

**Aus der Kinderklinik und Poliklinik**

**der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Christian P. Speer, FRCPE**

**Der Einfluss intravenös applizierten Lipopolysaccharids**

**auf die Lungenreifung**

**im Modell des frühgeborenen Lammes**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Andreas Ladenburger**

**aus Aalen**

**Würzburg, Februar 2020**

**Referent:** Professor Dr. med. Boris W. Kramer, Ph.D.

**Korreferentin:** Univ.-Professorin Dr. med. Christine Wulff

**Dekan:** Professor Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**09. September 2021**

**Der Promovend ist Arzt**

*Meiner lieben Pia*

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung .....	1
1.1	Frühgeburtlichkeit .....	1
1.2	Pulmonale Komplikationen der Frühgeburt.....	3
1.3	Lungenentwicklung.....	3
1.3.1	Embryonale Organanlage .....	4
1.3.2	Pseudoglanduläres Stadium.....	5
1.3.3	Kanalikuläres Stadium.....	6
1.3.4	Sakkuläres Stadium .....	7
1.3.4.1	Wachstum der Alveolen - Bedeutung elastischer Fasern .....	7
1.3.5	Klassische Alveolarisation.....	8
1.3.6	Mikrovaskuläre Reifung .....	10
1.3.7	Späte Alveolarisation.....	11
1.3.8	Äußere Einflüsse auf die Lungenentwicklung - Infektion, Entzündung und antenatale Glukokortikoide.....	11
1.4	Atmung.....	14
1.5	Chorioamnionitis und Amnioninfektionssyndrom .....	18
1.5.1	Fetale Auswirkungen einer Chorioamnionitis .....	19
1.6	Das Atemnotsyndrom.....	21
1.6.1	Einfluss der Chorioamnionitis auf das Atemnotsyndrom.....	22
1.6.2	Prävention des Atemnotsyndroms durch Glukokortikoide.....	24
1.6.3	Therapie des Atemnotsyndroms .....	25
1.7	Die Bronchopulmonale Dysplasie.....	26
1.7.1	Die klassische und die neue BPD .....	26
1.7.2	Die BPD als Folge einer Chorioamnionitis .....	29
1.7.3	Die Bedeutung elastischer Fasern.....	29
1.8	Surfactant .....	30
1.8.1	Die Surfactantproteine A und D.....	32
1.8.2	Die Surfactantproteine B und C .....	32
1.9	Zytokine und „second messenger“ (Botenstoffe).....	34
1.9.1	Botenstoffe der Entzündungsreaktion: Interleukin-6 .....	36
1.9.2	Botenstoffe der Entzündungsreaktion: Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-3 .....	37

1.10	Lipopolysaccharide .....	39
1.11	Das Schaf als Tiermodell für das Studium der Lungenreifung .....	41
1.11.1	Tiermodell Schaf: Unterschiede und Gemeinsamkeiten zum Menschen.....	42
1.12	Fragestellung .....	44
2	Material und Methoden .....	45
2.1	Versuchstiere und Tierhaltung .....	45
2.1.1	Erster Eingriff: Operation der Mutterschafe und der Feten.....	45
2.1.2	Infusion des Lipopolysaccharids und Vitalparametermessung .....	46
2.1.3	Zweiter Eingriff: Kaiserschnitt und Fixierung .....	47
2.2	Druck-Volumen-Kurve und Pneumektomie.....	48
2.3	Bronchoalveoläre Lavage (BAL).....	48
2.3.1	Lyophilisieren der BAL .....	49
2.3.2	Bestimmung der Gesamtproteinmenge .....	49
2.3.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	50
2.3.4	Western Blot .....	52
2.4	Histologische Untersuchung des Lungengewebes .....	54
2.4.1	Erstellung von Paraffinschnitten .....	54
2.4.2	Entparaffinieren und Hydratisieren sowie Dehydrieren und Eindecken der Gewebeschnitte.....	54
2.4.3	Hämalaun/Eosin-Färbung.....	55
2.4.4	Färbung intrapulmonaler Elastinfasern .....	55
2.4.5	Immunhistochemische Färbungen.....	56
2.4.5.1	Labelled Streptavidin Biotin (LSAB) Methode .....	56
2.4.6	Auswertung der Färbungen .....	58
2.4.7	Beurteilung der Lungenmorphologie.....	59
2.5	Statistische Auswertung .....	59
3	Ergebnisse.....	60
3.1	Vitalparameter nach LPS-Infusion .....	60
3.2	Geburtsgewicht der Versuchstiere .....	62
3.3	Pulmonale Compliance .....	62
3.4	Histologische Untersuchungen des Lungengewebes .....	63
3.4.1	Morphologische Veränderungen.....	63

3.4.2	Elastinverteilung.....	65
3.4.3	Zellproliferation.....	67
3.4.4	Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-3 .....	69
3.4.4.1	STAT-3, unphosphoryliert .....	69
3.4.4.2	Phospho-STAT-3 (Ser727).....	71
3.4.4.3	Phospho-STAT-3 (Tyr705) .....	73
3.5	Auswertung der Bronchoalveolären Lavage.....	75
3.5.1	Gesamtproteinmenge .....	75
3.5.2	Interleukin-6 .....	76
3.6	Surfactantprotein (SP)-B .....	77
3.6.1	Nachweis von SP-B in der BAL.....	77
3.6.2	Immunhistochemischer Nachweis von SP-B im Lungengewebe.....	78
4	Diskussion .....	81
5	Zusammenfassung .....	89
6	Literaturverzeichnis .....	91
	Abbildungsverzeichnis .....	109
	Tabellenverzeichnis .....	111
	Abkürzungen .....	112
	Danksagung	
	Lebenslauf	

# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Frühgeburtlichkeit

Frühgeburtlichkeit ist ein weltweites Problem, das pro Jahr 1,1 Millionen Kindern das Leben kostet <sup>(Althabe 2012)</sup>. Laut der im Jahr 1986 revidierten Klassifikation der World Health Organisation (WHO) wird ein lebendes Neugeborenes mit einem Gestationsalter von weniger als 37 abgeschlossenen Wochen als Frühgeborenes bezeichnet. Neugeborene mit weniger als 1500g Geburtsgewicht bezeichnet man als sehr kleine Frühgeborene (VLBW: very low birth weight infants) <sup>(Philip 1995)</sup>. In Deutschland, Österreich und der Schweiz werden jährlich 75000 Kinder zu früh geboren, was ca. 9% aller Neugeborenen entspricht. Die Tendenz ist steigend <sup>(Jorch 2006)</sup>. Etwa 1,5% aller Geburten erfolgen bereits vor vollendeter 32. Schwangerschaftswoche <sup>(Speer 2004)</sup>.

Die Frühgeburt ist die Hauptursache kindlicher Mortalität weltweit <sup>(Kramer 2000)</sup>. 70% aller perinatalen Todesfälle und fast die Hälfte aller bleibenden neurologischen Schädigungen sind auf eine Frühgeburt zurückzuführen <sup>(Hack 2000, Hack 1993)</sup>. Die wichtigsten Ursachen einer Frühgeburt sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Hierzu zählen maternales Alter, plazentäre Störungen, intrauterine Infektionen (wie zum Beispiel die Chorioamnionitis), immunologische Abweichungen, zervikale Insuffizienz, uterine Abnormalitäten und Mehrlingsschwangerschaften <sup>(Goldenberg 2003, Goldenberg 2000, Lettieri 1993)</sup>.

**Ursachen einer Frühgeburt**

Intrinsische Ursachen	Extrinsische Ursachen
Maternales Alter	Fortschritt Reproduktionsmedizin
Plazentäre Störungen	Zunahme künstlicher Befruchtungen
Intrauterine Infektionen	Nikotinabusus
Systemische maternale Infektionen	
Immunologische Abweichungen	
Zervikale Insuffizienz	
Uterine Abnormalitäten	
Mehrlingsschwangerschaften	
Mangelernährung	

*Tabelle 1: Auszug möglicher Ursachen einer Frühgeburt.*

Der Fortschritt der Reproduktionsmedizin und die Zunahme künstlicher Befruchtungen haben zu einem weiteren Anstieg der Frühgeburten geführt, zusätzlich zu den hierdurch häufigeren Mehrlingsschwangerschaften (Allen 2008, Wang 2002).

Trotz jahrzehntelanger Forschung und verschiedenster Behandlungsansätze zur Vermeidung einer Frühgeburt hat die Rate an Frühgeburten nicht abgenommen. Jedoch haben sich in den vergangenen Jahren durch moderne Therapieansätze die Überlebenschancen eines Frühgeborenen verbessert (Allen 2011, Klebanoff 2011). Die maternale Therapie mit Glukokortikoiden verringert die neonatale Morbidität und Mortalität signifikant, sofern die Frühgeburt um mindestens 48h verzögert werden kann (Gilbert 2006).

Die Überlebenschance eines Frühgeborenen steigt rapide mit dem Gestationsalter (Abbildung 1). Nach 23 vollendeten Gestationswochen ist die Überlebensrate lediglich 24%, nach 24 Wochen bereits 57% und nach 25 Wochen schon 74% (Gilbert 2006).

## Überlebenschance Frühgeborener

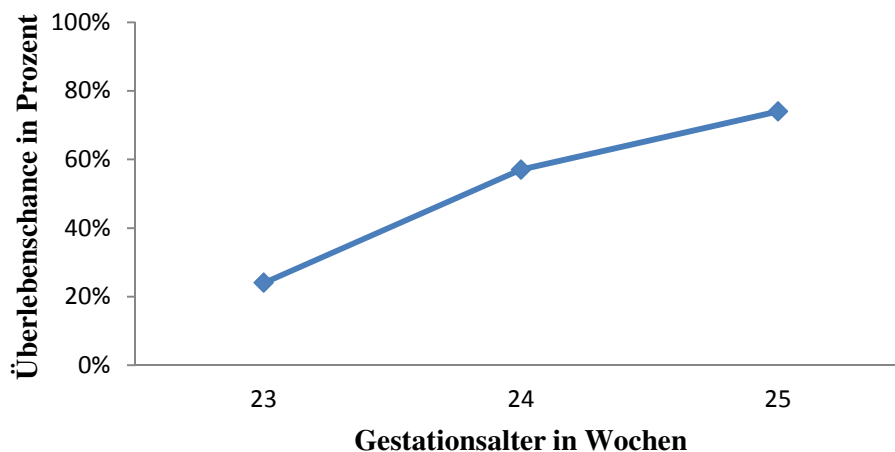


Abbildung 1: Überlebenschance eines Frühgeborenen in Prozent in Abhängigkeit vom Gestationsalter in Wochen nach (Gilbert 2006).

Darüber hinaus ist auch das Geschlecht des Frühgeborenen entscheidend. Weibliche Frühgeborene haben eine höhere Überlebenschance. Auch die immensen Fortschritte der Frühgeborenenmedizin können bislang diese geschlechterspezifische Differenz nicht angleichen (Stevenson 2000).



## 1.2 Pulmonale Komplikationen der Frühgeburt

Zu den schwerwiegendsten Problemen sehr kleiner Frühgeborener zählt nach wie vor die Unreife der Lunge, die zu einem Atemnotsyndrom (RDS: respiratory distress syndrome) oder im späteren Verlauf zu einer chronischen Lungenerkrankung, der bronchopulmonalen Dysplasie (BPD), führen kann. Vor allem sehr kleine Frühgeborene haben ein hohes Risiko eines Atemnotsyndroms. Lediglich 1% aller am regulären Termin geborenen Kinder erkranken an einem RDS, hingegen bis zu 60% der Frühgeborenen unterhalb der 30. vollendeten Gestationswoche <sup>(Speer 2004)</sup>. Daher ist eine der häufigsten Todesursachen sehr kleiner Frühgeborener die pulmonale Insuffizienz bei einem RDS (Costeloe 2000, Doyle 1999).

## 1.3 Lungenentwicklung

Die Lungenentwicklung umfasst einerseits das reine Größenwachstum des Organs, andererseits die morphologische und biochemische Lungenreifung <sup>(DiFiore 1994, Langston 1984)</sup>. Nach der embryonalen Anlage, der Organogenese, wird die Organdifferenzierung anhand morphologischer Unterschiede in mehrere Stadien unterteilt (Tabelle 2).

Entwicklungsstadium	Zeitperiode	Dauer	pränatal Embryonal- periode Fetalperiode
Embryonale Lungenbildung	26. Tag – 8. Woche	30 Tage	
Pseudoglanduläres Stadium	5. – 17. Woche	84 Tage	
Kanalikuläres Stadium	16. – 26. Woche	70 Tage	
Sakkuläres Stadium	24. Woche – Geburt	98 Tage	
Klassische Alveolarisation	36. Woche – 2. bis 3. Lebensjahr	2 – 3 Jahre	postnatal
Mikrovaskuläre Reifung	Geburt – 2. bis 3. Lebensjahr	2 – 3 Jahre	
Späte Alveolarisation	2. bis 3. Lebensjahr – 21. Lebensjahr	18 Jahre	
Lungenwachstum	3. Lebensjahr – 21. Lebensjahr	18 Jahre	
Alterserscheinungen	~35. Lebensjahr – Tod		

Tabelle 2: Zeitliche Abfolge der Stadien der prä- und postnatalen Lungenentwicklung des Menschen nach <sup>(Mutius 2013)</sup> und <sup>(Burri 2006)</sup>. Die Alveolarisation beginnt erst wenige Wochen vor der Geburt und setzt sich mindestens bis ins junge Erwachsenenalter fort.

Hierbei zeigen sich jedoch Überlappungen zwischen den einzelnen Abschnitten. Außerdem bestehen deutliche interindividuelle Unterschiede in der zeitlichen Reihenfolge.

Die Kenntnisse der Lungenentwicklung des Menschen vor und nach der Geburt haben in den vergangenen Jahrzehnten deutlich zugenommen. Albert von Kölliker nahm 1879 an, die Lunge des Erwachsenen entstehe durch schlichte Vergrößerung der Lunge des Neugeborenen (Kölliker 1879). Heute ist hingegen belegt, dass die Entwicklung der menschlichen Lunge zum Zeitpunkt der Geburt keinesfalls abgeschlossen ist (Zeltner 1987, Zeltner 1987). Die Lunge eines Neugeborenen enthält nur etwa 50 Millionen Alveolen (Langston 1984), während die Lunge eines Schulkindes über 300 Millionen Alveolen besitzt (Davies 1970).

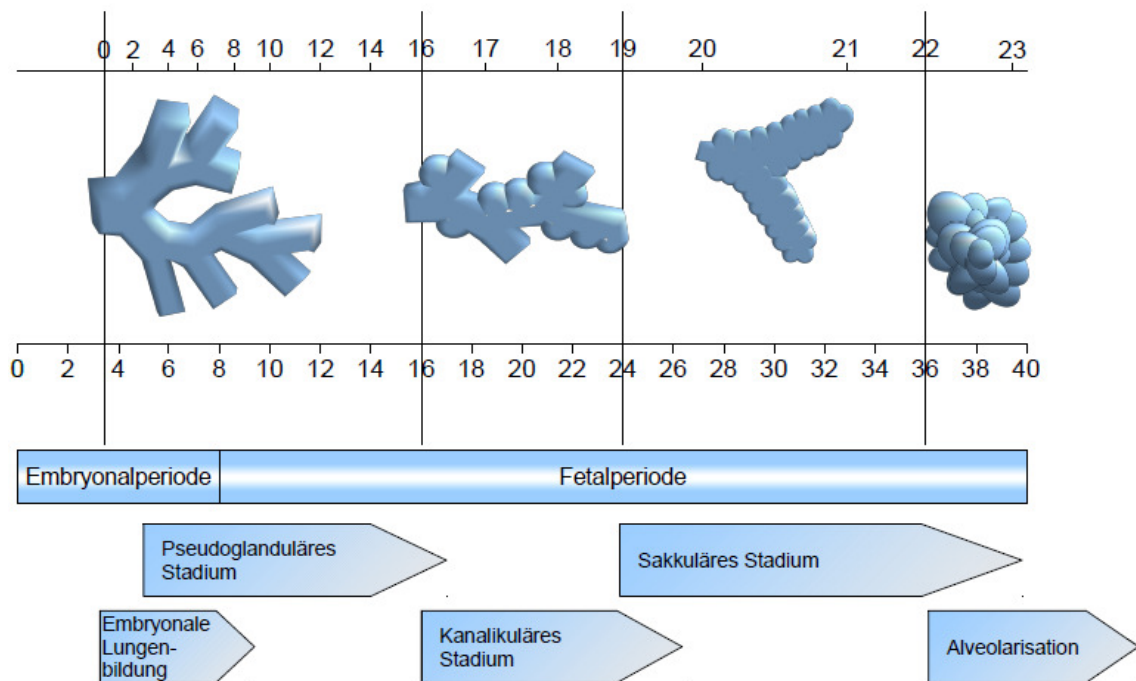


Abbildung 2: Die Stadien der Lungenentwicklung des Menschen (unterer Zeitstrahl) in der zeitlichen Abfolge nach Gestationsalter in Wochen. Parallel hierzu ist maßstabsverändert das jeweils zugehörige Gestationsalter des Schafes dargestellt (oberer Zeitstrahl) (Kramer 2008, Pringle 1986, Mutius 2013, Einverständnis liegt vor).

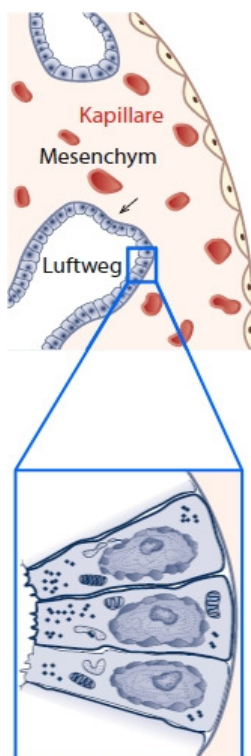
### 1.3.1 Embryonale Organanlage

In der embryonalen Periode wird die Lunge aus dem entodermalen Keimblatt angelegt, wobei rechte und linke Lunge separat angelegt werden. Etwa ab dem 26. Gestationstag

bilden sich zwei Lungenknospen, dazwischen befindet sich die Anlage der Trachea. Rasch bilden sich nun Hauptbronchien und Lungenlappen. Die Zahl und Komplexität der Atemwege nimmt durch dichotome Teilung exponentiell zu, bis sich in der 7. Woche bereits die subsegmentalen Äste des Atemwegsbaumes gebildet haben <sup>(Mutius 2013)</sup>.

Es besteht auch bereits ein aus dem 6. Aortenbogenpaar gespeister vaskulärer Plexus. Der proximale Anteil dieses Bogenpaares bildet die Pulmonalarterien, der linke distale Anteil bildet den Ductus arteriosus Botalli, durch den intrauterin als Umgehung der Lunge der Hauptanteil des rechtsseitigen Auswurfvolumens des Herzens fließt. Die Pulmonalvenen entstehen aus einer dorsalen Knospe des embryonalen Vorhofs, die sich mehrmals teilt und mit dem vaskulären Plexus in Verbindung tritt. Die Bronchialarterien entspringen erst ab der 12. Gestationswoche, für die linke Seite aus der nun singulären Aorta, für die rechte Seite aus der dritten und vierten Interkostalarterie <sup>(Mutius 2013)</sup>.

### 1.3.2 Pseudoglanduläres Stadium



Während des pseudoglandulären Stadiums, von der 5. bis zur 17. Gestationswoche, hat die Lunge das lichtmikroskopische Aussehen einer verzweigten Drüse (Abbildung 3). Es ist der Beginn der fetalen Lungenentwicklung. Jetzt entstehen alle rein leitenden Atemwege und der erste Teil des Parenchyμβαumes bis hin zu den Ductus alveolares der 20. Teilungsgeneration <sup>(Kitaoka 1996, Mutius 2013)</sup>.

Die Zellen und Gewebe der zentralen Luftwege sind teilweise differenziert, auch die ersten Alveolarepithelzellen können nachgewiesen werden. Bereits ab der 9. Gestationswoche können erste intrauterine Atembewegungen sonografisch nachgewiesen

werden <sup>(Andonotopo 2005)</sup>. Diese

Atembewegungen sind für die Lungenentwicklung essentiell <sup>(Kramer 1999,</sup>

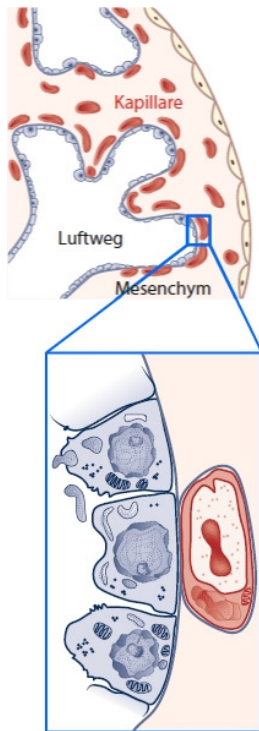
Roberts 1995, Wigglesworth 1982), da die zyklische

*Abbildung 3: Lunge eines Feten im pseudoglandulären Stadium* <sup>(Mutius 2013, Einverständnis liegt vor)</sup>

Veränderung der Lunge ein Wachstumsreiz ist. Das intrauterine Lungenwachstum hängt weiterhin von physikalischen Umgebungsfaktoren wie intrathorakalem Raum, vorhandener Fruchtwassermenge und intrapulmonalem Druck und dessen

Veränderungen ab (Alcorn 1977). Organveränderungen, wie Splenomegalie, Diaphragmahernien, Skelettmissbildungen, Hydrothorax oder auch neuromuskuläre Erkrankungen (Alcorn 1980, Cunningham 1978) können ebenso wie fehlende intrauterine Atembewegungen Ursache einer Lungenhypoplasie sein (Kramer 1999).

### 1.3.3 Kanalikuläres Stadium



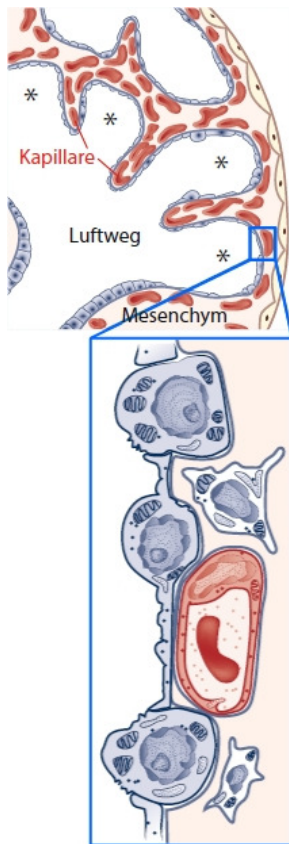
Die Lunge entwickelt sich in den kranialen Segmenten schneller als in den kaudalen Anteilen (Kramer 2008). Daher überlappt das von der 16. bis zur 26. Gestationswoche verlaufende kanalikuläre Stadium in den oberen Lungenanteilen mit dem pseudoglandulären Stadium. Dieses Stadium ist geprägt durch ein wachsendes Kapillarnetz und durch eine Differenzierung der distalen Luftwege des Parenchyms. Die sich hierdurch bildenden Canaliculi bekommen engen Kontakt zu dem Kapillarnetz (Mutius 2013). Synchron hierzu beginnt die Differenzierung der Alveolarepithelzellen (Pneumozyten). Ein Teil der kubischen, undifferenzierten Epithelzellen wird zu flachen Typ-I-Alveolarepithelzellen, welche die Luft-Blut-Schranke bilden. Typ-II-Alveolarepithelzellen behalten ihre kubische

*Abbildung 4: Lunge eines Feten im kanalikulären Stadium (Mutius 2013, Einverständnis liegt vor)*

Form bei und bilden lamelläre Einschlüsse, eine Vorstufe des späteren Surfactants. Es kann erstmalig während des kanalikulären Stadiums im Fruchtwasser nachgewiesen werden. Obwohl sich die Zahl der Typ-I- und der Typ-II-Pneumozyten in der erwachsenen Lunge lediglich geringfügig unterscheidet, besetzen Typ-I-Pneumozyten 97% der alveolären Oberfläche (Castranova 1988, Fukuda 1983).

Am Ende des kanalikulären Stadiums bestehen bereits funktionstüchtige Parenchymanteile. Blutgefäße und luftgefüllte Strukturen sind sich erstmals so nah, dass ein Gasaustausch durch Diffusion möglich wird. Jetzt hat ein Frühgeborenes eine Überlebenschance (Mutius 2013).

### 1.3.4 Sakkuläres Stadium



Das sakkuläre Stadium beginnt ab der 24. Gestationswoche und verläuft bis zur Geburt. Im späten kanalikulären und im frühen sakkulären Stadium vergrößern sich die Oberfläche der Lunge und das Lungenvolumen exponentiell. Es entstehen die letzten Generationen der Luftwege einschließlich der Ductus alveolares, deren am weitesten peripher gelegene Abschlüsse glattwandige Sacculi alveolares bilden. Die für den Gasaustausch relevante Oberfläche wächst nun stark (Mutius 2013).

Die Wand der Sacculi wird von Primärsepten aus Bindegewebe, doppelter Kapillarschicht und epitheliale Überzug gebildet (Abbildung 6). Im nun dünner werdenden Bindegewebe treten vermehrt elastische Fasern auf, die für die Alveolenbildung von

Abbildung 5:  
Lunge eines Feten  
im sakkulären  
Stadium (Mutius 2013,  
Einverständnis liegt vor)

entscheidender Bedeutung sind. Die ersten vereinzelt alveolären Strukturen sind in der Regel frühestens in der 29. Gestationswoche nachweisbar (Hislop 1986).

#### 1.3.4.1 Wachstum der Alveolen - Bedeutung elastischer Fasern

Bei der Entwicklung alveolärer Septen spielen drei extrazelluläre Elemente eine wichtige Rolle: Elastische Fasern, Kollagenfasern und die epitheliale Basalmembran (Fukuda 1983).

Elastische Fasern bestehen aus Kollagen, verschiedenen Glykoproteinen und Elastin. Ihnen kommt in der Lunge eine besondere Bedeutung zu. Das darin enthaltene Elastin ist maßgeblich für die biomechanischen Eigenschaften verantwortlich und verleiht verschiedenen Organen ihre Elastizität. Elastin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 68 kDa (Löffler 1998), das aus Polypeptid-Untereinheiten besteht. Neben der Lunge kommt es vor allem in Blutgefäßen und in der Haut vor.

Verschiedene Zellen sezernieren Pro- oder Tropoelastin, woraus Elastin als Proteinnetzwerk durch das Enzym Lysiloxidase gebildet wird. Die Expression des auf Chromosom 7q11 liegenden Elastingens unterliegt dem Einfluss von Wachstumsfaktoren (Insulin-like Growth Factor (IGF)-1) oder Zytokinen (Tumor

Nekrose Faktor (TNF)- $\alpha$ , Interleukin (IL)-1) (Löffler 1998).

Elastin spielt eine entscheidende Rolle bei der Verzweigung der terminalen Luftwege (Wendel 2000) sowie bei der Alveolarisation (Burri 1974, Lindahl 1997). Das durch alveoläre Myofibroblasten an den Spitzen zukünftiger Alveolarsepten synthetisierte Elastin markiert die Orte zukünftigen Wachstums neuer Alveolen (Abbildung 6).

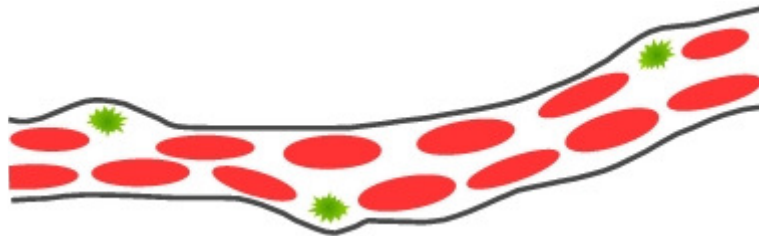


Abbildung 6: Primäres Septum im sakkulären Stadium. Elastin (grün) markiert die sich bildenden Alveolarsepten. Modifiziert nach (Schittny 2008, Einverständnis liegt vor).

