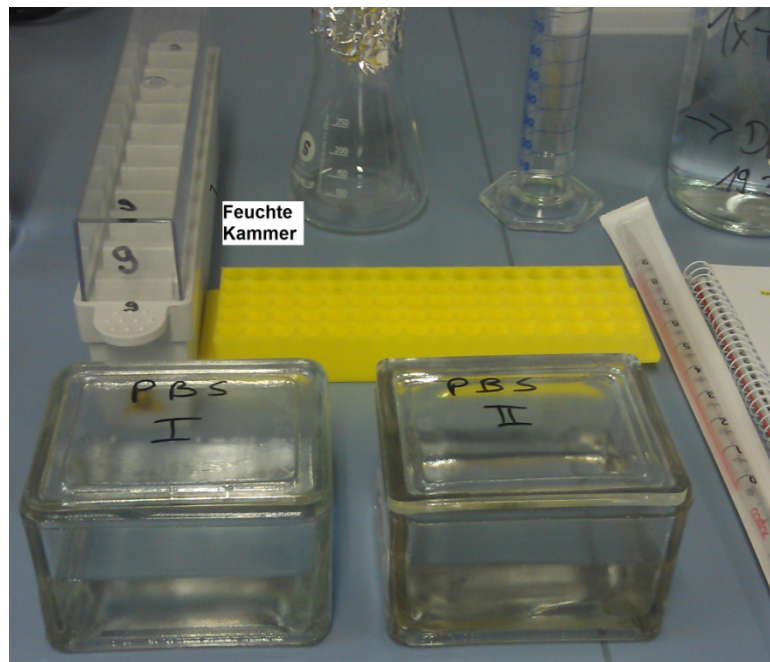


Abbildung 5: Vorbereitung für die Inkubation der Objektträger in der Feuchten Kammer

#### 5. Equilibrationspuffer

100µl Equilibrationspuffer wurden pro Objektträger auf die in der Feuchten Kammer eingespannten Coverplates gegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 6. TdT-Enzyme (Terminal deoxynucleotidyl Transferase)

Die in einem Stabilisierungspuffer enthaltenen Enzyme wurden im Verhältnis 70% Reaktionspuffer und 30% TdT-Enzyme gemischt.

100µl der Arbeitskonzentration der TdT-Enzyme wurden pro Objektträger auf die eingespannten Coverplates gegeben.

Exemplarisch für acht Objektträger wurde eine Lösung aus 560µl Reaktionspuffer und 240µl TdT-Enzyme verwendet.

Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C im Trockenschrank in der feuchten Kammer. Der Deckel der Feuchten Kammer musste fest verschlossen sein.

Um Negativ-Kontrollen zu erhalten, wurden in diesem Schritt die TdT-Enzyme durch Puffer ersetzt.

### 7. Stop/Wash Buffer

Der Stop/Wasch-Puffer wurde exemplarisch für acht Objektträger aus 23µl Stop/Wasch-Puffer und 782µl dH<sub>2</sub>O Millipore hergestellt.

100µl der Arbeitskonzentration des Stop/Wasch-Puffers wurden pro Objektträger auf die eingespannten Coverplates gegeben, um die Aktivität der Enzyme zu stoppen. Für zehn Minuten wurde bei Raumtemperatur inkubiert.

### 8. Anti-Digoxigenin Peroxidase

Die Anti-Digoxigenin Peroxidase wurde 20 Minuten vor Zugabe des Stop/Wasch-Puffers aus dem Gefrierfach entnommen und bei Raumtemperatur erwärmt. Es wurde einmal mit PBS gespült, um Reste der vorherigen Lösung zu entfernen. 100µl Anti-Digoxigenin Peroxidase wurden pro Objektträger auf die eingespannten Coverplates gegeben und dreißig Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchten Kammer inkubiert. Der Deckel musste fest verschlossen sein.

### 9. DAB Peroxidase Substrat (DAB=Diaminobenzidin)

Das DAB Peroxidase Substrat wurde hergestellt, indem 200mg DAB und 200ml TRIS-HCl (c=50mM, pH=7,4) unter lichtgeschützten Bedingungen zusammengegeben und nach kräftigem Schütteln in eine große Küvette filtriert wurden (0,22µm) (siehe Abbildung 6). Kurz vor der Inkubation wurden 100µl 30%-iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben.

Die Coverplates wurden einmal mit PBS gespült. Danach wurden die Objektträger aus der Feuchten Kammer genommen und in ein Schiffchen umgesetzt. Die Objektträger wurden sieben Minuten und 30 Sekunden bei Raumtemperatur lichtgeschützt in der DAB-Küvette inkubiert. Unter dem Mikroskop wurde die Färbung der Zellkerne kontrolliert und die Inkubation der Objektträger entsprechend weitergeführt oder beendet. Die optimale Inkubationszeit wurde erreicht, wenn die apoptotischen Zellkerne oder apoptotischen Körper eine braune Färbung angenommen hatten, der Hintergrund klar bzw. hell beige angefärbt war (siehe Abbildung 7 und 8).



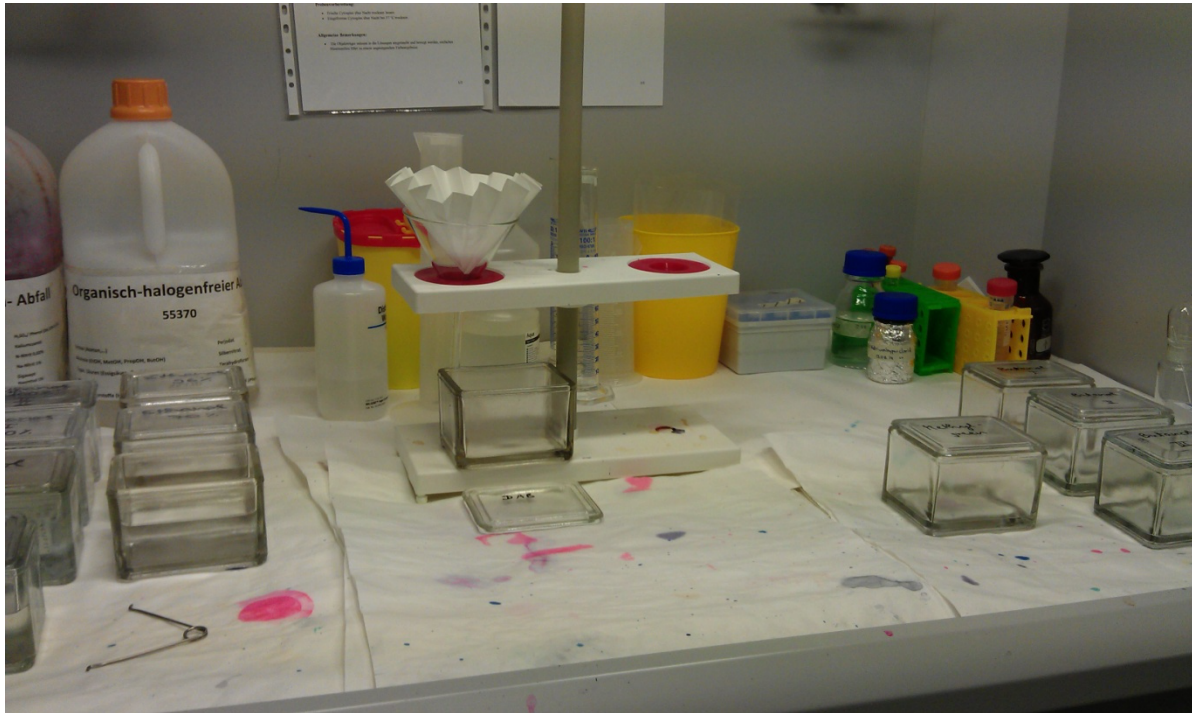


Abbildung 6: Filtration von DAB Peroxidase Substrat

#### 10. Waschen in dH<sub>2</sub>O

Zweimal wurde das Schiffchen mit den Objektträgern in je einer Küvette mit dH<sub>2</sub>O Millipore geschwenkt. Für fünf Minuten wurde bei Raumtemperatur in einer dritten Küvette mit dH<sub>2</sub>O Millipore inkubiert.

#### 11. Gegenfärbung mit Methylgreen

Die Objektträger wurden für zehn Minuten in der Küvette mit 0,5% Methylgreen bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger jeweils zehnmal in zwei verschiedenen dH<sub>2</sub>O Millipore – Küvetten geschwenkt und für 30 Sekunden in der dritten Küvette mit dH<sub>2</sub>O Millipore inkubiert. Die nicht-apoptotischen Zellkerne sollten ein helles bis mittleres Grün angenommen haben.

#### 12. N-Butanol

Jeweils zehnmal wurden die Objektträger in zwei verschiedenen N-Butanol-Küvetten geschwenkt und für 30 Sekunden in der dritten Küvette mit N-Butanol inkubiert.

#### 13. Fixieren der Objektträger

Das Schiffchen mit den Objektträgern wurde zweimal für fünf Minuten jeweils in eine Küvette mit frischem Xylol gegeben, um das Gewebe zu dehydrieren.

Zuletzt wurden die Objektträger mit Entellan eingedeckt, ohne die Objektträger austrocknen zu lassen. Die Ergebnisse der Färbung zeigen die Abbildungen 7 und 8.

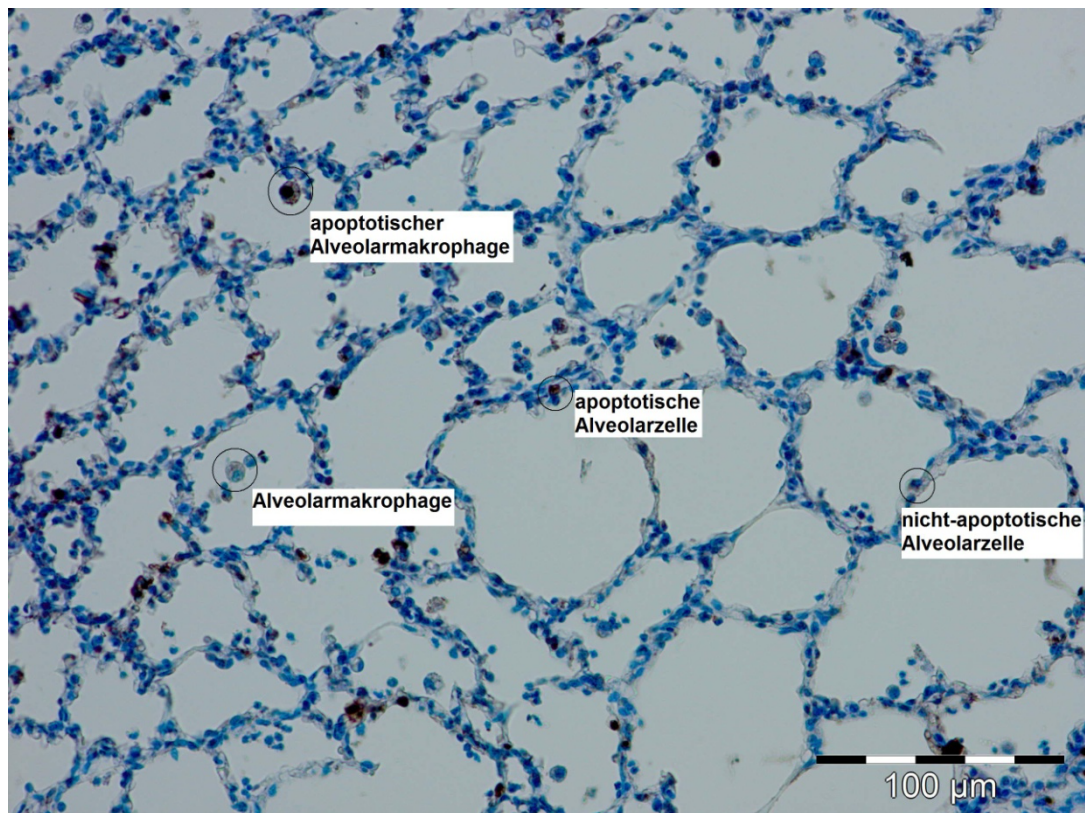


Abbildung 7: Übersicht über die angefärbten Zellen im Lungengewebe (Alveolen)

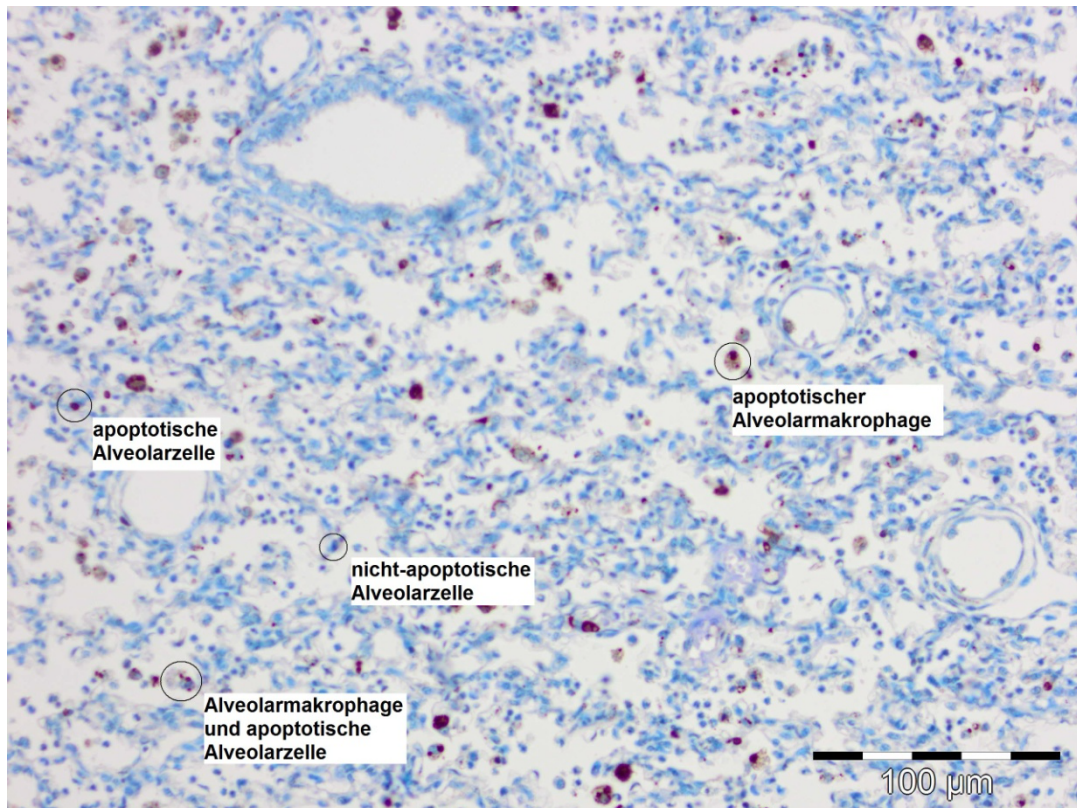


Abbildung 8: Übersicht über die angefärbten Zellen im dichten Lungengewebe

### 2.8.2. Bronchoalveoläre Lavages

Die zu Beginn des lungenschädigenden Protokolls (siehe 2.2) sowie nach 72 Stunden entnommenen Proben der Bronchoalveolären Lavages wurden bei  $-4^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank aufbewahrt.

Nach kurzem und schonendem Rütteln mit Hilfe des Vortexmixers (neoLab® D-6012, Heidelberg, Deutschland) (siehe Abbildung 9) wurden der 72-Stunden-Probe  $250\mu\text{l}$  entnommen. Mit dem Gerät Thermo Scientific™ Cytospin™ 4 Cytozentrifuge (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) wurden diese Proben auf einen Star Frost Objektträger aufgetragen (5 Minuten bei 750 RPM) und anschließend für 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Trockenschrank getrocknet (siehe Abbildung 10, 11 und 12).





Abbildung 9: Vortexmixer

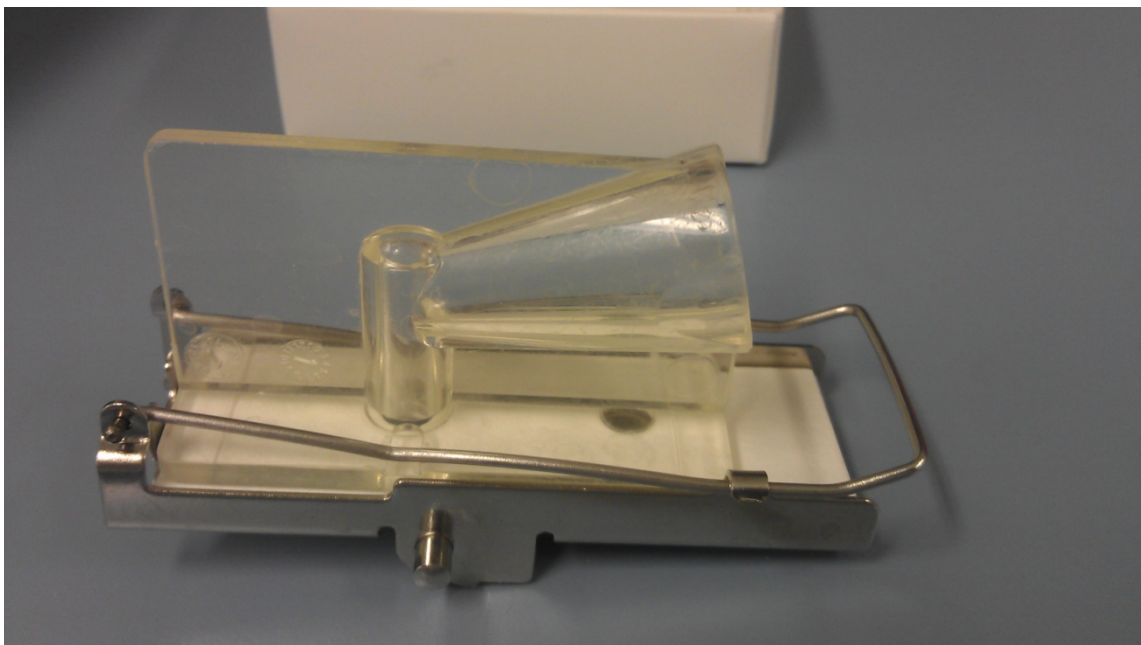


Abbildung10: Objektträger mit Filterpapier und Trichter

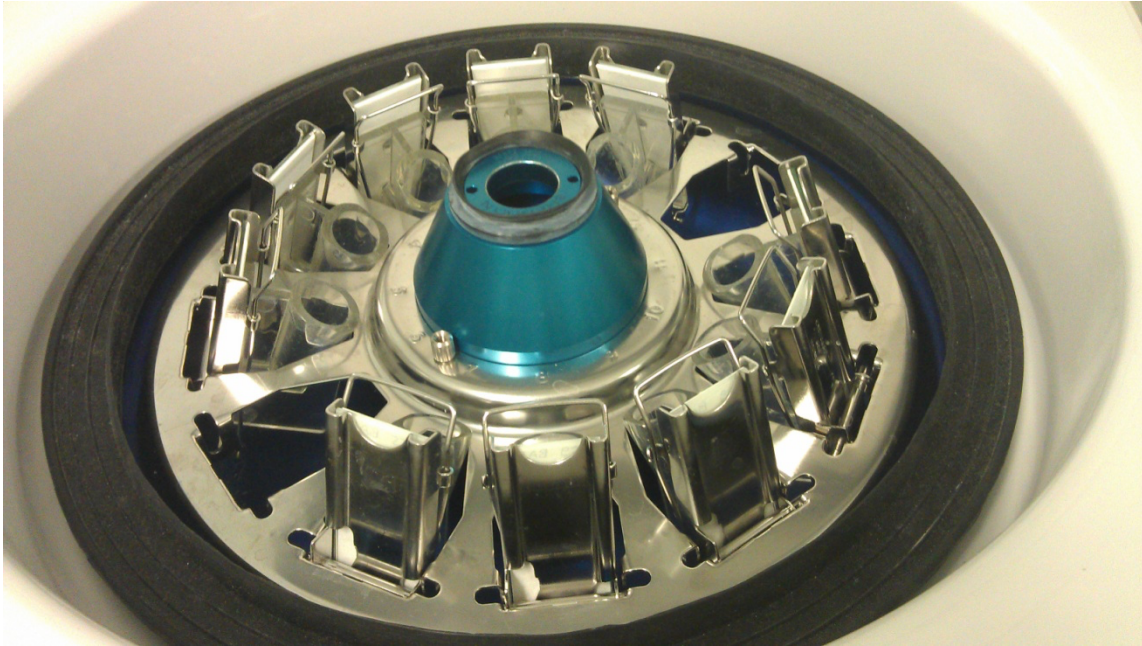


Abbildung 11: Objektträger in der Zentrifuge



Abbildung 12: Zentrifuge

Im zweiten Schritt wurde in gleicher Weise die Null-Stunden-Probe auf denselben Objektträger aufgebracht und für 30 Minuten bei 37°C im Trockenschrank getrocknet.