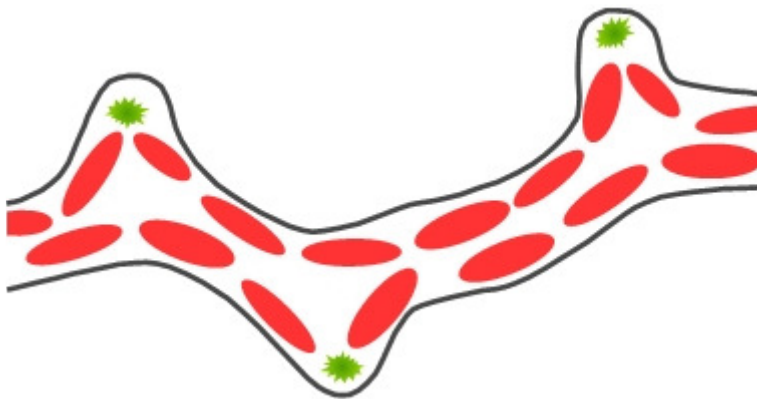
In der alveolären Phase ist die Menge an Elastin in den Spitzen der Alveolarsepten erhöht, lediglich geringe Mengen an elastischen Fasern sind in den Alveolarwänden außerhalb der Spitzen der Septen nachweisbar (Fukuda 1983).

### 1.3.5 Klassische Alveolarisation

Ab der 36. Woche ist die Differenzierung der Epithelzellen fast vollständig abgeschlossen und es bilden sich vermehrt Alveolen in den sakkulären Erweiterungen. Die Alveolarisation beginnt etwa ab der 36. Gestationswoche und findet größtenteils nach der Geburt statt. Die Alveolarisation wird mittlerweile unterteilt in die klassische Alveolarisation, die im 3. Lebensjahr endet, und die sich bis ins Erwachsenenalter fortsetzende späte Alveolarisation (Mutius 2013). Die Bildung neuer Gasaustauschregionen durch die späte Alveolarisation findet teilweise auch noch im Erwachsenenalter statt, jedoch in abnehmendem Maße. Das Verständnis der postnatalen Entwicklung des Lungenwachstums nach einer Frühgeburt ist jedoch noch unvollständig (Hislop 1987).

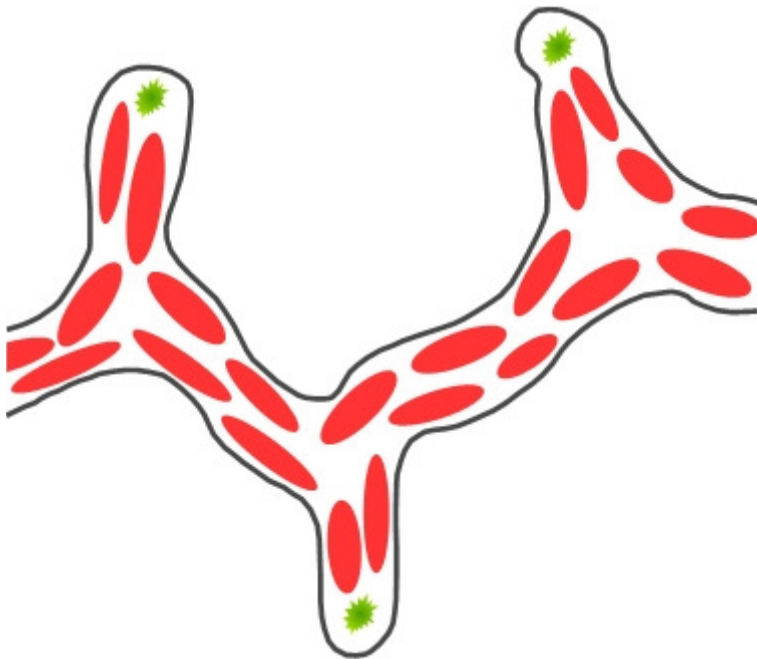
Die alveolären Septen der reifen Lunge können in primäre alveoläre Septen, die Wände der Sacculi und in sekundäre Septen unterteilt werden. Letztere ragen aus den Wänden der Sacculi hervor und bilden Gewebespitzen, die die terminalen Sacculi weiter unterteilen (Fukuda 1983). Bronchioli respiratorii, Ductus alveolares und endständige Sacculi alveolares beginnen sich durch die von primären Septen ausgehenden sekundären Septen zu unterteilen (Abbildung 7), was zu einer raschen und massiven

Vergrößerung der inneren Oberfläche der Lunge führt. Ein neues Septum bildet sich als Auffaltung einer Septumseite mit zugehörigem Kapillarnetz <sup>(Burri 1974)</sup>.



*Abbildung 7: Klassische Alveolarisation mit beginnender Bildung sekundärer Septen. Elastin (grün) markiert die sich bildenden Alveolarsepten. Modifiziert nach <sup>(Schittny 2008, Einverständnis liegt vor)</sup>.*

Sekundäre Septen besitzen wie primäre Septen zunächst noch ein doppeltes Kapillarnetz <sup>(Burri 2006)</sup>. Durch Längenwachstum der sekundären Septen (Abbildung 8) werden die bestehenden Lufträume weiter geteilt. Durch die sich hierdurch bildenden Alveolen wird die für den Gasaustausch relevante Oberfläche weiter vergrößert.

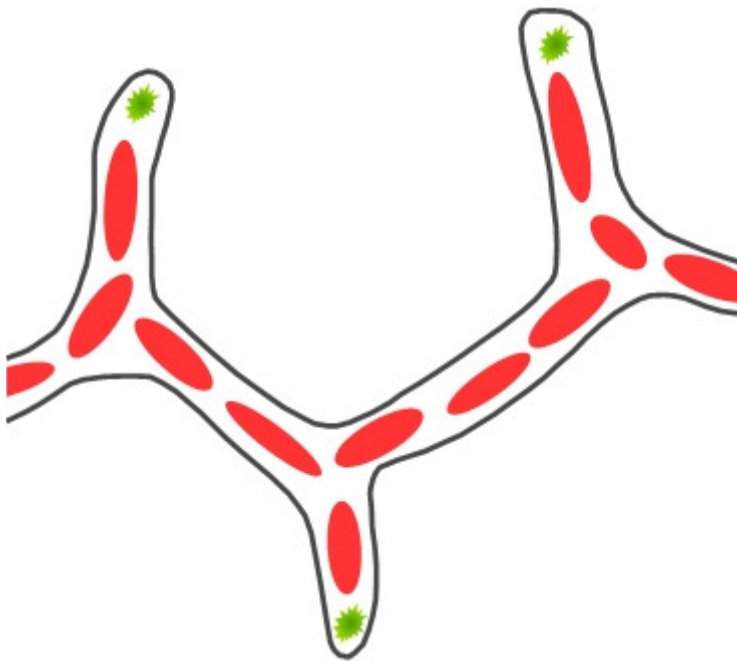


*Abbildung 8: Teilung bestehender Lufträume durch Reifung der Alveolarsepten. Elastin (grün) befindet sich noch immer in den Spitzen der Sekundärsepten. Die neuen Septen sind weiterhin doppelschichtig kapillarisiert. Modifiziert nach <sup>(Schittny 2008, Einverständnis liegt vor)</sup>.*

Die meisten Alveolen werden in den ersten 6 Lebensmonaten gebildet, hierdurch nimmt der parenchymalen Luftraum in diesem Zeitraum deutlich zu <sup>(Zeltner 1987)</sup>. Die Alveolarisation ist ein bedeutender Entwicklungsschritt, vergleicht man die zwanzigfach vergrößerte Gasaustauschfläche der Lunge des Erwachsenen mit der eines Neugeborenen <sup>(Burri 2006)</sup>.

### 1.3.6 Mikrovaskuläre Reifung

Während der mikrovaskulären Reifung, nach der Geburt bis zum 3. Lebensjahr, bilden sich die primitiven dicken Septen mit doppelten Kapillarnetzen durch Abnahme des Bindegewebes und Fusion der Kapillarnetze in dünne Septen mit singulärer Kapillarschicht um <sup>(Mutius 2013)</sup>. Die mikrovaskuläre Reifung findet parallel zur Alveolarisation statt. Apoptotische Prozesse spielen dabei eine zentrale Rolle <sup>(Mutius 2013)</sup>. Die Umwandlung wird weiter durch bevorzugtes Wachstum der Bereiche mit bereits erfolgter Kapillarfusion vorangetrieben <sup>(Zeltner 1987)</sup>.



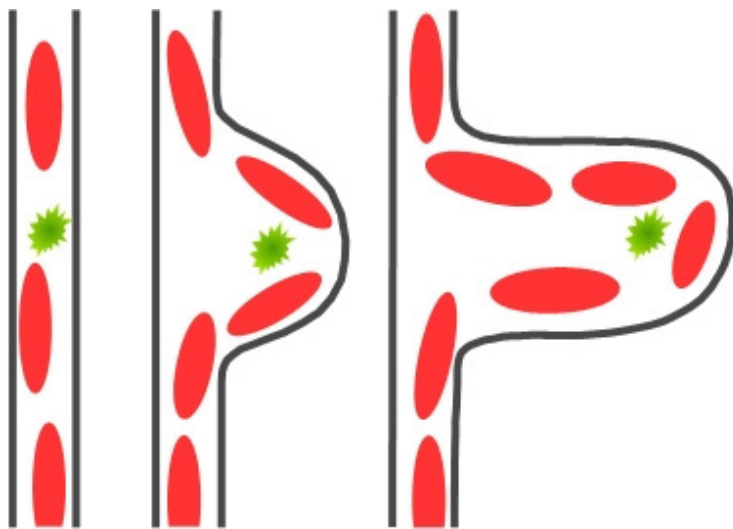
*Abbildung 9: Fusion der Kapillarnetze zu einer einschichtigen Alveolarwand im Rahmen der mikrovaskulären Reifung. Modifiziert nach <sup>(Schittny 2008)</sup>.  
Einverständnis liegt vor.*

Im Bereich direkter Kontakte zwischen Alveolarepithelzellen durch das Septum hindurch bilden sich Septendurchbrüche mit anschließender Umorganisation der Zellgrenzen zu Kohn-Poren, durch die benachbarte Alveolen miteinander verbunden werden <sup>(Cordingley 1972)</sup>. Die Bedeutung dieser Poren ist bislang nicht vollständig geklärt. Möglicherweise können Alveolarmakrophagen durch sie hindurch migrieren, oder sie erleichtern die pulmonale Verteilung des Surfactantfilms. Unterstützt wird diese Theorie durch die enge anatomische Beziehung der Kohn-Poren zu Alveolar-Typ-II-Zellen <sup>(Takaro 1985)</sup>. Der mikrovaskuläre Umbau wurde als finaler Schritt der pulmonalen Entwicklung angesehen <sup>(Burri 1974, Rieger 1999)</sup>. Letztendlich besitzt nun die Lunge eine adulte Morphologie.



### 1.3.7 Späte Alveolarisation

Die klassische Alveolarisation ist wahrscheinlich im 3. Lebensjahr abgeschlossen. Aber auch danach werden weiterhin Alveolen gebildet <sup>(Massaro 1993)</sup>, wenn auch mit deutlich reduzierter Geschwindigkeit und vor allem in subpleuralen Bereichen. Lange wurde angenommen, dass die Lunge nach dem 3. Lebensjahr ohne wesentliche strukturelle Änderungen bis zum Ende des Thoraxwachstums zu ihrer endgültigen Größe lediglich heranwächst <sup>(Zeltner 1987)</sup>. Mittlerweile ist jedoch das Stadium der späten Alveolarisation allgemein anerkannt (Abbildung 10), das sich mindestens bis in das junge Erwachsenenalter fortsetzt <sup>(Burri 2006, Mutius 2013)</sup>.



*Abbildung 10: Späte Alveolarisation. Die Bildung neuer Septen erfolgt durch Auffaltung des Gewebes. Es entsteht somit zunächst wieder ein doppelschichtiges Kapillarnetzwerk. Weiterhin scheint hierbei Elastin (grün) eine relevante Rolle zu spielen. Modifiziert nach (Schittny 2008, Einverständnis liegt vor).*

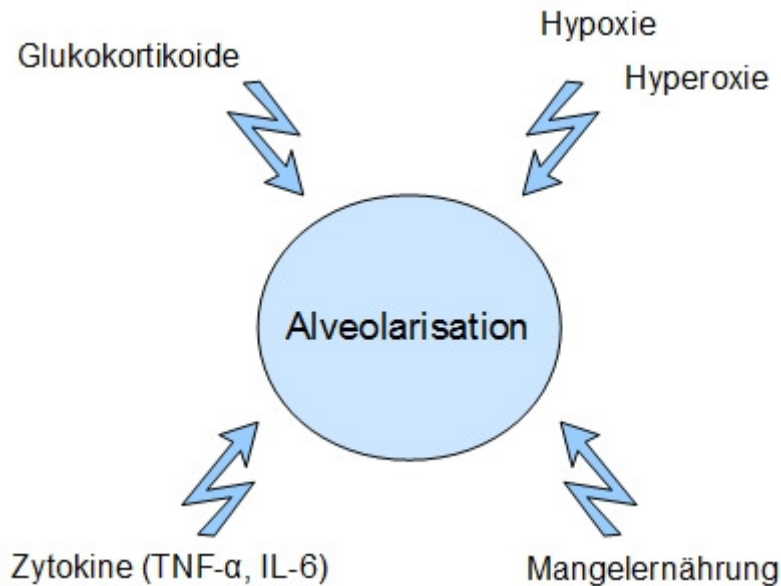
Darauf folgt eine mehrjährige strukturelle Stabilität, bis schließlich Alterungserscheinungen mit dem Verlust von Alveolen und einer Verringerung der Gasaustauschoberfläche auftreten <sup>(Burri 2006)</sup>.

### 1.3.8 Äußere Einflüsse auf die Lungenentwicklung - Infektion, Entzündung und antenatale Glukokortikoide

Zum Verständnis der möglichen Pathologien, die durch schädliche Einflüsse auf die Lunge des Feten entstehen können, ist es wichtig, den zeitlichen Ablauf und die unterschiedlichen Entwicklungen in den einzelnen Stadien der Lungenentwicklung zu kennen (Abbildung 2). Abhängig vom jeweiligen Entwicklungsstadium kann die Auswirkung eines schädlichen Ereignisses unterschiedliche Ausmaße annehmen.

Ein Gasaustausch durch Diffusion ist bereits vor Beginn der vermehrten Alveolenbildung ab der 34. Gestationswoche möglich. Daher können nach einer Frühgeburt in diesem Alter die klinischen Symptome eines Atemnotsyndroms sehr mild bis vollständig abwesend sein <sup>(Zeltner 1987)</sup>. Sehr kleine Frühgeborene, die zwischen der 24. und 28. Gestationswoche geboren werden, stehen jedoch gerade vor dem Beginn der Alveolarisation und der Ausbildung des alveolären Kapillarbetts <sup>(Jobe 1999)</sup>. Die Lunge befindet sich zum Zeitpunkt der Geburt sehr kleiner Frühgeborener erst am Ende des kanalikulären Stadiums und am Beginn des sakkulären Stadiums, während die Alveolarisation nicht vor der 30. Gestationswoche einsetzt <sup>(Jobe 2001)</sup>. Die Lungenentwicklung sehr kleiner Frühgeborener muss sich postnatal noch fortsetzen, da die fetale Lunge sich zwischen der 24. und 28. Gestationswoche gerade erst zu einem gasaustauschenden Organ zu entwickeln beginnt <sup>(Hislop 1986, Langston 1984)</sup>. Dennoch leiden Frühgeborene nach vollendeter 26. Gestationswoche nicht zwangsläufig unter einem schwerwiegenden Atemnotsyndrom oder späteren Lungenerkrankungen. Eine mögliche Erklärung lautet, dass fetaler Stress zu einer Lungenreifung führt. Antenatal verabreichte Glukokortikoide können die Inzidenz des RDS um 40-50% reduzieren. Bei drohender Frühgeburt können mindestens 48 Stunden vor der Geburt verabreichte Glukokortikoide die Lungenreifung beschleunigen <sup>(Bolt 2001, Gilbert 2006)</sup>. Ebenso führt ein mütterliches Amnioninfektionssyndrom zu einer beschleunigten Lungenreifung <sup>(Jobe 2005, Kramer 2007)</sup>. Die zunächst plumpen Alveolarsepten verschmälern sich und die biochemische Lungenreifung mit Surfactantbildung wird beschleunigt, jedoch wird gleichzeitig die Alveolarisation negativ beeinflusst <sup>(Crowley 1995, Jobe 1998, Massaro 1996, Pinkerton 1997)</sup>. Dies wird durch klinische Daten bestätigt. Wie eine Studie aller Kinder, die 1995 vor der 26. Gestationswoche in Großbritannien und Irland geboren wurden, zeigte, steigt die Überlebensrate sowohl bei antenatal verabreichten Kortikosteroiden als auch bei mütterlicher Chorioamnionitis <sup>(Costeloe 2000)</sup>. Die Lungenreifung wird jedoch nicht ausschließlich bei extrem Frühgeborenen positiv beeinflusst. Auch in der späteren Schwangerschaft bis zur 32. Schwangerschaftswoche kann sowohl durch die Gabe von Glukokortikoiden als auch durch eine intrauterine Infektion noch ein Effekt auf die Lungenreifung ausgeübt werden. Auch im Stadium der Alveolarisation sind Verzögerungen der Entwicklung auf Basis vielfältiger Faktoren möglich. Die Alveolarisation kann durch Hypoxie, Hyperoxie,

Glukokortikoide und Mangelernährung verzögert werden <sup>(Massaro 1996)</sup> (Abbildung 11). Der negative Einfluss der Glukokortikoide kann wiederum durch Vitamin A zum Teil reduziert werden <sup>(Massaro 2001, Massaro 1996)</sup>.



*Abbildung 11: Negative Einflussfaktoren auf die Alveolarisation.*

Auch Zytokine spielen eine bedeutende Rolle bei der Alveolarisation. So führt eine Überexpression von TNF- $\alpha$  im pulmonalen Epithelgewebe zu einer Entzündung, verbunden mit einer reduzierten Alveolenzahl <sup>(Miyazaki 1995)</sup>. Die Überexpression von IL-6 führt zu lymphozytärem Infiltrat in der Lunge und ebenfalls zahlenmäßig weniger, jedoch größeren Alveolen <sup>(DiCosmo 1994)</sup>. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass eine Entzündungsreaktion das Lungenwachstum in der Alveolarisation beeinträchtigt.

Wie in Abbildung 11 dargestellt, ist die Entwicklung der Lunge durch viele Faktoren bedroht. In Abbildung 12 sind verschiedene Einflussfaktoren auf die Entwicklung der Lunge im zeitlichen Verlauf im Rahmen einer Frühgeburt dargestellt. Die Störung der Lungenentwicklung führt durch eine Simplifizierung der Lungenstruktur zu einer chronischen Schädigung der Lunge. Verschiedene protektive Faktoren können einer gestörten Lungenentwicklung entgegenwirken. Weiterhin werden Reparaturmechanismen aktiviert, durch die strukturelle Schäden der Lunge vermindert werden können. Es treten sich gegenseitig teilweise aufhebende Effekte auf <sup>(Hutten 2014)</sup>.

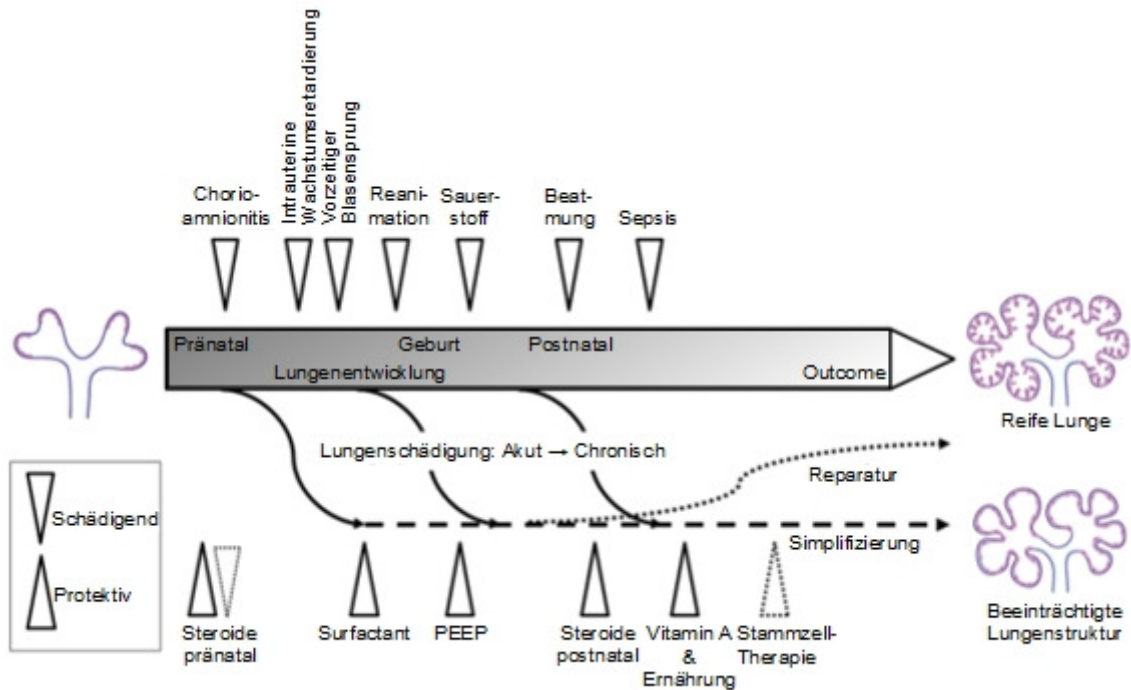


Abbildung 12: Prä- und postnatale Einflüsse, die zu einer gestörten Entwicklung der Lunge führen und gegensteuernde, protektive Einflussfaktoren sowie Reparaturmechanismen. Modifiziert nach (Hutten 2014, Einverständnis liegt vor).

## 1.4 Atmung

Die eukaryote Zelle bezieht ihre Energie vorwiegend aus dem oxidativen Abbau von Nährstoffen zu Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) und Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Die Atmung bezeichnet den Gasaustausch, durch den ständig der hierfür nötige Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) hinzugeführt und  $\text{CO}_2$  eliminiert wird (Schmidt 2005). Der konvektive Transport zu den Lungenalveolen durch die Ventilation und die anschließende Diffusion in das Lungenkapillarblut werden unter der Bezeichnung Lungenatmung zusammengefasst. Darauf folgt der Atemgastransport durch das Blut in die verschiedenen Gewebe, bis schließlich im Rahmen der inneren Atmung das Atemgas von den Gewebekapillaren in die umgebenden Zellen diffundiert. Der Abtransport von  $\text{CO}_2$  findet in umgekehrter Reihenfolge statt (Thews 2005). Nur der geringste Teil des  $\text{O}_2$  ist im Blut physikalisch gelöst, etwa 98% werden an Hämoglobin gebunden transportiert.  $\text{CO}_2$  nimmt den umgekehrten Weg über Blut und Alveolen zur Ausatemluft.  $\text{CO}_2$  liegt mit etwa 5% zu einem höheren Anteil physikalisch gelöst vor, der überwiegende Rücktransport findet jedoch in chemisch gelöster Form statt. 5%

werden nach Anlagerung an freie Aminogruppen des Hämoglobins als Carbaminohämoglobin transportiert, der überwiegende Teil wird in Bikarbonat umgesetzt. Diese Reaktion wird durch das in Erythrozyten vorhandene Enzym Karboanhydrase beschleunigt. Weitere 30% des CO<sub>2</sub> verbleiben als Bikarbonat in den Erythrozyten, während die restlichen 60% ebenfalls in Form von Bikarbonat ins Blutplasma diffundieren <sup>(Thews 2005)</sup>.

Für die Inspiration ist ein durch das Zwerchfell erzeugter Unterdruck notwendig. Das Verhältnis aus Volumen und jeweils dafür nötigem Druck wird als Compliance bezeichnet. Somit spiegelt die Compliance die Dehnbarkeit der Lunge wieder. Bei herabgesetzter Compliance muss mehr Arbeit zur Inspiration aufgewendet werden.

Im Rahmen der Lungenatmung gelangt die Atemluft über Rachenraum, Trachea, Bronchien, Bronchiolen, Bronchioli respiratorii und Ductus alveolares zu den Alveolen, in denen der Gasaustausch stattfindet. Von der Trachea an teilt sich der Bronchialbaum in immer feinere Verzweigungen auf. Die Leitungszone bis zu den Terminalbronchien der 16. Teilungsgeneration hat ausschließlich leitende Funktion. Daran schließt sich bis zur 19. Teilungsgeneration die Übergangszone mit den Bronchioli respiratorii an, in deren Wänden bereits die ersten Alveolen vorkommen. Hier besteht der erste Kontakt zu den Blutgefäßen. Nach der 20. Aufzweigung folgt die Respirationszone. In den mit Alveolen dicht besetzten Ductus alveolares findet der Gasaustausch statt <sup>(Thews 2005)</sup>.

Treibende Kraft für den Gasaustausch ist der Druckgradient zwischen Alveolarraum und Blut. Ein effektiver Diffusionsaustausch erfordert eine große Austauschfläche (F) und einen kleinen Diffusionsweg (L). Der Gasaustausch unterliegt dem Fick'schen Diffusionsgesetz.

*Fick'sches Diffusionsgesetz:  $\frac{Q}{t} = D \cdot F \cdot \frac{\Delta p}{L}$ , wobei Q: transportiertes Volumen, t: Kontaktzeit, D: Diffusionskonstante, F: Austauschfläche,  $\Delta p$ : Partialdruckgefälle und L: Diffusionsweg bedeutet.*

Der Diffusionsweg (Luft-Blut-Schranke) besteht aus dem Alveolarepithel, Interstitium zwischen den Basalmembranen, Kapillarendothel, Blutplasma und Erythrozytenmembran (Abbildung 13). Die Form der Erythrozyten in den Kapillaren gewährleistet ein Minimum an Diffusionsstrecke zwischen Extrazellulärraum und

Hämoglobin. In der reifen, gesunden Lunge beträgt der Diffusionsweg bis in den Erythrozyteninnenraum etwa  $1\ \mu\text{m}$  <sup>(Thews 2005)</sup>.

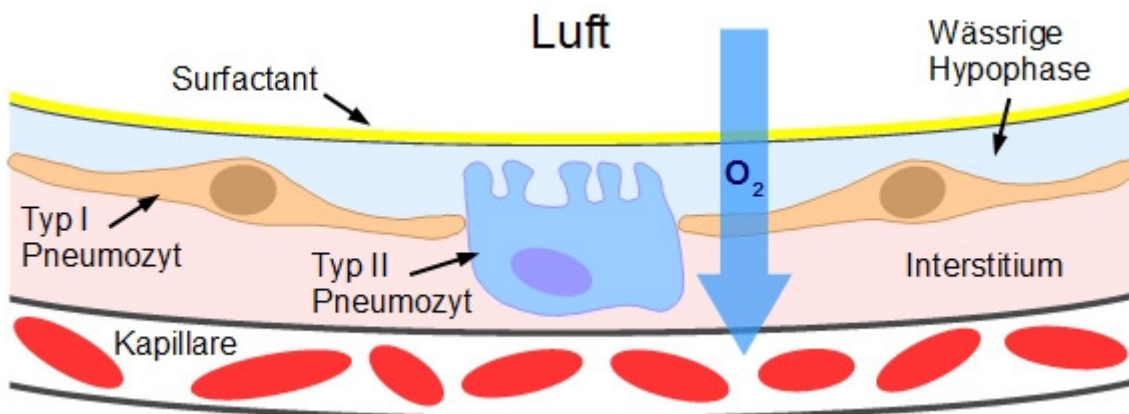


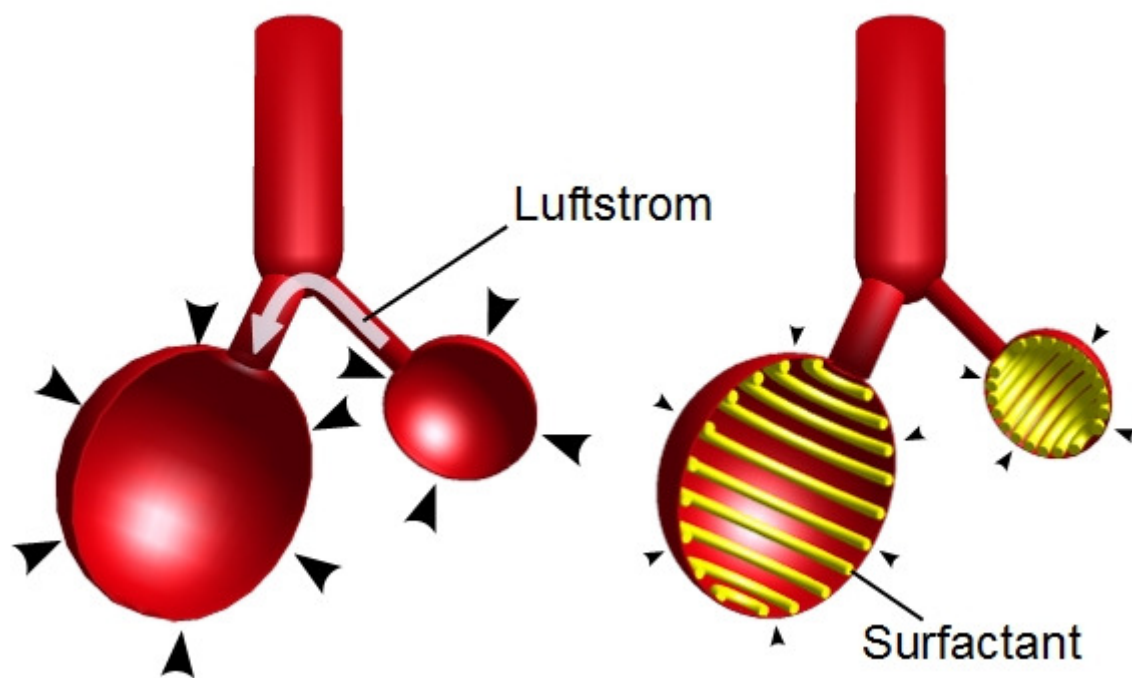
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Luft-Blut-Schranke nach <sup>(Parra Ortiz 2013)</sup>. Der Surfactantfilm reduziert die Oberflächenspannung an der Grenzschicht zwischen Luft und wässriger Hypophase. Der Diffusionsweg besteht aus Aleolarepithel, Interstitium, Kapillarendothel, Blutplasma und Erythrozytenmembran.

Die Diffusionskapazität bezeichnet das Verhältnis zwischen Diffusionsfläche und zurückzulegendem Diffusionsweg in Abhängigkeit von dem Krogh'schen Faktor, der die Diffusionsleitfähigkeit der Alveolarwand beschreibt. Aufgrund der hohen Diffusionskapazität reicht die geringe Kontaktzeit des durch die Lungenkapillaren strömenden Blutes für einen effektiven Gasaustausch aus <sup>(Lang 2007)</sup>.

Bei unterschiedlichen pulmonalen Erkrankungen ist die Diffusionskapazität durch verringerte Diffusionsfläche oder verlängerten Diffusionsweg vermindert. Es kommt zu einer Diffusionsstörung, verbunden mit einer Hypoxämie. Die Diffusion von  $\text{CO}_2$  ist bei Diffusionsstörungen kaum beeinträchtigt, da  $\text{CO}_2$  aufgrund größerer Wasserlöslichkeit etwa 23-mal leichter diffundiert als  $\text{O}_2$  <sup>(Lang 2007)</sup>.

Das Ventilations-Perfusions-Verhältnis der Lunge ist lageabhängig. Das Blut, das die oberen Lungenabschnitte passiert, wird besser mit  $\text{O}_2$  gesättigt als das in den unteren Lungenabschnitten. In der Umgebung schlecht ventilierter Alveolen kommt es aufgrund des alveolo-kapillären Reflexes (Euler-Liljestrand-Mechanismus) zur Vasokonstriktion, was bedeutet, dass nur diejenigen Alveolen perfundiert werden, die ausreichend ventilert sind. Werden auch minderbelüftete Alveolen perfundiert, so kommt es zu einem Rechts-Links-Shunt mit Beimischung von nicht  $\text{O}_2$ -gesättigtem Blut in den Pulmonalvenen <sup>(Lang 2007)</sup>.

Die Alveolen sind von einem oberflächenaktiven Stoff, dem Surfactant (surface active agent), benetzt. Die oberflächenaktiven Eigenschaften des Surfactants entstehen durch die komplexe biochemische Zusammensetzung dieses Stoffes aus Phospholipiden und Proteinen. Ohne die oberflächenspannungsreduzierende Eigenschaft des Surfactants würde die Oberflächenspannung des Wassers eine gleichmäßige Entfaltung der Lungenalveolen verhindern (Abbildung 14). Bei benachbarten Alveolen läge in der kleineren Alveole eine höhere Oberflächenspannung vor, diese würde kollabieren, während die größere Alveole an Radius zunehmen und überbläht würde <sup>(Lang 2007)</sup>.



*Abbildung 14: Intraalveolärer Luftstrom ohne und mit Surfactantfilm. Durch Modulation der Oberflächenspannung schützt der Surfactantfilm nach dem Gesetz von Laplace die kleinen Alveolen vor einem Kollaps und der Gasstrom kommt zum Stillstand.*

Bereits 1929 wurden der Effekt der pulmonalen Oberflächenspannung und die Auswirkung deren Reduktion gezeigt. Explantierte Lungen wurden mit Wasser anstelle von Luft gefüllt. Hierdurch wurde die intraalveoläre Oberflächenspannung eliminiert, da es keine Grenzschicht zwischen Luft und Wasser mehr gab. Die nun erstellten Druck-Volumen-Kurven zeigten, dass zur Entfaltung der Lunge ein deutlich geringerer Druck notwendig war <sup>(Neergard 1929)</sup>.

Unter physiologischen Bedingungen, bei der Füllung der Lunge mit Luft, wird die

pulmonale Oberflächenspannung durch den alveolären Surfactantfilm reduziert. Bei Verkleinerung einer Alveole nimmt die Konzentration des Surfactants zu, die Oberflächenspannung nimmt ab und die Alveolen streben eine mittlere Größe an.

*Laplace Gesetz:*  $K = \frac{P \cdot r}{(2 \cdot d)}$ , wobei *K*: Wandspannung, *P*: transmuraler Druck  
*r*: Gefäßradius und *d*: Wanddicke bedeutet.

Physikalisch beschrieben wird dies durch das Gesetz von Laplace <sup>(Laplace 1798)</sup>.

Der transmurale Druck *P* wird dynamisch, in Abhängigkeit von der Alveolargröße, durch Surfactant verändert. Die resultierenden Gasströme zwischen den verschiedenen großen Alveolen kommen beim Erreichen eines Gleichgewichts zum Stillstand. Hierdurch wird ein Kollaps der Alveolen verhindert (Abbildung 14).

## **1.5 Chorioamnionitis und Amnioninfektionssyndrom**

Die Chorioamnionitis ist eine Infektion der Fruchthöhle und ihres Inhaltes in der Schwangerschaft, des Chorions und des Amnions <sup>(Briese 1999)</sup>. Sie ist neben mütterlichen Erkrankungen die häufigste Ursache einer Frühgeburt <sup>(Goldenberg 2003, Goldenberg 2000, Thomas 2011)</sup>. Meist handelt es sich bei einer Chorioamnionitis um eine chronische, indolente Infektion mit stillem Verlauf, die postpartal lediglich durch histologische Untersuchung der Plazenta gesichert werden kann <sup>(Garnier 2003, Goldenberg 2000)</sup>. Eine solche chronische Infektion der fetalen Membranen und der Amnionflüssigkeit ist häufig bei Frühgeburten <sup>(Watts 1992)</sup>. Davon abzugrenzen ist ein ausgeprägtes Amnioninfektionssyndroms, das sich durch eine systemische Entzündungsreaktion der Mutter mit Fieber, Tachykardie, Leukozytose, erhöhten Entzündungsproteinen wie dem C-reaktiven Protein (CRP) und vorzeitiger Wehentätigkeit zeigt <sup>(Vogtmann 1993)</sup>.

Die Infektion erfolgt über ascendierende vaginale oder zervikale Infektionen, oder auch retrograd über die Tuben, durch hämatogene Streuung oder iatrogen <sup>(Satin 1992)</sup>. Die anfänglich lokale Entzündung der Eihäute kann zum Befall der Plazenta, der Amnionhöhle, zur Keimbeseidlung des Fruchtwassers und zur Infektion des Feten führen. Eine intrauterine Infektion könnte neuen Daten zufolge schon früh in der Schwangerschaft auftreten und über Monate unentdeckt bleiben <sup>(Goldenberg 2000)</sup>. Das Erregerspektrum umfasst *Escherichia coli*, Streptokokken, Staphylokokken,



Haemophilus influenzae, Pseudomonas spp. und andere Keime. Tritt eine spontane Frühgeburt ohne vorherige Ruptur der Eihäute auf, stellt sich ein anderes Erregerspektrum dar. Die häufigsten Keime sind Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis und Gardnerella vaginalis <sup>(Goldenberg 2000)</sup>. Ureaplasma urealyticum kann am häufigsten in der Amnionflüssigkeit nachgewiesen werden <sup>(Yoon 1998)</sup> und ist auch der häufigste Keim, der mit einer histologischen Chorioamnionitis bei einer Frühgeburt in Verbindung gebracht werden kann <sup>(Goldenberg 2000)</sup>. Der Nachweis dieses Keimes geht mit einer Erhöhung verschiedener Zytokine einher <sup>(Yoon 1998)</sup>.

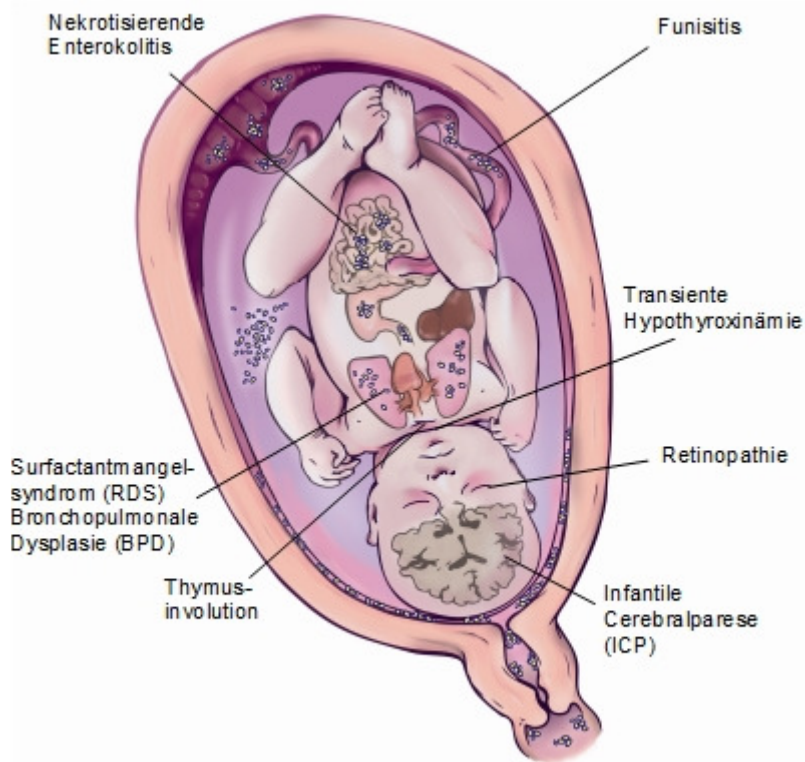
Verschiedene Tiermodelle setzen zur Simulation der Auswirkungen einer Chorioamnionitis Lipopolysaccharide (LPS) ein <sup>(Collins 2012, Kallapur 2001)</sup>, die aus der Zellwand gramnegativer Bakterien gewonnen werden (siehe auch Kapitel 1.10 auf Seite 39). Im Gegensatz zu bakteriellem Endotoxin, das zusätzlich kleine Mengen der Zellwandproteine, Lipide, Lipoproteine und Polysaccharide enthält, ist LPS ein aufgereinigtes Glykolipid <sup>(Fink 1990, Rietschel 1982)</sup>. In wissenschaftlichen Publikationen werden Endotoxin und Lipopolysaccharide jedoch häufig als Synonym verwandt. Eine vollständige Trennung beider Begriffe ist daher in der vorliegenden Arbeit nicht möglich.

### **1.5.1 Fetale Auswirkungen einer Chorioamnionitis**

Die Inzidenz der histologisch gesicherten Chorioamnionitis liegt bei sehr kleinen Frühgeborenen von weniger als 24 vollendeten Gestationswochen aktuellen Studien zufolge bei über 60% und sinkt mit zunehmendem Gestationsalter <sup>(Andrews 2006, Chellam 1985, Goldenberg 2000, Lahra 2004)</sup>.

Eine Chorioamnionitis ist eine Multiorganerkrankung des Feten (Abbildung 15). Sie ist häufig assoziiert mit intrakraniellen Blutungen, periventrikulärer Leukomalazie oder nekrotisierender Enterocolitis, wie histologisch belegt werden konnte <sup>(O'Shea 1998, Redline 2005)</sup>. Auch die weitere Organentwicklung wird durch die pränatale Entzündungsreaktion im Rahmen einer Chorioamnionitis beeinträchtigt <sup>(Dammann 2006, Dammann 2005, Shim 2004, Tauscher 2003)</sup>. Im Falle einer direkten intrauterinen bakteriellen Infektion entwickeln Neugeborene teilweise nach meist unspezifischen Symptomen eine rasch progrediente Erkrankung, die zu einer primären Sepsis mit septischem Schock führen kann. Im protrahierten Verlauf birgt eine intrauterine Infektion ein hohes Risiko einer Meningitis.

Jedoch kann der Fetus auch eine entzündliche Reaktion auf eine Chorioamnionitis zeigen, ohne dass eine schwere bakterielle Infektion des Feten erfolgen muss. Diese Entzündungsreaktion wird unter dem Begriff FIRS (Fetal Inflammatory Response Syndrome) subsummiert. Das FIRS ist eine systemische Entzündungsreaktion des Feten. Daher werden alle fetalen Organe in Mitleidenschaft gezogen <sup>(Gotsch 2007)</sup>.



*Abbildung 15: Die Chorioamnionitis ist eine Multiorganerkrankung des Feten. Der Fetus ist kontaminierter Amnionflüssigkeit ausgesetzt. Diese wird durch ihn aspiriert und geschluckt. Die direkte und indirekte Exposition wird mit Auswirkungen auf multiple Organe in Verbindung gebracht. Modifiziert nach <sup>(Gantert 2010, Einverständnis liegt vor)</sup>.*

Entgegen der allgemeinen klinischen Ansicht, eine Infektion gefährde den Feten schwerwiegend, sind einer Chorioamnionitis ausgesetzte Frühgeborene selten septisch <sup>(Costeloe 2000)</sup>. Ebenso hatten sehr kleine Frühgeborene eine verminderte Mortalitätsrate, wenn sie einer Chorioamnionitis ausgesetzt waren <sup>(Kosuge 2000, Lahra 2004)</sup>, was auch durch eine Untersuchung aller Kinder, die 1995 in England vor der 26. Gestationswoche geboren wurden und einer Chorioamnionitis ausgesetzt waren, belegt werden konnte <sup>(Costeloe 2000)</sup>. Ein anzunehmender Grund hierfür ist die positive Auswirkung der Chorioamnionitis auf die Reifung der fetalen Lunge, denn in klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass einer Chorioamnionitis ausgesetzte Frühgeborene ein deutlich vermindertes Risiko eines Atemnots syndroms hatten <sup>(Andrews 2006, Watterberg 1996)</sup>.

## 1.6 Das Atemnotsyndrom

Das Atemnotsyndrom des Früh- und Neugeborenen (syn: Surfactantmangelsyndrom, respiratory distress syndrome, RDS) entsteht durch eine sowohl funktionelle als auch strukturelle Unreife der Lunge. Es bestehen eine verminderte Compliance und eine reduzierte funktionelle Residualkapazität (FRC – functional residual capacity).

Aufgrund der funktionellen Unreife kann die Lunge noch keine ausreichende Menge an pulmonalem Surfactants bilden (Jorch 2006, Obladen 2006, Rieger 1999). Surfactant ist ein komplexes Gemisch aus Phospholipiden und Surfactantproteinen (siehe Kapitel 1.8 auf Seite 30). Eine ausreichende Surfactantsynthese besteht in der Regel erst ab der 35. Gestationswoche (Reinhardt 2004). Aufgrund der zusätzlich vorherrschenden strukturellen Unreife mit noch unvollständiger Alveolarisation ist die Gasaustauschfläche verringert und die Diffusionsstrecke verlängert (Abbildung 16).

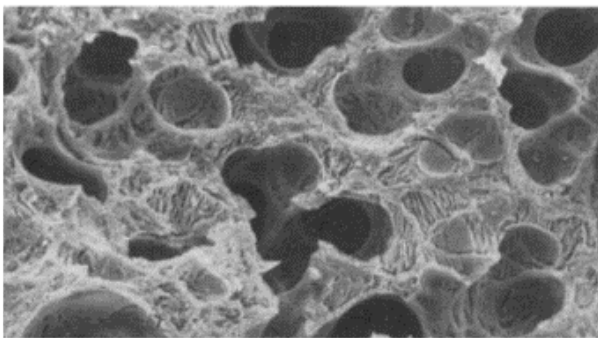
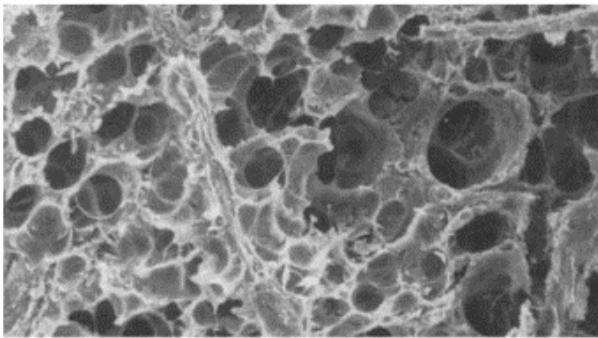


Abbildung 16:  
*Elektronenmikroskopische Aufnahme der alveolären Struktur einer unauffälligen, reifen Lunge (oben) und der Struktur einer an einem Surfactantmangelsyndrom (RDS) erkrankten Lunge (unten). Deutlich sichtbar ist die plumpe Struktur mit breiteren Alveolarwänden (Jackson 1991, Einverständnis liegt vor).*

In der noch unreifen Lunge ist außerdem die Permeabilität der alveokapillären Membran erhöht, wodurch Plasmabestandteile in die Gasaustauschräume einströmen können und es zur Ausbildung hyaliner Membranen kommt. Durch diese wird nicht nur die Diffusionsstrecke verlängert, sondern die Surfactantwirkung wird weiterhin direkt inhibiert (Reinhardt 2004, Rieger 1999).

Aufgrund von Mikroatelektasen entstehen ein vermehrtes intrapulmonales Shuntvolumen, erhöhter Sauerstoffbedarf der Atemmuskeln durch vermehrte Atemarbeit, verminderte pulmonale Kapillarperfusion und ein kardialer Rechts-Links-Shunt über das offene Foramen ovale bzw. den Ductus arteriosus. In der Lunge finden sich atelektatische Bezirke neben überblähten Bronchiolen und Alveolargängen. In diesen Bereichen kommt es zu Epithelnekrosen und Epithelabschilferungen. Das histologische Bild ist gekennzeichnet durch hyaline Membranen, die als eosinophiles Material die terminalen Atemwege tapetenartig auskleiden <sup>(Morgenroth 1986)</sup>.

Klinisch zeigt sich eine zunehmende Atemnot mit Zyanose trotz Tachypnoe (Atemfrequenz >60/min), sternale, interkostale und epigastrische Einziehungen bei Inspiration, expiratorisches Stöhnen und Nasenflügeln <sup>(Obladen 2006)</sup>. Radiologisch zeigt sich bei schwerem Verlauf aufgrund ausgeprägter Atelektasenbildung das typische Bild einer weißen Lunge. Typischerweise zeigen sich die Symptome unmittelbar nach Geburt oder in den ersten 3-4 Lebensstunden und verlaufen über die ersten 24 Lebensstunden progredient, weiter negativ beeinflusst durch Hypoxie, Azidose, Hypothermie, Infektion und Beatmung <sup>(Ludwig 1995)</sup>.

Das RDS ist die klassische Ursache des respiratorischen Versagens bei Frühgeborenen <sup>(Rieger 1999)</sup> und eine der Hauptursachen der Morbidität und Mortalität Frühgeborener <sup>(Guyer 1997)</sup>. Nicht nur sehr kleine Frühgeborene sind betroffen, auch nach 30 Gestationswochen ist die Lunge häufig noch nicht ausreichend reif, so dass postnatal ein RDS auftritt <sup>(DiFiore 1994)</sup>. Jährlich erleiden in Deutschland etwa 3500-4500 Kinder ein RDS, entsprechend 1% aller Neugeborenen. Das Gestationsalter ist hierbei der entscheidende Risikofaktor. Lediglich 20% Kinder über 32 Gestationswochen leiden unter einem RDS, hingegen bereits 60% unter 30 Wochen und 90% bei einem Gestationsalter unter 28 Wochen <sup>(Harms 1994, Jorch 2006, Obladen 2006, Reinhardt 2004, Speer 2004, Stannigel 1992)</sup>.

### **1.6.1 Einfluss der Chorioamnionitis auf das Atemnotsyndrom**

Die Entzündung der fetalen Luftwege führt zu einer Reifung der fetalen Lunge mit einer Zunahme des Surfactantpools. Dies zeigte sich in experimentellen Modellen mit frühgeborenen Lämmern und Kaninchen, die einem künstlich herbeigeführten

Amnioninfektionsyndrom ausgesetzt waren <sup>(Bry 1997, Jobe 2000, Kallapur 2001, Kramer 2001)</sup>. Proinflammatorische Zytokine können die Lungenentwicklung modulieren. Intraamniotisch verabreichtes IL-1 $\alpha$  führt zu vermehrter Bildung von Surfactantlipiden, verändert gestationsaltersabhängig die Transkription der mRNA der Surfactantproteine (SP-) A, SP-B und SP-C und verbessert dosisabhängig die pulmonale Compliance frühgeborener Kaninchen <sup>(Bry 1997, Glumoff 2000)</sup>. Die Wirkung tritt ohne Erhöhung des Cortisolspiegels im Blutplasma des Feten ein <sup>(Emerson 1997)</sup>. Die intraamniotische Verabreichung von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führt ebenfalls zu einer Chorioamnionitis <sup>(Jobe 2001)</sup>. Intraamniotisch appliziertes Endotoxin verursacht innerhalb weniger Stunden einen Anstieg von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  sowie eine Infiltration inflammatorischer Zellen in Amnion/Chorion <sup>(Kallapur 2001)</sup>. Auch in der fetalen Lunge kann bei nur geringfügiger systemischer Reaktion ein deutlicher Anstieg an Zytokin-mRNA nachgewiesen werden. Die fetale Lunge reagiert im Tiermodell auf intraamniotisch appliziertes Endotoxin mit einem Anstieg der mRNA der Surfactantproteine (SP-) A, B, C und D, der bereits nach einmaliger Injektion 15 Tage nachweisbar bleibt <sup>(Bachurski 2001)</sup>. Nach vier Tagen steigt die Konzentration der Surfactantproteine in der bronchoalveolären Lavage, sieben Tage nach Injektion ist ein bis zu hundertfacher Anstieg gegenüber der Kontrolle messbar. Das fetale Lamm hat bei einem Gestationsalter von 125 Tagen nur geringe Mengen an SP-B in den Luftwegen, lediglich 25% davon ist das vollständig prozessierte Peptid <sup>(Bachurski 2001)</sup>. Intra-amniotisch verabreichtes Endotoxin führt innerhalb von sieben Tagen zu einem hundertfachen Anstieg des vollständig prozessierten, reifen Peptids in den Luftwegen. Parallel zu den Surfactantproteinen steigt auch die Konzentration von Phosphatidylcholin. Vier Tage nach Endotoxininjektion steigt die Compliance der fetalen Lunge <sup>(Jobe 2000)</sup>. Die Lungenreifung korreliert mit dem Vorhandensein von Entzündungszeichen in Amnion/Chorion und dem fetalen Lungengewebe. In tierexperimentellen Studien ist die Reaktion der fetalen Lunge bei einer Endotoxindosis zwischen 1 und 100 mg dosisunabhängig. Die Zahl der Entzündungszellen in Blut und Lungengewebe steigt mit höherer Endotoxindosis, jedoch unterscheidet sich das Ausmaß der Lungenreifung nicht. Eine noch niedrigere Endotoxindosis von 0,1 mg führt hingegen lediglich zu systemischen Entzündungszeichen, jedoch tritt keine Lungenreifung ein <sup>(Kramer 2001)</sup>.

## 1.6.2 Prävention des Atemnotsyndroms durch Glukokortikoide

Erstmalig wurde im Jahr 1969 beobachtet, dass frühgeborene Lämmer von pränatal verabreichten Glukokortikoiden profitierten (Liggins 1969). Maternal verabreichte Glukokortikoide führten im Tiermodell zu einer ausgeprägteren Lungenreifung als fetal verabreichte Glukokortikoide (Jobe 1998).

Bereits die ersten humanen Studien zeigten, dass die Inzidenz des Atemnotsyndroms nach antenatal verabreichten Glukokortikoiden deutlich sinkt (Goldenberg 2006, Liggins 1972).

Daher werden bei drohender Frühgeburt Schwangeren Dexamethason oder Betamethason intramuskulär injiziert. Eine Senkung der neonatalen Mortalität und Morbidität hierdurch ist unbestritten, jedoch existieren bislang keine eindeutigen Daten, welches Glukokortikoid dem anderen überlegen ist (Murphy 2007). Während eine aktuelle Studie von einer Reduktion intrakranieller Blutungen nach Dexamethason bei sonst vergleichbaren Daten gegenüber Betamethason spricht (Elimian 2007), und auch weitere Autoren Dexamethason als geeigneter sehen (Mushkat 2001, Rotmensch 1999), wurde nach Betamethason bereits eine geringere Inzidenz der periventrikulären Malazie beschrieben (Baud 1999). Eine weitere aktuelle Studie zeigt eine geringere Inzidenz des Atemnotsyndroms und der bronchopulmonalen Dysplasie bei sonst wiederum vergleichbaren Daten gegenüber Dexamethason (Feldman 2007). Andere Autoren hatten in der Vergangenheit keinerlei signifikante Unterschiede bezüglich der neonatalen Morbidität gefunden (Subtil 2003).

Glukokortikoide verbessern die Lungenfunktion sowohl durch Beschleunigung der strukturellen Reifung (Pinkerton 1997) als auch durch Steigerung der Produktion und Sekretion von Surfactant (Polk 1997). Nach maternal injiziertem Betamethason kommt es nach sieben Tagen zu einem Anstieg der Bestandteile des Surfactantsystems (Ikegami 1997), jedoch ist auch das mittlere Geburtsgewicht vermindert. Im Tiermodell war das Geburtsgewicht frühgeborener Lämmer 14% niedriger nach Betamethason (Willet 2000).