Die TUNEL-Färbung wurde entsprechend dem oben genannten Protokoll unter 2.8.1. durchgeführt. Allerdings entfiel der Schritt der Entparaffinierung, sodass das Färbeprotokoll mit der Zugabe der Proteinase K startete.

## 2.9. Auswertung der gefärbten Zellen

### 2.9.1. Alveolarzellen

Die Zellen des Lungengewebes wurden nach Färbung mittels ApopTag® Peroxidase in Situ Apoptosis Detection Kit von Millipore® am Mikroskop Olympus BX61 (Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland) mit Hilfe der newCAST Plus Software VIS (Visiopharm Integrator System Version 4.6.3.857, Hørsholm, Dänemark) ausgewertet (siehe Abbildung 13).



Abbildung 13: Mikroskop Olympus BX61



Der auszuwertende Objektträger wurde auf dem motorisierten Objektträgertisch eingespannt und die gefärbten Lungenschnitte auf dem Objektträger mit Hilfe eines polygonalen Werkzeugs (Layer drawing) am Monitor eingerahmt.

Danach wurde der prozentuale Anteil der zu analysierenden Fläche an der Gesamtfläche des Lungengewebes so festgelegt, dass insgesamt ca. 200 Sichtfelder pro Objektträger ausgewertet werden konnten (10x40 Objektiv). Die Positionen der Sichtfelder wurden durch die Software nach dem Prinzip des systematic uniform random sampling (SURS) festgelegt.

Pro Sichtfeld wurden 4 Counting Frames mit der Größe 80µm x 60µm und einem überlagerten testline-system mit ca. 30µm langen, regelmäßig und parallel angeordnete Linien auf das Lungengewebe projiziert (siehe Abbildung 14).

Die Auswertung erfolgte systematisch und manuell. Zuerst wurden die Counting Frames festgelegt, die in einer Position auswertbar waren. Voraussetzung dafür war, dass innerhalb dieses Rechtecks Alveolarzellen von den parallelen Linien geschnitten wurden (siehe Abbildung 15). Im nächsten Schritt wurde entschieden, ob es sich um sehr dichtes Gewebe oder um Alveolen handelte.

Das dichte Lungengewebe wurde wiederum in drei Kategorien unterteilt:

1. Keine apoptotischen Zellen im Counting Frame auszählbar
2. Eine bis fünf apoptotischen Zellen im Counting Frame auszählbar
3. Mehr als fünf apoptotischen Zellen im Counting Frame auszählbar (siehe Abbildung 16).

Die Alveolarzellen wurden innerhalb der Counting Frames in apoptotische oder nicht-apoptotische Zellen eingeteilt. Es wurden nur Zellen berücksichtigt – apoptotische und nicht-apoptotische, die von den gleichmäßig angeordneten Linien (testlines) gekreuzt wurden. Aus dem Verhältnis dieser Zahlen (apoptotische Zellen/[apoptotische und nicht-apoptotische Zellen]) ließ sich der prozentuale Anteil der Alveolaroberfläche mit apoptotischen Zellen berechnen.

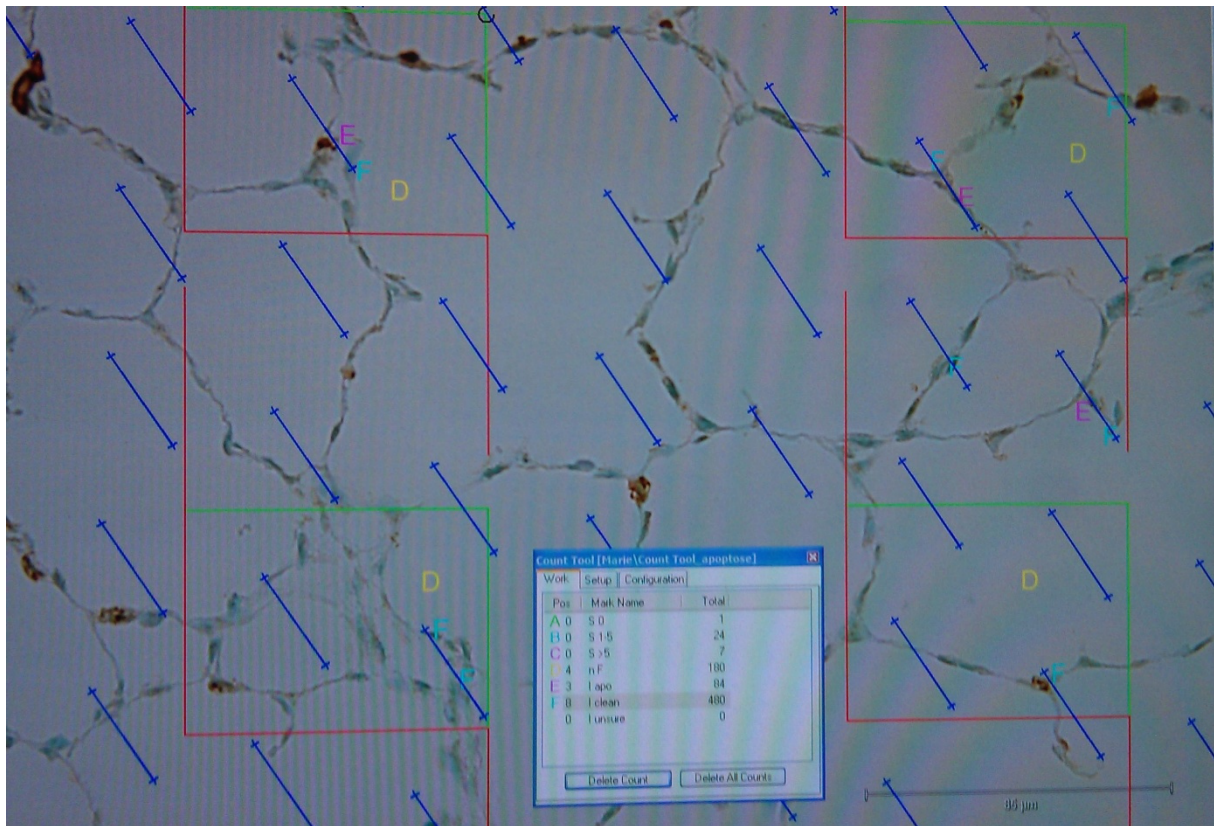


Abbildung 14: Auswertung der Alveolarzellen mittels newCAST Plus Software  
 A,B und C: Einteilung von apoptotischen Alveolarzellen in dichtem Lungengewebe (hier nicht zu sehen) in die 3 verschiedenen Kategorien; D: auswertbare Counting Frames (Linien kreuzen Alveolarzellen); E: apoptotische Alveolarzellen; F: nicht-apoptotische Alveolarzellen

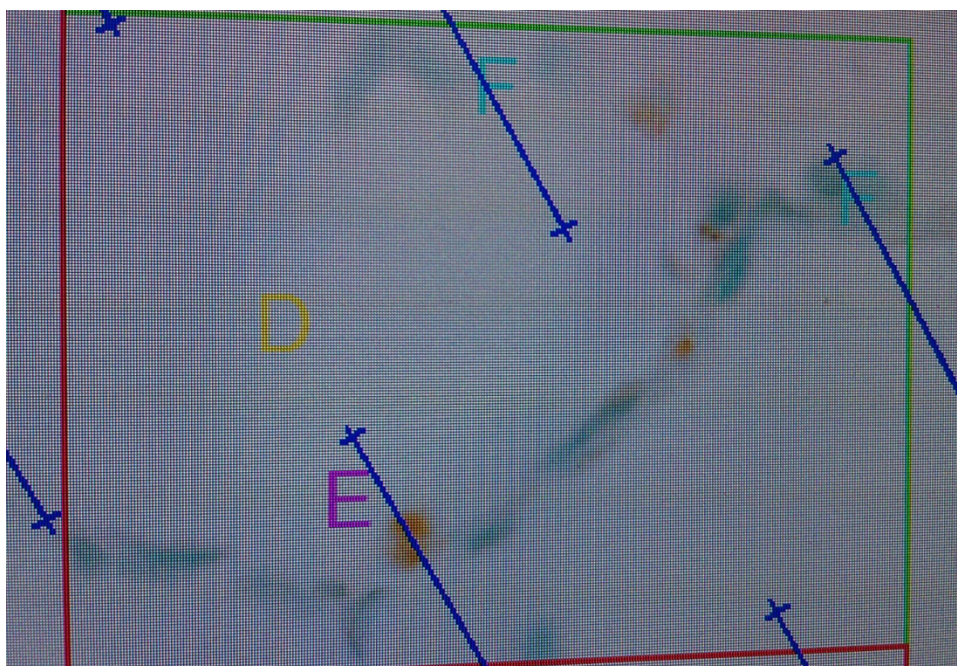


Abbildung 15: Vergrößerung eines auswertbaren Counting Frame  
 D: auswertbarer Counting Frame (Linien kreuzen Alveolarzellen); E: apoptotische Alveolarzelle; F: nicht-apoptotische Alveolarzellen



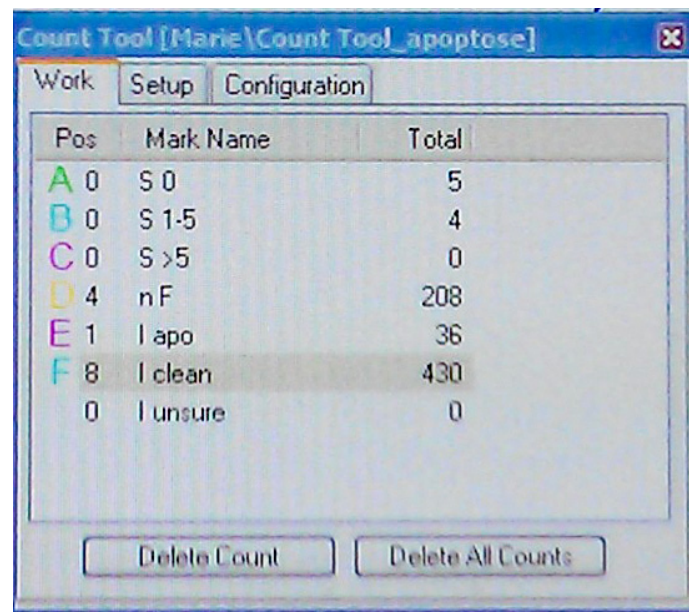


Abbildung 16: Zählwerkzeug der newCAST Plus Software

A,B und C: Kategorien für apoptotische Alveolarzellen in dichtem Lungengewebe (je Counting Frame Einteilung in Kategorie 1: keine apoptotischen Zellen, 2: 1-5 apoptotische Zellen und 3: >5 apoptotische Zellen)

## 2.9.2. Zellen der Bronchoalveolären Lavages

Die Zellen der Bronchoalveolären Lavages wurden nach Färbung mittels ApopTag® Peroxidase in Situ Apoptosis Detection Kit von Millipore® am Mikroskop Olympus BX51 (Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland) wie folgt ausgezählt und eingeteilt.

Mit Hilfe des elektronischen Blutbild-Differenziergeräts (Counter AC-8, Assistent 345, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön, Deutschland) (siehe Abbildung 17) wurden 200 Zellen einer Probe durch systematische Felderung ausgezählt und in die folgenden 6 Kategorien anhand der Zellgröße und der Zellmorphologie eingeteilt:

Apoptotische und nicht-apoptotische Monozyten (Alveolarmakrophagen, bis 20µm)

Apoptotische und nicht-apoptotische Granylozyten (segmentierter Zellkern, 10-12µm)

Apoptotische und nicht-apoptotische Lymphozyten (mononukleäre Zellen, 4-7µm), (Lüllmann-Rauch R, 2009).

Anhand der bräunlichen Farbe durch die TUNEL-Färbung wurden die apoptotischen von den nicht-apoptotischen Zellen abgegrenzt. Eine Übersicht über die angefärbten apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen zeigen die Abbildungen 18 und 19.



Abbildung 17: Blutbild-Differenziergerät

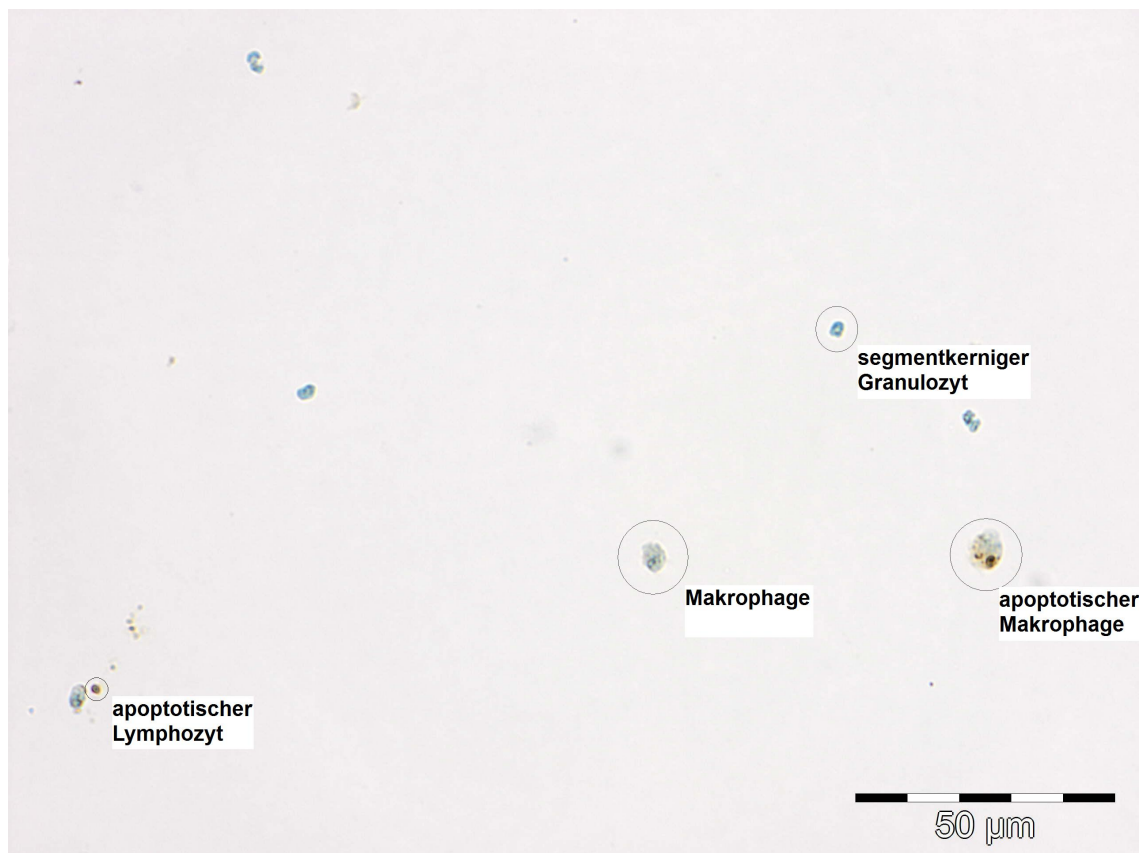


Abbildung 18: Übersicht über die angefärbten Zellen in der BAL-Flüssigkeit

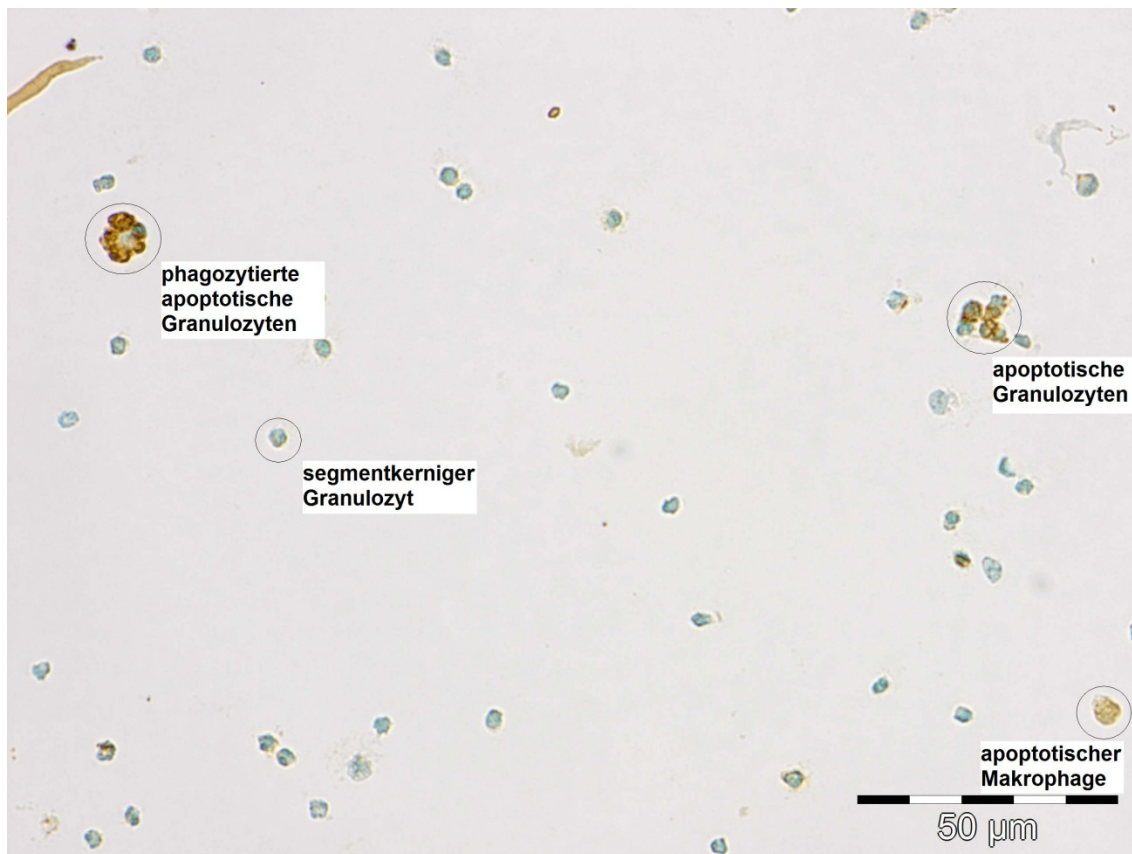


Abbildung 19: Übersicht über die angefärbten Zellen in der BAL-Flüssigkeit

## 2.10. Statistische Methoden

Der Kolmogorov-Smirnov-Test ist ein statistisches Verfahren, mit welchem sich beurteilen lässt, ob die Verteilung der an einer Stichprobe erhobenen Werte signifikant von einer Normalverteilung abweicht. Bei einem  $p > 0,1$  wurde die Normalverteilung der Messdaten angenommen. Dies gilt für die folgenden Analysen: Zellzahl in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit, Lungengewicht, saure Sphingomyelinase-Aktivität und Ceramid-Konzentration im Lungengewebe, Apoptotische Zellen in der BALF, alveolarepitheliale Zellen in luftgefüllten Alveolen und dichtem Lungengewebe.

Die normal-verteilten Parameter wurden mit Hilfe der Varianzanalyse, genauer der one-way analysis of variance (ANOVA) untersucht. Diese Methode untersucht den Einfluss einer unabhängigen Variablen auf ihre Zielgröße.

Für Vergleiche der Untergruppen wurde bei den parametrischen Daten der Bonferroni posthoc-Test angewendet. Mit Hilfe der Bonferroni-Methode wird das Signifikanzniveau an die Anzahl der durchgeführten Tests angepasst. Mit Hilfe dieser

Analysen wurden das Lungengewicht, die Aktivität der sauren Sphingomyelinase und die Ceramid-Konzentration untersucht.

Um signifikante Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen zu finden, wurden die Gruppen mit Surfactant 200mg/kg, Surfactant plus Myo-Inositol-1,2,6-Triphosphat (S+IP3), Surfactant plus Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat (S+PIP2), Surfactant plus 16:0/18:1-Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylglycerol (S+POPG) und Surfactant plus 18:1/18:1-Di-Oleoyl-Phosphatidylglycerol (S+DOPG) jeweils mit der Surfactant 50mg/kg-Gruppe (S50 = Kontrollgruppe) verglichen.

Für den Vergleich von Mittelwerten der ordinalskalierten Variablen von mehr als zwei unabhängigen Versuchsgruppen eignet sich der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test im Rahmen der Varianzanalyse. Es wird untersucht, ob es in einer Gruppe von Mittelwerten signifikante Unterschiede gibt. Dieser Test wurde zum Vergleich aller Interventionsgruppen eingesetzt. Für die statistische Auswertung der Zellen aus den bronchoalveolären Lavages wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet, ebenso bei der Auswertung der Alveolarepithelialzellen in den entfalteten und luftgefüllten Alveolen. Für Vergleiche zwischen den Subgruppen wurde der Dunn posthoc-Test genutzt.

Der nicht-parametrische Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ -Test) dient dem Vergleich der Verteilung einer nominalen Zufallsvariablen zwischen den unterschiedlichen Ausprägungen eines anderen nominalen Merkmals. Er untersucht damit nominale Daten, die durch die Einteilung in Kategorien messbar gemacht werden, in mehr als zwei Versuchsgruppen. Bei der Auswertung der Alveolarepithelialzellen in atelektatischem Lungengewebe wurde der Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ -Test) eingesetzt.

Das Signifikanzniveau oder die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt.

Die graphische Darstellung der überwiegenden Daten erfolgte in Form von Box-Whisker-Plots, die mit der Software GraphPad Prism5 (La Jolla, California USA) erstellt wurden. Diese Darstellung erlaubt eine Einschätzung, ob die Verteilung der Daten schief ist oder ob es Ausreißer gibt und eignet sich zum Vergleich mehrerer Stichproben. Der Median wird als vertikale Linie innerhalb der Box dargestellt. Die Whisker erstrecken sich vom kleinsten bis zum größten Messwert.

Messwerte und Daten, die Kategorien zugeordnet werden konnten, erhielten hingegen eine Darstellung als Streudiagramm oder sogenannte Punktwolke.

Die erhobenen klinischen Parameter (OI, VEI,  $C_{rs}$ ,  $R_{rs}$ , EVLWI) wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Mit Hilfe der Software SPSS (Version 22, IBM, Ehningen, Deutschland) wurden die wiederholten Messwerte analysiert (repeated-measures linear mixed model option). Im nächsten Schritt wurden die t-Tests durchgeführt, wenn der Gesamtvergleich eine signifikante Wirkung der Interventionen zeigte. Es ist das Testverfahren der Wahl für den Vergleich des unbekannten Erwartungswertes einer Normalverteilung mit einem vorgegebenen Referenzwert. (Caliebe et al., 2013)

Um die Interventionsunterschiede im zeitlichen Verlauf nach den schädigenden Prozeduren an der Lunge der Versuchstiere laut Studienprotokoll besser zuordnen zu können, wurden drei Zeitintervalle einzeln betrachtet:

Intervall 1: 4-24h (Nach wiederholter Lavage der Luftwege zum Zeitpunkt 0h)

Intervall 2: 28-48h (Nach schädigender Beatmung zum Zeitpunkt 24-26h)

Intervall 3: 52-72h (Nach intratrachealer Applikation von LPS zum Zeitpunkt 48h)

Dabei wurden zwei Faktoren mit Hilfe der two-way ANOVA untersucht: zum einen die Zeit (unabhängige Variable) und zum anderen die Wirkung der Behandlung (abhängige Variable). Bei der Analyse der Interaktion zwischen diesen beiden Faktoren konnte immer die Nullhypothese bestätigt werden, dass keine Abhängigkeit zwischen den beiden genannten Faktoren existiert.

### **3. Ergebnisse**

Die 59 in die Studie eingeschlossenen Ferkel wurden, wie im Studienprotokoll unter Punkt 2.2. beschrieben, untersucht und behandelt. Acht zusätzliche Ferkel dienten als gesunde Referenz (HC: Healthy Control). Diese Ferkel wurden nicht lungenschädigend behandelt und erhielten zudem keine Behandlung durch die Testsubstanzen. Bei ihnen wurden dieselben im Studienprotokoll genannten klinischen Parameter und Messwerte, wie bei den Versuchstieren, erhoben.

Um die Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen zu prüfen, wurden bei allen Tieren der Interventionsgruppen zu Beginn des lungenschädigenden Studienprotokolls folgende Parameter analysiert: Alter der Ferkel, Geschlecht, Körpergewicht, Gewichtszunahme über 76h (Dauer des Studienprotokolls), Urinproduktion, Anzahl der

bronchoalveolären Lavages (bis eine  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  von 100-120mmHg erreicht wurde) und der Flüssigkeitsverlust über die Luftwege bei der Durchführung der Lavages. Die Merkmale Alter, Lavages und Flüssigkeitsverlust wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test und die Merkmale Gewicht, Gewichtszunahme und Urinproduktion wurden mit der Varianzanalyse (one-way ANOVA) analysiert. Es zeigten sich in dieser Analyse keine signifikanten Abweichungen, sodass von einer Vergleichbarkeit der Interventionsgruppen ausgegangen wurde. Siehe dazu Tabelle 2: Vergleichbarkeit der Interventionsgruppen.

Gruppen	C	S50	S200	S+IP3	S+PIP2	S+POPG	S+DOPG	HC	p-Wert
Anzahl der Ferkel (n)	8	8	3	8	8	8	8	8	-
Geschlecht (weiblich:männlich, n)	4:4	1:7	2:1	2:6	3:5	2:6	2:6	2:6	-
Alter (Tage)	3,6 ± 0,3	3,6 ± 0,3	3,6 ± 0,4	3,1 ± 0,3	3,1 ± 0,3	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,3	3,5 ± 0,2	0,88
Gewicht (kg)	2,32 ± 0,05	2,44 ± 0,04	2,42 ± 0,12	2,37 ± 0,06	2,30 ± 0,06	2,42 ± 0,05	2,37 ± 0,05	2,42 ± 0,07	0,42
Gewichtszunahme (kg)	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,07 ± 0,04	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	-	0,07
Urinproduktion ( $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	1,9 ± 0,1	2,4 ± 0,3	2,0 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,4	-	0,88
Lavages (n)	16,8 ± 1,5	16,0 ± 2,0	15,3 ± 7,6	17,8 ± 1,4	16,7 ± 2,5	18,2 ± 0,9	16,5 ± 1,5	-	0,72
Flüssigkeitsverlust ( $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	39 ± 5	31 ± 2	37 ± 5	32 ± 2	32 ± 7	34 ± 2	35 ± 5	-	0,53

Die Zahlenwerte sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Die Merkmale Alter, Lavages und Flüssigkeitsverlust wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test und die Merkmale Gewicht, Gewichtszunahme und Urinproduktion wurden mit der Varianzanalyse (one-way ANOVA) analysiert.

Tabelle 2: Vergleichbarkeit der Interventionsgruppen

Zur Beurteilung der Lungenfunktion werden zunächst der Oxygenierungsindex, der Ventilationseffizienzindex, die Compliance und Resistance des respiratorischen Systems, der Extravaskuläre Lungenwasserindex und das Lungengewicht betrachtet.

### 3.1. Oxygenierungsindex

Der Oxygenierungsindex (siehe Abbildung 20) zeigt zunächst einen starken Anstieg der Messwerte von ~79% nach der ersten Lungenschädigung (wiederholte bronchoalveoläre Lavages). Nach der ersten Gabe der Testsubstanzen zum Zeitpunkt 2h fällt der Oxygenierungsindex um ~43%. Diesen Effekt sieht man ebenso nach der zweiten Gabe der Testsubstanzen. Die S200-Gruppe zeigt allerdings nach der 2. Lungenschädigung den auffälligsten Anstieg des Oxygenierungsindex mit einem maximalen Wert von 17,1 bei 52h. Die Werte bleiben in dieser Gruppe bis zum Ende des Studienprotokolls hoch. Nach der dritten Lungenschädigung zum Zeitpunkt 48h (intratracheale Gabe von LPS) und der dritten Gabe der Substanzen kann man einen weiteren starken Anstieg des Oxygenierungsindex in der Kontrollgruppe und der S50-Gruppe beobachten. Dagegen hält sich der Oxygenierungsindex der Interventionsgruppen S+IP3, S+DOPG, S+POPG und S+PIP2 zum Ende des Studienprotokolls stabil niedrig, vor allem in der S+IP3-Gruppe. Der Anfangswert des Oxygenierungsindex von 2,4 ( $\text{MAP} \times \% \text{O}_2 / \text{PaO}_2$ ) wurde jedoch nicht mehr erreicht. Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test) zwischen den Interventionsgruppen zeigten sich im Intervall 1 (4-24h) mit  $p=0,003$  und im Intervall 3 (52-72h) mit  $p=0,000$ .  
Intervall 1: S50 gegenüber S+IP3  $p=0,007$ ; S50 gegenüber S+PIP2  $p=0,021$ ; S50 gegenüber S+POPG  $p=0,002$ ; S50 gegenüber S+DOPG  $p=0,001$ .  
Intervall 3: S50 gegenüber S+IP3  $p=0,000$ ; S50 gegenüber S+PIP2  $p=0,002$ ; S50 gegenüber S+POPG  $p=0,000$ ; S50 gegenüber S+DOPG  $p=0,000$ .  
Im Intervall 3 des Oxygenierungsindex stellten sich signifikante Effekte des Faktors Zeit in der Analyse heraus mit  $p=0,021$ .



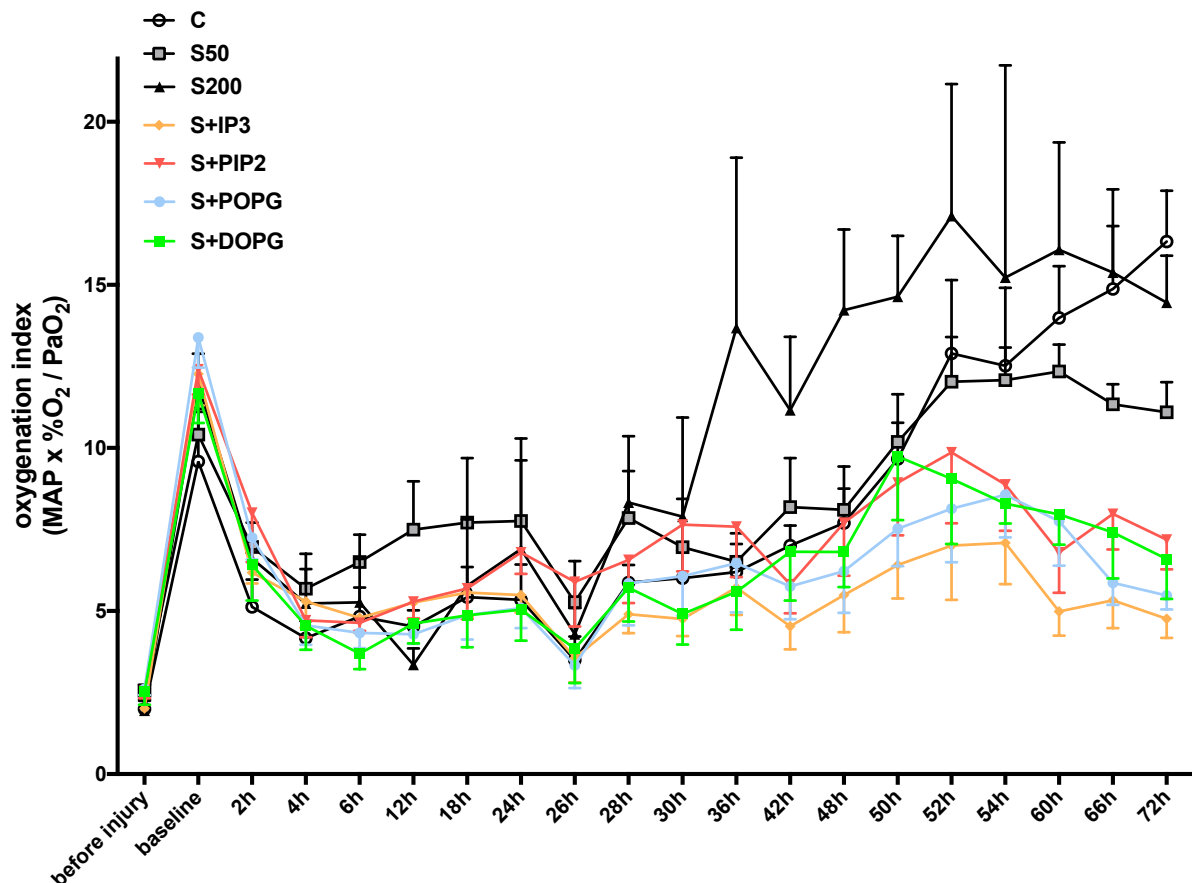


Abbildung 20: Oxygenierungsindex

Der Oxygenierungsindex wurde wiederholt während der mechanischen Beatmung gemessen: vor der Lungenschädigung (before injury), direkt nach der wiederholten bronchoalveolären Lavage (baseline-Messung) und für weitere 72h. Die drei Lungenschädigungen fanden zu folgenden Zeitpunkten statt: 1. Wiederholte bronchoalveoläre Lavage direkt vor der baseline-Messung, 2. Die schädigende Beatmung zum Zeitpunkt 24-26h und 3. Die intratracheale Gabe von LPS zum Zeitpunkt 48h. Die drei Interventionen mit der Gabe der verschiedenen Wirkstoffe (S50, S200, S+IP3, S+PIP2, S+POPG, S+DOPG) erfolgten zu den Zeitpunkten 2h, 26h und 50h. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 8$  Tiere pro Gruppe (Ausnahme S200-Gruppe mit  $n = 3$  Tieren). Interventionsgruppen: C: Kontrollgruppe, S50: 50mg/kg Surfactant, S200: 200mg/kg Surfactant, S+IP3: Surfactant + Inositol-1,2,6-Triphosphat, S+PIP2: Surfactant + Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat, S+POPG: Surfactant + Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerol, S+DOPG: Surfactant + Dioleoyl-Phosphatidylglycerol.

### 3.2. Ventilationseffizienzindex

Der Ventilationseffizienzindex (siehe Abbildung 21) zeigt nach der ersten Lungenschädigung zum Zeitpunkt 0h einen steilen Abfall aller Studiengruppen um  $\sim 72\%$ . Nach der ersten Applikation der Testsubstanzen wird eine dezente



Verbesserung des Ventilationseffizienzindexes erhoben. Deutlicher wird die Verbesserung des Indexes nach der zweiten und dritten Gabe der Substanzen in den Interventionsgruppen S+IP3, S+PIP2, S+POPG und S+DOPG. Die größte Verbesserung des Ventilationseffizienzindexes konnte in den Gruppen S+IP3 und S+POPG beobachtet werden. Dagegen zeigen die übrigen Gruppen C, S50 und S200 nach der zweiten Lungenschädigung nur eine kleine Verbesserungstendenz und nach der dritten Lungenschädigung bis zum Studienende keine Erholung dieses Parameters mehr.

Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test) zwischen den Interventionsgruppen zeigten sich im Intervall 1 (4-24h) mit  $p=0,001$ , Intervall 2 (28-48h) mit  $p=0,026$  und im Intervall 3 (52-72h) mit  $p=0,000$ .

Intervall 1: S50 gegenüber S+IP3  $p=0,000$ ; S50 gegenüber S+PIP2  $p=0,012$ ; S50 gegenüber S+POPG  $p=0,000$ ; S50 gegenüber S+DOPG  $p=0,021$ .

Intervall 2: S50 gegenüber S+IP3  $p=0,011$ ; S50 gegenüber S+PIP2  $p=0,001$ ; S50 gegenüber S+POPG  $p=0,009$ ; S50 gegenüber S+DOPG  $p=0,018$ .

Intervall 3: S50 gegenüber S+IP3  $p=0,009$ ; S50 gegenüber S+PIP2  $p=0,088$ ; S50 gegenüber S+POPG  $p=0,002$ ; S50 gegenüber S+DOPG  $p=0,097$ .

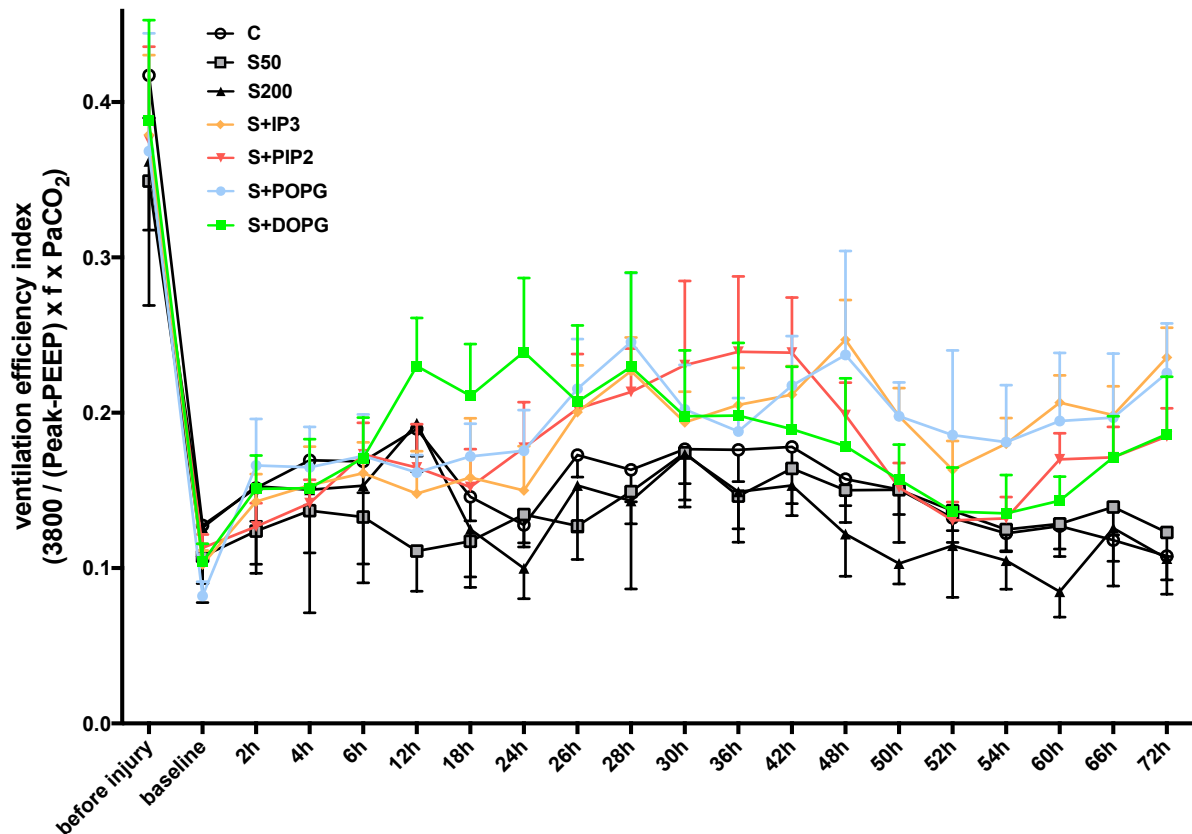


Abbildung 21: Ventilationseffizienzindex

Der Ventilationseffizienzindex wurde wiederholt während der mechanischen Beatmung gemessen: vor der Lungenschädigung (before injury), direkt nach der wiederholten bronchoalveolären Lavage (baseline-Messung) und für weitere 72h. Die drei Lungenschädigungen fanden zu folgenden Zeitpunkten statt: 1. Wiederholte bronchoalveoläre Lavage direkt vor der baseline-Messung, 2. Die schädigende Beatmung zum Zeitpunkt 24-26h und 3. Die intratracheale Gabe von LPS zum Zeitpunkt 48h. Die drei Interventionen mit der Gabe der verschiedenen Wirkstoffe (S50, S200, S+IP3, S+PIP2, S+POPG, S+DOPG) erfolgten zu den Zeitpunkten 2h, 26h und 50h. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 8$  Tiere pro Gruppe (Ausnahme S200-Gruppe mit  $n = 3$  Tieren). Interventionsgruppen: C: Kontrollgruppe, S50: 50mg/kg Surfactant, S200: 200mg/kg Surfactant, S+IP3: Surfactant + Inositol-1,2,6-Triphosphat, S+PIP2: Surfactant + Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat, S+POPG: Surfactant + Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerol, S+DOPG: Surfactant + Dioleoyl-Phosphatidylglycerol.

### 3.3. Spezifische Compliance des respiratorischen Systems

Die spezifische Compliance des respiratorischen Systems (siehe Abbildung 22), die unter der laufenden kontrollierten mechanischen Beatmung gemessen wurde, zeigt nach der ersten Lungenschädigung mit wiederholten bronchoalveolären Lavages einen starken Abfall um  $\sim 53\%$  mit einer Erholung in allen Gruppen, wobei der

Ausgangswert von  $\sim 0,99$  nicht annähernd erreicht wird. Die S200-Gruppe erreicht vor der zweiten Lungenschädigung der schädigenden Beatmung nahezu das Ausgangsniveau, bevor die Kurve dann steil abfällt und bis zum Studienende keine Verbesserung mehr zeigt. Signifikante Verbesserungen der Compliance zeigen sich vor allem in den Interventionsgruppen S+IP3 und S+POPG zum Studienende. Die Gruppen S+PIP2 und S+DOPG weisen am dritten Tag eine bessere Compliance auf als die S50-, die S200- und die Kontrollgruppe, erreichen aber nicht den Wert der S+IP3- und der S+POPG-Gruppe.

Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test) zwischen den Interventionsgruppen zeigten sich im Intervall 1 (4-24h) mit  $p=0,011$ , Intervall 2 (28-48h) mit  $p=0,003$  und im Intervall 3 (52-72h) mit  $p=0,000$ .