Antenatal verabreichte Glukokortikoide beeinflussen die Alveolarisation (Massaro 1996). Bei Ratten führte sowohl eine pränatale (Massaro 1992) als auch eine postnatale (Blanco 1989) Exposition gegenüber Dexamethason zu einer gestörten Bildung alveolärer Septen. Die Bildung alveolärer Septen war auch bei Schafen, die 48h vor Frühgeburt eine fetale Injektion Betamethason erhielten, gestört (Willet 1999). Trotz beeinträchtigter

Alveolarisation ist die Lungenfunktion Betamethason-behandelter Tiere direkt nach der Geburt der von unbehandelten Kontrolltieren überlegen <sup>(Jobe 2000)</sup>.

Vorteile	Nachteile
Strukturelle Reifung ↑	Geburtsgewicht ↓
Surfactantproduktion ↑	Gestörte Alveolarisation
Surfactantsekretion ↑	
Lungenfunktion ↑	
Intrakranielle Blutungen ↓	

*Tabelle 3: Positive und negative Einflüsse von maternal injizierten Glukokortikoiden bei drohender Frühgeburt.*

### 1.6.3 Therapie des Atemnotsyndroms

Allen Therapien ist das Grundprinzip des „minimal handling“ eigen, die möglichst geringe Belastung des Frühgeborenen durch diagnostische und therapeutische Maßnahmen <sup>(Obladen 2006, Rieger 1999)</sup>. Bestandteile der symptomatischen Therapie sind je nach Ausprägung des RDS neben sorgfältiger Beobachtung und intensivmedizinischer Überwachung des Säuglings eine gezielte Sauerstoffzufuhr, Nasen-CPAP (Continuous Positive Airway Pressure) oder künstliche Beatmung mit PEEP (positive endexpiratory pressure, positiver endexpiratorischer Druck), Antibiotikabehandlung und sorgfältige Flüssigkeitsbilanz <sup>(Obladen 2006)</sup>.

Die kausale Therapie des an einem Atemnotsyndrom erkrankten Frühgeborenen stützt sich daher auf die Gabe von synthetischen oder natürlichen Surfactant-Präparaten, die aus Rinder- oder Schweinelungen gewonnen werden. Natürliche Surfatantpräparate sind den synthetischen Produkten hierbei überlegen <sup>(Halliday 1996, Soll 2001)</sup>.

Eine frühzeitige Gabe von Surfactant ist bei zu erwartendem oder drohendem Atemnotsyndrom entscheidend. Durch die Therapie mit modernen Surfactantpräparaten haben die Auswirkungen des Atemnotsyndroms nachgelassen <sup>(Halliday 1996)</sup>. Die Pneumothoraxrate konnte gesenkt und die neonatale Mortalität vermindert werden <sup>(Halliday 2005)</sup>.

Die unreife Lungenstruktur des Frühgeborenen wird hierdurch jedoch nicht verändert. Therapeutisch vermindern bei drohender Frühgeburt pränatal mütterlich verabreichte Glukokortikoide die Unreife der Lunge. Hierdurch haben sowohl die Häufigkeit als auch die Schwere des Atemnotsyndroms nachgelassen <sup>(Halliday 1996)</sup>.

Der größte therapeutische Erfolg stellt sich bei der Kombination pränatal verabreichter Glukokortikoide mit postnatal verabreichtem Surfactant ein <sup>(Farrell 1989)</sup>.

## **1.7 Die Bronchopulmonale Dysplasie**

### **1.7.1 Die klassische und die neue BPD**

Definitionsgemäß leiden Frühgeborene, die mindestens über den Zeitraum von 28 Tagen Sauerstoffkonzentrationen über 21% benötigen, an einer Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) <sup>(Jobe 2001)</sup>. Im Gegensatz zu der relativen Häufigkeit des Atemnotsyndroms hat sich die Inzidenz der BPD in den letzten Jahren nicht verringert. Auch durch den Einsatz von Surfactantpräparaten konnte die Häufigkeit der BPD nicht reduziert werden <sup>(Halliday 2005)</sup>. Jedoch ist infolge neuer Therapieansätze und aufgrund des Überlebens vieler kleiner Frühgeborener ein eindeutiger Trend zu einer mildereren Verlaufsform zu beobachten <sup>(Bhandari 2007)</sup> (Tabelle 4).

1967 wurde die Bronchopulmonale Dysplasie erstmalig als schwere Lungenschädigung aufgrund mechanischer Beatmung, verbunden mit hoher Sauerstoffkonzentration, beschrieben <sup>(Northway 1967)</sup>. 1985 wurden die aus mechanischer Beatmung und hohen Sauerstoffkonzentrationen resultierenden Veränderungen mit Entzündung, Fibrose und Hypertrophie glatter Muskulatur in den Atemwegen in Verbindung gebracht <sup>(O'Brodovich 1985)</sup>. Da in der Vergangenheit auch primär pulmonal kaum beeinträchtigte Neugeborene an einer BPD erkrankten <sup>(Charafeddine 1999, Rojas 1995)</sup>, werden heute hohe Sauerstoffkonzentrationen und Barotrauma nicht mehr als die beiden Hauptfaktoren der Entstehung einer BPD gesehen. Die „neue BPD“ scheint vielmehr Folge einer Beeinträchtigung der Lungenentwicklung zu sein <sup>(Jobe 1999)</sup>. Dennoch scheint eine BPD nicht in unmittelbarem Zusammenhang zu einem RDS zu stehen, das wiederum eine direkte Folge der unreifen Lunge eines Frühgeborenen ist. Klinische Daten belegen, dass auch Neugeborene eine BPD entwickeln können, ohne zuvor an einem RDS erkrankt gewesen zu sein <sup>(Charafeddine 1999)</sup>. Die neue BPD ist zum einen charakterisiert



durch einen Stopp der Lungenentwicklung mit verminderter Alveolarzahl und vergrößertem alveolären Volumen, was zu einer starken Reduktion der Gasaustauschfläche der Lunge führt <sup>(Husain 1998)</sup>, zum anderen durch abnorme mikrovaskuläre Reifung infolge einer chronischen Entzündungsreaktion <sup>(Albertine 1999, Coalson 1995, Jobe 2001, Jobe 2001)</sup>.

	<b>klassische BPD</b>	<b>neue BPD</b>
Geburtsalter	32 Gestationswochen	24-26 Gestationswochen
Geburtsgewicht	1900g	600g
Risikokinder	reifere Kinder	extrem Frühgeborene
Entwicklungsphase	Sakkulär- und Alveolärstadium	Kanalikulär- und frühes Sakkulärstadium
Fibrose	schwer	minimal
Luftwege	schwer betroffen	kaum beeinträchtigt
Alveolen	in Bereichen ohne Fibrose gut entwickelt	Stopp der Entwicklung
Ursachen	Sauerstofftoxizität, mechanische Beatmung	Beeinträchtigung der Organentwicklung

*Tabelle 4: Vergleich der klassischen und der neuen BPD nach <sup>(Kramer 2008)</sup>. Die neue BPD ist charakterisiert durch eine deutlich unreifere Lunge aufgrund einer Schädigung im Rahmen der Organentwicklung. Die klassische BPD hingegen entsteht durch eine postnatale Schädigung der Lunge, im Allgemeinen durch mechanische Beatmung und Sauerstofftoxizität.*

Die meisten Kinder, die eine BPD entwickeln, werden noch vor vollendeter 28. Gestationswoche geboren und haben ein Geburtsgewicht unter 1000g <sup>(Jobe 2001, Villamor-Martinez 2019)</sup>. Die Lunge dieser Kinder befindet sich bei Geburt erst im sakkulären Entwicklungsstadium. Gerade sehr kleine Frühgeborene mit anatomisch unausgereifter Lungenstruktur, die maschinell beatmet werden und erhöhte Sauerstoffkonzentrationen benötigen, leiden gehäuft unter einer BPD <sup>(May 2004)</sup>.

Aus der BPD können erhebliche Konsequenzen für die pulmonale Morbidität ehemaliger Frühgeborener bis ins Erwachsenenalter folgen <sup>(Kennedy 1999, Vrijlandt 2006)</sup>. Viele Erwachsene, die im Säuglingsalter an einer bronchopulmonale Dysplasie erkrankten, leiden unter obstruktiven Atemwegserkrankungen, hyperreaktiven Atemwegen oder Hyperinflation <sup>(Northway 1990)</sup>.

Entscheidend für die Entwicklung einer BPD scheint die Schädigung der fetalen Lunge und Luftwege während der Alveolarisation zu sein. Die Regulation der Alveolarisation vor und nach der Geburt ist noch nicht vollständig geklärt. Die mechanische Beatmung der noch unreifen Lunge beeinträchtigt die Alveolarisation sowohl klinisch <sup>(Husain 1998)</sup> als auch im Tiermodell mit Affen <sup>(Coalson 1999)</sup> und Schafen <sup>(Albertine 1999)</sup>. Auch eine chronische Entzündung in den Luftwegen führt zu einer reduzierten Alveolargenese <sup>(Speer 2006)</sup>.

Eine Entzündungsreaktion mit erhöhten Leukozyten in der Lunge und erhöhten Zytokinkonzentrationen tritt häufig nach künstlichem Barotrauma oder toxischen Sauerstoffkonzentrationen auf <sup>(Carlton 1997, Chiumello 1999, Warner 1998)</sup>. Ebenso kann eine vorhandene pulmonale Entzündung durch die Toxizität hoher Sauerstoffkonzentrationen, künstliche Beatmung oder systemische oder pulmonale Infektionen prolongiert oder aggraviert werden <sup>(Jobe 1998, Speer 2006)</sup>.

Aber auch entzündungshemmende Stoffe, wie Glukokortikoide, und unspezifische Einflüsse, wie ein kalorisches Defizit, können die Alveolarisation verzögern. Beim Schaf führen sieben Tage vor eingeleiteter Frühgeburt maternal verabreichtes Betamethason ebenso wie intra-amniotisch appliziertes Endotoxin zu einem Stillstand der alveolären Entwicklung <sup>(Willet 2000)</sup>. Hingegen führen Thyroxin (T<sub>4</sub>) und Retinolsäure zu einer gesteigerten Alveolarisation <sup>(Garber 2006, Pinkerton 1997)</sup>.

Bislang konnte keine alleinige Komponente der komplexen Entzündungsantwort identifiziert werden, die die Lungenschädigung vorantreibt oder die Alveolarisation hemmt. Die Immunantwort des Frühgeborenen unterscheidet sich von der des Erwachsenen, da kaum Alveolarmakrophagen vorhanden und erst geringe Mengen der Bestandteile der angeborenen Immunität, wie die Surfactantproteine A und D, Defensine oder Lysozyme, vorhanden sind <sup>(Jobe 2001)</sup>. Außerdem zeigen weiße Blutzellen Frühgeborener eine deutlich schwächere Reaktion auf Entzündungsstimuli.

Die Definition der BPD ist anhaltend Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen <sup>(Gomez-Pomar 2018)</sup>. In Anbetracht der unreifen Kinder, die heute eine BPD entwickeln, erscheint eine Veränderung der Definition auf der Hand zu liegen. Andererseits ist mit einer Veränderung der Definition der BPD die Vergleichbarkeit mit älteren klinischen Studien nicht mehr gegeben.

### **1.7.2 Die BPD als Folge einer Chorioamnionitis**

Die Studien über den Zusammenhang zwischen der pränatalen Exposition gegenüber einer Chorioamnionitis und der späteren Entstehung einer bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) sind widersprüchlich. Während bislang die Autoren mehrerer Studien in einer Chorioamnionitis einen eindeutigen Risikofaktor für eine BPD sehen <sup>(Watterberg 1996)</sup>, besteht laut neueren Studien kein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer Chorioamnionitis und dem späteren Auftreten einer BPD <sup>(Jobe 2011, Redline 2002)</sup>.

Der unmittelbare Kontakt zu Entzündung und Infektion im Rahmen einer Chorioamnionitis kann zu einer fetalen Entzündungsreaktion in der Lunge führen, die möglicherweise mit der späteren Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie assoziiert ist. So ist eine histologisch nachweisbare Chorioamnionitis verbunden mit einer erhöhten Inzidenz der BPD <sup>(Watterberg 1996)</sup>. Auch die Exposition gegenüber Ureaplasma urealyticum, dem häufigsten Erreger einer Chorioamnionitis, geht mit einer deutlich gesteigerten Inzidenz einer BPD einher <sup>(Hannafoord 1999)</sup>. Erhöhte Werte an IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  sowie zahlreicher anderer Zytokine oder Chemokine in den Atemwegen Neugeborener gehen ebenso mit einem erhöhten Risiko einer BPD einher wie einer neonatalen Sepsis oder Pneumonie <sup>(Rojas 1995)</sup>. Auch ein erhöhter IL-6-Spiegel im Nabelschnurblut oder erhöhte Werte von IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  in der Amnionflüssigkeit prädisponieren für eine BPD <sup>(Yoon 1997)</sup>.

### **1.7.3 Die Bedeutung elastischer Fasern**

Wie bereits weiter oben ausgeführt ist Elastin obligatorisch für die Lungenentwicklung. Bei Patienten mit manifester BPD und in entsprechenden Tiermodellen sind die Elastinfasern an den Spitzen der alveolären Septen nicht mehr vorhanden <sup>(Bland 2005)</sup>. Eine gestörte alveoläre Elastinproduktion geht mit einer Lungenanomalie einher. In PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)-defizienten Mäusen wird kein Elastin in den Spitzen der alveolären Septen deponiert. Bei diesen Tieren kommt es zu keiner weiteren Septenbildung, die Bildung reifer Alveolen bleibt aus. Die distalen alveolären Luftsäcke (unreife Alveolen) sind bei elastindefizienten Mäusen größer und dünnwandiger <sup>(Wendel 2000)</sup>.

Der Elastinabbau erfolgt durch das Enzym Elastase. Dieses Enzym kommt unter

anderem in alveolären Makrophagen, Granulozyten und Thrombozyten vor. Bei Neugeborenen, die im späteren Verlauf eine BPD entwickelten, ist die Elastaseaktivität in der Tracheallavage signifikant erhöht (Groneck 1994, Merritt 1983).

## 1.8 Surfactant

Pneumozyten vom Typ II und Clara-Zellen sezernieren ein oberflächenwirksames Gemisch aus Phospholipiden und Proteinen, das Surfactant (surface active agent) genannt wird (Rooney 1994, Whitsett 2010). Dieser intrapulmonale Surfactant bildet einen Doppellipidfilm, der die Alveolen von innen auskleidet. Die dominierende funktionelle Eigenschaft dieses pulmonalen Surfactants ist der Schutz der Struktur der Alveolen durch Reduktion der alveolären Oberflächenspannung an der Kontaktstelle zwischen Luft und Gewebe, wodurch sowohl die gleichmäßige Entfaltung aller Alveolen während der Inspirationsphase ermöglicht, als auch ein Zusammenfallen der Alveolen am Ende der Expirationsphase verhindert wird (Goerke 1998, Johansson 1997). Während die Wirkung des intrapulmonalen Surfactantfilms bereits durch Kurt von Neergaard im Jahr 1929 beschrieben wurde (Neergard 1929, Obladen 2005), lieferte Clements 1957 den ersten experimentellen Beweis für das Vorhandensein eines Surfactantfilms (Clements 1957).

Surfactant besteht, bezogen auf das Trockengewicht, mit insgesamt 87% größtenteils aus unterschiedlichen Phospholipiden (hauptsächlich Phosphatidylcholin, wovon etwa die Hälfte als Dipalmitoylphosphatidylcholin vorliegt, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylinositol (Veldhuizen 1998)), 2-3% Neutralfetten und etwa 10% spezifischen surfactantassoziierten Apoproteinen (Abbildung 17). Die Surfactantproteine beeinflussen die biophysikalischen Eigenschaften und die physiologische Funktion des pulmonalen Surfactants auf vielfältige Weise. Vier Surfactantproteine sind bekannt, benannt nach der chronologischen Reihenfolge ihrer Entdeckung, Surfactantprotein (SP)-A, SP-B, SP-C und SP-D (Weaver 1991). Bezogen auf das Trockengewicht des pulmonalen Surfactants hat SP-A mit 5-6% den größten Anteil, SP-B und SP-C haben jeweils einen Anteil von knapp 1% und SP-D lediglich ungefähr 0,5% (Serrano 2006).

SP-A, SP-B und SP-D werden sowohl in Alveolar-Typ-II - Zellen als auch in den Clara - Zellen der Bronchioli respiratorii gebildet, hingegen ist die Bildung von SP-C beschränkt auf Alveolar-Typ-II - Zellen.

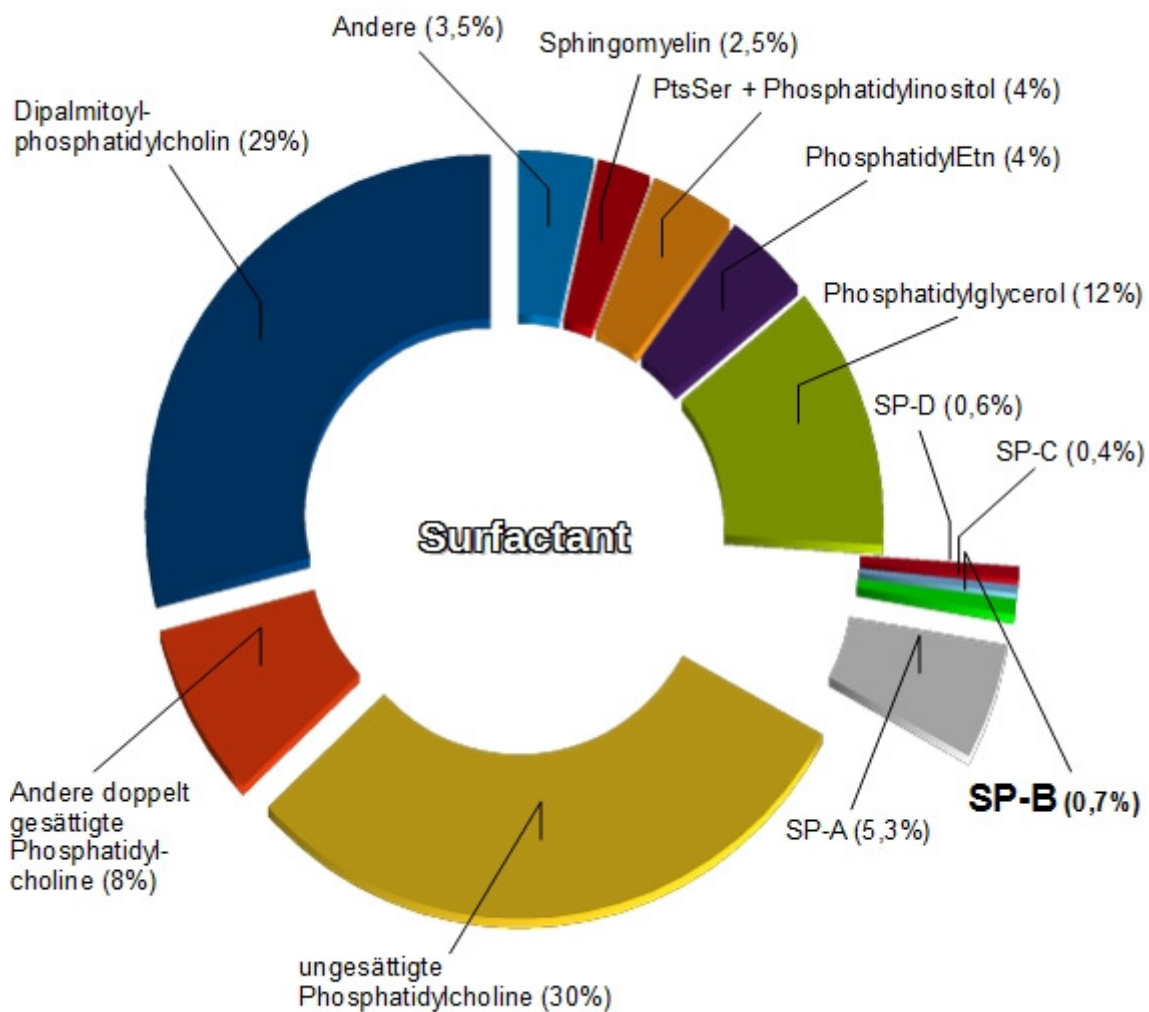


Abbildung 17: Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants Weniger als 10% des Surfactants besteht aus Surfactantproteinen. Jedoch sind die vier Proteine SP-A, SP-B, SP-C und SP-D entscheidend für die Stabilität und die Funktion des Sufactantfilms. (Johansson 1997, Kishore 2006, Serrano 2006, Veldhuizen 1998, Weaver 1991)

Daneben werden die Surfactantproteine SP-A, SP-B und SP-D auch in anderen Geweben, zum Beispiel im Gastrointestinaltrakt, exprimiert (Eliakim 1989, van Rozendaal 2001). SP-C wurde bislang ausschließlich in der Lunge nachgewiesen (Glasser 1990). Die Gen-Expression der Surfactantproteine wird während der fetalen Lungenreifung eingeleitet und durch verschiedene Faktoren, darunter Zytokine, Glukokortikoide und cAMP, moduliert (Boggaram 2003). Die Surfactantphospholipide werden im endoplasmatischen Retikulum der Typ-II-Pneumozyten synthetisiert und gelangen über den Golgi-Apparat

zu den Lamellenkörperchen, die mittels Exozytose in den Alveolarraum sezerniert werden. Die Neusynthese erfolgt besonders beim Neugeborenen relativ langsam. Beim Schaf hingegen dauert es etwa 60 Stunden bis zur maximalen Sekretion von frisch synthetisiertem Surfactant in den Alveolarraum <sup>(Rieger 1999)</sup>. Die Surfactantproteine werden nach Transkription intrazellulär prozessiert.

### **1.8.1 Die Surfactantproteine A und D**

SP-A und SP-D sind hochmolekulare hydrophile Proteine und gehören zur Familie der Kollektine <sup>(Kishore 2006)</sup>. Wie in-vitro-Studien und zahlreiche Tiermodelle mit herbeigeführtem Surfactant-Mangel zeigten, spielen SP-A und SP-D eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der angeborenen Immunantwort und der Inflammationsreaktion der Lunge <sup>(Wright 2005)</sup>. SP-A und SP-D regulieren die Aktivität der Alveolarmakrophagen <sup>(Kingma 2006)</sup>. Sowohl SP-A als auch SP-D binden Endotoxin <sup>(Kuan 1992, Van Iwaarden 1994)</sup>. SP-A werden auch wichtige Funktionen bei der Regulation der zellulären Sekretion und Wiederaufnahme der Surfactantphospholipide zugesprochen <sup>(Speer 2004)</sup>. SP-A ist mengenmäßig das häufigste Surfactantprotein <sup>(Rieger 1999)</sup>. Gemeinsam mit SP-B ermöglicht es die Konversion des sezernierten endogenen Surfactants in tubuläres Myelin, dem Hauptreservoir intraalveolären Surfactants in der wässrigen Hypophase <sup>(McCormack 1998)</sup>. SP-A/D-Knockout-Mäuse sind trotz deutlich erhöhter Infektneigung überlebensfähig. Anders als bislang vermutet, war in diesen Tieren die Surfactantaktivität nicht verändert. Die biophysikalische Surfactantfunktion ist somit unabhängig von SP-A und SP-D <sup>(Hawgood 2002)</sup>.

### **1.8.2 Die Surfactantproteine B und C**

SP-B und SP-C sind niedermolekulare lipophile Proteine. Die Bildung des Surfactantfilms und dessen Stabilität hängen maßgeblich von diesen beiden hydrophoben Surfactantproteinen ab. SP-B und SP-C steuern die Absorption und die schnelle Verteilung der Surfactantphospholipide in der Grenzschicht zwischen Luft und wässriger Hypophase sowie deren Anordnung im oberflächenaktiven Monolayer. Somit sind sie notwendig für die Aufrechterhaltung der oberflächenspannungsreduzierenden

Funktion des Surfactants <sup>(Weaver 2001)</sup>. Darüber hinaus steigern sowohl SP-B als auch SP-C die Aufnahme von Phospholipiden in Typ-II-Pneumozyten <sup>(Rieger 1999)</sup>. SP-B scheint in der Lunge auch einen protektiven Effekt zu haben <sup>(Miles 1999)</sup>. Mehrere Studien haben auch antiinflammatorische Eigenschaften von SP-B und SP-C und Phospholipiden in Surfactantpräparaten gezeigt <sup>(Baur 1998, Epaud 2003, Ikegami 2005, Speer 1991)</sup>. Ein erhöhter Wert von SP-B führt zu einer deutlich geringeren Entzündungsreaktion nach Endotoxinexposition, verbunden mit geringeren Zytokinwerten und weniger Entzündungszellen in der bronchoalveolären Lavage <sup>(Epaud 2003)</sup>. Daher wird angenommen, dass SP-B auch eine wichtige Rolle im Rahmen der Entzündungsreaktion bei bakteriellen Infektionen der Lunge spielt.

Die Transkription von Surfactantprotein (SP)-B nimmt während des Reifeprozesses zu und kann durch Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-3 induziert werden <sup>(Yan 2002)</sup>. Die Exposition gegenüber Endotoxin scheint bei adulten Mäusen einen inhibitorischen Effekt auf die Transkription der mRNA von SP-B zu haben <sup>(Ingenito 2001)</sup>.

SP-B ist das einzige zwingend lebensnotwendige Surfactantprotein. Ein komplettes Fehlen von SP-B, wie bei der Frame-shift-Mutation auf Chromosom 2 in Codon 121 (121ins2) des SP-B-Gens beim Menschen <sup>(Nogee 1993)</sup> und genetisch veränderten SP-B-null-Mäusen <sup>(Clark 1995)</sup>, führt zu tödlicher Ateminsuffizienz. Selbst ein partieller Mangel an SP-B führt zu erhöhter Anfälligkeit für Lungenschäden, was nahelegt, dass ein optimales Level an SP-B notwendig ist, um die reguläre Lungenfunktion aufrechtzuerhalten <sup>(Clark 1997)</sup>. Gentechnisch manipulierte Mäuse mit SP-B-Mangel entwickeln ein Atemversagen innerhalb einer Spanne von nur vier Tagen, verbunden mit einer Inflamationsreaktion <sup>(Ikegami 2005)</sup>. Die Wiederherstellung des SP-B-Levels kehrte die Funktionsstörung der Lunge und die damit verbundene Inflammation um. Unter den Bedingungen des SP-B-Mangels waren weder der Gehalt an SP-C noch der Gehalt an oder die Beschaffenheit der Surfactant-Phospholipide verändert, was die wichtige Rolle von SP-B bei der Aufrechterhaltung der Lungenfunktion unterstreicht. Der Mangel an SP-B führt zu einem neonatalen Atemnotsyndrom <sup>(Nogee 1993, Nogee 1994, Whitsett 1995)</sup>.

Ein SP-B Mangel ist nicht in allen Fällen auf eine noch nicht eingetretene Lungenreifung zurückzuführen. In seltenen Fällen kann ein SP-B-Mangel auch genetisch bedingt sein und ist unabhängig von einer Frühgeburt <sup>(Magnani 2019)</sup>. Im Falle

eines ausgeprägten genetisch bedingten SP-B-Mangels ist aktuell die einzige Therapiemöglichkeit eine Lungentransplantation innerhalb der ersten Lebensmonate (Palomar 2006).