Intervall 1: S50 gegenüber S+IP3  $p=0,776$ ; S50 gegenüber S+PIP2  $p=0,265$ ; S50 gegenüber S+POPG  $p=0,019$ ; S50 gegenüber S+DOPG  $p=0,009$ .

Intervall 2: S50 gegenüber S+IP3  $p=0,581$ ; S50 gegenüber S+PIP2  $p=0,732$ ; S50 gegenüber S+POPG  $p=0,053$ ; S50 gegenüber S+DOPG  $p=0,456$ .

Intervall 3: S50 gegenüber S+IP3  $p=0,057$ ; S50 gegenüber S+PIP2  $p=0,054$ ; S50 gegenüber S+POPG  $p=0,011$ ; S50 gegenüber S+DOPG  $p=0,062$ .

Es stellten sich zudem signifikante Effekte (two-way ANOVA) des Faktors Zeit bei der Untersuchung der spezifischen Compliance des respiratorischen Systems (Crs) im Intervall 3 heraus mit  $p=0,005$ .

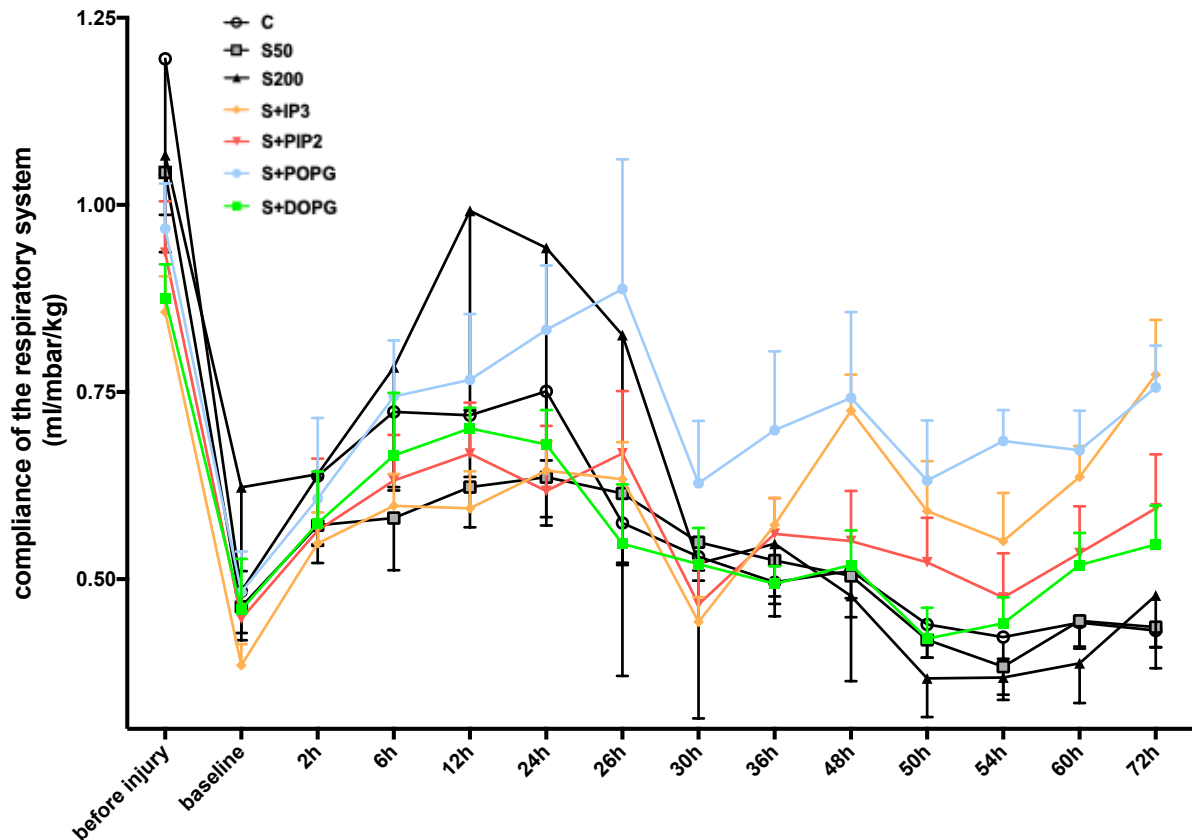


Abbildung 22: Compliance des respiratorischen Systems

Die Compliance des respiratorischen Systems wurde wiederholt während der mechanischen Beatmung gemessen: vor der Lungenschädigung (before injury), direkt nach der wiederholten bronchoalveolären Lavage (baseline-Messung) und für weitere 72h. Die drei Lungenschädigungen fanden zu folgenden Zeitpunkten statt: 1. Wiederholte bronchoalveoläre Lavage direkt vor der baseline-Messung, 2. Die schädigende Beatmung zum Zeitpunkt 24-26h und 3. Die intratracheale Gabe von LPS zum Zeitpunkt 48h. Die drei Interventionen mit der Gabe der verschiedenen Wirkstoffe (S50, S200, S+IP3, S+PIP2, S+POPG, S+DOPG) erfolgten zu den Zeitpunkten 2h, 26h und 50h. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 8$  Tiere pro Gruppe (Ausnahme S200-Gruppe mit  $n = 3$  Tieren). Interventionsgruppen: C: Kontrollgruppe, S50: 50mg/kg Surfactant, S200: 200mg/kg Surfactant, S+IP3: Surfactant + Inositol-1,2,6-Triphosphat, S+PIP2: Surfactant + Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat, S+POPG: Surfactant + Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerol, S+DOPG: Surfactant + Dioleoyl-Phosphatidylglycerol.

### 3.4. Resistance des respiratorischen Systems

Die Resistance des respiratorischen Systems (siehe Abbildung 23) steigt nach der ersten Lungenschädigung zunächst in allen Gruppen um  $\sim 21\%$  leicht an. Nach der zweiten Lungenschädigung lässt sich ein steiler Anstieg der Resistance insbesondere in den Gruppen C, S50, S200 und S+DOPG um fast 50% erkennen. Die übrigen

Interventionsgruppen zeigen einen weniger steilen Anstieg ( $\sim 27\%$ ) und damit eine geringere Verschlechterung der Resistance. Dieser steile Anstieg ist direkt durch die lungenschädigende Beatmung zu erklären. Nach der zweiten Gabe der Wirkstoffe verbessert sich die Resistance in allen Gruppen. Diese Verbesserung hält insbesondere in den Gruppen S+IP3, S+PIP2, S+POPG und S+DOPG auch nach der dritten Lungenschädigung und Applikation der Testsubstanzen an. Am Ende des Studienprotokolls zeigen vor allem die Kontrollgruppe, weniger stark die S50- und die S200-Gruppe eine deutliche Verschlechterung der Resistance gegenüber den anderen Gruppen und gegenüber dem Ausgangswert an.

Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test) zwischen den Interventionsgruppen zeigten sich nur im Intervall 3 (52-72h) mit  $p=0,000$ .

Intervall 3: S50 gegenüber S+IP3  $p=0,000$ ; S50 gegenüber S+PIP2  $p=0,004$ ; S50 gegenüber S+POPG  $p=0,002$ ; S50 gegenüber S+DOPG  $p=0,016$ .

Es zeigte sich ein signifikanter Effekt des Faktors Zeit bei der Untersuchung der Resistance des respiratorischen Systems ( $R_{rs}$ ) im Intervall 1 mit  $p=0,006$  (two-way ANOVA).

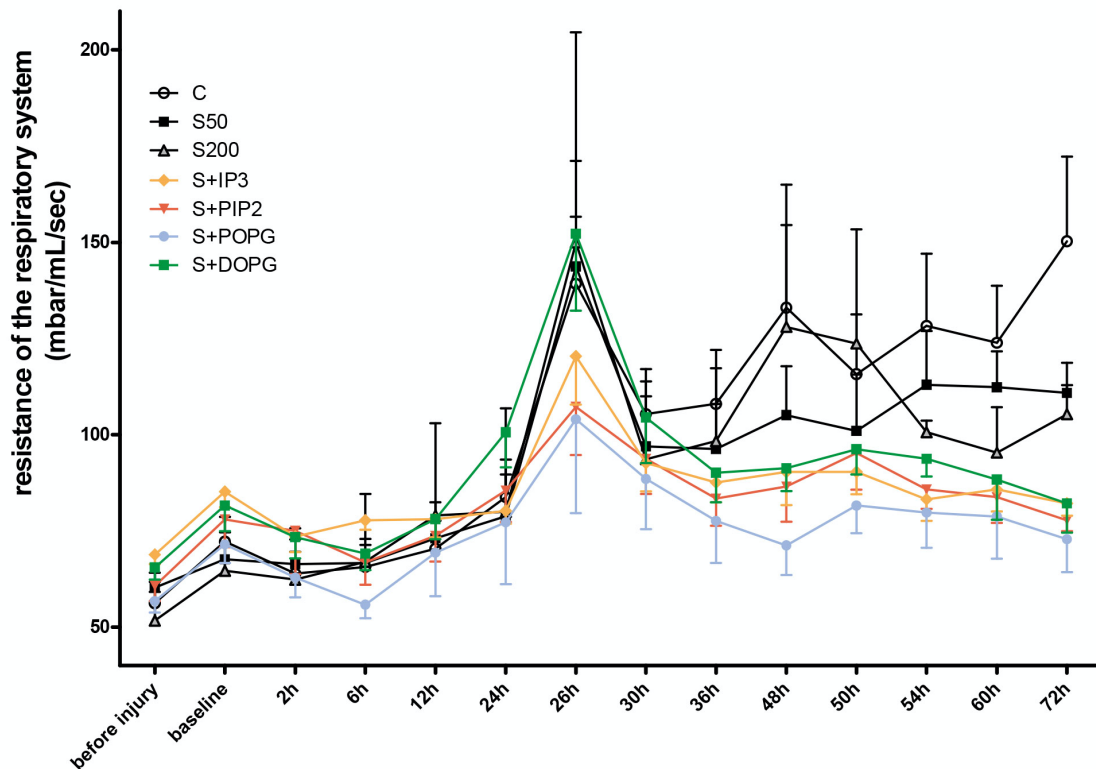


Abbildung 23: Resistance des respiratorischen Systems

Die Resistance des respiratorischen Systems wurde wiederholt während der mechanischen Beatmung gemessen: vor der Lungenschädigung (before injury), direkt nach der wiederholten bronchoalveolären Lavage (baseline-Messung) und für weitere 72h. Die drei Lungenschädigungen fanden zu folgenden Zeitpunkten statt: 1. Wiederholte bronchoalveoläre Lavage direkt vor der baseline-Messung, 2. Die schädigende Beatmung zum Zeitpunkt 24-26h und 3. Die intratracheale Gabe von LPS zum Zeitpunkt 48h. Die drei Interventionen mit der Gabe der verschiedenen Wirkstoffe (S50, S200, S+IP3, S+PIP2, S+POPG, S+DOPG) erfolgten zu den Zeitpunkten 2h, 26h und 50h. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n = 8 Tiere pro Gruppe (Ausnahme S200-Gruppe mit n = 3 Tieren). Interventionsgruppen: C: Kontrollgruppe, S50: 50mg/kg Surfactant, S200: 200mg/kg Surfactant, S+IP3: Surfactant + Inositol-1,2,6-Triphosphat, S+PIP2: Surfactant + Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat, S+POPG: Surfactant + Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerol, S+DOPG: Surfactant + Dioleoyl-Phosphatidylglycerol.

### 3.5. Extravaskulärer Lungenwasserindex

Der extravaskuläre Lungenwasserindex (EVLWI) (siehe Abbildung 24) zeigt nach der ersten Lungenschädigung einen starken Anstieg um  $\sim 56\%$  und mit der ersten Gabe der Substanzen einen Rückgang um  $\sim 28\%$ , der im weiteren Verlauf in den Gruppen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. So halten sich die Werte in der S+IP3- und der S+POPG-Gruppe über die gesamte Protokollzeit stabil niedrig. In der S+IP3-Gruppe

lassen sich zwischen 6 und 36h sehr niedrige Werte (unter dem Ausgangswert von  $\sim 12\text{ml/kg}$ ) für den extravaskulären Lungenwasserindex beobachten. Die Werte für den EVLWI in den Gruppen S50, S200, S+PIP2 und S+DOPG zeigen sich im Mittelfeld relativ stabil ab 4h über die gesamte Versuchszeit. Die höchsten Werte lassen sich in der Kontrollgruppe feststellen, die sich nach der dritten Lungenschädigung nochmal bis zum Studienende verschlechtern (maximal  $32\text{ml/kg}$ ).

Statistisch signifikante Unterschiede (t-Test) zwischen den Interventionsgruppen zeigten sich im Intervall 1 (4-24h) mit  $p=0,000$ , Intervall 2 (28-48h) mit  $p=0,000$  und im Intervall 3 (52-72h) mit  $p=0,000$ .

Intervall 1: S50 gegenüber S+IP3  $p=0,000$ ; S50 gegenüber S+PIP2  $p=0,131$ ; S50 gegenüber S+POPG  $p=0,000$ ; S50 gegenüber S+DOPG  $p=0,008$ .

Intervall 2: S50 gegenüber S+IP3  $p=0,002$ ; S50 gegenüber S+PIP2  $p=0,083$ ; S50 gegenüber S+POPG  $p=0,000$ ; S50 gegenüber S+DOPG  $p=0,009$ .

Intervall 3: S50 gegenüber S+IP3  $p=0,000$ ; S50 gegenüber S+PIP2  $p=0,159$ ; S50 gegenüber S+POPG  $p=0,000$ ; S50 gegenüber S+DOPG  $p=0,035$ .

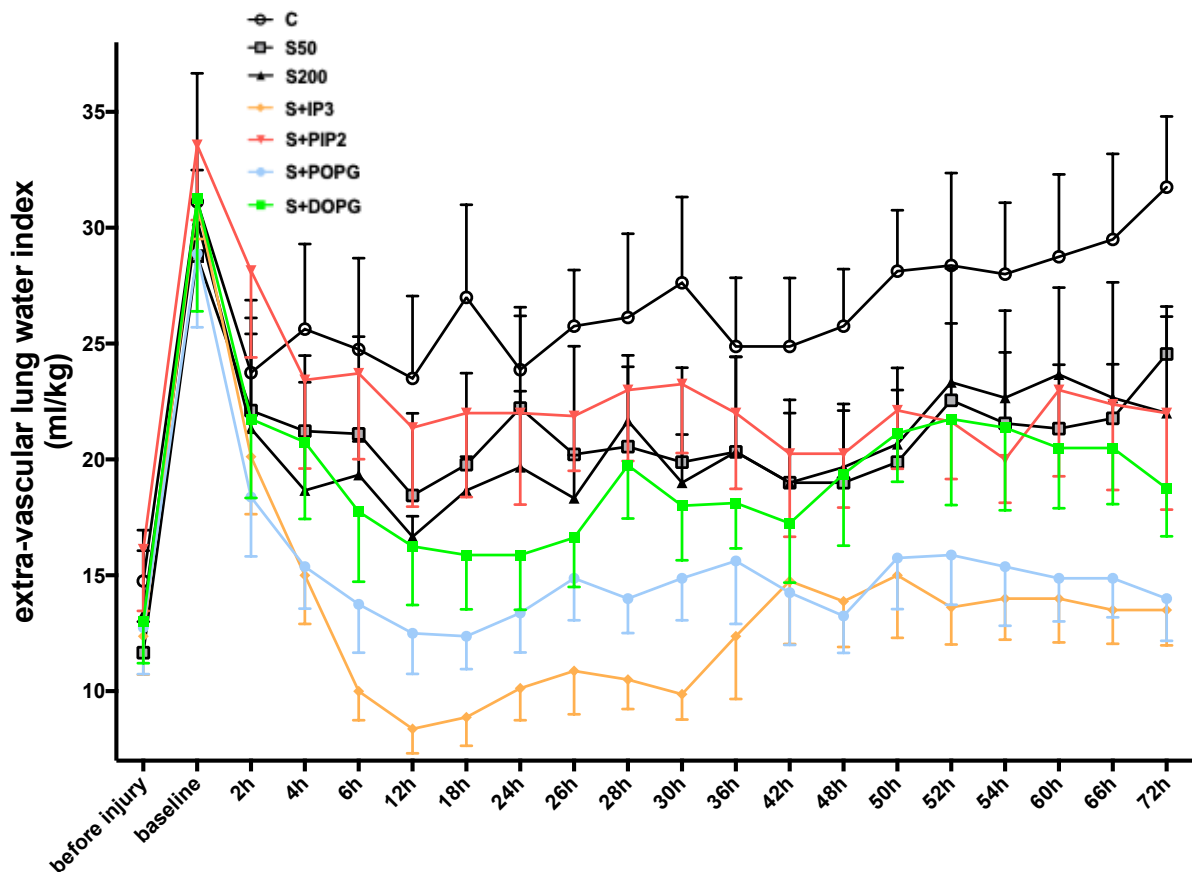


Abbildung 24: Extravaskulärer Lungenwasserindex

Der Extravaskuläre Lungenwasserindex wurde wiederholt während der mechanischen Beatmung gemessen: vor der Lungenschädigung (before injury), direkt nach der wiederholten bronchoalveolären Lavage (baseline-Messung) und für weitere 72h. Die drei Lungenschädigungen fanden zu folgenden Zeitpunkten statt: 1. Wiederholte bronchoalveoläre Lavage direkt vor der baseline-Messung, 2. Die schädigende Beatmung zum Zeitpunkt 24-26h und 3. Die intratracheale Gabe von LPS zum Zeitpunkt 48h. Die drei Interventionen mit der Gabe der verschiedenen Wirkstoffe (S50, S200, S+IP3, S+PIP2, S+POPG, S+DOPG) erfolgten zu den Zeitpunkten 2h, 26h und 50h. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 8$  Tiere pro Gruppe (Ausnahme S200-Gruppe mit  $n = 3$  Tieren). Interventionsgruppen: C: Kontrollgruppe, S50: 50mg/kg Surfactant, S200: 200mg/kg Surfactant, S+IP3: Surfactant + Inositol-1,2,6-Triphosphat, S+PIP2: Surfactant + Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat, S+POPG: Surfactant + Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerol, S+DOPG: Surfactant + Dioleoyl-Phosphatidylglycerol.

### 3.6. Lungengewicht

Das Lungengewicht (siehe Abbildung 25) wurde nach Studienende bestimmt, nachdem die Lungen den Ferkeln entnommen und sämtliches Blut der Lungengefäße entfernt worden war. Zum Vergleich wurden die Lungengewichte der gesunden Ferkel ermittelt. Diese waren mit 40,35g als Mittelwert (36,8g - 46,3g) deutlich geringer als



die Lungengewichte der Ferkel, die der dreifachen Lungenschädigung zugeführt wurden. Die Kontrollgruppe ergab im Mittel ein Lungengewicht von 75,4g (63,5g - 86,9g). Die Interventionsgruppen S+IP3 und S+POPG heben sich signifikant mit ihrem relativ niedrigen Gewicht von den anderen Gruppen ab: S50 mit 77,1g (71,1g - 87,0g) gegenüber S+IP3 mit 64,4g (53,6g-74,9g) und S+POPG 63,5g (49,2g-73,0g) mit jeweils  $p < 0,05$ . Der Gesamtvergleich aller Interventionsgruppen (one way ANOVA) ergibt ein  $p = 0,013$  und ist damit statistisch signifikant.

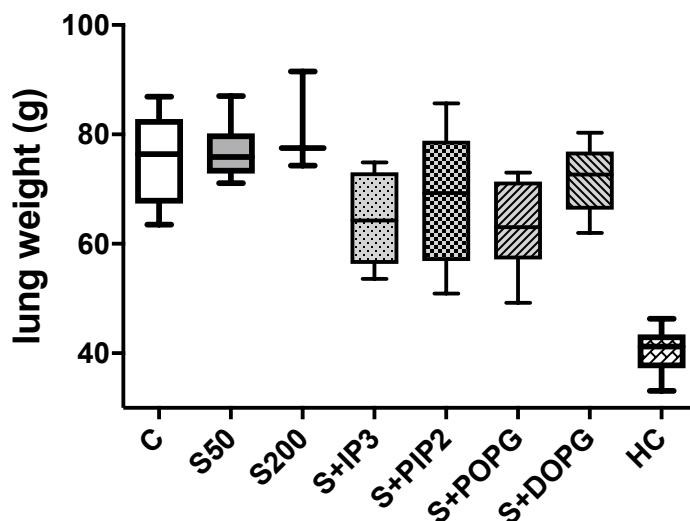


Abbildung 25: Lungengewicht

Das Lungengewicht wurde post mortem bestimmt, nachdem die Lungen entnommen und von dem Blut der Lungenzirkulation bereinigt wurde mit  $n = 8$  Tieren pro Gruppe (Ausnahme S200-Gruppe mit  $n = 3$  Tieren). Interventionsgruppen: C: Kontrollgruppe, S50: 50mg/kg Surfactant, S200: 200mg/kg Surfactant, S+IP3: Surfactant + Inositol-1,2,6-Triphosphat, S+PIP2: Surfactant + Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat, S+POPG: Surfactant + Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerol, S+DOPG: Surfactant + Dioleoyl-Phosphatidylglycerol, HC: Healthy control – Ferkel, die nicht dem lungenschädigenden Protokoll zugeführt wurden.