Überraschenderweise leiden SP-C-Knockout-Mäuse jedoch unter keiner schweren Lungenerkrankung, was darauf hindeutet, dass SP-C in vivo nicht zwingend für die oberflächenaktive Funktion des alveolären Phospholipidfilms erforderlich ist (Glasser 2001). Ein genetisch bedingter vollständiger Mangel an SP-B führt hingegen auch zu einer reduzierten Konzentration von SP-C (Vorbroke 1995). SP-C bindet wie auch SP-A und SP-D Endotoxin (Augusto 2002), lediglich SP-B scheint kein Endotoxin binden zu können (Epaud 2003).

## **1.9 Zytokine und „second messenger“ (Botenstoffe)**

Verschiedene Körperzellen produzieren lokal oder systemisch wirkende Gewebshormone. Von besonderer Bedeutung unter diesen Gewebshormonen sind die sogenannten Zytokine, von denen derzeit bereits mehr als 45 bekannt sind. Sie regulieren meist die Proliferation oder Differenzierung und die Funktion ihrer Zielzellen (Löffler 1998). Einzelne Zytokine haben multiple Funktionen, während die selben biologischen Funktionen teilweise durch verschiedene Zytokine aktiviert werden. Zytokinen wird auch eine zentrale Rolle in der Immunregulation zugesprochen, dort sind sie involviert in die Steuerung der Immunantwort und den Ablauf von Entzündungsreaktionen. Zytokine binden an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche und wirken autokrin, parakrin oder endokrin und können über ein komplexes Netzwerk die Bildung und Sekretion weiterer Zytokine stimulieren. Die Bindungsaffinität zwischen Zytokinen und ihren spezifischen Rezeptoren ist hoch, weshalb bereits geringste Konzentrationen von Zytokinen einen Effekt hervorrufen. Verschiedene Zytokine interagieren miteinander. So aktivieren IL-1 und TNF- $\alpha$  NF-kappaB, was wiederum die Expression von Interleukin (IL)-6 stimuliert. Glukokortikoide hingegen hemmen die Synthese mehrerer Zytokine, darunter IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  (Kent 2005, Li 2001).

Von besonderer Bedeutung in der systemischen Inflammationsreaktion sind die proinflammatorischen Zytokine Tumor Nekrose Faktor (TNF)- $\alpha$ , Interleukin (IL)-1, IL-



6 und IL-8. Im normalen Schwangerschaftsverlauf ohne Anzeichen einer Infektion sind weder IL-1 noch TNF- $\alpha$  im Fruchtwasser nachweisbar, dahingegen kann man IL-6 und IL-8 unabhängig vom Gestationsalter in geringen Mengen nachweisen (Silver 1993). Die Exposition gegenüber einer Chorioamnionitis geht mit dem Auftreten verschiedener Entzündungsmediatoren einher. Bei einem Amnioninfektionsyndrom sind insbesondere die Werte von IL-6 und IL-1 erhöht (Yoon 1997, Yoon 2000).

Erhöhte Werte verschiedener Entzündungsmediatoren in der Amnionflüssigkeit gehen jedoch häufig mit schwerwiegenden Erkrankungen einher. Erhöhte Spiegel der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 in der Amnionflüssigkeit sind verbunden mit einem erhöhten Risiko der BPD (Gomez 1998, Yoon 1997), ein erhöhter Wert von TNF- $\alpha$  korreliert mit einer gesteigerten Inzidenz eines Atemnotsyndroms (Hitti 1997). Weiterhin ist der Nachweis von IL-6, TNF- $\alpha$  oder Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) vor einer Frühgeburt assoziiert mit einem kindlichen Hirnschaden (Alexander 1998, Nelson 1998, Tauscher 2003, Yoon 1997).

Interleukin-6 kann auch im Nabelschnurblut gemessen werden. Bei Frühgeborenen, die nach einem vorzeitigen Blasensprung oder vorzeitig einsetzenden Wehen geboren wurden, konnte ein erhöhter Wert von IL-6 im Nabelschnurblut nachgewiesen werden. Hiermit verbunden war ein erhöhtes Risiko eines FIRS (Fetal Inflammatory Response Syndrome), einer Periventrikulären Leukomalazie und einer Nekrotisierenden Enterokolitis (Goepfert 2004). Weiterhin ist ein erhöhter Wert von IL-6 im Nabelschnurblut ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer Bronchopulmonale Dysplasie (Yoon 1999).

Nicht alle Effekte der Zytokine auf die sich entwickelnde Lunge müssen negativ sein. So führt das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\alpha$  zu einer Lungenreifung (Bry 1997). IL-1 $\alpha$  erhöht die mRNA der Surfactantproteine SP-A und SP-B und verbessert die Compliance der Lunge beatmeter frühgeborener Kaninchen (Bry 1996, Bry 1997). In klinischen Studien war die reduzierte Inzidenz des RDS assoziiert mit erhöhtem Interleukin (IL)-6 im Nabelschnurblut, einem Marker der systemischen fetalen Entzündungsantwort (Shimoya 2000).

Intraamniotisches Endotoxin löst im frühgeborenen Lamm eine stärkere Lungenreifung aus als Betamethason, insbesondere hinsichtlich des Surfactantsystems (Jobe 2000, Jobe 2000).

Diese Beobachtungen werfen die Hypothese auf, proinflammatorische Zytokine könnten als Reifungssignale für den Feten wirken. Zytokine könnten eine signalgebende Rolle sowohl während der normalen Lungenentwicklung als auch während einer Lungenschädigung und nachfolgender Reparatur haben <sup>(Jobe 1999)</sup>.

### **1.9.1 Botenstoffe der Entzündungsreaktion: Interleukin-6**

Interleukin (IL)-6 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 21,5 - 30 kDa, das von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen gebildet wird, unter anderem von Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Nach Stimulation produzieren auch Makrophagen, T-Helferzellen, B-Lymphozyten, Granulozyten, Mastzellen, Epithelzellen und einige weitere das Zytokin <sup>(Bauer 1991)</sup>. Die Heterogenität des Molekulargewichts erklärt sich aus post-translationalen Modifizierungen wie beispielsweise Glykosylierungen oder Phosphorylierungen.

Das Zytokin übt seinen Effekt durch Bindung an den IL-6-Rezeptor an der Zelloberfläche aus, wodurch intrazelluläre Signalwege aktiviert werden (Abbildung 18) <sup>(Mihara 2012)</sup>.

IL-6 ist der Prototyp einer ganzen Familie von Zytokinen, zu der auch Interleukin-11, Oncostatin M und weitere gehören. Es ist einer der bedeutendsten Mediatoren des Immunsystems und der Akut-Phase-Antwort einer Gewebeschädigung. Daneben beeinflusst es direkt oder indirekt die Proliferation und Differenzierung bei der Hämatopoese und im Nervensystem <sup>(Kishimoto 1989)</sup>. Einer der Haupteffekte des IL-6 ist die Koordination von Abwehr- und Reparaturprozessen, sowohl hinsichtlich unspezifischer inflammatorischer Reaktionen als auch des spezifischen Immunsystems. Als bedeutender Regulator der lymphozytären Funktion induziert es die Reifung von B-Zellen zu Immunglobulin-sezierenden Plasmazellen. Weiterhin stimuliert IL-6 die Sekretion von Antikörpern und kann unter Anwesenheit von IL-2 die Differenzierung von reifen und unreifen T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen vermitteln. Ebenso stimuliert IL-6 die Proliferation von Thymozyten <sup>(de Bont 1993)</sup>. In Hepatozyten aktiviert es die Synthese von Akute-Phase-Proteinen <sup>(Heinrich 1990)</sup>. Außerdem kann es die Ausschüttung vieler Hormone beeinflussen.

Im Blut gesunder Individuen ist IL-6 im Allgemeinen nicht nachweisbar. Hingegen ist ein nachweisbarer Anstieg im Rahmen eines Entzündungsgeschehens eine physiologische Reaktion. So können beispielsweise erhöhte Werte in der Amnionflüssigkeit eine intrauterine Infektion anzeigen <sup>(Romero 1990)</sup>. Im Nabelschnurblut Neugeborener, die anschließend an einer Sepsis, einer Pneumonie, einer Nekrotisierenden Enterokolitis oder einer Hirnblutung erkranken, konnten erhöhte Werte an IL-6 nachgewiesen werden <sup>(Weeks 1997)</sup>. Ebenfalls kann IL-6 als sensitiver Marker zur Früherkennung einer Neugeborenen-sepsis verwandt werden <sup>(Messer 1996)</sup>. Die Synthese von IL-6 erfolgt unter anderem nach Kontakt mit Lipopolysaccharid (LPS) <sup>(Helfgott 1987)</sup>, Viren, Interferon, IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ . Auch durch IL-6 selbst kann die Synthese positiv oder negativ stimuliert werden. Glukokortikoide, IL-4 und IL-10 hingegen hemmen die Synthese von IL-6 <sup>(Kent 2005, Li 2001, Szabo 1991)</sup>.

### **1.9.2 Botenstoffe der Entzündungsreaktion: Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-3**

Die Transkription der Surfactantproteine wird durch intrazelluläre Transkriptionsfaktoren vermittelt (Abbildung 18). Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs) sind Proteine, die nach der Aktivierung eines entsprechenden Zytokinrezeptors an der Zelloberfläche angeregt werden und die intrazelluläre Signalgebung vermitteln <sup>(Stephanou 2005)</sup>. Nach Aktivierung durch Phosphorylierung mittels Januskinasen (JAKs) formen STATs Dimere, die zum Zellkern translozieren, dort aktivieren sie die Transkription der entsprechenden Gene <sup>(Ihle 2001)</sup>. Dieser komplexe Signalweg umfasst nach heutigem Wissen vier Januskinasen (JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2) und sieben STAT-Proteine (STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a/b und STAT-6) <sup>(Schindler 2007)</sup>.

Während die meisten spezifischen STATs in erster Linie Signale spezifischer Rezeptoren vermitteln, partizipiert STAT-3 in zahlreichen Signalwegen diverser Wachstumsfaktoren und Zytokine. Initial wurde STAT-3 als nuklearer Faktor identifiziert, der die IL-6 - abhängige Signalgebung in der Akut-Phase Reaktion der Leber vermittelt. Nachfolgende Studien zeigten, dass STAT-3 die Signalgebung zahlreicher Zytokine (z.B. IL-6, IL-11, IL-10, IL-2, Oncostatin M, Erythropoietin und

andere) und Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, TGF- $\alpha$ , HGF, G-CSF, und andere) in verschiedensten Zellen und Organen vermittelt (Akira 1997, Boccaccio 1998, Damell 1997, Kirito 1997).

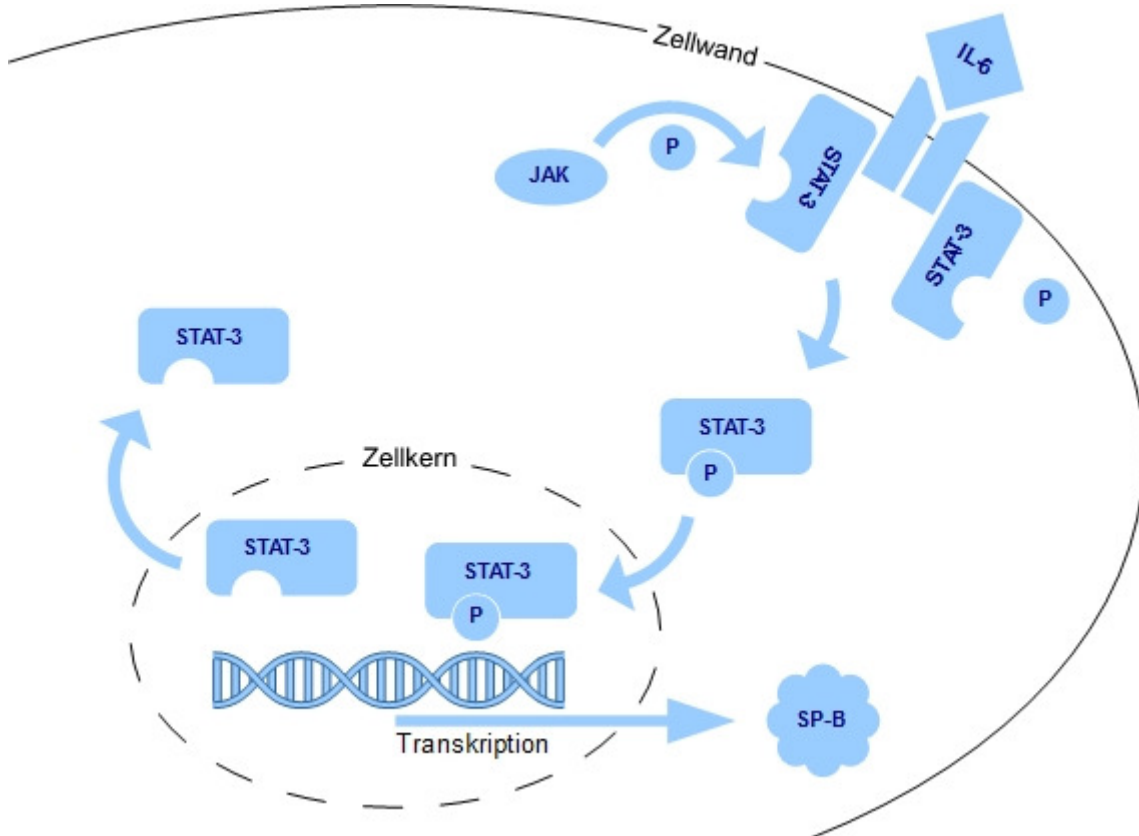


Abbildung 18: IL-6 - STAT-3 - Signalweg. STAT-3 wird durch Phosphorylierung nach Rezeptorbindung an der Zelloberfläche aktiviert und transloziert in den Nukleus. Dort übt es seine Funktion durch Aktivierung der Transkription von Zielgenen, unter anderem SP-B, aus.

STAT-3 wird in verschiedenen Zellen der reifenden sowie postnatalen Lunge exprimiert. Wie in unterschiedlichen in-vitro-Studien gezeigt werden konnte, reguliert STAT-3 die Expression von SP-B (Abbildung 18) durch Bindung und Aktivierung cis-aktiver Elemente des Promoters des Surfactantprotein-B (Yan 2002). STAT-3 scheint jedoch für die Bildung von SP-B nicht unentbehrlich zu sein. STAT-3-defiziente Mäuse benötigen den Transkriptionsfaktor weder für die Ausbildung noch für die Funktion einer unversehrten Lunge (Hokuto 2004). Hingegen vermittelt STAT-3 protektive oder reparative Reaktionen in der durch Hyperoxie geschädigten Lunge. In STAT-3-defizienten Mäusen ist unter

anderem die Menge an SP-B nach Hyperoxie deutlich erniedrigt, was zeigt, dass STAT-3 die Expression von SP-B in der geschädigten Lunge beeinflusst <sup>(Hokuto 2004)</sup>. Die Aktivierung von STAT-3 durch Interleukin-6 kann durch bakterielle Produkte, wie zum Beispiel Lipopolysaccharide, induziert werden <sup>(Severgnini 2004)</sup>.

## 1.10 Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (LPS) sind in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien enthalten. Im Gegensatz zu bakteriellem Endotoxin, das zusätzlich kleine Mengen der Zellwandproteine, Lipide, Lipoproteine und Polysaccharide enthält, ist LPS ein aufgereinigtes makromolekulares Glykolipid aus der Zellwand gramnegativer Bakterien <sup>(Fink 1990, Rietschel 1982)</sup>. In wissenschaftlichen Publikationen werden Endotoxin und Lipopolysaccharide jedoch häufig als Synonym verwandt.

Im Blut wird LPS an das Lipopolysaccharid-bindende-Protein (LBP) gebunden. Dieser Komplex wiederum bindet an den Membranrezeptor CD14, der unter anderem von Monozyten exprimiert wird, wodurch die Freisetzung verschiedener Zytokine induziert wird. LPS wird häufig zur Simulation einer Infektion genutzt, da es die meisten Komponenten einer Entzündungsantwort initiiert. Als potentes proinflammatorisches Agens wurde es bereits zuvor tierexperimentell eingesetzt, um eine fetale systemische Entzündungsreaktion in unreifen Lämmern auszulösen <sup>(Garnier 2006, Garnier 2003)</sup>. Die Verabreichung von LPS hat in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis und der Verabreichungsweise <sup>(Kramer 2011, Kramer 2001, Lambermont 2014)</sup> schwere Auswirkungen auf den Feten (Abbildung 19). Neben der mehrfach nachgewiesenen akut eintretenden Entzündungsreaktion des Feten wird auch die weitere Entwicklung in verschiedenster Weise beeinflusst. LPS verursacht eine periventrikuläre Leukencephalopathie und eine Entzündung sowohl in der weißen Substanz als auch in basalen Ganglien <sup>(Garnier 2003)</sup>. Außerdem beeinträchtigt eine intravenöse Applikation von LPS in höherer Dosierung (50 µg/kg fetales KG) das fetale kardiovaskuläre System schwerwiegend vor, während und nach einer kurzen hypoxischen Phase <sup>(Garnier 2001)</sup>. Wird dem Feten LPS in utero intravenös verabreicht, so folgen fetale Tachykardie, Hypoxämie, Hypotension und erhöhte systemische proinflammatorische Zytokine <sup>(Duncan 2002, Sechase 2011)</sup>. Es wird ein substantieller, lang andauernder Abfall des umbilikalen Blutflusses mit chronischer

Hypoxie beim unreifen fetalen Schaf ausgelöst <sup>(Coumans 2004)</sup>. Mehrfache Verabreichungen schädigen das Gehirn des Feten, unabhängig von fetaler Hypoxämie oder Hypotension <sup>(Duncan 2006)</sup>. Hingegen scheint eine singuläre Verabreichung keinen Hirnschaden zu verursachen <sup>(Duncan 2002)</sup> (Abbildung 19).

Trotz der toxischen Wirkung von LPS führt im Tiermodell eine geringe intraamniotisch verabreichte Menge nicht zum Absterben des Feten, hingegen wird eine beschleunigte Lungenreifung induziert <sup>(Kuypers 2012)</sup>. Eine konsekutive Erhöhung des Cortisolspiegels im

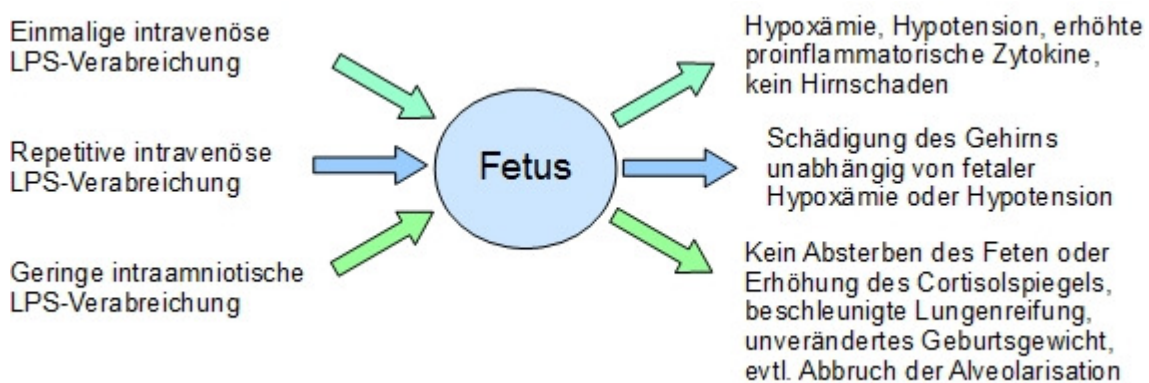


Abbildung 19: Auswirkungen von Lipopolysaccharid-Gaben in Abhängigkeit der Häufigkeit auf den Fetus.

Blutplasma erfolgt jedoch nicht, somit ist die Aktivierung des Glukokortikoid-Signalwegs keine Erklärung für diese Beobachtung <sup>(Jobe 2000, Jobe 2000, Willet 2000)</sup>. Die Lungenfunktion ist nach intraamniotischer Verabreichung des proinflammatorischen Stimulus besser als nach antenatal verabreichtem Betamethason <sup>(Jobe 2000)</sup>. Im Tiermodell konnte die Compliance um 50%, das Lungengasvolumen um 100% gesteigert werden. Hingegen stieg das Lungengasvolumen nach Betamethason lediglich um 50% <sup>(Jobe 2000)</sup>. Trotz vergleichbarer Lungenstruktur waren die Lungen funktionell denen Betamethason-behandelter Tiere überlegen <sup>(Willet 2000)</sup>.

Die Synthese von Phosphatidylcholin, SP-A und SP-B ist nach LPS-Applikation verglichen mit antenatal verabreichtem Betamethason deutlich höher <sup>(Jobe 2000)</sup>. Anders als maternal appliziertes Betamethason verursacht intraamniotisch verabreichtes LPS keine Reduktion des Geburtsgewichts <sup>(Jobe 2000)</sup>.

Möglicherweise führt jedoch die mit intraamniotisch verabreichtem LPS einhergehende Erhöhung proinflammatorischer Zytokine zu einem Abbruch der Alveolarisation.

Kinder, die eine BPD entwickeln, haben erhöhte proinflammatorische Zytokine in den Luftwegen (Groneck 1995). Und transgene Mäuse mit einer Überexpression von IL-6, IL-11, TNF- $\alpha$  oder TGF- $\alpha$  im Lungenepithel haben nur eine geringe Alveolarisation (DiCosmo 1994, Hardie 1997, Miyazaki 1995, Ray 1997).

## 1.11 Das Schaf als Tiermodell für das Studium der Lungenreifung

Die Lungenentwicklung unterscheidet sich zwischen den einzelnen Spezies erheblich. Die zeitliche Abfolge der einzelnen Phasen der Lungenentwicklung des Schafes, bezogen auf das Gestationsalter, ist der des Menschen jedoch sehr ähnlich (Wolfs 2012). Das macht das Schaf zu einem idealen Tiermodell für ein Studium der Lungenentwicklung bei einer Frühgeburt oder von Einflüssen auf die Entwicklung der Lunge in utero wie bei einer intrauterinen Infektion (Kramer 2002).

Verschiedene Arbeiten beschreiben die Entwicklung der Lunge des Schafes sowohl pränatal (Alcorn 1981, Docimo 1991) als auch postnatal (Davies 1988). Wie bei anderen Säugetieren kann die Lungenentwicklung des Schafes in eine embryonale (Bryden 1973), eine pseudoglanduläre, eine kanalikuläre, eine sakkuläre und eine alveoläre Phase unterteilt werden (Alcorn 1981, Kramer 2008, Pringle 1986) (Abbildung 20).

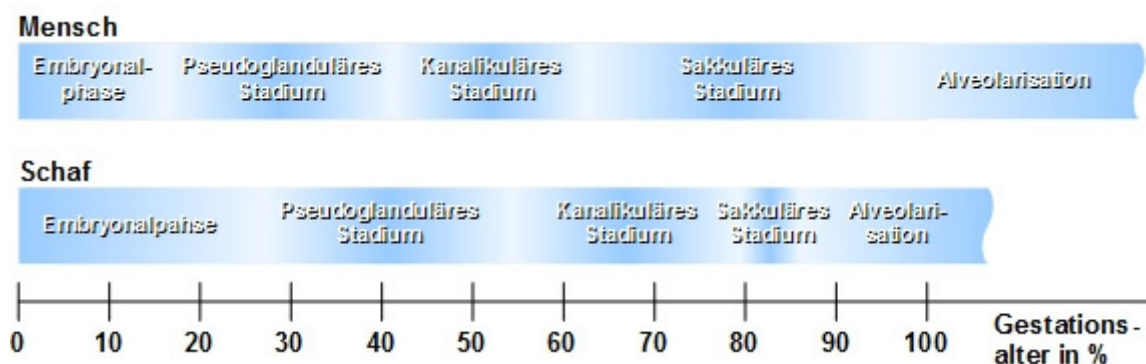


Abbildung 20: Vergleich der intrauterinen Lungenentwicklung von Mensch und Schaf, bezogen auf das prozentuale Gestationsalter (Reguläre Schwangerschaft beim Schaf 147 Tage, beim Menschen 40 Wochen) (Mutius 2013).

In der pseudoglandulären Phase vom 40. bis zum 80. Gestationstag entwickeln sich die leitenden Atemwege des Bronchialbaumes. Während der kanalikulären Entwicklungsphase zwischen dem 80. und 120. Gestationstag steigt das später

luftgefüllte Lungenvolumen deutlich. Typ-I-Pneumozyten treten erstmalig ab dem 95. Gestationstag auf, ab dem 110. Gestationstag sind Typ-II-Pneumozyten mit einzelnen osmophilen Einschlüssen sowie einzelne primitive Alveolen nachweisbar <sup>(Alcorn 1981)</sup>. Die eigentliche alveoläre Phase verläuft jedoch vom 120. Gestationstag bis zur Geburt <sup>(Docimo 1991)</sup>. Nun werden Alveolen gebildet, die luftleitenden Strukturen werden dünnwandiger. Der Durchmesser der Alveolarwände verringert sich bis zur Geburt von 4,12  $\mu\text{m}$  auf 2,55  $\mu\text{m}$  <sup>(Docimo 1991)</sup>. Die Surfactantbildung, als Zeichen der biochemischen Lungenreifung, steigt rapide zwischen dem 130. und 140. Gestationstag <sup>(Alcorn 1981, Mescher 1975)</sup>.

### **1.11.1 Tiermodell Schaf: Unterschiede und Gemeinsamkeiten zum Menschen**

Unter allen Spezies sind die Entwicklungsschritte der Lunge in Affen und Schafen der menschlichen Lungenentwicklung am nächsten <sup>(Kramer 2008)</sup>. Dennoch bestehen insbesondere im Stadium der Alveolarisation deutliche Unterschiede. In der menschlichen Lunge sind am Ende der regulären Schwangerschaft zahlreiche Alveolen vorhanden <sup>(Pringle 1986)</sup>. Jedoch verläuft beim Menschen die Alveolarisation bis weit nach der Geburt <sup>(Docimo 1991)</sup>.

Nagetiere sind insbesondere für die Untersuchung der pränatalen Alveolarisation wenig geeignet, da sich die ersten Alveolen erst postnatal bilden. In der Lunge von Kaninchen <sup>(Kikkawa 1968)</sup>, Ratte <sup>(Burri 1974)</sup> und Maus <sup>(Amy 1977)</sup> dominieren bei der Geburt noch sakkuläre Strukturen, Alveolen sind noch nicht nachweisbar.

Beim Schaf hingegen verläuft die alveoläre Phase bereits größtenteils pränatal, die Alveolarepten sind histologisch bereits mehrere Wochen vor dem regulären Geburtstermin ausgereift <sup>(Docimo 1991)</sup>. Vollständig abgeschlossen ist die alveoläre Phase jedoch auch beim Schaf bei der Geburt noch nicht. Die Lunge enthält noch immer viele undifferenzierte Bronchialzellen, und die Ductus alveolares sind lediglich durch sich entwickelnde Alveolarepten unterteilt, was auf eine noch nicht abgeschlossene Lungenreifung hindeutet <sup>(Alcorn 1981)</sup>.

Die relative Anzahl der Alveolen der Lunge des neugeborenen Lammes übersteigt die des Menschen bei weitem. Verwendet man die radiale Zählmethode nach Emery und



Mithal, so ist die Anzahl der Alveolen beim neugeborenen Lamm gegenüber der des Menschen verdreifacht <sup>(Emery 1960)</sup>.

Auch das postnatale Wachstum der Alveolen des Schafes unterscheidet sich von dem des Menschen. Die bereits bei Geburt hohe Zahl der Alveolen des Schafes verdreifacht sich postnatal lediglich <sup>(Davies 1988, Hu 1987)</sup>, während sich beim Menschen die Zahl der Alveolen je nach Studie von etwa  $17 - 71 \times 10^6$  auf  $200 - 600 \times 10^6$  um ein Vielfaches steigert <sup>(Merkus 1996)</sup>.