### 3.7. Zellzahl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die Zellkonzentration in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (siehe Abbildung 26) wurde für den Zeitpunkt vor der Lungenschädigung zu einem Wert aller an der Studie teilnehmenden Tiere ( $n = 51$ ) aller Gruppen zusammengefasst. Dies sind im Median 560 Zellen/ $\mu$ l (minimal 190 Zellen/ $\mu$ l – maximal 1640 Zellen/ $\mu$ l). Für den Zeitpunkt 72h wurden die Gruppen jeweils einzeln betrachtet. Signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test) zeigten sich zwischen den folgenden Gruppen: S50 mit 1630 Zellen/ $\mu$ l im

Median (minimal 920 Zellen/ $\mu$ l – maximal 2370 Zellen/ $\mu$ l) gegenüber S+IP3 mit 715 Zellen/ $\mu$ l im Median (minimal 480 Zellen/ $\mu$ l – maximal 930 Zellen/ $\mu$ l) mit  $p < 0,05$ , S50 gegenüber S+POPG mit 695 Zellen/ $\mu$ l im Median (minimal 450 Zellen/ $\mu$ l – maximal 2680 Zellen/ $\mu$ l) mit  $p < 0,05$  und S50 gegenüber S+DOPG mit 500 Zellen/ $\mu$ l im Median (300 Zellen/ $\mu$ l – 1710 Zellen/ $\mu$ l) mit  $p < 0,01$ . Die Kontroll-Gruppe und die S200-Gruppe zeigen am Ende des Studienprotokolls deutlich höhere Zellzahlen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit als die Interventionsgruppen: C mit 1145 Zellen/ $\mu$ l im Median (minimal 990 Zellen/ $\mu$ l – maximal 3920 Zellen/ $\mu$ l) und S200 mit 1680 Zellen/ $\mu$ l im Median (minimal 620 Zellen/ $\mu$ l – maximal 4840 Zellen/ $\mu$ l). Die Gruppe S+PIP2 mit 810 Zellen/ $\mu$ l im Median (minimal 590 Zellen/ $\mu$ l – maximal 1920 Zellen/ $\mu$ l) zeigt keinen signifikanten Unterschied gegenüber der S50-Gruppe.

Der Gesamtvergleich (Kruskal-Wallis-Test) aller Interventionsgruppen ergibt ein  $p=0,009$ .

Die Zelldifferenzierung der durch die bronchoalveolären Lavages gewonnenen Zellen ergab ein einheitliches Zellbild in allen Gruppen: Vor der Lungenschädigung enthielten die Lavageflüssigkeiten als Mittelwert 63,1% Monozyten, 33,1% Granulozyten und 3,4% Lymphozyten. Am Studienende enthielten die Lavageflüssigkeiten als Mittelwert 17,9% Monozyten, 79,9% Granulozyten und 2,0% Lymphozyten.

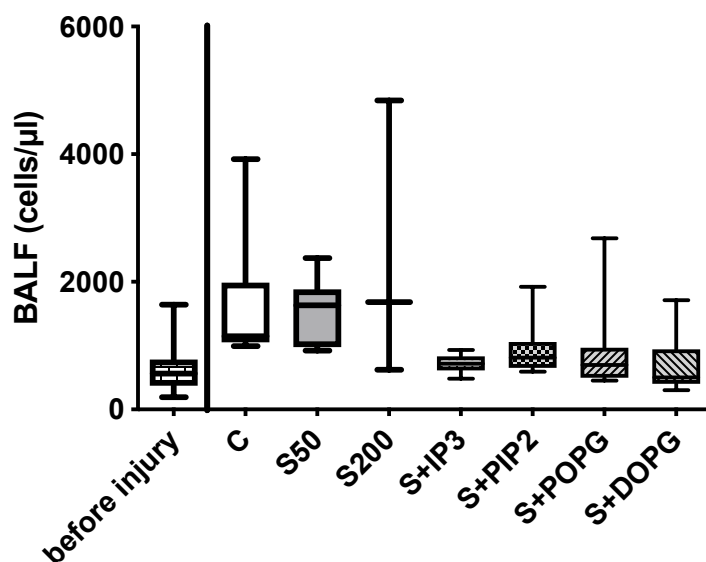


Abbildung 26: Anzahl der Zellen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die Zellkonzentration der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit vor der Lungenschädigung aller in die Studie eingeschlossener Tiere, zusammengefasst mit  $n = 51$  und die Zellkonzentration der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit nach 72h in der finalen diagnostischen Lavage, die verschiedenen

Studiengruppen einzeln dargestellt mit n = 8 Tieren pro Gruppe (Ausnahme S200-Gruppe mit n = 3 Tieren). Interventionsgruppen: C: Kontrollgruppe, S50: 50mg/kg Surfactant, S200: 200mg/kg Surfactant, S+IP3: Surfactant + Inositol-1,2,6-Triphosphat, S+PIP2: Surfactant + Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat, S+POPG: Surfactant + Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerol, S+DOPG: Surfactant + Dioleoyl-Phosphatidylglycerol.

### 3.8. Aktivität der sauren Sphingomyelinase

Die Aktivität der sauren Sphingomyelinase (aSMase) (siehe Abbildung 27) wurde in homogenisiertem Lungengewebe nach 72h am Studienende mit Hilfe des N-methyl-( $^{14}\text{C}$ )-sphingomyelin untersucht. In den Interventionsgruppen S+IP3 und S+PIP2 zeigten sich im Vergleich zur S50-Gruppe signifikante Unterschiede: S50  $44\text{nM}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  im Median (minimal  $35\text{nM}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  – maximal  $49\text{nM}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) gegenüber S+IP3  $20\text{nM}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  im Median (minimal  $16\text{nM}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  – maximal  $28\text{nM}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) mit  $p < 0,001$  und S50 gegenüber S+PIP2  $31\text{nM}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  im Median (minimal  $30\text{nM}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  – maximal  $37\text{nM}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) mit  $p < 0,001$ . Die anderen Interventionsgruppen zeigten, wie im Box-Whisker-Plot zu sehen (siehe Abbildung 27), keine signifikanten Unterschiede. Die Healthy Control-Gruppe, gesunde Ferkel, die keiner Schädigung oder Intervention zugeführt wurden, zeigte im Median eine Aktivität der sauren Sphingomyelinase von  $18,61\text{nM}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  mit einem Minimum von  $15,37\text{nM}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  und einem Maximum von  $22,18\text{nM}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Die Interventionsgruppe mit S+IP3 kommt mit dem Medianwert von  $20\text{nM}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  dem der HC-Gruppe nach Lungenschädigung und Wirkstoff-Gabe sehr nah.

Die Abnahme der Aktivität der sauren Sphingomyelinase in den Gruppen S+IP3 und S+PIP2 deutet auf eine Inhibition des Ceramid-Signalweges hin, welcher eine wichtige Funktion in der Entzündungskaskade der Lunge einnimmt.

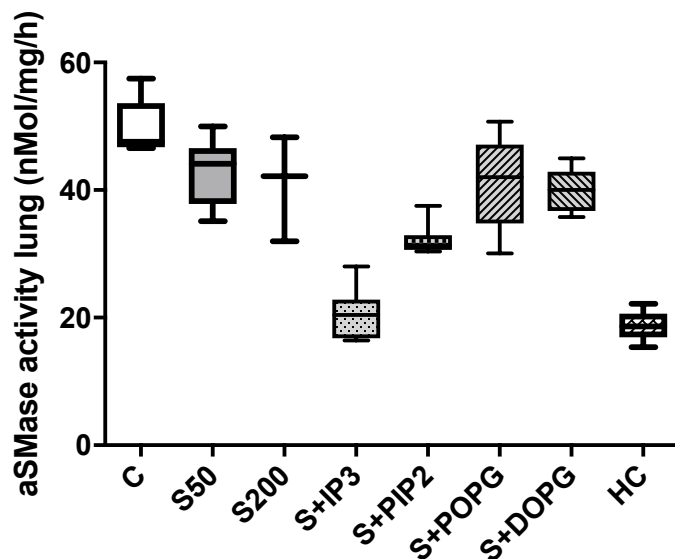


Abbildung 27: Aktivität der sauren Sphingomyelinase

Die Aktivität der sauren Sphingomyelinase (aSMase) wurde am Studienende (72h) bestimmt mit  $n = 8$  Tieren pro Gruppe (Ausnahme S200-Gruppe mit  $n = 3$  Tieren). Interventionsgruppen: C: Kontrollgruppe, S50: 50mg/kg Surfactant, S200: 200mg/kg Surfactant, S+IP3: Surfactant + Inositol-1,2,6-Triphosphat, S+PIP2: Surfactant + Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat, S+POPG: Surfactant + Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerol, S+DOPG: Surfactant + Dioleoyl-Phosphatidylglycerol, HC: Healthy control – Ferkel, die nicht dem lungenschädigenden Protokoll zugeführt wurden.

### 3.9. Ceramid-Konzentration

Die Ceramid-C16/18-Konzentration (siehe Abbildung 28) wurde am Studienende in homogenisiertem Lungengewebe analysiert. In den Interventionsgruppen S+IP3 und S+PIP2 zeigten sich im Vergleich zur S50-Gruppe signifikante Unterschiede: S50 im Median 1104,0pM (minimal 931,3pM – maximal 1199,0pM) gegenüber S+IP3 im Median 611,1pM (minimal 448,5pM – maximal 723,4pM) mit  $p < 0,001$  und S50 gegenüber S+PIP2 im Median 1024,0pM (minimal 900,1pM – maximal 1113,0) mit  $p < 0,05$ . Die Gruppen S+POPG und S+DOPG zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Healthy Control-Gruppe, gesunde Ferkel, die keiner Schädigung oder Intervention zugeführt wurden, zeigte im Median eine Ceramid-Konzentration von 520,0pM mit einem Minimum von 431,9pM und einem Maximum von 728,8pM. Auch bei der Auswertung bei der Ceramid-Konzentration wie bei der Aktivität der sauren Sphingomyelinase nähert sich insbesondere die S+IP3-Gruppe mit Ihrem Medianwert von 611,1pM dem Medianwert der Healthy Control-Gruppe (520,0pM) am besten an.

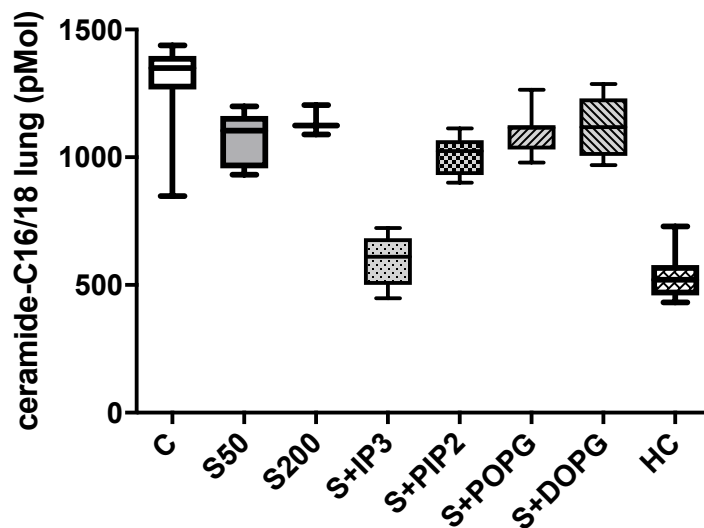


Abbildung 28: Ceramid-Konzentration

Die Ceramid-Konzentration wurde am Studienende (72h) bestimmt mit  $n = 8$  Tieren pro Gruppe (Ausnahme S200-Gruppe mit  $n = 3$  Tieren). Interventionsgruppen: C: Kontrollgruppe, S50: 50mg/kg Surfactant, S200: 200mg/kg Surfactant, S+IP3: Surfactant + Inositol-1,2,6-Triphosphat, S+PIP2: Surfactant + Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat, S+POPG: Surfactant + Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerol, S+DOPG: Surfactant + Dioleoyl-Phosphatidylglycerol, HC: Healthy control – Ferkel, die nicht dem lungenschädigenden Protokoll zugeführt wurden.

### 3.10. Apoptotische Makrophagen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die apoptotischen Makrophagen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (siehe Abbildung 29) zeigen vor Lungenschädigung einen niedrigen Anteil im Median mit 7% an der Gesamtzahl der Makrophagen in der BALF (minimal 4% – 14% apoptotischer Anteil an der Gesamtzahl der Makrophagen in den einzelnen Gruppen im Median).

Der Kruskal-Wallis-Test wurde verwendet, um die unterschiedlichen Wirkstoffgruppen zu vergleichen. Am Ende des Studienprotokolls zum Zeitpunkt 72h konnten zwischen den Interventionsgruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In der Kontrollgruppe ergibt sich ein Anteil von 54% apoptotischen Makrophagen an der Gesamtzahl der Makrophagen im Median. In den Interventionsgruppen S50, S200, S+IP3, S+PIP2, S+POPG und S+DOPG schwanken die apoptotischen Makrophagen-Anteile zwischen 31% und 61% im Median.

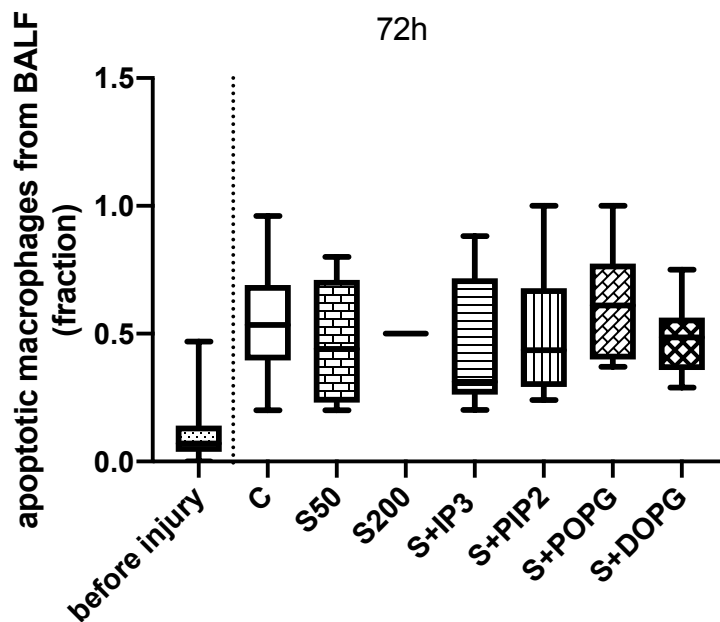


Abbildung 29: Apoptotische Makrophagen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Der Anteil der apoptotischen Makrophagen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit wurde für den Zeitpunkt vor der Lungenschädigung aller in die Studie eingeschlossenen Tiere, zusammengefasst mit  $n = 51$  und der Anteil der apoptotischen Makrophagen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit nach 72h in der finalen diagnostischen Lavage wurde einzeln in den verschiedenen Studiengruppen dargestellt mit  $n = 8$  Tieren pro Gruppe (Ausnahme S200-Gruppe mit  $n = 3$  Tieren). Interventionsgruppen: C: Kontrollgruppe, S50: 50mg/kg Surfactant, S200: 200mg/kg Surfactant, S+IP3: Surfactant + Inositol-1,2,6-Triphosphat, S+PIP2: Surfactant + Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat, S+POPG: Surfactant + Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerol, S+DOPG: Surfactant + Dioleoyl-Phosphatidylglycerol.

### 3.11. Apoptotische Granulozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die apoptotischen Granulozyten (PMNL – polymorphonuclear leukocytes) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (siehe Abbildung 30) zeigen, wie die apoptotischen Makrophagen, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen zum Zeitpunkt 72h des Studienprotokolls. In der Kontrollgruppe ergibt sich ein Anteil von 14% apoptotischen Granulozyten an der Gesamtzahl der Granulozyten im Median. In den Interventionsgruppen S50, S200, S+IP3, S+PIP2, S+POPG und S+DOPG schwanken die apoptotischen Granulozyten-Anteile zwischen minimal 9% und maximal 12% im Median.

Vor der Lungenschädigung zeigten die Granulozyten einen Anteil mit 8% im Median an Gesamtzahl der Granulozyten in der BALF (5% – 16% apoptotischer Anteil an der Gesamtzahl der Granulozyten in den einzelnen Gruppen im Median).

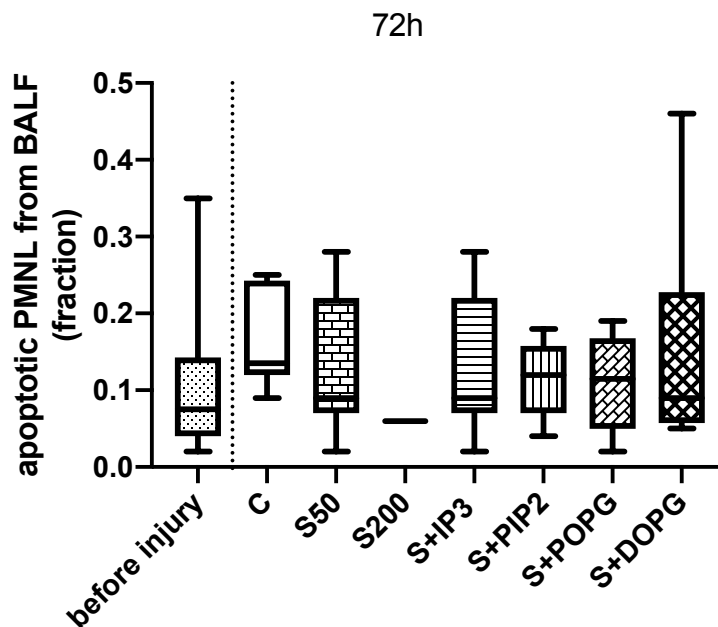


Abbildung 30: Apoptotische Granulozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit  
Der Anteil der apoptotischen Granulozyten (PMNL) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit wurde für den Zeitpunkt vor der Lungenschädigung aller in die Studie eingeschlossenen Tiere, zusammengefasst mit n = 51 und der Anteil der apoptotischen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit nach 72h in der finalen diagnostischen Lavage wurde einzeln in den verschiedenen Studiengruppen dargestellt mit n = 8 Tieren pro Gruppe (Ausnahme S200-Gruppe mit n = 3 Tieren)  
Interventionsgruppen: C: Kontrollgruppe, S50: 50mg/kg Surfactant, S200: 200mg/kg Surfactant, S+IP3: Surfactant + Inositol-1,2,6-Triphosphat, S+PIP2: Surfactant + Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat, S+POPG: Surfactant + Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerol, S+DOPG: Surfactant + Dioleoyl-Phosphatidylglycerol. PMNL: polymorphonuclear leukocytes

### 3.12. Apoptotische Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die apoptotischen Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (siehe Abbildung 31) zeigen vor Lungenschädigung einen Anteil mit 25% im Median an Gesamtzahl der Lymphozyten in der BALF (13% – 56% apoptotischer Anteil an der Gesamtzahl der Lymphozyten in den einzelnen Gruppen im Median).

Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test konnten auch in dieser Analyse am Ende des Studienprotokolls zum Zeitpunkt 72h zwischen den Interventionsgruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In der Kontrollgruppe ergibt sich ein Anteil von 39% apoptotischen Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten im Median. In den Interventionsgruppen S50, S200, S+IP3, S+PIP2, S+POPG und S+DOPG schwanken die apoptotischen Lymphozyten-Anteile zwischen 17% und 56% im Median.

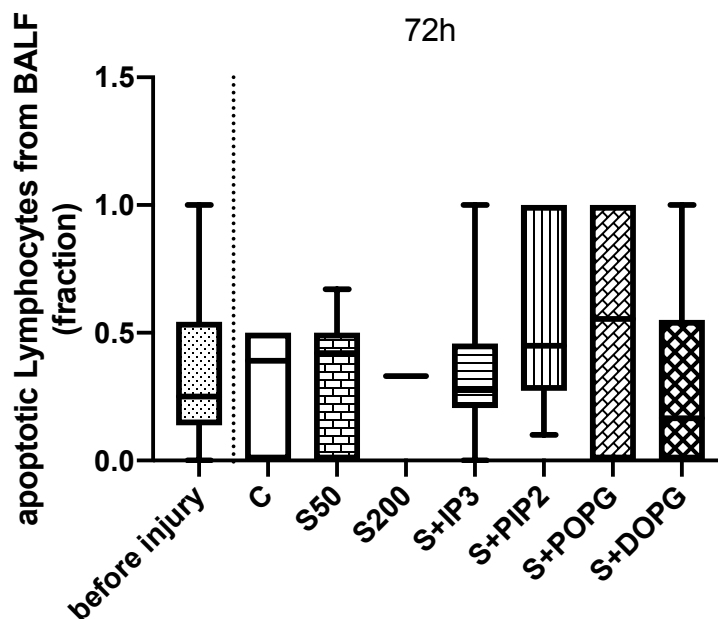


Abbildung 31: Apoptotische Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit  
Der Anteil der apoptotischen Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit wurde für den Zeitpunkt vor der Lungenschädigung aller in die Studie eingeschlossenen Tiere, zusammengefasst mit  $n = 51$  und der Anteil der apoptotischen Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit nach 72h in der finalen diagnostischen Lavage wurde einzeln in den verschiedenen Studiengruppen dargestellt mit  $n = 8$  Tieren pro Gruppe (Ausnahme S200-Gruppe mit  $n = 3$  Tieren). Interventionsgruppen: C: Kontrollgruppe, S50: 50mg/kg Surfactant, S200: 200mg/kg Surfactant, S+IP3: Surfactant + Inositol-1,2,6-Triphosphat, S+PIP2: Surfactant + Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat, S+POPG: Surfactant + Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerol, S+DOPG: Surfactant + Dioleoyl-Phosphatidylglycerol.

### 3.13. Apoptotische Alveolarepithelzellen

Die apoptotischen Alveolarepithelzellen (siehe Abbildung 32) zeigten vor allem eine signifikante Reduktion in den Interventionsgruppen S+POPG und S+DOPG im



Vergleich zur S50-Gruppe. Dabei lag der Anteil der von apoptotischen Alveolarepithelzellen bedeckten Alveolaroberfläche zudem unter dem Anteil der Gruppe der gesunden Ferkel (HC). Auch die Gruppen S200 und S+PIP2 zeigten eine statistisch signifikante Abweichung von der S50-Gruppe mit jeweils einem  $p < 0,05$ : S50 zeigte im Median 19% Anteil der von apoptotischen Alveolarepithelzellen bedeckten Alveolaroberfläche (minimal 15% – maximal 32%) gegenüber S+POPG mit im Median 11% Anteil der von apoptotischen Alveolarepithelzellen bedeckten Alveolaroberfläche (minimal 7% – maximal 18%) und S+DOPG mit im Median 11% Anteil der von apoptotischen Alveolarepithelzellen bedeckten Alveolaroberfläche (minimal 2% – maximal 14%) mit jeweils einem  $p < 0,01$ ; S200 zeigte im Median 10% Anteil der von apoptotischen Alveolarepithelzellen bedeckten Alveolaroberfläche (minimal 9% – maximal 15%) und S+PIP2 zeigte im Median 13% Anteil der von apoptotischen Alveolarepithelzellen bedeckten Alveolaroberfläche (minimal 9% – maximal 16%).

Die HC-Gruppe dagegen wies im Median einen Anteil von 13% (minimal 9% – maximal 24%) von apoptotischen Alveolarepithelzellen bedeckten Alveolaroberfläche auf.

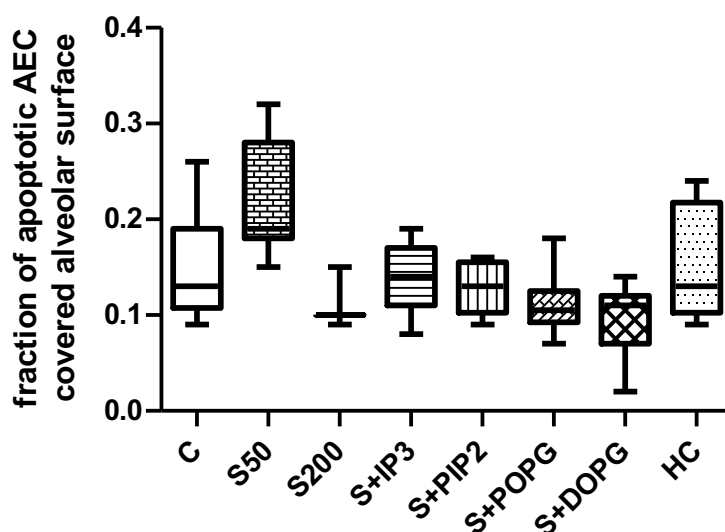


Abbildung 32: Apoptotische Alveolarepithelzellen

Der Anteil der von apoptotischen Alveolarepithelzellen bedeckten Alveolaroberfläche wurde für den Zeitpunkt 72h des Studienprotokolls mit  $n = 7-8$  Tieren pro Gruppe (Ausnahme S200-Gruppe mit  $n = 3$  Tieren) dargestellt. Interventionsgruppen: C: Kontrollgruppe, S50: 50mg/kg Surfactant, S200: 200mg/kg Surfactant, S+IP3: Surfactant + Inositol-1,2,6-Triphosphat, S+PIP2: Surfactant + Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat, S+POPG: Surfactant + Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerol, S+DOPG: Surfactant + Dioleoyl-Phosphatidylglycerol, HC: Healthy control – Ferkel, die nicht dem lungenschädigenden Protokoll zugeführt wurden. AEC: Alveolarepithelzellen

### 3.14. Apoptotische Zellen in dichtem Lungengewebe

Die apoptotischen Zellen in dichtem Lungengewebe (Bereiche mit Lungenatelektasen) (siehe Abbildung 33) wurden in drei Kategorien eingeteilt: 0, 1-5 und > 5 apoptotische Zellen pro ausgezähltem Sichtfeld (60µm x 80µm).

Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests wurden die Interventionsgruppen analysiert. Es ergab sich ein  $p < 0,05$  für die Kategorie 0 apoptotische Zellen und ein  $p < 0,001$  für die Kategorien 1-5 und > 5.

Die Anteile der Rechtecke mit dichtem Lungengewebe in den verschiedenen Interventionsgruppen unterschieden sich wie folgt: C mit  $0,034 \pm 0,023$ ; S50 mit  $0,028 \pm 0,021$ ; S200 mit 0,000; S+IP3 mit  $0,004 \pm 0,004$ ; S+PIP2 mit  $0,003 \pm 0,003$ ; S+POPG mit 0,000; S+DOPG mit  $0,007 \pm 0,006$  und HC mit  $0,029 \pm 0,011$ .



## **4. Diskussion**

### **4.1. Beschreibung des lungenschädigenden Protokolls**

**Triple-hit Model.** Das zugrundeliegende lungenschädigende Protokoll im neonatalen Ferkel-Modell schafft durch die wiederholten bronchoalveolären Lavages, die schädigende Beatmung und die intratracheale Applikation von Lipopolysacchariden (LPS) als Ausgangslage einen Surfactantmangel, Atelektasen und ein Lungenödem sowie eine beginnende Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Granulozyten ins Lungengewebe. Das Modell repräsentiert damit die Haupteigenschaften des ARDS. Die Schädigungen wurden auf drei unterschiedlichen Wegen erreicht: mechanisch durch die schädigende Beatmung, chemisch durch die wiederholten Lavages mit Reduzierung des Surfactants und biologisch durch die Applikation von Lipopolysacchariden. Die neugeborenen Ferkel wurden entsprechend den menschlichen Neugeborenen mit Equipment und Interventionen versorgt wie sie auf einer Intensivstation Standard sind. Wie in der Publikation „Improved Pulmonary Function by Acid Sphingomyelinase Inhibition in a Newborn Piglet Lavage Model“ (Von Bismarck et al., 2008) beschrieben, führen wiederholte bronchoalveoläre Lavages zu erhöhter Aktivität der sauren Sphingomyelinase und erhöhter Ceramid-Synthese. Die saure Sphingomyelinase wurde durch den unspezifischen Inhibitor Imipramin gehemmt und folglich verbesserten sich der Sauerstoffpartialdruck, die Clearance und das extravaskuläre Lungenwasser signifikant. Außerdem konnte ein Wirkverlust des Surfactants durch eine erhöhte Ceramidkonzentration im Vergleich der Kontrollgruppe (lungengeschädigte, nicht behandelte Ferkel) zu denen der gesunden Ferkel vermindert werden.

### **4.2. Wirkstoffe**

Die Wirkstoffe Myo-Inositol-1,2,6-Triphosphat (IP3), Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat (PIP2), Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylglycerol (POPG) und Di-Oleoyl-Phosphatidylglycerol (DOPG) wurden aufgrund der Bedeutung des Ceramidstoffwechsels und des Metabolismus der sauren Sphingomyelinase auf das Entzündungsgeschehen dem Surfactant zugesetzt. Die Wirkung auf klinische Parameter und die Veränderungen auf zellulärer Ebene, insbesondere im Hinblick auf die apoptotischen Zellen, wurden in dieser Arbeit genauer analysiert. Surfactant, von

Surface active agent, also oberflächenaktives Agens, wird von den Pneumozyten Typ 2 gebildet und enthält bei gesunden Menschen 90% Lipide und ungefähr 10% Proteine. Das sind die Proteine SP-A, SP-B, SP-C und SP-D. Hauptaufgabe des Surfactant ist das Herabsetzen der Oberflächenspannung an der Grenze von Luft und Flüssigkeit in den Alveolen, um bei geringem Lungenvolumen ein Kollabieren der Alveolen zu verhindern. Die in größter Menge vorkommenden Lipide sind die Phospholipide und von ihnen wiederum die Phosphatidylcholine (~68%), dessen größtenteils ungesättigtes Dipalmitoylphosphatidylcholin ~65% ausmacht. Einen weiteren großen Anteil machen die Phosphatidylglycerole mit ~12% aus. Weitere Komponenten der Lipide sind die Phosphatidylinositole (~4%), Phosphatidylethanolamine (~5%), Phosphatidylserine (~2%), Sphingomyelin (~3%) und Lysophosphatidylcholine (~1%). Veränderungen bei der Zusammensetzung des Surfactants lassen sich bei vielen verschiedenen Lungenerkrankungen nachweisen. So zeigen Neugeborene mit Respiratory Distress Syndrome eine Konzentrationsabnahme der Phospholipide, Dipalmitoylphosphatidylcholin, Phosphatidylglycerol und SP-A, die unter anderem zu einer reduzierten Oberflächenaktivität führen (Griese M, 1999).

**Inositolderivate.** Zu den Inositolen gehören IP3 und PIP2 (Myo-Inositol-1,2,6-Triphosphat und Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat). Ihre Wirkung erzielen sie über die Verringerung der Aktivität der sauren Sphingomyelinase und der damit verbundenen reduzierten Ceramid-Synthese.

**IP3.** Myo-Inositol-1,2,6-Triphosphat, auch als  $\alpha$ -Trinositol oder pp56 bekannt, ist ein Isomer des natürlich vorkommenden second messengers D-Myo-Inositol-1,4,5-Triphosphat. Es weist antiinflammatorische Effekte auf, bewirkt eine reduzierte Eicosanoidsynthese und die Inhibition von entzündungsinduzierten Ödemen. IP3 zeigte in der Studie von Nakazawa et al., 1994 eine Reduzierung von Lungenödemen nach Rauchgasinhalation bei Lämmern. Der Wirkstoff verminderte Veränderungen in der pulmonalen mikrovaskulären Permeabilität und dem transvaskulären Lymphstrom. Myo-Inositol-1,2,6-Triphosphat als Zusatz von Surfactant im neonatalen Ferkelmodell verbesserte signifikant den Gasaustausch der Lunge und reduzierte Lungenödeme. Als Hauptmechanismus für die Verbesserung der Lungenfunktion zeigte sich die Inhibition der sauren Sphingomyelinaseaktivität. In der mit IP3-behandelten Gruppe zeigte sich zudem eine Reduktion von TGF- $\beta$ 1, ein transformierender Wachstumsfaktor, der die Fibroseproliferation in der subakuten

Phase des ARDS (acute respiratory distress syndrome) fördert, und Amphiregulin, ein Wachstumsregulator in Epithelzellen der Lunge sowie eine Reduktion der epithelialen Apoptosen in den Alveolen (Preuß et al., August 2012). Des Weiteren zeigte sich in der Arbeit von Spengler et al., 2017, dass Inositole, vor allem IP3, eine Supprimierung des Inflammasoms “NLRP3- (nucleotide-binding domain leucin-rich repeat-containing protein-3) -apoptosis-associated speck-like protein” und des dazugehörigen “caspase recruitment domain (ASC)-caspase-1 complex” bewirken. Die profibrotischen Mediatoren TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor) und Interferon- $\gamma$  wurden durch IP3- und DOPG-Zusätze im Surfactant verringert. Als Zeichen für eine Abschwächung der beginnenden Fibrosierung zeigten das Matrix-Protein Elastin und sein Stimulator, die Matrix Metalloproteinase (MMP)-1, eine Verringerung ihrer Menge. Dies konnte in den untersuchten Lungenhomogenaten ebenfalls in den mit IP3 und DOPG behandelten Gruppen festgestellt werden. Die Aktivität der I $\kappa$ B (inhibitor of nuclear factor kappa B) Kinase, die eine wichtige Rolle im NF- $\kappa$ B (nuclear factor – spezifischer Transkriptionsfaktor) Signalweg einnimmt, war signifikant reduziert, sodass eine ungehinderte NF- $\kappa$ B Translokation angenommen wurde.

**PIP2.** Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat kommt natürlicherweise in Surfactant vor. Es macht mit < 0,1% einen sehr geringen Anteil der Phosphoinositole aus. In den Pneumozyten Typ 2 wird PIP2 durch Phosphorylierung des Phosphatidylinositols mit Hilfe spezieller Kinasen hergestellt und anschließend in die Lunge freigesetzt. Aufgrund seiner verzweigten Molekülstruktur begrenzt sich die Verteilung dieses Wirkstoffes auf die Luftwegskompartimente (Preuß et al., November 2012). PIP2 ist ein starker Inhibitor der sauren Sphingomyelinase, wie Kölzer et al., 2003 in Zellkulturen nachwiesen. In einer vorherigen Studie zeigten Preuß et al., November 2012, dass PIP2 die saure Sphingomyelinase-Aktivität in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit signifikant reduziert, im Lungengewebe jedoch nicht. Des Weiteren inhibiert PIP2 die Migration von Makrophagen und Granulozyten in die Luftwege durch eine reduzierte Expression von CD14/CD18 an Zellmembranen. Der Wirkstoff schwächt außerdem die Expression von epidermalen Wachstumsfaktoren wie Amphiregulin und TGF- $\beta$ 1 sowie Interleukin-6 als profibrotischen Faktor ab.

**Glycerolderivate.** POPG und DOPG (Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylglycerol und Di-Oleoyl-Phosphatidylglycerol) zeigten als Surfactantzusätze eine Hemmung der polymorphkernigen Leukozyten-Aktivität. Dafür wurden die Matrix-Metalloproteinase 8 (MMP-8), eine neutrophile Kollagenase im Stoffwechsel der polymorphkernigen

Leukozyten (PMNL – polymorphonuclear leukocytes) und die Myeloperoxidase, die in den polymorphkernigen Leukozyten synthetisiert und freigesetzt wird, gemessen. Diese zeigten jeweils eine Verringerung ihrer Menge. Des Weiteren beobachtete man in den Interventionsgruppen mit POPG- und DOPG-Zusätzen eine Inhibierung der Synthese von Interleukin-6. Durch die Aufrechterhaltung der alveolarkapillären Barrierefunktion und eine verringerte Anzahl an Apoptosen der Alveolarepithelzellen zeigten sich ebenfalls weniger schwere Lungenödeme (Spengler et al., 2017).

POPG. Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylglycerol macht ungefähr 10% der Phospholipide im Surfactant aus. Die höchste Konzentration bildet es in der extrazellulären Surfactantschicht innerhalb der Alveolen. Laut Rau et al., 2004 unterscheidet sich das Surfactant neugeborener Ferkel signifikant von dem älterer Schweine. So ist POPG in dem Surfactant neugeborener Ferkel nur in kleinen Mengen vorhanden, in dem der älteren Schweine deutlich mehr. Die Entwicklung der Surfactantzusammensetzung kommt durch die Anpassung an äußere Lebensumstände und Umweltfaktoren zustande. POPG kann induziert durch Lipopolysaccharide inflammatorische Antworten abschwächen, indem es die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen inhibiert. Dies geschieht durch direkte Interaktionen mit den Proteinen CD14 (CD – cluster of differentiation) und MD2 (MD – myeloid differentiation factor / Lymphozyten Antigen 96), die mit dem Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) interagieren. POPG gilt als Antagonist des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins und CD14. Die Produktion von Interleukin-6 und Interleukin-8 wird nach Behandlung der bronchoepithelialen Zellen mit POPG signifikant gehemmt, ebenso wie zytopathogene Effekte, die durch eine Infektion mit RSV hervorgerufen wurden. Bei der Behandlung von Mäusen, zeigte sich, dass die Produktion von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und die erhöhte Expression des Surfactant-Proteins D (SP-D) aufgehoben wurde (Numata et al., 2009). In einer weiteren Arbeit von Numata et al., 2011 zeigt sich, dass POPG ein starkes antivirales Agens gegen das Influenza A Virus ist. So wird die Produktion von Interleukin-8 und die Induktion von Interferon- $\gamma$  abgeschwächt sowie die Bindung des Virus an die Plasmamembran gehemmt. In der Studie von Spengler et al., 2017 zeigte sich, dass POPG direkt die Interleukin-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  Produktion durch Makrophagen reduziert sowie die Interleukin-6 Produktion in Co-Kulturen.

DOPG. Di-Oleoyl-Phosphatidylglycerol ist Bestandteil des Surfactants. Es macht eine geringe Menge der Phosphatidylglycerole im Surfactant aus, andere Phosphatidylglycerole wie POPG sind deutlich häufiger vertreten (Rau et al., 2004).



Geringe Mengenunterschiede zwischen neugeborenen und älteren Schweinen zeigen sich auch in dieser Gruppe der Phosphatidylglycerole. Berger et al., 1999 zeigten in ihrer Studie, dass DOPG durch Inhibierung der TNF- $\alpha$ -Sekretion die sPLA2-Synthese (sezernierte Phospholipase A2) in Alveolarmakrophagen hemmt und somit die Induktion der Entzündungsreaktion eingedämmt wird. Des Weiteren supprimiert DOPG die Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B) und inhibiert auch auf diesem Weg die sPLA2-Expression in Alveolarmakrophagen (Wu et al., 2003). DOPG reduziert die Zahl der Apoptosen der Alveolarepithelzellen (Preuß et al., 2014). Außerdem konnte gezeigt werden, dass DOPG die Barrierefunktion der Alveolarepithelzellen aufrechterhalten kann. Dies wurde durch physiologische Kompartimentierung von SP-D (Surfactant Protein D) im Serum und Albumin in bronchoalveolärer Lungenflüssigkeit gezeigt. Der Wirkstoffzusatz DOPG begrenzte zudem die profibrotische Reaktion (Spengler et al., 2017). Insgesamt zeigten sich durch die Zugabe von hoch konzentrierten Inositolderivaten und Phosphatidylglycerolen als Zusatz zur Behandlung mit Surfactant eine Abschwächung wichtiger Entzündungskaskaden bei entzündlichen Lungenkrankheiten. Diese Erkenntnisse könnten in Zukunft sehr interessant bei der Behandlung des ARDS bei Neugeborenen sein.

### 4.3. Ceramid-Signalweg

Die Freisetzung von Ceramiden durch die saure Sphingomyelinase wird durch verschiedene Stimuli, wie Stress, Strahlung, Hitzeschock, UV-Licht, durch verschiedene Rezeptoren, wie CD95 oder der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor, aber auch Lipopolysaccharide sowie durch die physiologische Entwicklung getriggert. Das Enzym saure Sphingomyelinase wird ebenfalls durch verschiedene proapoptotische Stimuli aktiviert. Die Translokation der sauren Sphingomyelinase von intrazellulär zur extrazellulären Seite der Zellmembran wird durch eine Fusion der Zellmembran mit den sauren Sphingomyelinase-beladenen Vesikeln herbeigeführt, sodass das Enzym auf der Zellmembran exponiert ist. Die saure Sphingomyelinase hydrolysiert Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin. So entstehen Ceramid-reiche Plattformen in der Zellmembran. In diesen Ceramid-reichen Domänen befinden sich Rezeptormoleküle, welche die proapoptotischen Stimuli über Signalwege ins Zellinnere weiterleiten. Betrachtet man den LPS-Signalweg, so zeigt sich nach der Präsentation von Lipopolysacchariden gegenüber des CD14-MD2-TLR4 Moleküls in

der Zellmembran eine Aktivierung des sauren Sphingomyelinase-Ceramid-Signalwegs wie oben beschrieben. In der Folge führt dies zu einer Ceramid-induzierten Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  und weiteren Schlüssel-Regulatoren der Inflammation. Inhibiert man den zugehörigen NF- $\kappa$ B-Signalweg, so wird auch die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase abgeschwächt und folglich die Produktion der inflammatorischen oder proapoptotischen Mediatoren reduziert (Gulbins, 2003 und Li et al., 2019). Ohne Inhibierung endet dieser Signalweg über die Caspase 8-Homodimerisation und damit Aktivierung der sogenannten Exekutions-Caspasen 3 und 7 in der Apoptose (Vanden Berghe et al., 2014). In der Studie von Preuß et al., August 2012 konnte die Verknüpfung der sauren Sphingomyelinase mit der Ceramidproduktion, sowie die davon abhängige Caspase-8-Aktivierung und die auf diesem Weg herbeigeführte Apoptose gezeigt werden. Eine erhöhte Aktivität des Enzyms saure Sphingomyelinase ging einher mit einer erhöhten Ceramid-Konzentration und einer erhöhten Caspase 8-Konzentration, die zu vermehrten Apoptosen führte. Durch die Behandlung neugeborener Ferkel mit Surfactant plus IP3 zeigte sich entsprechend eine geringere Aktivität der sauren Sphingomyelinase, weniger Ceramide, die als pro-apoptotische Mediatoren wirken konnten und folglich eine geringere Caspase 8-Konzentration und weniger Apoptosen. Der beschriebene Signalweg stellt eine wichtige Entzündungskaskade in der Lunge dar, die zukünftig mögliche Angriffspunkte einer Behandlung des ARDS aufzeigt.