Bei der Geburt hat die Lunge des Schafes ein singuläres Kapillarbett <sup>(Alcorn 1981)</sup>. Ein doppeltes Kapillarbett, das beim Menschen bis zum Stadium der mikrovaskulären Reifung besteht, wurde beim Schaf auch in deutlich früherem Gestationsalter nicht gefunden. Somit scheint die Reifung der Alveolarsepten mit Verringerung des Wanddurchmessers anders als beim Menschen unabhängig von einer Änderung der Kapillarkonfiguration zu sein.

Aufgrund der bei der Geburt des Schafes bereits fast vollständig abgeschlossenen Entwicklung der Lunge sind die morphologischen Änderungen während des postnatalen Lungenwachstums deutlich geringer als beim Menschen oder bei Nagetieren wie zum Beispiel der Ratte <sup>(Davies 1988)</sup>.

Die vergleichsweise reife Lunge des neugeborenen Lammes ist zweckdienlich für ein Tier, das direkt nach der Geburt in der Lage sein muss, selbständig zu laufen. Sowohl Nagetiere als auch der Mensch sind bei Geburt vergleichsweise hilflos. Sie kommen mit einer deutlich unreiferen Lunge aus. Bis zur Selbständigkeit sind jedoch postnatal noch große morphologische Entwicklungsschritte notwendig.

## 1.12 Fragestellung

In dieser Arbeit wird die Hypothese überprüft, ob eine intrauterine Verabreichung von Lipopolysaccharid in die fetale Blutbahn eine Lungenreifung induziert. Grundlage dieser Hypothese ist die bereits bekannte Initiierung einer Lungenreifung durch intraamniotisch verabreichtes Lipopolysaccharid <sup>(Kramer 2001)</sup>. Hierbei wurde durch Aspiration der Amnionflüssigkeit eine fetale pulmonale Inflamationsreaktion in Gang gesetzt. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Studien war im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals eine kontrollierte systemische Exposition ausschließlich des Feten gegenüber dem verabreichten Lipopolysaccharid möglich. Dies geschah durch direkte chirurgische Zugänge, mittels derer eine intrauterine, intravenöse Infusion von Lipopolysaccharid ausschließlich in den Feten gelang. Die Auswirkungen der hierauf folgenden systemischen, fetalen Entzündungsreaktion auf die fetale Lunge wurden histologisch, morphometrisch, biochemisch und funktionell untersucht. Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in einer internationalen Zeitschrift nach Begutachtung durch unabhängige Experten im Fachgebiet publiziert <sup>(Kramer 2009)</sup>.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere und Tierhaltung**

Der tierexperimentelle Teil der Arbeit wurde an der Universität Maastricht in den Niederlanden durchgeführt <sup>(Kramer 2009)</sup>. Die experimentellen Protokolle wurden von der tierethischen Kommission der Universität Maastricht genehmigt und erfüllten die Richtlinien der zuständigen staatlichen Behörden (Aktenzeichen DEC2006-125). In der vorliegenden Arbeit wurde ein bereits mehrfach erprobtes Tiermodell an Schafen verwandt <sup>(Jobe 2000, Kallapur 2001, Kramer 2008, Willet 2000)</sup>, um die fetale Lungenentwicklung mit besonderem Schwerpunkt auf der Lungenreifung *in vivo* zu studieren. Auch in dieser Studie wurden wie bereits in vorhergehenden Arbeiten Schafe der Rasse Texel verwandt. Die reguläre Schwangerschaftszeit dieser Tiere beträgt 147 Tage. Die Mutterschafe wurden in Einzelkäfigen gehalten und hatten uneingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser.

#### **2.1.1 Erster Eingriff: Operation der Mutterschafe und der Feten**

Einundzwanzig fetale Schafe wurden in einem mittleren Schwangerschaftsalter von  $107 \pm 1$  Tagen durch einen operativen Eingriff permanent an Überwachungsgeräte angeschlossen (Abbildung 21) <sup>(Garnier 2001)</sup>. Die Operation wurde in Vollnarkose der Mutterschafe (1g Thiopental pro 70 kg Körpergewicht intravenös zur Narkoseeinleitung, 0,5-1,0 % Halothan in einem Gasgemisch aus Lachgas und Sauerstoff in einem Verhältnis von 1:1 zur Narkoseaufrechterhaltung) durchgeführt. Das Abdomen wurde durch einen ventralen Medianschnitt eröffnet. Die fetalen Gliedmaßen wurden identifiziert und durch eine Inzision in den Uterus freigelegt. Polyvinylkatheter (Maxxim Medical BV, Den Bosch, Niederlande) mit einem Innendurchmesser von 0,75 mm und einem Außendurchmesser von 1,25 mm wurden über die fetalen Hinterbeine in je eine tibiale Vene und eine tibiale Arterie eingebracht und bis in die Vena cava inferior beziehungsweise die Aorta abdominalis vorgeschoben. Anschließend wurde die fetale Haut mit Cyanoacrylat verschlossen (Cyanolit, Japan). Die verlorene Amnionflüssigkeit wurde durch 0,9%ige Kochsalzlösung mit einer Temperatur von 39°C ersetzt, ein intrauteriner Druckkatheter eingebracht und der Uterus mittels Naht verschlossen.

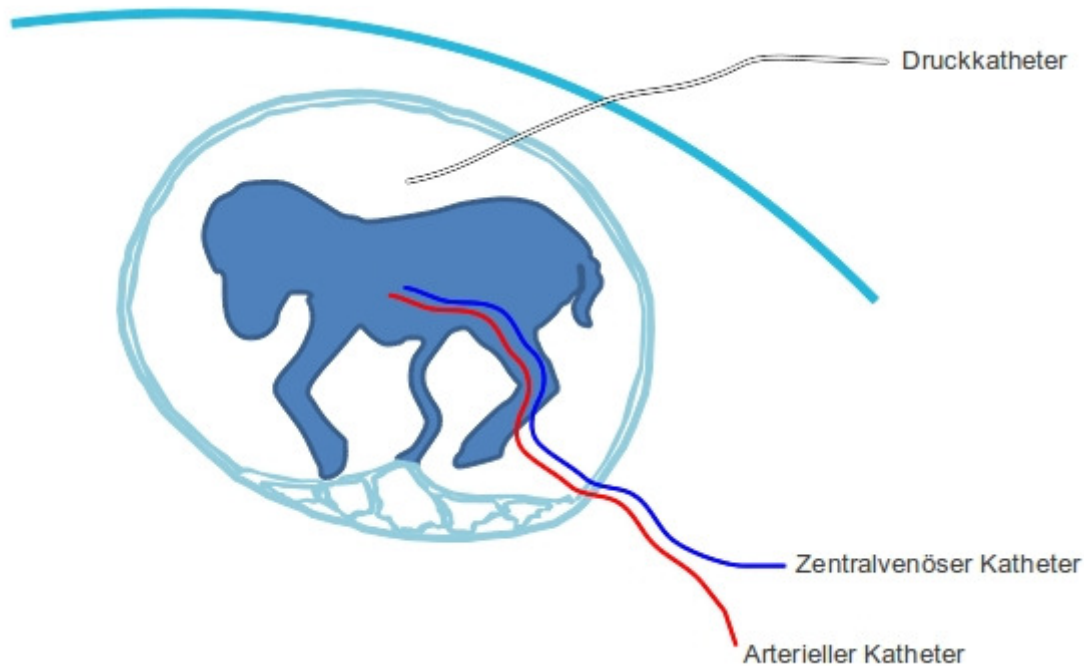


Abbildung 21: Instrumentation der fetalen Schafe. Durch einen operativen Eingriff wurden ein intrauteriner Druckkatheter, ein zentralvenöser Katheter in die fetale Vena cava inferior und ein arterieller Katheter in die fetale Arteria abdominalis eingebracht. Modifiziert nach <sup>(Drury 2015, Einverständnis liegt vor)</sup>.

Die Katheter wurden mit 100 IE / ml Heparin befüllt (Heparin-Natrium®, Braun, Melsungen, Deutschland) und durch eine minimale Inzision in die Flanke des Mutterschafes nach außen abgeleitet. Die Katheter wurden durch eine auf die Haut des Mutterschafes genähte Tasche geschützt.

Die Mutterschafe erhielten 1g Ampicillin (Pentrexyl®; Bristol-Myers, Woerden, Niederlande) subcutan und 10 µg je Kilogramm Körpergewicht Buprenorphin (Temgesic®; Schering, Niederlande) zweimal täglich für insgesamt drei Tage postoperativ. Nach dieser dreitägigen Erholungsperiode wurden die Experimente begonnen.

### 2.1.2 Infusion des Lipopolysaccharids und Vitalparametermessung

Die Versuchstiere wurden randomisiert in Gruppen eingeteilt (Abbildung 22). Am 110. ± 1 Gestationstag erhielten die Feten intrauterin über die einliegenden intravenösen Katheter jeweils 5 ml einer der folgenden Infusionslösungen. Die Feten der

Kontrollgruppe (n = 9) erhielten eine Kochsalzinfusion (5 ml 0,9%ige Kochsalzlösung), die Feten der Versuchsgruppe (n = 12) erhielten 100 ng LPS (E. coli, 0127:B8, Sigma-Aldrich, Deutschland, in 5 ml 0,9%iger Kochsalzlösung) (Abbildung 22). Die Lösungen wurden über eine Zeitspanne von 10 Minuten infundiert.

Die fetale Herzfrequenz und der mittlere arterielle Blutdruck wurden während des Experiments durchgängig mit einem PC unter Verwendung eines speziell angepassten Systems zur hämodynamischen Datengewinnung (Universität Maastricht, Niederlande) aufgezeichnet. Blutproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Infusion aus der Aorta descendens entnommen (-1 h, +1 h, +3 h, +6 h, +12 h, +24 h, +48 h, +72 h). Untersucht wurden Blutgase, Säure-Basen-Status (AVL 993, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark), Hämoglobinkonzentration und arterielle Sauerstoffsättigung des Hämoglobins (OSM 2 Hemoximeter, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark).

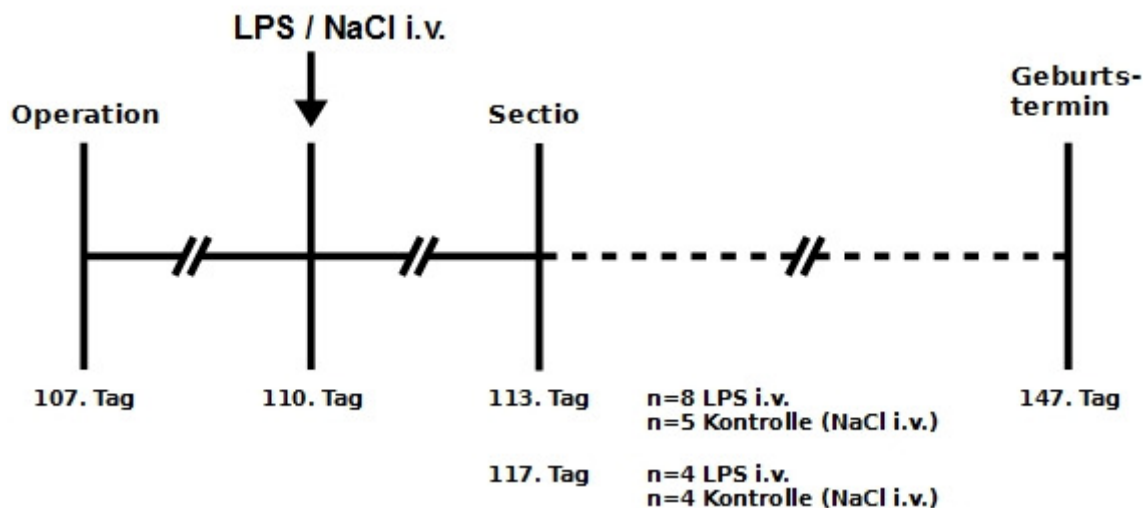


Abbildung 22: Design des Experiments (Kramer 2009, Einverständnis liegt vor). Die reguläre Schwangerschaftsdauer beträgt bei den Versuchstieren 147 Tage. Am 107. Schwangerschaftstag wurden die fetalen Lämmer intrauterin operiert und an die Überwachungsgeräte angeschlossen. Am 110. Schwangerschaftstag wurde den Tieren entweder eine reine 0,9%ige Kochsalzlösung oder Lipopolysaccharid von E. coli intravenös injiziert. Die Tiere wurden anschließend weitere drei oder sieben Tage überwacht und dann die Schwangerschaft durch eine Sectio beendet.

### 2.1.3 Zweiter Eingriff: Kaiserschnitt und Fixierung

Drei beziehungsweise sieben Tage nach fetaler LPS-Infusion wurden die Mutterschafe erneut narkotisiert (Natrium-Pentobarbital 1 g pro 70 kg Körpergewicht intravenös zur

Narkoseeinleitung, 0.5–1.0% Halothan in einem Gasmisch aus Lachgas und Sauerstoff in einem Verhältnis von 1:1 zur Narkoseaufrechterhaltung).

Der rechte Vorhof und beide Jugularvenen des Feten wurden inzidiert. Nach Heparininfusion (10.000 IE) wurde jedes Tier perfusionsfixiert. Hierzu wurde eine Nadel in den linken Ventrikel platziert. 500 ml gepuffertes Paraformaldehyd (4%) wurden infundiert, bis der Ausfluss aus beiden Jugularvenen klar war <sup>(Garnier 2008)</sup>. Die Mutterschafe und die Feten wurden durch eine mütterliche Überdosis Natrium-Pentobarbital (150 mg pro kg Körpergewicht) eingeschläfert und die Feten entnommen.

## 2.2 Druck-Volumen-Kurve und Pneumektomie

Nach endotrachealer Intubation des Lammes wurde der fetale Thorax chirurgisch eröffnet. Nun wurde die Lunge mit einem Druck von 40 cm Wassersäule über einen Zeitraum von einer Minute gebläht <sup>(Ueda 1994)</sup>. Das maximale Lungenvolumen wurde aufgezeichnet.

Der Druck wurde anschließend schrittweise auf die vordefinierten Werte von 20, 15, 10, 5 und 0 cm Wassersäule vermindert. Das hierbei gemessene Lungenvolumen wurde jeweils 30 Sekunden nach Erreichen des entsprechenden Drucks dokumentiert. Die erhobenen Werte wurden entsprechend der Compliance des Beatmungssystems korrigiert. Anschließend wurde die Lunge zur weiteren Analyse aus dem Thorax entnommen.

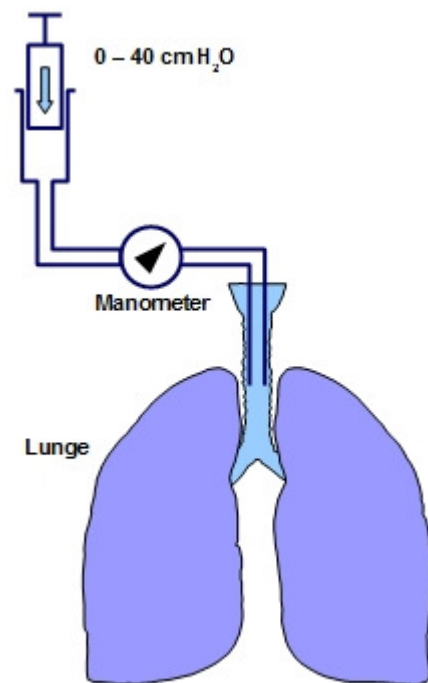


Abbildung 23: Versuchsaufbau zur Bestimmung der Compliance der fetalen Lunge

## 2.3 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die bronchoalveoläre Lavage wurde gewonnen, indem die Lunge jedes Versuchstieres fünfmal mit auf 4°C gekühlter 0.9%iger Kochsalzlösung befüllt wurde, bis sie sichtbar ausgedehnt war.

### **2.3.1 Lyophilisieren der BAL**

Durch die mehrfachen bronchoalveolären Waschungen war die Konzentration der intrapulmonalen Proteine und Zytokine in der gewonnenen Lavage sehr gering. Daher wurden zunächst mittels Gefriertrocknung Lyophilisate aus den bronchoalveolären Lavagen der jeweiligen Tiere hergestellt. Dialysierschläuche (Spectra/Por<sup>®</sup> MWCO: 6-8.000, 132650, Spectrum Laboratories, USA) wurden zunächst 30 Minuten in destilliertem Wasser eingeweicht, bevor die aufgetauten Proben darin hineinpipettiert wurden. In diesen Dialysier-Cellophanschläuchen konnte die BAL über vier Stunden bei 4°C gegen währenddessen mehrfach gewechseltes destilliertes Wasser diffundieren. Hierdurch sollte der Kochsalzgehalt in der BAL reduziert werden, da hohe Kochsalzreaktionen möglicherweise zu Fehlreaktionen bei der Messung geführt hätten. Die Dialysate wurden in Polypropylen-Tubes (Greiner Bio-One Cellstar NUNC 50 ml) pipettiert, auf denen das exakte Volumen des Inhalts notiert wurde. Die Tubes wurden mit einer perforierten Folie (Parafilm) verschlossen und für drei Wochen in einen Gefriertrockner zum Lyophilisieren gegeben. Die gefriergetrockneten Proben wurden bis zur Messung mittels ELISA bei -20°C gelagert. Am Tag der Messung wurden die gefriergetrockneten Proben wieder in destilliertem Wasser gelöst, jetzt jedoch nur noch in einem Zehntel des Ausgangsvolumens. Daraus folgt eine zehnfache Konzentration des Probenmaterials gegenüber der ursprünglich gewonnenen BAL.

### **2.3.2 Bestimmung der Gesamtproteinmenge**

In der bronchoalveolären Lavage wurde als Marker für kapilläre Leckagen die Gesamtproteinmenge nach der durch Lowry beschriebenen Methode bestimmt <sup>(Kramer 2001, Lowry 1951)</sup>. Durch diese Methode kann die Konzentration sowohl löslicher als auch unlöslicher Proteine bestimmt werden. In der Probe enthaltene Proteine gehen zunächst mit einem alkalischen  $\text{Cu}^{2+}$ -Reagenz eine dem Biuret-Komplex ähnliche Verbindung ein. Anschließend folgt die Reduktion des Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenzes (Folin-Reagenz) durch die mit dem  $\text{Cu}^{2+}$  komplexierten Proteine. Das Endprodukt ist, abhängig vom Proteingehalt, blau gefärbt. Das Ausmaß der Blaufärbung dient der quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration.

Zunächst wird eine Standardkurve erstellt. Die Extinktion des entstehenden blauen

Farbstoffs mehrerer Proben mit bekannter Proteinkonzentration wird bei einer Wellenlänge von 750 nm ermittelt. Nach dem Lambert - Beer'schen Gesetz <sup>(Beer 1852)</sup> wird die gemessene Extinktion als Funktion der Proteinkonzentration graphisch dargestellt und der molare Extinktionskoeffizient aus dem Anstieg der resultierenden Geraden ermittelt.

*Lambert – Beer'sches Gesetz:  $E_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d$ , wobei  $E_\lambda$ : Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda$ ,  $\varepsilon_\lambda$ : molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$ ,  $c$ : Stoffmengenkonzentration und  $d$ : Schichtdicke des durchstrahlten Körpers bedeutet.*

Zur Verbesserung der Genauigkeit der Proteinbestimmung werden die bekannten Konzentrationen so gewählt, dass die Werte der zu messenden Proben im mittleren Bereich der Standardkurve liegen.

Durch die erneute Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann mittels des errechneten molaren Extinktionskoeffizienten die Proteinkonzentration einer beliebigen Probe bestimmt werden.

Zur interindividuellen Vergleichbarkeit der gemessenen Gesamtproteinmenge in der Lunge der Versuchstiere wurden die ermittelten Ergebnisse anschließend in Abhängigkeit des Körpergewichts des jeweiligen Tieres berechnet.

### **2.3.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Die ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Methode beruht auf einer Antikörper-Reaktion gegen das gesuchte Antigen <sup>(Engvall 1972)</sup>. Die zu untersuchende Probe wird in eine Mikrotiterplatte aus Polystyrol gegeben und auf dem Grund immobilisiert. Für die in diesem Versuchsaufbau angewandte Sandwich-Technik sind zwei spezifische Antikörper erforderlich. Zunächst wird die Mikrotiterplatte mit einem spezifischen Einfang-Antikörper beschichtet. Anschließend wird die zu untersuchende Probe hinzugegeben. Nun bindet der bereits an die Platte gebundene Antikörper an das gesuchte Antigen. Ein spezifischer Nachweis-Antikörper wird nun hinzugegeben und bindet ebenfalls an das gesuchte Antigen (daher die Bezeichnung Sandwich-ELISA, Abbildung 24). Nun wird noch ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, der die anschließende enzymatische Reaktion katalysiert. Durch die Bindung mehrerer



sekundärer Antikörper an einen primären Antikörper wird das Signal zusätzlich verstärkt. Das im letzten Schritt hinzugegebene farblose Substrat wird umgesetzt und eine quantitativ messbare Farbreaktion ausgelöst.

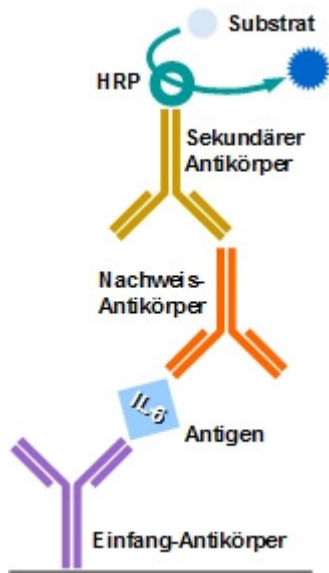


Abbildung 24: Schema eines Sandwich-ELISA zur Detektion von IL-6

In unseren Versuchen diente die ELISA-Methode der schon zuvor beschriebenen Messung der Konzentration an Interleukin (IL)-6 in der bronchoalveolären Lavage <sup>(Girgis 1995)</sup>. Die verwendeten primären Antikörper waren für das Schaf geeignet und bereits in Vorarbeiten mehrfach erprobt <sup>(Kramer 2002, Kramer 2009)</sup>. Zunächst wurde eine Mikrotiterplatte mit dem ersten primären Antikörper gegen IL-6 beschichtet. Hierzu wurde dieser monoklonale Antikörper (MAB1004, Chemicon, USA) in einer Konzentration von 5 µg/ml mit einer Pufferlösung (0,1 M Carbonatpuffer, pH 9,6) verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde dreimal mit Phosphatpufferlösung (PBS mit 0,05 % Tween 20, Sigma-Aldrich, Deutschland) gewaschen, um nicht gebundene Antikörper möglichst vollständig zu entfernen. Nun wurden die einzelnen Proben der bronchoalveolären Lavage der Versuchstiere hinzugefügt. Durch die Bindung des Antikörpers gegen das gesuchte Antigen (IL-6) wurde dieses am Boden der Probenröhrchen immobilisiert. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur wurde erneut dreimal mit Phosphatpufferlösung gewaschen, um Rückstände zu entfernen. Jetzt wurde der zweite primäre Antikörper (AB1839, Chemicon, USA) in einer Konzentration von 1:500 in der durchgängig verwandten Phosphatpufferlösung verdünnt und jeweils 100 µl zu den Proben hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde wiederum dreimal mit Phosphatpufferlösung gewaschen. Nun wurde der mit Meerrettichperoxidase (Horseradishperoxidase, HRP) konjugierte sekundäre Antikörper (Ziege anti-Kaninchen Immunoglobulin, Invitrogen, USA) in einer Konzentration von 1:1000 mit Phosphatpufferlösung verdünnt und wiederum jeweils 100 µl zu den Proben hinzugegeben. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde wieder dreimal mit Phosphatpufferlösung

gewaschen. Zuletzt wurden jeweils 100 µl Farbreagenz (TMB(3,3',5,5-Tetramethylbenzidin)-Chromogenlösung, Thermo Fisher Scientific, USA) hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde die Reaktion durch jeweils 50 µl 2M Schwefelsäure gestoppt. Die Quantifizierung erfolgte durch Messung der einzelnen Proben in einem Photometer bei der Wellenlänge von 650 nm.

### 2.3.4 Western Blot

Der Western Blot ermöglicht die Identifikation und Quantifikation spezifischer Proteine in Proteingemischen. Die Bezeichnung Western Blot geht auf den Namen des Erfinders der Blotting Technik Edwin Southern zurück, der erstmals 1975 die Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten als Southern Blotting publizierte <sup>(Southern 1975)</sup>. In

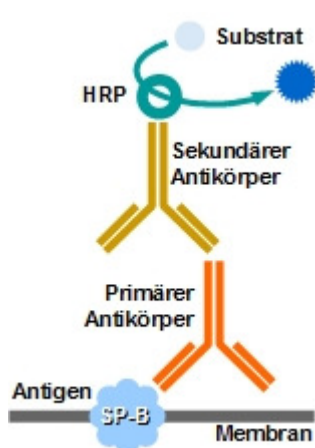


Abbildung 25: Schema eines Western Blots zur Detektion von SP-B

Anlehnung daran wurde das Proteinblotting als Western Blot bezeichnet <sup>(Burnette 1981, Towbin 1979)</sup>.

Nach größenabhängiger Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld mittels Gelelektrophorese werden diese auf eine Membran transferiert. Dort erfolgt dann der Nachweis mit spezifischen primären Antikörpern (Abbildung 25). Der primäre Antikörper wird durch einen sekundären Antikörper, an den ein Enzym gekoppelt ist, detektiert. Durch die katalytische Aktivität dieses Enzyms stellt sich nach Zugabe eines geeigneten Substrats das gesuchte Protein in Form einer Bande dar.

In der zuvor gewonnenen bronchoalveolären Lavage wurde die Menge an Surfactantprotein-B gemessen. Eine Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid (sodium dodecylsulfate polyacrylamide, SDS) – Gelelektrophorese <sup>(Laemmli 1970)</sup> wurde mit Gradientengelen (10-20%, Novex, USA) durchgeführt. Diese Gradientengele besitzen einen ansteigenden Acrylamidanteil, was die Auftrennung einer Probe mit Zielproteinen deutlich unterschiedlicher molarer Masse erleichtert.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen <sup>(Bachurski 2001)</sup>. Die Kammern der Gelelektrophorese-Einheit (XCell Surelock, Invitrogen, USA) wurden mit Elektrophoresepuffer (NuPAGE SDS Running

Buffer, Invitrogen, USA) befüllt und das Gradientengel eingesetzt. Neben den zu untersuchenden Proben wurde eine vom Schaf isolierte SP-B-Probe in standardisierter Menge aufgetragen, weiterhin wurde ein Marker mitgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden in die jeweiligen Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese fand bei einer angelegten Spannung von 200 V über einen Zeitraum von 25 Minuten statt.

Die Proteine wurden anschließend auf Polyvinylfluorid(PVDF)-Membranen (Schleicher & Schuell, Deutschland) zur Immunoblot-Analyse transferiert. Hierzu wurde die Membran zunächst für eine Minute in Methanol aktiviert, dann in Transferpuffer (NuPAGE Transfer Buffer, Invitrogen, USA) aufbewahrt. Währenddessen wurden die Schwämme der Transferkammer (XCell II Blot Module, Invitrogen, USA) mit Transferpuffer getränkt und alle Luftblasen entfernt. Anschließend wurde die Transfereinheit zusammengesetzt und mit Transferpuffer befüllt. Der Transfer erfolgte bei einer angelegten Spannung von 30 V für 60 Minuten.

Die Membran wurde nun aus der Kammer entnommen und mit Tris-gepufferter Natriumchloridlösung (TBS mit 0,1 Vol.-% Tween 20, pH 7,4, Sigma-Aldrich, Deutschland) gewaschen, um Rückstände zu entfernen. Aus diesem Puffer wurde nun durch Zusatz von 5 % Magermilchpulver (2,5 g fettarmes Magermilchpulver in 50 ml Pufferlösung) eine Lösung zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen hergestellt. Die Membran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in diese Blockpufferlösung gelegt.

Der nun verwandte anti-SP-B Antikörper wurde im Kaninchen hergestellt und stammte von Dr. J.A. Whittett (Division of Pulmonary Medicine, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Ohio, USA). Dieser primäre Antikörper bindet sowohl an vollständig prozessiertes (Molekulargewicht ~25 kDa) als auch teilweise prozessierte Formen (Homodimer, Molekulargewicht ~16 kDa) von SP-B.

Der Primäantikörper wurde im Verhältnis 1:10.000 ebenfalls in Blockpufferlösung verdünnt und die Membranen damit über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils fünf Minuten in Tris-gepufferter Natriumchloridlösung gewaschen und eine Sekundäantikörperlösung angesetzt. Hierzu wurde Meerrettichperoxidase (Horseradishperoxidase, HRP)-konjugiertes Ziege anti-Kaninchen Immunglobulin (Calbiochem, USA) in einer Verdünnung von 1:4.000

ebenfalls in Tris-gepufferte Natriumchloridlösung (ohne Zusatz von Magermilchpulver) gegeben. Die Inkubation der Membran erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran wiederum fünfmal für insgesamt 10 Minuten in Tris-gepuffelter Natriumchloridlösung gewaschen. Das zur Entwicklung des Immunoblots verwendete Chemilumineszenzsubstrat (Amersham, USA) wurde jeweils frisch angesetzt. Die Darstellung erfolgte mit dem Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (Fujifilm, Japan). Das Experiment wurde dreifach wiederholt.

## **2.4 Histologische Untersuchung des Lungengewebes**

### **2.4.1 Erstellung von Paraffinschnitten**

Da das Stadium der Lungenreifung bekanntermaßen zwischen den einzelnen Regionen der Lunge variiert <sup>(Kendall 1990)</sup>, wurden alle histologischen Untersuchungen an Gewebepreparaten des jeweiligen rechten Oberlappens durchgeführt.

Der rechte Oberlappen des Versuchstieres wurde in Inflation bei einem Druck von 30 cm H<sub>2</sub>O mit 4% Formalin fixiert. Anschließend wurden die Proben in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom (HN 40, Leica, Deutschland) wurden Paraffingewebeschnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt und auf silanisierte Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden anschließend bis zur weiteren Färbung im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

### **2.4.2 Entparaffinieren und Hydratisieren sowie Dehydrieren und Eindecken der Gewebeschnitte**

Vor jeder der folgenden Färbungen mussten die Gewebeschnitte entparaffiniert werden. Hierzu wurden die Objektträger 20 Minuten in 100% Xylol eingestellt. Anschließend wurden die Objektträger durch Schwenken in einer absteigenden Alkoholreihe von 100% Ethanol bis zu reinem destillierten Wasser hydratisiert. Jetzt konnte mit dem Protokoll der jeweiligen Färbemethode begonnen werden.

Nach erfolgreicher Färbung wurden die Objektträger in umgekehrter Reihenfolge durch Schwenken in einer aufsteigenden Alkoholreihe beginnend mit reinem destillierten

Wasser bis 100% Ethanol dehydriert, dann in 100% Xylol eingestellt und mit Vitro-Clud (Langenbrinck, Deutschland) eingedeckt.

### **2.4.3 Hämalaun/Eosin-Färbung**

Die Gewebeschnitte wurden entparaffiniert und hydratisiert. Durch Lösen von 1,0 g Eosin (K26704735, Merck) in 1000 ml destilliertem Wasser entstand die sofort gebrauchsfertige Lösung. Hämalaun besteht aus 500 ml destilliertem Wasser mit 1,0 g Hämatoxylin (3816, Roth), 0,2 g Natriumjodat ( $\text{NaJO}_3$ , 6525, Merck), 50,0 g Kaliumaluminiumsulfat (8896.1, Roth), 50,0 g Chloralhydrat (2425, Merck) und 1,0 g Citronensäuremonohydrat (1.00244.1000, Merck). Die Objektträger wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur in Hämalaun eingestellt und anschließend 3 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte weitere 3 Minuten in Eosin eingestellt und wiederum 3 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Anschließend wurden die Gewebeschnitte dehydriert und eingedeckt.

### **2.4.4 Färbung intrapulmonaler Elastinfasern**

Die Paraffinschnitte der jeweiligen Versuchstiere wurden durch eine modifizierte Elastinfärbung nach Hart <sup>(Hart 1908)</sup> gefärbt. Hierzu wurden die Objektträger zunächst wie beschrieben entparaffiniert und hydratisiert. Die Objektträger wurden anschließend 20 Minuten im Brutschrank bei 60 °C in eine Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert (2E 030, Chroma) eingestellt. Danach wurden die Objektträger 10 Minuten bei Raumtemperatur unter fließendem Leitungswasser gespült. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte 3 Minuten in eine Tartrazin-Lösung, bestehend aus 400 ml destilliertem Wasser, 1 ml Essigsäure (3738.1, Roth) und 1,0 g Tartrazin (1B 455, Chroma), eingestellt. Die Elastinfasern waren nun schwarz gefärbt, der Hintergrund stellte sich gelb dar. Die Objektträger wurden wie beschrieben dehydriert und eingedeckt.

## **2.4.5 Immunhistochemische Färbungen**

Immunhistochemische Färbungen beruhen auf Antigen-Antikörper-Reaktionen, bei denen das gesuchte Protein durch einen für dieses Protein spezifischen primären Antikörper erkannt und gebunden wird. An diesen primären Antikörper bindet ein sekundärer Antikörper. Um die Antigen-Antikörper-Reaktionen sichtbar zu machen, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die sich jeweils unterschiedlicher Markersubstanzen bei den sekundären Antikörpern bedienen. Letztendlich beruht die in dieser Arbeit angewandte Methode auf der Bindung eines Meerrettichperoxidase (HRP)-Komplexes an den sekundären Antikörper. Dieser katalysiert die chemische Umsetzung eines hinzugefügten Substrats, das hierdurch als Signal sichtbar gemacht werden kann. Bei dieser Methode kann die Erhebung und Auswertung der Ergebnisse unter dem Mikroskop ohne zusätzliche Filter im Durchlicht erfolgen.

### **2.4.5.1 Labelled Streptavidin Biotin (LSAB) Methode**

Die Labelled Streptavidin Biotin - Methode beruht auf der Verwendung von Biotin, das fest an den sekundären Antikörper gekoppelt ist. Dieser biotinmarkierte Sekundärantikörper bindet an den spezifischen Primärantikörper (Abbildung 26). Nun wird Streptavidin-Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase, HRP) hinzugefügt. Streptavidin ist ein Protein, das von *Streptomyces avidinii* produziert wird. Durch seine äußerst hohe Affinität zu Biotin entsteht eine starke Bindung zwischen Streptavidin und Biotin mit Komplexbildung. Anschließend wird 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zugesetzt, welches im Rahmen einer durch Meerrettichperoxidase enzymatisch katalysierten Reaktion mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oxidiert und eine bräunliche Färbung annimmt. Durch Zugabe von Cobalt wird die Färbung noch intensiver. Letztendlich entsteht ein äußerst stabiles, weder in Wasser noch in Alkohol lösliches Ausfallprodukt am Ort der Meerrettichperoxidase.

Die Gewebeschnitte wurden wie oben beschrieben entparaffiniert und hydratisiert. Anschließend wurden die Schnitte in einer Mikrowelle (HF 12021, Siemens, Deutschland) für insgesamt 15 Minuten bei 800 Watt in Citratpuffer bei pH 6,0 vorbehandelt <sup>(Kim 2004)</sup>. Der Citratpuffer wurde angefertigt, indem auf einer geeichten Waage (Chyo MK-500c) 1,1 g Citronensäuremonohydrat (1.00244.1000, Merck,

Deutschland) gewogen und in 500 ml destilliertem Wasser gelöst wurden. Anschließend wurde unter Kontrolle mit einem pH-Meter (Cyberscan pH 510) durch Zugabe von 2 N Natriumhydroxid-Lösung (NaOH) ein pH-Wert von 6,0 eingestellt. Nach zwanzigminütigem Abkühlen und anschließendem Spülen mit destilliertem Wasser wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch Inkubation mit Wasserstoffperoxid geblockt. Hierzu wurden die Objektträger bei Raumtemperatur 10 Minuten in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.07209.0250, Merck, Deutschland) in Methanol (8045, J.T. Baker) gestellt. Anschließend wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült. Danach wurden die Schnitte für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 5% Ziegennormalserum (Goat Serum (Normal) X0907, Dako Cytomation, Deutschland) und 1% Rinderserumalbumin (BSA, A7638, Sigma) in Antikörper Diluent (S3022, Dako Cytomation, Deutschland) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper zu blocken. Das

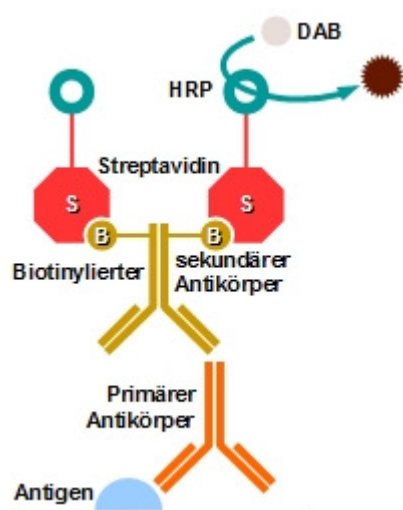


Abbildung 26: Schema einer immunhistochemischen Färbung mittels der LSAB-Methode

Ziegennormalserum wurde anschließend nur abgekippt, es folgte kein weiterer Waschschrift.

Nun folgte die Inkubation mit dem jeweiligen ebenfalls in Antikörper Diluent verdünnten primären Antikörper. Immunhistochemische Färbungen wurden durchgeführt mit primären Antikörpern gegen Ki-67, SP-B und pro-SP-B, STAT-3 und phosphoryliertes STAT-3. Die Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Gewebeschnitte wurden anschließend mehrfach mit Phosphatpuffer (PBS, Phosphate Buffered Saline, BR0014G, Dulbecco) gespült.

Die Präparate wurden nun mit dem biotinmarkierten Sekundärantikörper bedeckt (LSAB2 System, K0675, Dako Cytomation, Deutschland) und weitere 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte erneut mehrfach mit Phosphatpuffer gespült. Nun wurden die Präparate mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat (LSAB2 System, K0675, Dako Cytomation, Deutschland) bedeckt und wiederum 10 Minuten inkubiert. Wiederum wurden die Gewebeschnitte mehrfach mit PBS gespült.

Jetzt folgte die unter dem Mikroskop sichtbare Färbung durch zehnmünütige Reaktion mit Diaminobenzidin und Cobalt (DAB Substrate-Chromogen System, K3466, Dako Cytomation, Deutschland), wodurch die Antikörper-gebundenen Zellen braun gefärbt wurden. Der Färbeprozess wurde unter einem Lichtmikroskop überwacht. Die Gegenfärbung erfolgte durch einminütiges Eintauchen in Hämalaun und anschließendes dreiminütiges Spülen unter fließendem Leitungswasser. Hierdurch wurde der Hintergrund blau gefärbt. Die Objektträger wurden wie oben beschrieben dehydriert und eingedeckt.

Antikörper mit Katalognummer	Verdünnung	Inkubationszeit
Ki-67: #M7240	1 : 50	45 Minuten bei Raumtemperatur
STAT-3: #9139	1 : 500	über Nacht bei 4°C
p-STAT-3 (Ser727): #9134	1 : 150	über Nacht bei 4°C
p-STAT-3 (Tyr705): #9145	1 : 300	über Nacht bei 4°C
SP-B / pro-SP-B	1 : 1000	über Nacht bei 4°C

*Tabelle 5: Auflistung der in der Immunhistochemie verwendeten primären Antikörper mit der jeweiligen Verdünnung und Inkubationszeit. Der Antikörper gegen das Ki-67-Antigen wurde von Dako (Hamburg, Deutschland) erworben, die Antikörper gegen STAT-3 und dessen phosphorylierte Formen von Cell Signaling (Boston, USA). Der Antikörper gegen SP-B und pro-SP-B stammte von Dr. J.A. Whitsett (Division of Pulmonary Medicine, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Ohio, USA).*

#### **2.4.6 Auswertung der Färbungen**

Die Auswertung sowohl der konventionellen als auch der immunhistochemischen Färbungen fand mithilfe einer fünfstufigen semiquantitativen Skala statt <sup>(Kramer 2005)</sup>. Zwei unabhängige Untersucher, die die Zuordnung der Präparate nicht kannten, führten die Analyse bei Vergrößerungen von 25x, 50x und 100x unter dem Lichtmikroskop durch. Je Präparat wurden vier bis fünf Gewebesektionen aus unterschiedlichen Regionen sowohl qualitativ (Intensität der Färbung) als auch quantitativ (Anzahl der gesuchten Strukturen je Bildausschnitt) analysiert. Der Durchschnittswert der Ergebnisse wurde für jedes Präparat errechnet.



### **2.4.7 Beurteilung der Lungenmorphologie**

Die zu untersuchenden Paraffinschnitte wurden wie oben beschrieben mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Anhand dieser Färbungen wurden die Durchmesser der Alveolarwände mit repetitiven Messungen bestimmt.

Das hierzu angewandte Verfahren wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten eingesetzt (Kramer 2008). Die Lungenpräparate wurden in standardisierte Felder eingeteilt. Die zu analysierenden Felder wurden zufällig ausgewählt, Überschneidungen der Messbereiche wurden ausgeschlossen. In dem jeweils lichtmikroskopisch analysierten Bereich wurde eine maßstabsgetreue Linie exakt senkrecht zu der zu messenden Alveolarwand gezogen. In jedem der ausgewählten Felder wurden 5 Messungen durchgeführt. Der Durchschnittswert der Ergebnisse wurde für jede Lunge errechnet.

### **2.5 Statistische Auswertung**

Die Ergebnisse werden präsentiert als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) in den Abbildungen und als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) in den Tabellen. Vergleiche zwischen den Gruppen wurden durch die Analyse der Varianzen und Student-Newman-Keuls-Test zur post-hoc-Analyse erstellt. Signifikante Unterschiede wurden bei einem p-Wert  $< 0,05$  angenommen. Alle Berechnungen wurden mit der Software GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad Software, USA) durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vitalparameter nach LPS-Infusion

Die intrauterinen Vitalparameter des Feten wurden aufgezeichnet. Mit der Aufzeichnung wurde eine Stunde vor intravenöser Infusion der Lipopolysaccharid- oder Kochsalzlösung begonnen. Die Daten wurden bis zu einem Zeitpunkt 72 Stunden nach der Infusion festgehalten.

Direkt nach Lipopolysaccharidinfusion stieg der fetale mittlere arterielle Blutdruck auf  $51 \pm 3$  mmHg und erreichte damit eine Stunde nach Versuchsbeginn einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrolltieren (Abbildung 27). Anschließend fiel der Blutdruck kontinuierlich knapp unter den der Kontrolltiere und erreichte 72 Stunden nach LPS-Infusion seinen niedrigsten Wert mit  $34 \pm 5$  mmHg. Der mittlere arterielle Blutdruck der Kontrolltiere blieb hingegen nahezu konstant.

Drei Stunden nach Lipopolysaccharidinfusion stieg die fetale Herzfrequenz signifikant gegenüber der der Kontrolltiere und erreichte sechs Stunden nach Infusion ein Maximum mit  $224 \pm 11$  Schlägen pro Minute. Anschließend sank die fetale Herzfrequenz und erreichte 24 Stunden nach Infusion wieder das Niveau der Kontrolltiere. Entsprechend dem signifikanten Blutdruckabfall 72 Stunden nach LPS-Infusion stieg die fetale Herzfrequenz zu diesem Zeitpunkt wieder auf einen signifikant höheren Wert von  $193 \pm 14$  Schläge pro Minute. Die Herzfrequenz der Kontrolltiere hingegen schwankte kaum.

Drei Stunden nach LPS-Infusion sank die arterielle Sauerstoffsättigung und erreichte mit  $32,0 \pm 4,2$  % nach sechs Stunden ihren signifikanten Tiefstwert. Anschließend näherte sich die Sauerstoffsättigung wieder der der Kontrolltiere an, bis sie 72 Stunden nach Versuchsbeginn abermals auf einen signifikant niedrigeren Wert von  $38,8 \pm 9,2$  % fiel. Die arterielle Sauerstoffsättigung der Kontrolltiere blieb über den gesamten Versuchszeitraum konstant.

Anders als bei der arteriellen Sauerstoffsättigung war bei den arteriellen Gaspartialdrücken von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid kein Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den mit Lipopolysaccharid behandelten Tieren bemerkbar. Beide Werte bewegten sich während des Versuchszeitraums im normalen Bereich.

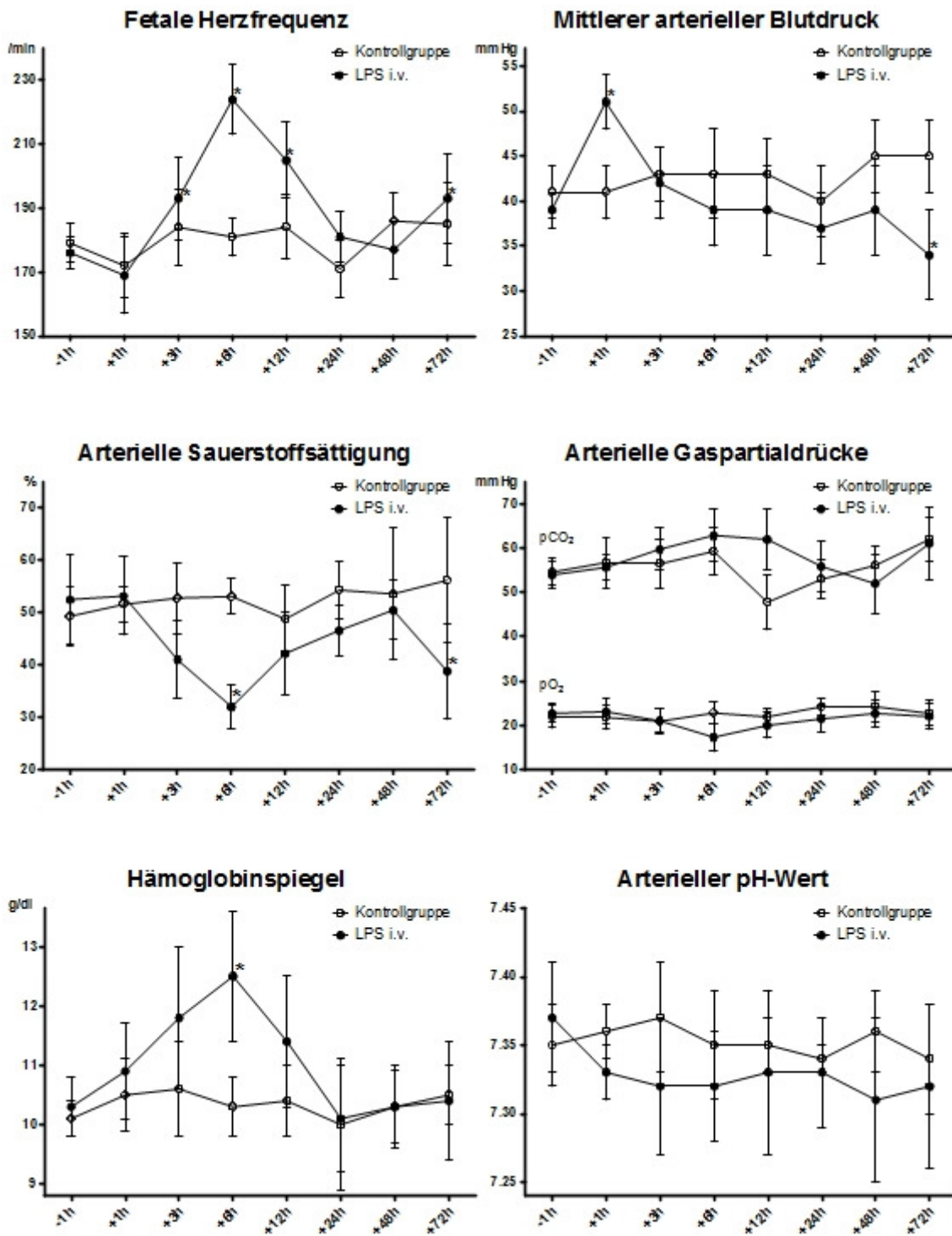


Abbildung 27: Intrauterin gemessene fetale Vitalparameter eine Stunde vor bis 72 Stunden nach Versuchsbeginn. Die Werte der Kontrolltiere veränderten sich kaum, während nach LPS-Infusion teilweise starke Veränderungen messbar waren (\*  $p < 0,01$  versus Kontrollgruppe). Modifiziert nach (Kramer 2009, Seehase 2011).

Der Hämoglobinspiegel der LPS-behandelten Tiere stieg nach der Infusion und erreichte sechs Stunden später mit einem Maximalwert von  $12,5 \pm 1,1$  mg / dL einen signifikant höheren Wert als den der Kontrolltiere. Anschließend fiel der Hämoglobinspiegel wieder, bis er sich 24 Stunden nach LPS-Infusion nicht mehr von dem der Kontrolltiere unterschied. Der Hämoglobinspiegel der Kontrolltiere hingegen blieb während des ganzen Versuchszeitraums unverändert.

Der arterielle pH-Wert war nach LPS-Infusion geringfügig niedriger als der der Kontrolltiere, unterschied sich jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant von diesem.

### 3.2 Geburtsgewicht der Versuchstiere

Nach der geplanten Geburt durch Sectio wurde zunächst das Geburtsgewicht der Feten bestimmt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Tabelle 6).

	113 Gestationstage	117 Gestationstage
Kochsalzlösung i.v.	$1843,3 \pm 265,6$ g	$1910,0 \pm 165,6$ g
Lipopolysaccharidlösung i.v.	$1877,1 \pm 75,4$ g	$1777,5 \pm 147,4$ g

*Tabelle 6: Fetales Körpergewicht nach Sectio. Zwischen den vier Gruppen bestand hinsichtlich des Körpergewichts kein signifikanter Unterschied.*

### 3.3 Pulmonale Compliance

Nachdem die fetale Lunge aus dem Thorax entfernt worden war, wurde die Compliance bestimmt. Das Lungengasvolumen wurde bei Drücken von 0, 5, 10, 20 und 40 cm H<sub>2</sub>O bestimmt. Das gemessene Lungengasvolumen wurde anschließend mit dem Körpergewicht des jeweiligen Versuchstieres korreliert, um miteinander vergleichbare Werte zu gewinnen.

Das Lungengasvolumen pro Kilogramm Körpergewicht war sieben Tage nach LPS-Infusion bei einem Druck von 5, 10, 20 und 40 cm Wassersäule signifikant erhöht. Mit einem maximalen Volumen von  $18,95 \pm 0,9$  ml bei 40 cm H<sub>2</sub>O war es gegenüber der Kontrollgruppe verdoppelt (Abbildung 28).

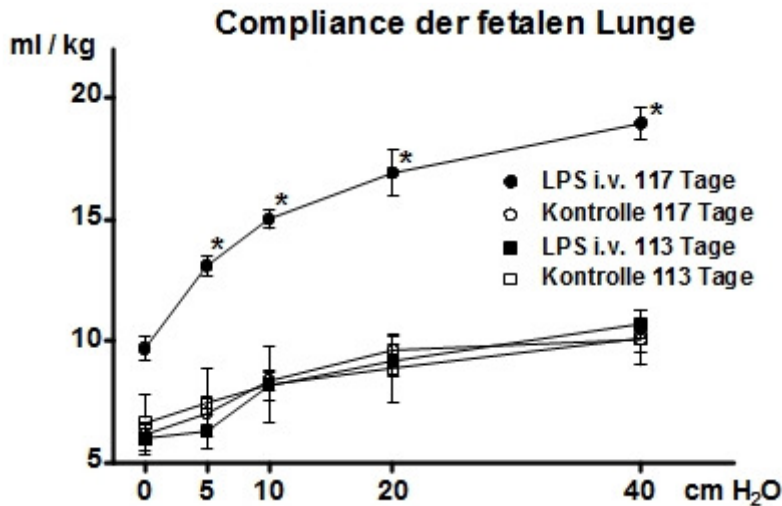


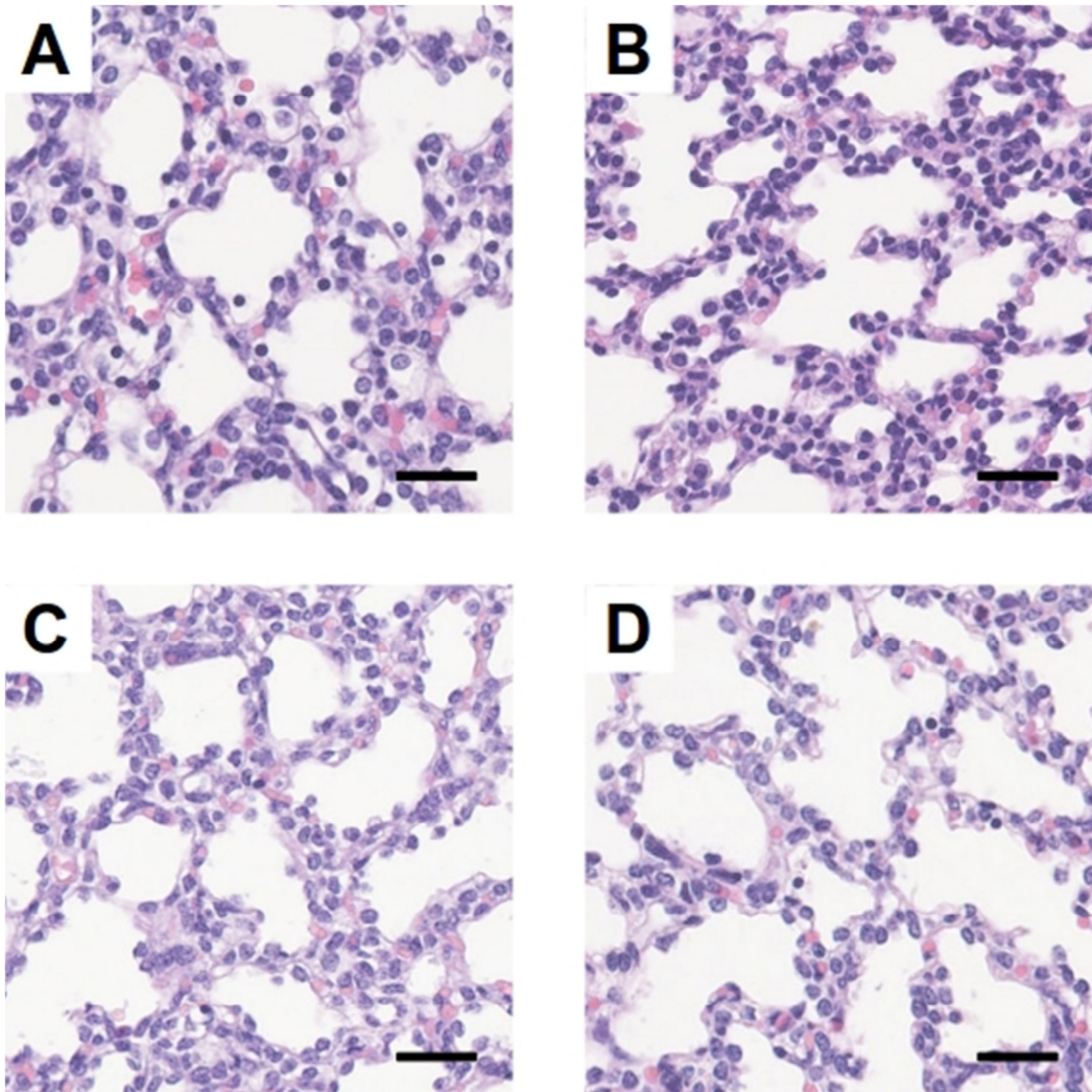
Abbildung 28:  
Compliance der fetalen Lunge. Das Gasvolumen verdoppelte sich sieben Tage nach intravenösem LPS (\* $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe). Drei Tage nach LPS i.v. war noch kein Unterschied messbar. Modifiziert nach <sup>(Kramer 2009)</sup>.