#### 4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

**Oxygenierungsindex.** Es zeigte sich eine deutliche Verbesserung des Indexes nach der dreifachen Lungenschädigung und der anschließenden Gabe der Testsubstanzen in den Interventionsgruppen mit S+IP3, S+PIP2, S+POPG und S+DOPG im Gegensatz zu der Kontrollgruppe (C) und den Surfactantgruppen (S50 und S200). Die niedrigsten Werte des Oxygenierungsindexes erreichte die Gruppe mit dem Wirkstoffzusatz IP3. So kann man eine positive Wirkung der Testsubstanzen auf die Lungenfunktion annehmen. Da das Anfangsniveau des Oxygenierungsindexes in keiner der Interventionsgruppen mehr erreicht wurde, ist von einer irreversiblen Lungenschädigung ausgehen.

**Ventilationseffizienzindex.** Es zeigte sich ebenfalls eine deutliche Verbesserung des Indexes nach den drei lungenschädigenden Interventionen und Applikationen der

Wirkstoffe in den Gruppen mit S+IP3, S+PIP2, S+POPG und S+DOPG. Die positivste Entwicklung zeigten die Gruppen mit S+IP3 und S+POPG. Aber auch bei diesem klinischen Parameter konnte der Ausgangswert nicht erreicht werden, sodass man auch hier von einer weiter bestehenden Lungenschädigung ausgeht.

**Compliance des respiratorischen Systems.** Es zeigten sich die positiven Wirkstoffeffekte insbesondere in den Gruppen mit S+IP3 und S+POPG, aber auch S+PIP2 und S+DOPG zeigten eine deutliche Besserung der Lungendehnbarkeit gegenüber den übrigen Gruppen. Nur die Interventionsgruppen S+IP3 und S+POPG näherten sich am Ende des Studienprotokolls nahezu den Ausgangswerten an. In den übrigen Gruppen kann man daher von einer länger bestehenden oder womöglich irreversiblen Lungenschädigung ausgehen.

**Resistance des respiratorischen Systems.** Der Atemwegswiderstand besserte sich über die Zeit des Studienprotokolls in den Interventionsgruppen S+IP3, S+PIP2, S+POPG und S+DOPG deutlich gegenüber den übrigen Gruppen. Ein Erreichen des Ausgangsniveaus zeigte sich nicht, sodass auch die Resistance-Daten eine bleibende Lungenschädigung in allen Gruppen vermuten lassen.

**Extravaskulärer Lungenwasserindex.** Insbesondere in den Interventionsgruppen S+IP3 und S+POPG zeigten sich über die gesamte Protokollzeit hin stabil niedrige Werte, sodass wir von einer guten Wirksamkeit der Testsubstanzen auf das Aufrechterhalten von Barrieren und der Integrität der Zellen und Membranen sowie auf das Entzündungsgeschehen schließen können. In der Arbeit von Spengler et al., 2017 zeigte der Wirkstoff POPG bei der Aufrechterhaltung der transepithelialen elektrischen Resistance (TEER) seine wichtige antiödematöse Wirkung. Die anti-entzündliche Wirkung von POPG zeigte sich in der Abschwächung der Interleukin-6 Antwort auf die Applikation von Lipopolysacchariden in Zellkulturen (H441-outgrowth epithelial cells), die in der Folge Einfluss auf die Verteilung von Flüssigkeiten hat.

**Lungengewicht.** Die Daten des Extravaskulären Lungenwasserindex korrelieren eng mit den Ergebnissen der Lungengewichtsmessungen am Studienende. Dort zeigten ebenfalls die Gruppen S+IP3 und S+POPG die besten Ergebnisse hinsichtlich einer Wirkung der Testsubstanzen auf die Verbesserung des Flüssigkeitshaushalts und somit letztendlich auch der Lungenfunktion.

**Zellzahl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.** Bei der Analyse der Zellzahlen fielen die Gruppen mit S+IP3, S+POPG und S+DOPG mit statistisch signifikant geringeren Zellzahlen in der BALF gegenüber der S50-Gruppe auf. Aus

diesem Grund nimmt man an, dass in diesen Gruppen eine abgeschwächte und inhibierte Immunreaktion mit folglich geringerer Migration von Entzündungszellen einherging.

**Aktivität der sauren Sphingomyelinase.** In den Interventionsgruppen S+IP3 und S+PIP2 zeigten sich gegenüber der S50-Gruppe eine statistisch signifikante Abnahme der Aktivität der sauren Sphingomyelinase. Diese Abnahme der Aktivität der sauren Sphingomyelinase deutet auf eine Inhibition des Ceramid-Signalweges hin, welcher eine wichtige Funktion in der Entzündungskaskade der Lunge einnimmt.

**Ceramid-Konzentration.** Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich in den Interventionsgruppen S+IP3 und S+PIP2, wobei sich vor allem die S+IP3-Gruppe dem Wert der gesunden Ferkel (HC) am stärksten angenähert hat. Diese Annäherung ließ sich ebenfalls in den Daten der Aktivitätsanalyse der sauren Sphingomyelinase erkennen (s.o.). Das zeigt abermals die gemeinsame Abhängigkeit dieser beiden Parameter im Signalweg der Entzündungskaskade. Eine Abnahme der Ceramid-Konzentration weist auf eine Inhibierung der Entzündungskaskade in der Lunge hin. Die Gruppen S+POPG und S+DOPG zeigten, dass Phosphatidylglycerole keinen Einfluss auf die Ceramid-Konzentration und somit auf die pulmonale Entzündungskaskade nehmen.

**Apoptotische Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.** Diese drei Zellarten zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen bis zum Ende des Studienprotokolls. Gegenüber der Kontrollgruppe mit den lungengeschädigten, nicht behandelten Ferkeln zeigte sich in der S50-Gruppe eine Reduktion der apoptotischen Makrophagen und Granulozyten. Eine weitere Reduktion der apoptotischen Makrophagen und Granulozyten über die Wirkung des Surfactants hinaus durch die Wirkstoffe IP3, PIP2, POPG und DOPG konnte jedoch nicht gezeigt werden. Die Auswertung der apoptotischen Lymphozyten im Vergleich zu den Makrophagen und Granulozyten stellte eine deutlich größere Schwankungsbreite bei der Zellanzahl dar. Vermutlich kommt diese durch die insgesamt viel geringere Zahl der Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit zustande. In ihrer Studie untersuchten Matute-Bello et al., 1997 die apoptotischen Granulozyten (PMN) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten. Es zeigte sich ein niedriger Anteil von apoptotischen Granulozyten ohne signifikanten Unterschied zwischen den ARDS-Patienten, die überlebten und den Patienten, die starben. Diese niedrige Zahl

an Apoptosen erklärten sie mit der schnellen Phagozytose der apoptotischen Zellen durch Alveolarmakrophagen und durch ein verlängertes Überleben der Zellen durch Herausögern der Apoptose. Diese beiden genannten Effekte wurden G-CSF und GM-CSF zugeschrieben, die in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit enthalten sind. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass die Apoptose ein dynamischer Prozess ist, der schnell beendet wird, oftmals unter einer Stunde (Del Riccio et al., 2004). Bei den erfolgten Untersuchungen kann daher ausschließlich eine Momentaufnahme der apoptotischen Zellverhältnisse dargestellt werden.

**Apoptotische Alveolarepithelzellen.** Insbesondere in den Interventionsgruppen S+POPG und S+DOPG zeigte sich eine deutliche Reduktion der apoptotischen Alveolarepithelzellen gegenüber der S50-Gruppe. Daraus lässt sich eine direkte Wirkung der beiden Testsubstanzen auf die Alveolarepithelzellen ableiten, da sich keine eindeutige Korrelation zu den apoptotischen Zellen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit zeigte. In der Gruppe der gesunden Ferkel (HC) zeigte sich ein ähnlich hoher Anteil an apoptotischen Alveolarepithelzellen wie in der Kontrollgruppe (C) und höher als in den Wirkstoffgruppen. Dies weist auf eine hohe Zahl an Hintergrund-Apoptosen in den Atemwegen hin, die durch die physiologisch vorkommende höhere bakterielle Besiedlung der Atemwege der Ferkel erklärt sein könnte. Auch die hohe Zahl an Granulozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit bei den gesunden Ferkeln könnte durch diese Umstände erklärt sein. Die Schnauzen der Ferkel kommen von Geburt an mit dem Stall- oder Erdboden in Berührung. Bouchet et al., 2009 untersuchten die Rolle von *Haemophilus parasuis* auf Epitheltrachealzellen bei Schweinen und fanden heraus, dass die Kolonisation dieses Bakteriums zu bakterieller Adhäsion, Induktion von Apoptosen und Zytokinfreisetzung führt, das Lipooligosaccharid des Bakteriums jedoch eine begrenzte Wirkung auf diese Prozesse hat. Ein weiterer Aspekt, der bei der Interpretation der Apoptosezahlen berücksichtigt werden sollte, sind die Hintergrund-Apoptosen wachsender Ferkel. So sind Apoptosen in den ersten zwei Lebensjahren ein Merkmal sich entwickelnder Lungen. Dieser relativ hohe Anteil an Apoptosen kommt bei Organismen mit schnellem Wachstum physiologisch vor. Der Zelluntergang ermöglicht Wachstum, die Differenzierung und den Umbau vorhandener Strukturen eines Organs wie der Lunge. Schittny et al., 1998 zeigten in Ihrer Arbeit, dass die postnatale Lungenentwicklung und Reifung bei Ratten einen messbaren Anstieg der Apoptosen vor allem der Fibroblasten und Typ 2 Epithelzellen voraussetzt.

In der Studie von Bem et al., 2010, in der das Lungenepithel von Kindern untersucht wurde, die an einem akuten Atemnotsyndrom verstarben, zeigte sich eine Apoptoserate der Alveolarepithelzellen im Median von 6,1% mit einer großen Variationsbreite von 1 - 18,1%. Die apoptotischen Zellen wurden in der oben genannten Studie mittels doppelter Immunhistochemie mit Caspase-3 und Zytokeratin in Lungengewebe während der Autopsie nachgewiesen. Die große Variabilität der apoptotischen Alveolarepithelzellen bei den sechzehn untersuchten Kindern korrelierte positiv mit dem Alter der Kinder. Man vermutet, dass das Alter im Hinblick auf die Lungenentwicklung und Reifung, die natürlicherweise einhergeht mit programmiertem Zelltod, ein wesentlicher Faktor ist, der die große Spannbreite der Apoptosen erklärt.

Die guten Ergebnisse in der Wirkstoffgruppe S+IP3 bezüglich Oxygenierungsindex, Ventilationseffizienzindex, Spezifische Compliance und Resistance des respiratorischen Systems, Extravaskulärem Lungenwasserindex, Lungengewicht, Aktivität der sauren Sphingomyelinase und Ceramid-Konzentration stimmen mit den Ergebnissen der Zellzahl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit überein. Die positiven Ergebnisse der S+IP3-Gruppe spiegeln sich jedoch nicht in der Anzahl der apoptotischen Alveolarepithelzellen wider sowie in den apoptotischen Zellen aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit oder den apoptotischen Zellen in dichtem Lungengewebe. Da keine Korrelation zwischen Apoptosen und den anderen oben genannten Ergebnissen anzunehmen ist, stellt sich die Frage, ob die Untersuchung von Zellen aus der bronchoalveolären Lavage bei Lungenerkrankungen überhaupt Rückschlüsse auf den Zustand des Lungengewebes erkennen lässt. (Für mikrobiologische und zytologische Analysen ist die bronchoalveoläre Lavage zweifellos eine wichtige Untersuchung.) Bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse der angefärbten apoptotischen Zellen, sollte man zudem berücksichtigen, dass die TUNEL-Färbung nicht spezifisch für die Markierung von apoptotischen Zellen ist. Durch die Färbetechnik werden freie 3'-OH-Enden an DNA-Doppelstrangbrüchen mit modifizierten Nukleotiden markiert und so die entsprechenden Zellen sichtbar gemacht. Auf diese Art können außer apoptotischen Zellen auch nekrotische Zellen markiert werden, wenn diese erhebliche Doppelstrangbrüche der DNA und lange 3'-Überhänge aufweisen, ebenso werden vereinzelt Zellen mit aktiver Transkription oder aktiver DNA-Reparatur sichtbar gemacht (Henson et al., 2008). Wenn in einem Gewebe viele Apoptosen vorhanden sind, werden bei der TUNEL-Färbung vermutlich

auch viele dieser Zellen nachgewiesen. Möglicherweise kommt diese hohe Apoptoserate aber auch dadurch zustande, dass zu dem Zeitpunkt der Färbung weniger apoptotische Zellen abgebaut wurden. Entweder gibt es ein Missverhältnis zwischen zu vielen apoptotischen Zellen zu den wenigen phagozytierenden Makrophagen oder die Makrophagen erreichen aufgrund von zerstörten Gewebestrukturen nicht das Zielgewebe. Dasselbe gilt für die Auswertung von apoptotischen Zellen in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit. Zu unterscheiden, ob eine hohe Zahl an zugrunde gegangenen apoptotischen Zellen oder eine reduzierte Clearance von durch programmierten Zelltod untergegangenen Zellen vorliegt, ist schwierig. Die genaue Analyse der Makrophagen mit Fokus auf die Gesamtzahl und die Zählung von Makrophagen mit sichtbaren phagozytierten apoptotischen Zelltrümmern kann dabei hilfreich sein. Die Unterscheidung, ob es sich um apoptotische Makrophagen oder Makrophagen handelt, die apoptotische Zellen phagozytiert haben, ist ebenfalls nicht immer sicher differenzierbar. Des Weiteren ist die Differenzierung der Zellarten interessant, ob das Epithel, das Endothel oder das Interstitium betroffen sind. Um die Zelltypen genauer zu unterscheiden, müsste man anschließend zelltypische Marker benutzen. Diese zelltypischen Eigenschaften können jedoch bei apoptotischen Zellen während des Vorgangs des programmierten Zelltods verloren gehen.

Die Begriffe Apoptose als programmierter Zelltod mit Zellschrumpfung, Reorganisation und Segmentierung des Zellkerns, aktiver Bildung von Zellmembranausstülpungen und Fragmentierung der Zellen in Membran-umhüllte Vesikel (apoptotische Körper) und Nekrose als pathologischer irreversibler Gewebsuntergang mit unmittelbarer Entzündungsreaktion waren viele Jahre lang so definiert (Schittny et al., 1998). Heute weiß man, dass es ein großes Geflecht mit vielen unterschiedlich regulierten verknüpften Signalwegen und ebenfalls noch vielen unbekannten Variablen gibt, die zu einem Zugrundegehen einer Zelle führen. So haben Vanden Berghe et al., 2014 in Ihrer Arbeit ein Netzwerk aus Triggern, aktivierten Initiatormechanismen, verschiedenen Mediatoren, weitergeleiteten Signalen und zuletzt biochemischen Mechanismen der regulierten Nekrose erstellt. Programmierter Zelltod heißt also nicht immer Apoptose, sondern kann auch regulierte Nekrose heißen. Je nach Initiation, Mediatoren und biochemischen Mechanismen können dies Nekroptose, Parthanatose, Oxytose, Ferroptose, ETose, NETose, Pyronekrose oder Pyroptose sein. In dem in dieser Arbeit genutzten Ferkelmodell spielt das Inflammasom NLRP3 eine wichtige



Rolle. Durch den Caspase-1-abhängigen Signalweg kommt es zur IL-1 $\beta$  und IL-18-Aktivierung und Freisetzung, die im Verlauf zu Entzündung und Fieber führen (Vanden Berghe et al., 2014). Dieser beschriebene Weg der regulierten Nekrose heißt Pyroptose und könnte in dem untersuchten Modell neben der Apoptose einen konkurrierenden Zelltod darstellen, der jedoch nicht von der TUNEL-Färbung erfasst wird. Als Ausblick für weiterführende Studien wäre eine weitere Aufschlüsselung der Zelltodarten und der dorthin führenden Signalwege mit ihren beteiligten Signalmolekülen und Initiatoren interessant. Auf diese Weise könnten sich neue Behandlungsmethoden offenbaren, welche direkt und individuell in die vorliegenden Signalwege eingreifen.

## **5. Zusammenfassung**

In diesem ARDS-Modell mit neugeborenen Ferkeln lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass an ARDS-erkrankte Neugeborene und Säuglinge von einer Behandlung mit Surfactant-verstärkenden Wirkstoffen profitieren könnten. Insbesondere Inositol-1,2,6-Triphosphat (IP3) als auch Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerol (POPG) zeigten eine Verbesserung des Gasaustauschs und der Lungenbelüftung anhand des Oxygenierungsindex, des Ventilationseffizienzindex sowie der Compliance und Resistance des respiratorischen Systems. Ebenso ließ sich eine Abnahme der Ödembildung anhand des Extravaskulären Lungenwasserindex und des Lungengewichtes erkennen. Die beiden untersuchten Inositolderivate Inositol-1,2,6-Triphosphat (IP3) und Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat (PIP2) zeigten direkte Effekte auf die Aktivität der sauren Sphingomyelinase und die Ceramidkonzentration, wodurch dieser inflammatorische und proapoptotische Signalweg inhibiert wurde. Die Glycerolderivate Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylglycerol (POPG) und Di-Oleoyl-Phosphatidylglycerol (DOPG) offenbarten hingegen mit geringeren Apoptosezahlen direkte Effekte auf das Lungenepithel. In dieser Studie ließen sich sowohl auf der klinischen als auch auf der histologischen Ebene Unterschiede in den Interventionsgruppen darstellen. Diese Unterschiede lassen sich durch direkte Effekte der Surfactant-Zusätze als auch durch die verstärkte beziehungsweise verlängerte Wirkung des Surfactants erklären. Lediglich die Ergebnisse der apoptotischen Zellen (Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit ließen keine Übereinstimmung mit den

Daten der apoptotischen Zellen im Lungengewebe oder mit den klinisch erhobenen Daten erkennen.

Zusammengefasst stellen die genutzten Surfactant-Zusätze der Inositol- und Glycerolderivate einen erfolgsversprechenden Behandlungsansatz dar, um den klinischen Ausgang neonataler inflammatorischer Lungenerkrankungen zu verbessern.

## **6. Literaturverzeichnis**

Bem RA, van der Loos CM, van Woensel JB, Bos AP. Cleaved caspase-3 in lung epithelium of children who died with acute respiratory distress syndrome. *Pediatr Crit Care Med*. 2010 Sep;11(5):556-60. doi: 10.1097/PCC.0b013e3181d5063c. PMID: 20173675.

Berger A, Havet N, Vial D, Arbibe L, Dumarey C, Watson ML, Touqui L. Dioleoylphosphatidylglycerol inhibits the expression of type II phospholipase A2 in macrophages. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Feb;159(2):613-8. doi: 10.1164/ajrccm.159.2.9805053. PMID: 9927381.

Bouchet B, Vanier G, Jacques M, Auger E, Gottschalk M. Studies on the interactions of *Haemophilus parasuis* with porcine epithelial tracheal cells: limited role of LOS in apoptosis and pro-inflammatory cytokine release. *Microb Pathog*. 2009 Feb;46(2):108-13. doi: 10.1016/j.micpath.2008.10.008. Epub 2008 Nov 1. PMID: 19013513.

Caliebe A., Hedderich J., Krawczak M., Freitag-Wolf S., Fritzer E., Jochens A., Junge O., Neumann P., Vollrath O. Methodik des wissenschaftlichen Arbeitens. Vorlesungsskript des Instituts für Medizinische Informatik und Statistik Christian-Albrechts-Universität Kiel 2013, 10. Auflage

Del Riccio V, van Tuyl M, Post M. Apoptosis in lung development and neonatal lung injury. *Pediatr Res*. 2004 Feb;55(2):183-9. doi: 10.1203/01.PDR.0000103930.93849.B2. Epub 2003 Nov 20. PMID: 14630991.

De Luca D, van Kaam AH, Tingay DG, Courtney SE, Danhaive O, Carnielli VP, Zimmermann LJ, Kneyber MCJ, Tissieres P, Brierley J, Conti G, Pillow JJ, Rimensberger PC. The Montreux definition of neonatal ARDS: biological and clinical background behind the description of a new entity. *Lancet Respir Med*. 2017 Aug;5(8):657-666. doi: 10.1016/S2213-2600(17)30214-X. Epub 2017 Jul 4. PMID: 28687343.

Getinge.com, PiCCO-Technologie, 2018 Sep, Abgerufen 20.06.2021, [https://www.getinge.com/siteassets/products-a-z/picco/de/picco-technology-brochure-de\\_r07-screen.pdf](https://www.getinge.com/siteassets/products-a-z/picco/de/picco-technology-brochure-de_r07-screen.pdf)

Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J*. 1999 Jun;13(6):1455-76. doi: 10.1183/09031936.99.13614779. PMID: 10445627.

Gulbins E. Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacol Res*. 2003 May;47(5):393-9. doi: 10.1016/s1043-6618(03)00052-5. PMID: 12676513.

Henson PM, Tuder RM. Apoptosis in the lung: induction, clearance and detection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Apr;294(4):L601-11. doi: 10.1152/ajplung.00320.2007. Epub 2008 Jan 4. PMID: 18178675.

Hübler A., Jorch G., Neonatologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 2019, 2. Auflage

Jensen JM, Schütze S, Förl M, Krönke M, Proksch E. Roles for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier. *J Clin Invest.* 1999 Dec;104(12):1761-70. doi: 10.1172/JCI5307. PMID: 10606630; PMCID: PMC409877.

Kölzer M, Arenz C, Ferlinz K, Werth N, Schulze H, Klingenstein R, Sandhoff K. Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphate is a potent and selective inhibitor of acid sphingomyelinase. *Biol Chem.* 2003 Sep;384(9):1293-8. doi: 10.1515/BC.2003.144. PMID: 14515991.

Li C, Wang A, Wu Y, Gulbins E, Grassmé H, Zhao Z. Acid Sphingomyelinase-Ceramide System in Bacterial Infections. *Cell Physiol Biochem.* 2019;52(2):280-301. doi: 10.33594/000000021. Epub 2019 Feb 28. PMID: 30816675.

Lüllmann-Rauch R., Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart 2009, 3. Auflage

Muntau Ania Carolina, Intensivkurs Pädiatrie. Elsevier GmbH Urban & Fischer Verlag 2009, 5. Auflage

Matute-Bello G, Liles WC, Radella F 2nd, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M, Chi EY, Hudson LD, Martin TR. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Dec;156(6):1969-77. doi: 10.1164/ajrccm.156.6.96-12081. PMID: 9412582.

Millipore.com, Gebrauchsanleitung des ApopTag<sup>®</sup> Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S7100, 2013 Jan, Abgerufen 20.06.2021, [https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/ApopTag-Peroxidase-In-Situ-Apoptosis-Detection-Kit,MM\\_NF-S7100?CatalogCategoryID=#anchor\\_BRO](https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/ApopTag-Peroxidase-In-Situ-Apoptosis-Detection-Kit,MM_NF-S7100?CatalogCategoryID=#anchor_BRO)

Nakazawa H, Gustafsson TO, Traber LD, Herndon DN, Traber DL. alpha-Trinositol decreases lung edema formation after smoke inhalation in an ovine model. *J Appl Physiol* (1985). 1994 Jan;76(1):278-82. doi: 10.1152/jappl.1994.76.1.278. PMID: 8175518.

Notter RH, Egan EA, Kwong MS, Holm BA, Shapiro DL. Lung surfactant replacement in premature lambs with extracted lipids from bovine lung lavage: effects of dose, dispersion technique, and gestational age. *Pediatr Res.* 1985 Jun;19(6):569-77. doi: 10.1203/00006450-198506000-00014. PMID: 3839302.

Numata M, Chu HW, Dakhama A, Voelker DR. Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jan 5;107(1):320-5. doi: 10.1073/pnas.0909361107. Epub 2009 Dec 22. PMID: 20080799; PMCID: PMC2806703.

Numata M, Kandasamy P, Nagashima Y, Posey J, Hartshorn K, Woodland D, Voelker DR. Phosphatidylglycerol suppresses influenza A virus infection. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012 Apr;46(4):479-87. doi: 10.1165/rcmb.2011-0194OC. Epub 2011 Nov 3. PMID: 22052877; PMCID: PMC3359948.

Preuß S, Omam FD, Scheiermann J, Stadelmann S, Winoto-Morbach S, von Bismarck P, Adam-Klages S, Knerlich-Lukoschus F, Lex D, Wesch D, Held-Feindt J, Uhlig S, Schütze S, Krause MF. Topical application of phosphatidyl-inositol-3,5-bisphosphate for acute lung injury in neonatal swine. *J Cell Mol Med*. 2012 Nov;16(11):2813-26. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01618.x. PMID: 22882773; PMCID: PMC4118249.

Preuß S, Scheiermann J, Stadelmann S, Omam FD, Winoto-Morbach S, Lex D, von Bismarck P, Adam-Klages S, Knerlich-Lukoschus F, Wesch D, Held-Feindt J, Uhlig S, Schütze S, Krause MF. 18:1/18:1-Dioleoyl-phosphatidylglycerol prevents alveolar epithelial apoptosis and profibrotic stimulus in a neonatal piglet model of acute respiratory distress syndrome. *Pulm Pharmacol Ther*. 2014 Jun;28(1):25-34. doi: 10.1016/j.pupt.2013.10.002. Epub 2013 Oct 16. PMID: 24140177.

Preuß S, Stadelmann S, Omam FD, Scheiermann J, Winoto-Morbach S, von Bismarck P, Knerlich-Lukoschus F, Lex D, Adam-Klages S, Wesch D, Held-Feindt J, Uhlig S, Schütze S, Krause MF. Inositol-trisphosphate reduces alveolar apoptosis and pulmonary edema in neonatal lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 Aug;47(2):158-69. doi: 10.1165/rcmb.2011-0262OC. Epub 2012 Mar 8. PMID: 22403805.

Rau GA, Vieten G, Haitsma JJ, Freihorst J, Poets C, Ure BM, Bernhard W. Surfactant in newborn compared with adolescent pigs: adaptation to neonatal respiration. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 May;30(5):694-701. doi: 10.1165/rcmb.2003-0351OC. Epub 2003 Oct 24. PMID: 14578213.

Sakka SG et al. Assessment of cardiac preload and extravascular lung water by single transpulmonary thermodilution. *Intensive Care Med* 2000; 26(2): 180-187

Schittny JC, Djonov V, Fine A, Burri PH. Programmed cell death contributes to postnatal lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998 Jun;18(6):786-93. doi: 10.1165/ajrcmb.18.6.3031. PMID: 9618383.

Smith LS, Zimmerman JJ, Martin TR. Mechanisms of acute respiratory distress syndrome in children and adults: a review and suggestions for future research. *Pediatr Crit Care Med*. 2013 Jul;14(6):631-43. doi: 10.1097/PCC.0b013e318291753f. PMID: 23823199.

Spengler D, Winoto-Morbach S, Kupsch S, Vock C, Blöchle K, Frank S, Rintz N, Diekötter M, Janga H, Weckmann M, Fuchs S, Schromm AB, Fehrenbach H, Schütze S, Krause MF. Novel therapeutic roles for surfactant-inositols and -phosphatidylglycerols in a neonatal piglet ARDS model: a translational study. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018 Jan 1;314(1):L32-L53. doi: 10.1152/ajplung.00128.2017. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28860142.

Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Feb;15(2):135-47. doi: 10.1038/nrm3737. PMID: 24452471.

von Bismarck P, Wistädt CF, Klemm K, Winoto-Morbach S, Uhlig U, Schütze S, Adam D, Lachmann B, Uhlig S, Krause MF. Improved pulmonary function by acid sphingomyelinase inhibition in a newborn piglet lavage model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Jun 1;177(11):1233-41. doi: 10.1164/rccm.200705-752OC. Epub 2008 Feb 28. PMID: 18310483.

Wiegmann K, Schütze S, Machleidt T, Witte D, Krönke M. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell*. 1994 Sep 23;78(6):1005-15. doi: 10.1016/0092-8674(94)90275-5. PMID: 7923351.

Wu YZ, Medjane S, Chabot S, Kubrusly FS, Raw I, Chignard M, Touqui L. Surfactant protein-A and phosphatidylglycerol suppress type IIA phospholipase A2 synthesis via nuclear factor-kappaB. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Sep 15;168(6):692-9. doi: 10.1164/rccm.200304-467OC. Epub 2003 Jul 25. PMID: 12882758.

## **7. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Studienprotokoll.....	Seite 9
Abbildung 2: Schiffchen für Objektträger.....	Seite 21
Abbildung 3: Entparaffinierung der Objektträger in Küvetten.....	Seite 21
Abbildung 4: Inkubation der Objektträger in der Proteinase K-Lösung...	Seite 22
Abbildung 5: Vorbereitung für die Inkubation der Objektträger in der Feuchten Kammer.....	Seite 23
Abbildung 6: Filtration von DAB Peroxidase Substrat.....	Seite 25
Abbildung 7: Übersicht über die angefärbten Zellen im Lungengewebe (Alveolen).....	Seite 26
Abbildung 8: Übersicht über die angefärbten Zellen im dichten Lungengewebe.....	Seite 27
Abbildung 9: Vortexmixer.....	Seite 28
Abbildung 10: Objektträger mit Filterpapier und Trichter.....	Seite 28
Abbildung 11: Objektträger in der Zentrifuge.....	Seite 29
Abbildung 12: Zentrifuge.....	Seite 29
Abbildung 13: Mikroskop Olympus BX61.....	Seite 30
Abbildung 14: Auswertung der Alveolarzellen mittels newCAST Plus Software.....	Seite 32
Abbildung 15: Vergrößerung eines auswertbaren Counting Frame.....	Seite 32
Abbildung 16: Zählwerkzeug der newCAST Plus Software.....	Seite 33
Abbildung 17: Blutbild-Differenziergerät.....	Seite 34
Abbildung 18: Übersicht über die angefärbten Zellen in der BAL-Flüssigkeit.....	Seite 34
Abbildung 19: Übersicht über die angefärbten Zellen in der BAL-Flüssigkeit.....	Seite 35
Abbildung 20: Oxygenierungsindex.....	Seite 40
Abbildung 21: Ventilationseffizienzindex.....	Seite 42
Abbildung 22: Compliance des respiratorischen Systems.....	Seite 44
Abbildung 23: Resistance des respiratorischen Systems.....	Seite 46
Abbildung 24: Extravaskulärer Lungenwasserindex.....	Seite 48
Abbildung 25: Lungengewicht.....	Seite 49
Abbildung 26: Anzahl der Zellen in der bronchoalveolären Lavage.....	Seite 50
Abbildung 27: Aktivität der sauren Sphingomyelinase.....	Seite 52

Abbildung 28: Ceramid-Konzentration.....	Seite 53
Abbildung 29: Apoptotische Makrophagen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	Seite 54
Abbildung 30: Apoptotische Granulozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	Seite 55
Abbildung 31: Apoptotische Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	Seite 56
Abbildung 32: Apoptotische Alveolarepitheliale Zellen in den Alveolen...	Seite 57
Abbildung 33: Apoptotische Zellen in dichtem Lungengewebe.....	Seite 59



## **8. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Ausschluss der Ferkel aus der Studie.....	Seite 5
Tabelle 2: Vergleichbarkeit der Interventionsgruppen.....	Seite 38

## **9. Abkürzungen**

ARDS – Acute Respiratory Distress Syndrome

aSMase – acid Sphingomyelinase

C – control, Kontrollgruppe: Gruppe von Ferkeln, die der Lungenschädigung zugeführt wurden, jedoch ohne Intervention)

CPAP – Continuous Positive Airway Pressure

C<sub>rs</sub> – Spezifische Compliance des respiratorischen Systems

DAB – Diaminobenzidin

DNA – Desoxyribonukleinsäure

DOPG – 18:1/18:1-Di-Oleoyl-Phosphatidylglycerol

EVLWI – extra vascular lung water index

F<sub>i</sub>O<sub>2</sub> – fraction of inspired oxygen

G-CSF – Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte colony-stimulating factor)

GM-CSF – Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

HC – Healthy control, Gruppe gesunder Ferkel ohne Lungenschädigung und ohne Intervention)

HCL – Salzsäure

HI – heart index

IP3 – Myo-Inositol-1,2,6-Triphosphat

LPS – Lipopolysaccharid

MAP – mean airway pressure, mittlerer Atemwegsdruck

OI – Oxygenierungsindex

paCO<sub>2</sub> – Kohlendioxidpartialdruck im arteriellen Blut

paO<sub>2</sub> – Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut

PBS – Phosphate Buffered Saline

PEEP – positive endexpiratory pressure

PiCCO – pulse index continuous cardiac output

PIP – peak inspiratory pressure

PIP2 – Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat

PMNL – polymorphonuclear leukocytes

POPG – 16:0/18:1-Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylglycerol

RPM – rounds per minute

R<sub>rs</sub> – Resistance des respiratorischen Systems

S50 – Gruppe von Ferkeln, die der Lungenschädigung zugeführt wurden und jeweils 50mg/kg Surfactant als Intervention erhielten

S200 – Gruppe von Ferkeln, die der Lungenschädigung zugeführt wurden und jeweils 200mg/kg Surfactant als Intervention erhielten

S+IP3 – Gruppe von Ferkeln, die der Lungenschädigung zugeführt wurden und jeweils Surfactant + Myo-Inositol-1,2,6-Triphosphat als Intervention erhielten

S+DOPG – Gruppe von Ferkeln, die der Lungenschädigung zugeführt wurden und jeweils Surfactant + 18:1/18:1-Di-Oleoyl-Phosphatidylglycerol als Intervention erhielten

S+PIP2 – Gruppe von Ferkeln, die der Lungenschädigung zugeführt wurden und jeweils Surfactant + Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat als Intervention erhielten

S+POPG – Gruppe von Ferkeln, die der Lungenschädigung zugeführt wurden und jeweils Surfactant + 16:0/18:1-Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylglycerol als Intervention erhielten

SVRI – systemic vascular resistance index

TdT – Terminal deoxynucleotidyl Transferase

TRIS – Tris(hydroxymethyl)aminomethan

VEI – Ventilationseffizienzindex

V<sub>T</sub> – Tidalvolumen, Atemzugvolumen

## **10. Erklärung**

Hiermit versichere ich, Marie Diekötter, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich erkläre außerdem, dass ich die vorliegende Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

20.10.2021

M. Diekötter

# 11. Anhänge

## 11.1. Genehmigung über die Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume

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



Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt  
und ländliche Räume | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Herrn  
Prof. Dr. Martin F. Krause  
Klinik für Allg. Pädiatrie  
Schwanenweg 20  
24105 Kiel

Ihr Antrag vom: 28.05.2013  
Eingang 06.06.2013

Mein Zeichen: V 241- 72241.121-24 (86-7/13)

Dr. Michael Sekulla  
Michael.Sekulla@MELUR.landsh.de  
Telefon: 0431 988-4948  
Telefax: 0431 988-5246

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

15. August 2013

### **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 15. Juli 2009 (BGBl. I S. 1950), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

*„Vermeidung fibrotischer Lungenveränderungen durch epithelial-mesenchymale- Transition und Inflammasom NLRP3 Interaktion durch Hemmung der sauren Sphingomyelinase und durch Phosphatidylglyzerol-Substitution bei neonatalem Atemnotsyndrom (nARDS)“*

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 8 Saugferkel verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. August 2016 befristet.  
Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.

Dienstgebäude Mercatorstraße 3, 5, 7, 24106 Kiel | Adolf-Westphal-Str. 4, 24143 Kiel | Telefon 0431 988-0 | Telefax 0431 988-7239 |  
poststelle@melur.landsh.de | www.schleswig-holstein.de | E-Mail-Adressen: Kein Zugang für elektronisch signierte oder verschlüsselte  
Dokumente. Das Landeswappen ist gesetzlich geschützt.

3. Leiter des Versuchsvorhabens:  
Herr Prof. Dr. Martin F. Krause
4. Sein Stellvertreter:  
Herr Dr. Dietmar Spengler
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:  
Wie im Antrag vorgeschlagen, sind die Versuche im Rahmen eines Stufenplans durchzuführen. Für die Etablierung des Modells werden hiermit 8 Saugferkel genehmigt. Sollten die im Antrag genannten 16 Tiere benötigt werden, so ist vorab eine detaillierte Begründung vorzulegen.

Die im Antrag gemachten Angaben sind Bestandteil dieser Genehmigung. Sofern vorstehend abweichende Nebenbestimmungen getroffen wurden, gehen diese den Angaben im Antrag vor.

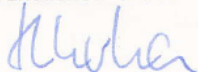
Die Bestimmungen der §§ 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

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. Sekulla



Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt  
und ländliche Räume | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Ihr Antrag vom: 29.08.2013

Mein Zeichen: V 242-7224.121-24 (86-7/13)

Herr Buttchereit

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

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

nachrichtlich:

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

13. September 2013

#### Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken

Sehr geehrter Herr Prof. Krause,

aufgrund Ihres o. a. Antrages können im Rahmen meiner Genehmigung vom 15. August 2013 für das Versuchsvorhaben „Vermeidung fibrotischer Lungenveränderungen durch epithelial-mesenchymale Transition und Inflammation NLRP3 Interaktion durch Hemmung der sauren Sphingomyelinase und durch Phosphatidylglycerol-Substitution bei neonatalem Atemnotsyndrom (nARDS)“ weitere 8 Saugferkel verwendet werden.

Ich weise vorsorglich darauf hin, dass die Sachkunde der im Erweiterungsantrag erwähnten drei Doktorandinnen zu gegebener Zeit noch zu belegen ist.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Sekulla





Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt  
und ländliche Räume | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Ihr Antrag vom: 07.03.2014

Mein Zeichen: V 242-7224.121-24 (86-7/13)

Herr Buttchereit

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

Herrn  
Dr. Dietmar Spengler  
Klinik für Allgemeine Pädiatrie  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Campus Kiel  
Schwanenweg 20  
24105 Kiel

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

3. April 2014

### Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken

Sehr geehrter Herr Dr. Spengler,

aufgrund Ihres o. a. Antrages können im Rahmen meiner Genehmigung vom 15. August 2013 für das Versuchsvorhaben „Vermeidung fibrotischer Lungenveränderungen durch epithelial-mesenchymale Transition und Inflammation NLRP3 Interaktion durch Hemmung der sauren Sphingomyelinase und durch Phosphatidylglycerol-Substitution bei neonatalem Atemnotsyndrom (nARDS)“ weitere 80 Saugferkel verwendet werden.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Sekulla



## **12. Danksagung**

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Krause, der mir die Mitarbeit an diesem Projekt ermöglichte und mich mit viel Geduld vor allem bei der Betreuung des experimentellen Teils dieser Arbeit unterstützte.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Fehrenbach, der mich bei der Auswertung und Methodik der experimentellen Arbeit im Forschungslabor in Borstel und bei der Verfassung dieser Arbeit unterstützt hat.

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Fuchs, die mich sofort nach meiner Anfrage (nachdem Herr Prof. Dr. Krause nicht weiter als Doktorvater zur Verfügung stand) diese Doktorarbeit weiter zu betreuen, unter Ihre Fittiche nahm. Dank ihr habe ich diese Arbeit abschließen können.

Vielen Dank an die fleißigen Mitarbeiter im Forschungszentrum Borstel, die mich beim Zuschneiden des Lungengewebes unterstützt haben, mir bei Nichtgelingen von Färbungen neue Ansätze und Verbesserungsvorschläge entgegenbrachten und die bei Fragen immer ein offenes Ohr für mich hatten. Ich danke vor allem Christina Vock, die jederzeit für Rücksprachen zur Verfügung stand.

Auch danke ich meinem Mann, der mir durch die Betreuung unserer Kinder den Rücken freigehalten hat und mich stets mit aufmunternden Worten motiviert hat.

Ich danke meinen Eltern für Ihre Motivation, diese Arbeit fertig zu stellen und dafür, dass sie mich während dieser Zeit finanziell unterstützt haben, damit ich die vielen Kilometer zum Forschungszentrum Borstel fahren konnte und meiner Schwester, die sich Zeit genommen hat, um diese Arbeit zu lesen und zu kommentieren.

Und ich danke meinen Schwiegereltern, die mir die schriftliche Verfassung dieser Doktorarbeit durch die Betreuung meiner jüngsten Tochter ermöglichten.