Die Kontrollgruppen unterschieden sich trotz des unterschiedlichen Schwangerschaftsalters von 113 Gestationstagen ( $10,1 \pm 1,1$  ml) und 117 Gestationstagen ( $10,1 \pm 0,5$  ml) nicht. Auch drei Tage nach LPS-Infusion war bezüglich des Lungengasvolumens bei den gemessenen Drücken kein Unterschied hinsichtlich der Compliance der fetalen Lunge zu den Kontrolltieren der beiden Gruppen messbar. Das maximale Lungengasvolumen dieser Tiere betrug bei einem Druck von 40 cm H<sub>2</sub>O  $10,7 \pm 0,6$  ml pro Kilogramm Körpergewicht.

### 3.4 Histologische Untersuchungen des Lungengewebes

#### 3.4.1 Morphologische Veränderungen

Die Auswertung der morphologischen Veränderungen des Lungengewebes erfolgte durch histologische Gewebeschnitte mit Hilfe einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Abbildung 29). In dieser Übersichtsfärbung stellten sich die Zellkerne blau dar, das Zytoplasma färbte sich rot an. Die beiden Kontrollgruppen zeigten trotz des unterschiedlichen Gestationsalters keinerlei morphologische Unterschiede. Es werden repräsentative Gewebeschnitte in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen gezeigt.



*Abbildung 29: Morphologische Veränderungen im Lungengewebe. Der Balken entspricht einer Länge von 25 µm. Die beiden Kontrollgruppen zeigten keine strukturellen Unterschiede. Drei (B) und sieben Tage (D) nach LPS-Infusion war der Durchmesser der Alveolarsepten verglichen mit dem der Kontrolltiere (A + C) geringer, wobei bei den Kontrolltieren kein signifikanter Unterschied zwischen einem Gestationsalter von 113 Tagen und 117 Tagen festgestellt wurde.*

Die morphologischen Veränderungen in der fetalen Lunge wurden semiquantitativ miteinander verglichen. Hierzu wurden für jedes Tier der Durchmesser der Alveolarwände in mehreren zufällig ausgewählten Gesichtfeldern bestimmt. Bei allen LPS-exponierten Tieren waren diese dünner als bei der zugehörigen Kontrollgruppe (Abbildung 29), was die für den Gasaustausch nötige Diffusion erleichtert.

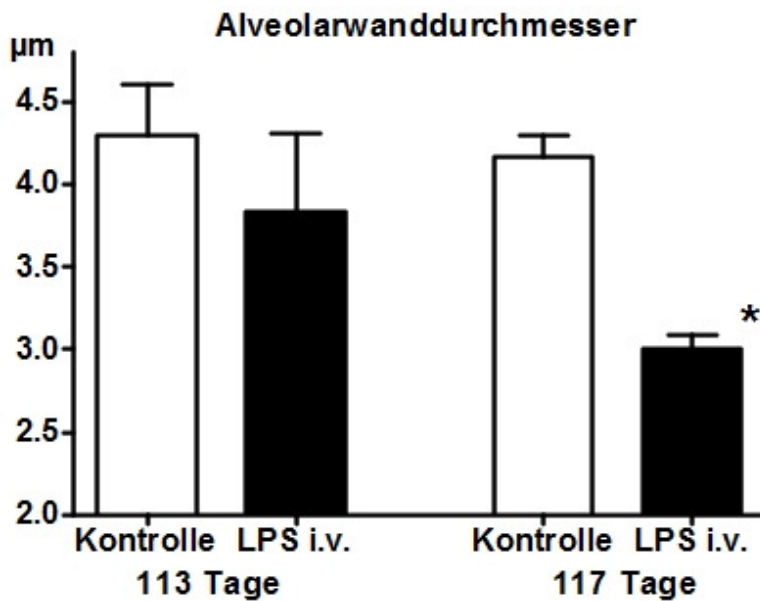
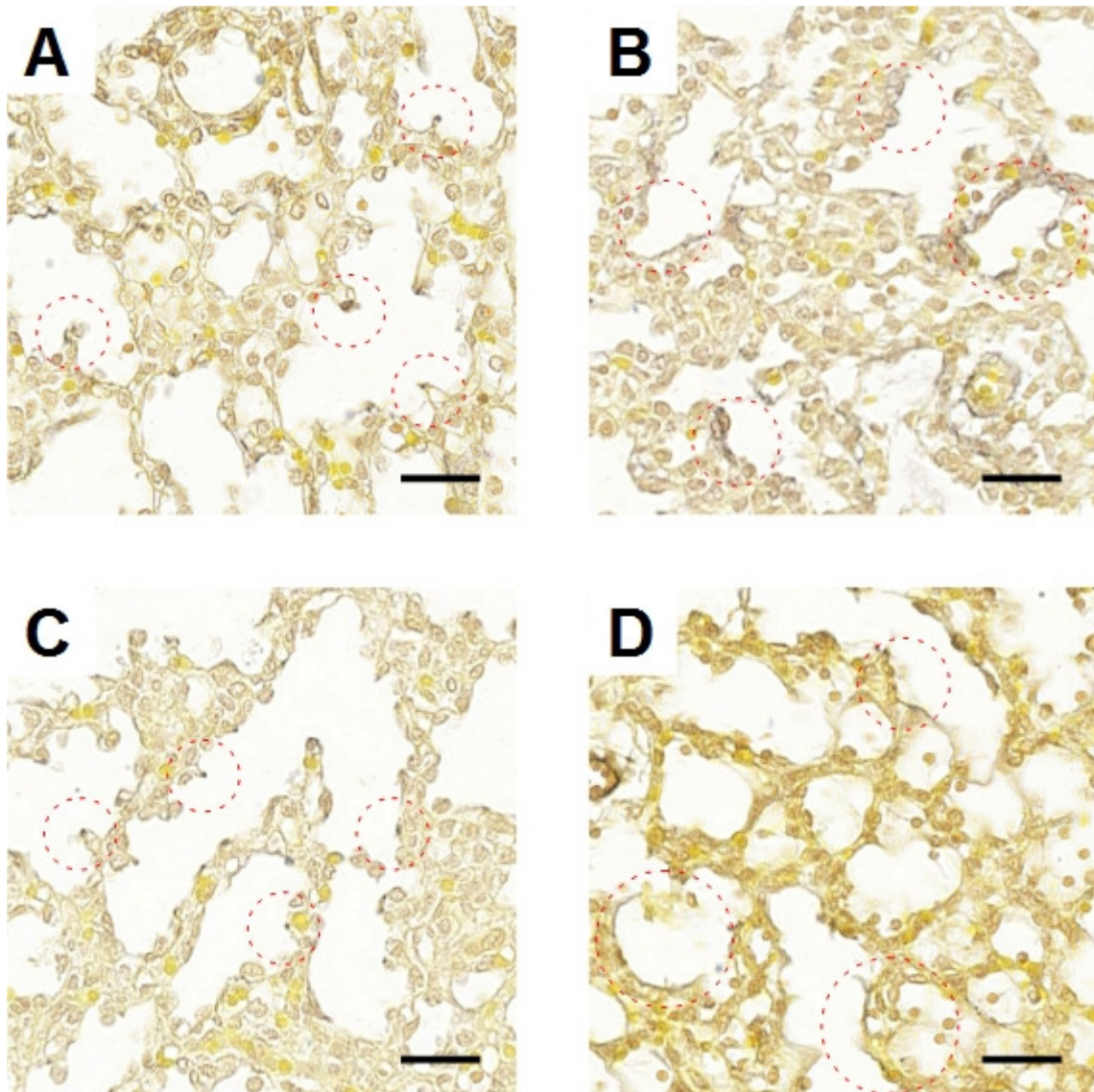


Abbildung 30:  
Alveolarwanddurchmesser  
im fetalen Lungengewebe.  
Drei Tage nach LPS i.v.  
war bereits eine  
tendenzielle  
Verschmälerung der  
Alveolarwand zu erahnen.  
Nach sieben Tagen war  
bereits eine signifikante  
Reduktion nachweisbar (\*  
 $p < 0,05$  versus  
Kontrollgruppe).  
Modifiziert nach (Kramer  
2009).

Die mittlere Alveolarwanddicke der 3-Tage-Kontrollgruppe ( $4,2 \mu\text{m} \pm 0,2 \mu\text{m}$ ) war verglichen mit der 7-Tage-Kontrollgruppe ( $4,1 \mu\text{m} \pm 0,2 \mu\text{m}$ ) nicht signifikant unterschiedlich. Die mittlere Wanddicke war drei Tage nach LPS-Infusion auf  $3,6 \mu\text{m} \pm 2 \mu\text{m}$  reduziert, sieben Tage nach LPS-Infusion betrug die mittlere Wanddicke nur noch  $3,2 \mu\text{m} \pm 0,1 \mu\text{m}$  und unterschied sich somit signifikant von der Kontrollgruppe (Abbildung 30).

### 3.4.2 Elastinverteilung

Zur Beurteilung der Verteilung der elastischen Fasern im fetalen Lungengewebe wurden histologische Schnitte mit einer modifizierten Resorcin-Fuchsin-Färbung gefärbt (Abbildung 31). Die elastischen Fasern stellten sich schwarz dar, während sich alle anderen Strukturen gelb färbten. Regulär verteiltes Elastin in den Spitzen der Alveolarsepten markiert den Entstehungsort neuer Alveolen, während sich ungeordnetes Elastin als langgezogene schwarze Fasern im Lungengewebe darstellt. Es werden repräsentative Präparate aller vier Versuchsgruppen gezeigt.



*Abbildung 31: Elastinverteilung im fetalen Lungengewebe. Der Balken entspricht einer Länge von 25 µm. Die roten Kreise markieren das sich unterschiedlich dastellende Elastin. Bei beiden Kontrollgruppen (A+C) war vorwiegend eine reguläre, komprimierte Anordnung der Elastinfasern in den Spitzen der sekundären Septen zu finden. Hingegen waren sowohl drei (B) als auch sieben (D) Tage nach intravenösem LPS verstärkt langgezogene Elastinfasern entlang des Alveolarepithels nachweisbar.*

Es fand sich sowohl konzentriertes, regulär verteiltes, als auch ungeordnetes, ausgebreitetes Elastin (Abbildung 31). Die Verteilung der Elastinfasern war nach LPS-Infusion verändert. Elastin war in beiden Kontrollgruppen hauptsächlich im distalen Bereich der Spitzen der sekundären Septen lokalisiert, an denen sich künftige Alveolen formen. Zusätzlich konnte Elastin in der Wand kleiner Blutgefäße detektiert werden.



Hingegen waren die elastischen Fasern im Lungengewebe der mit LPS behandelten Tiere nicht konzentriert, sondern verteilt entlang der Wand der verkümmerten Alveolarsepten. Der Anteil an regulär verteiltem Elastin wurde mikroskopisch semiquantitativ bestimmt, indem mehrere zufällig ausgewählte Gesichtsfelder ausgewertet wurden.

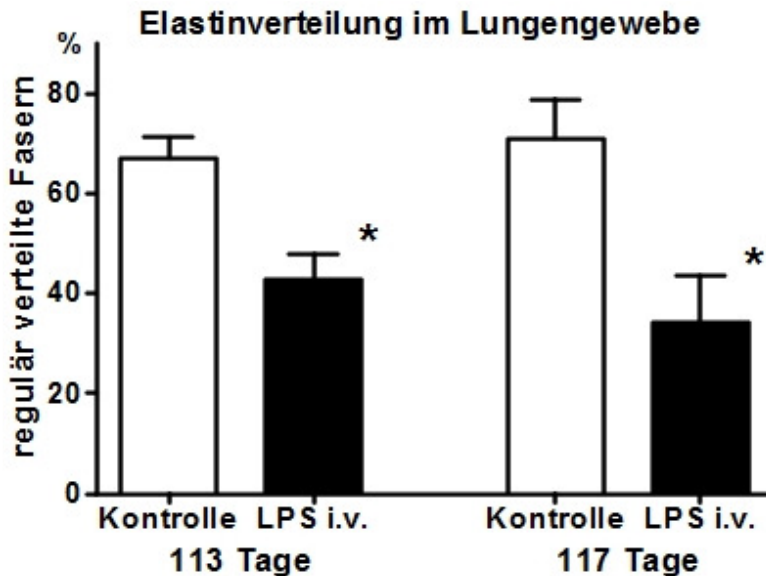
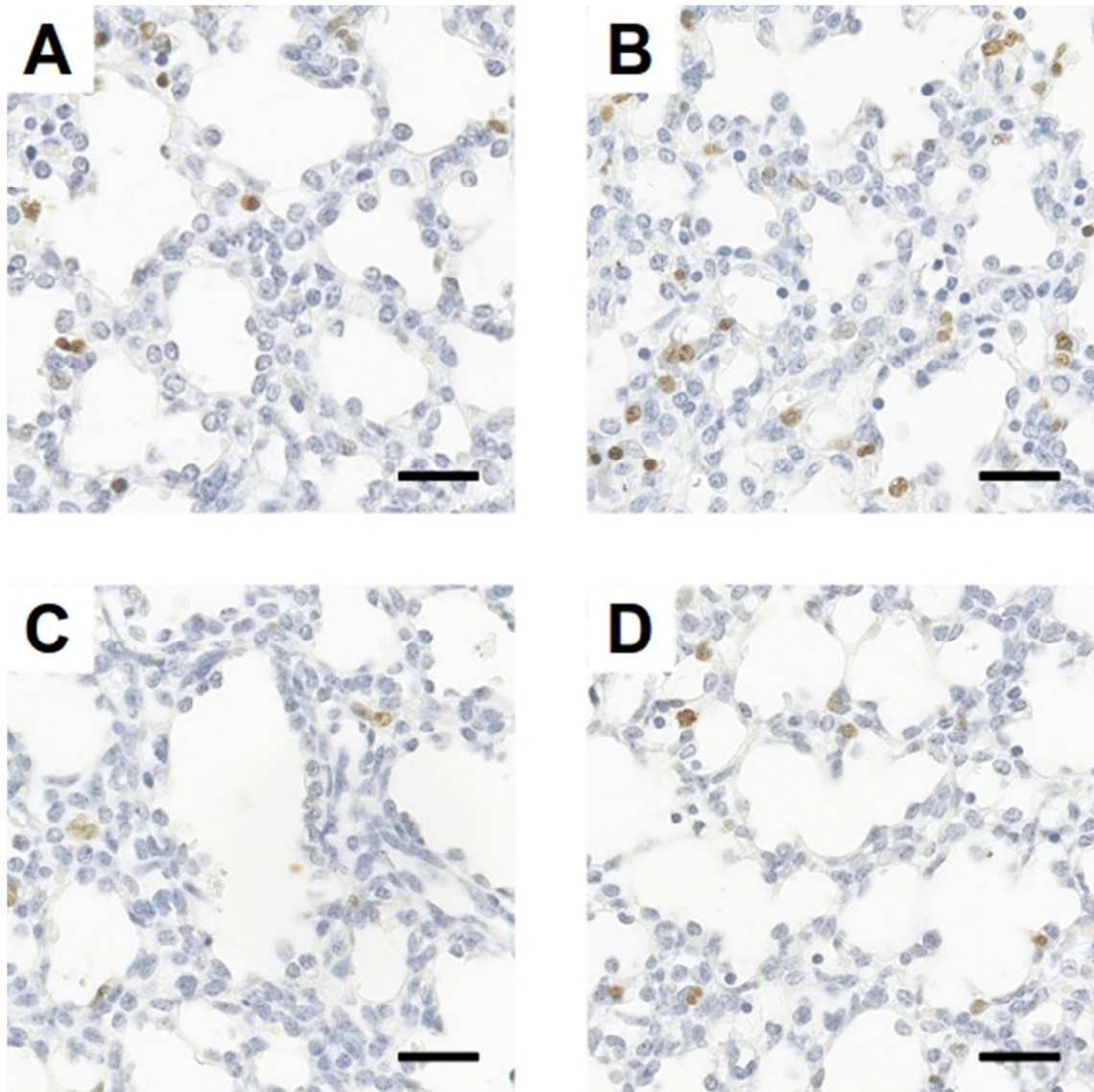


Abbildung 32: Regulär verteiltes Elastin im fetalen Lungengewebe. Der Anteil der normal verteilten Elastinfasern in den Spitzen der sekundären Septen war nach LPS-Infusion in beiden Gruppen signifikant vermindert (\*  $p < 0.05$  versus Kontrollgruppe). Modifiziert nach (Kramer 2009).

Die Analyse der Verteilung der Elastinfasern in der Lunge LPS-exponierter Tiere zeigt sowohl nach drei als auch nach sieben Tagen eine signifikant verminderte Deposition regulärer Elastinfasern in den Alveolarsepten (Abbildung 32). Hingegen bestand zwischen den beiden Kontrollgruppen kein Unterschied. Ebenfalls war zwischen beiden LPS-Gruppen kein signifikanter Unterschied feststellbar.

### 3.4.3 Zellproliferation

Die Proliferation des Lungengewebes wurde anhand des Ki-67-Antigens bestimmt (Abbildung 33). Dieses Antigen wird während der Zellproliferation exprimiert. Es werden Zellen in der G1, S, G2 und M-Phase des Zellzyklus gefärbt, jedoch nicht während der G0-Phase. Dadurch konnten alle Zellen, die sich im Proliferationszyklus befanden, identifiziert werden.



*Abbildung 33: Zellproliferation im Lungengewebe. Der Balken entspricht einer Länge von 25 µm. Durch den verwendeten Antikörper werden alle Zellen gefärbt, die sich nicht in der G0-Phase befinden. Gezeigt werden repräsentative Schnitte der vier Gruppen. Drei Tage nach LPS-Infusion (B) ist eine deutlich stärkere Färbung mit mehr positiv gefärbten Zellen verglichen mit der zugehörigen Kontrolle (A) zu sehen. Sieben Tage nach LPS-Infusion (D) ist das Färbeverhalten nur noch leicht gesteigert gegenüber der zugehörigen Kontrolle (C).*

In den Gewebeschnitten der LPS-behandelten Tiere färbten sich verglichen mit der zugehörigen Kontrollgruppe mehr Zellkerne positiv an (Abbildung 33), was auf eine gesteigerte Zellproliferation nach LPS-Infusion schließen lässt. Um die Proliferationsrate im Lungengewebe der einzelnen Versuchstiere miteinander

vergleichen zu können, wurden die histologischen Präparate semiquantitativ beurteilt und mittels einer Fünfstufenskala eingeteilt, wobei ein größerer Wert eine vermehrte Proliferation bedeutete.

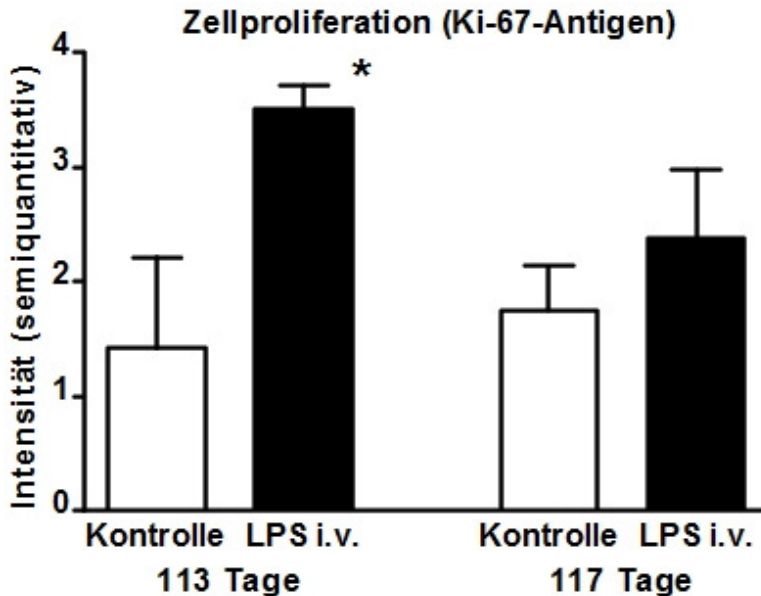


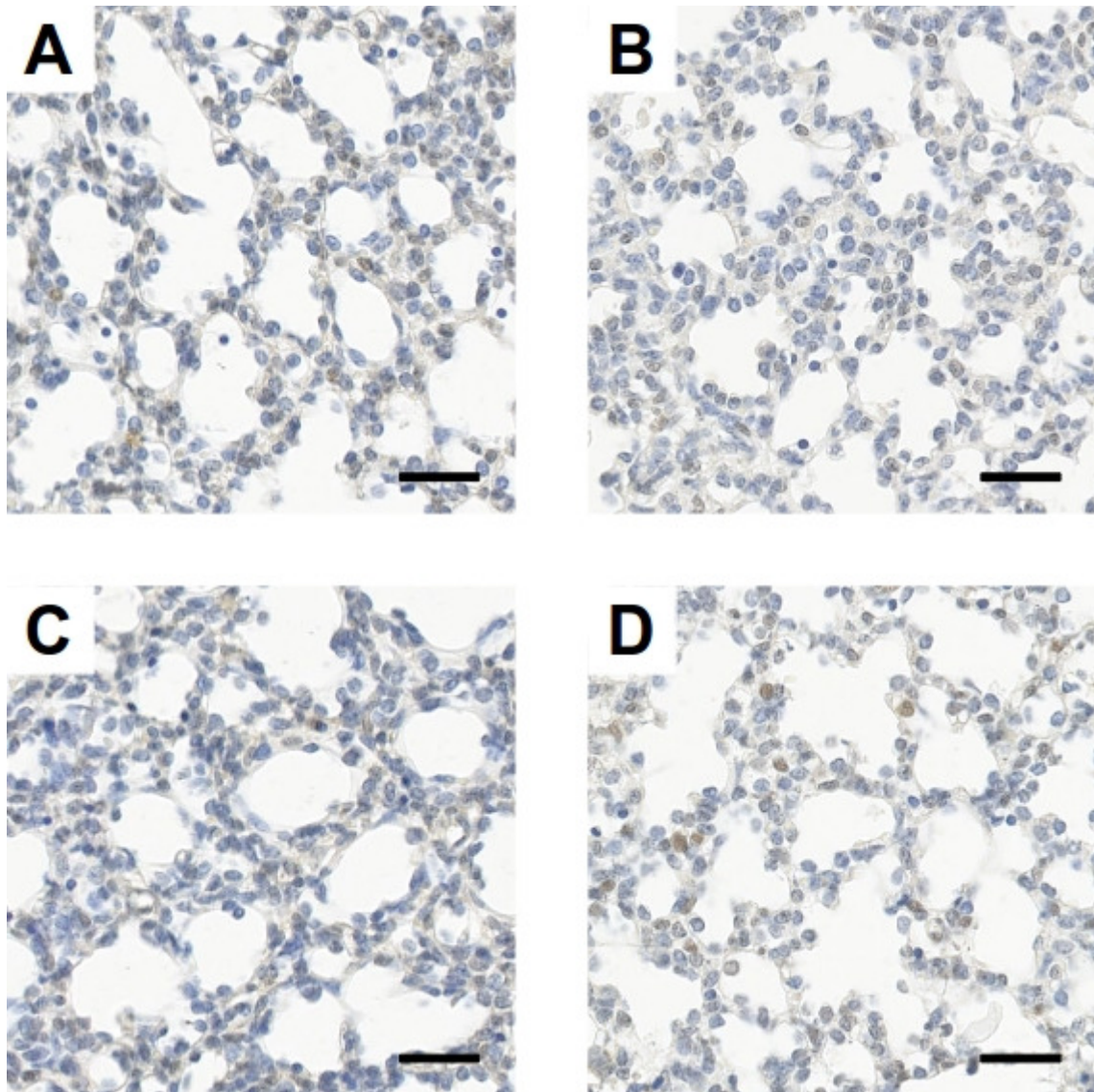
Abbildung 34:  
Semiquantitative Analyse der Zellproliferation im fetalen Lungengewebe. Drei Tage nach intravenös verabreichtem LPS bestand eine signifikante Vermehrung der Proliferation (\* $p < 0,05$  versus Kontrolle). Nach sieben Tagen war kein Unterschied nachweisbar. Modifiziert nach <sup>(Kramer 2009)</sup>.

Die Zellproliferation war drei Tage nach LPS-Infusion gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe stark gesteigert (Abbildung 34). Hingegen war die Zellproliferation sieben Tage nach LPS-Infusion verglichen mit der zugehörigen Kontrollgruppe nicht mehr signifikant erhöht.

### 3.4.4 Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-3

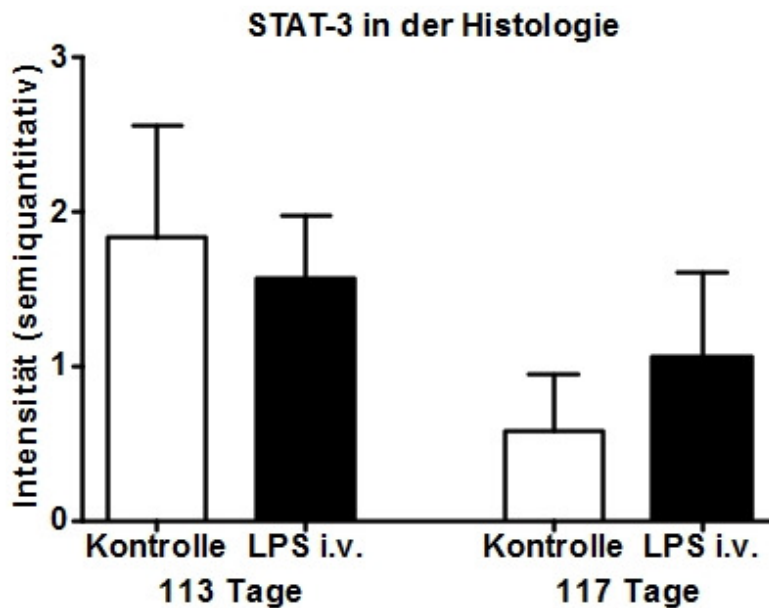
#### 3.4.4.1 STAT-3, unphosphoryliert

Histologische Schnitte des fetalen Lungengewebes wurden immunhistochemisch gegen die unphosphorylierte, nicht aktivierte Form von STAT-3 gefärbt (Abbildung 35). Die inaktive Form von STAT-3 liegt vor allem im Zytoplasma vor, weniger im Zellkern. Entsprechend färbte sich hauptsächlich das Zytoplasma an, vereinzelt auch Zellkerne. Gezeigt werden repräsentative Gewebeschnitte aller vier Versuchsgruppen.



*Abbildung 35: STAT-3 in der fetalen Lunge. Der Balken entspricht einer Länge von 25  $\mu\text{m}$ . Drei Tage nach intravenösem LPS (B) war keine Veränderung der Färbung verglichen mit der zugehörigen Kontrollgruppe nach 113 Schwangerschaftstagen (A) detektierbar. Auch sieben Tage nach LPS i.v. (D) war keine Veränderung der Färbung gegenüber der Kontrollgruppe nach 117 Schwangerschaftstagen (C) festzustellen.*

Die LPS-Infusion hatte keinen Einfluss auf das Vorkommen der unphosphorylierten Form von STAT-3 (Abbildung 35). Die Gewebeschnitte wurden mittels einer Vierstufenskala semiquantitativ analysiert und miteinander verglichen.

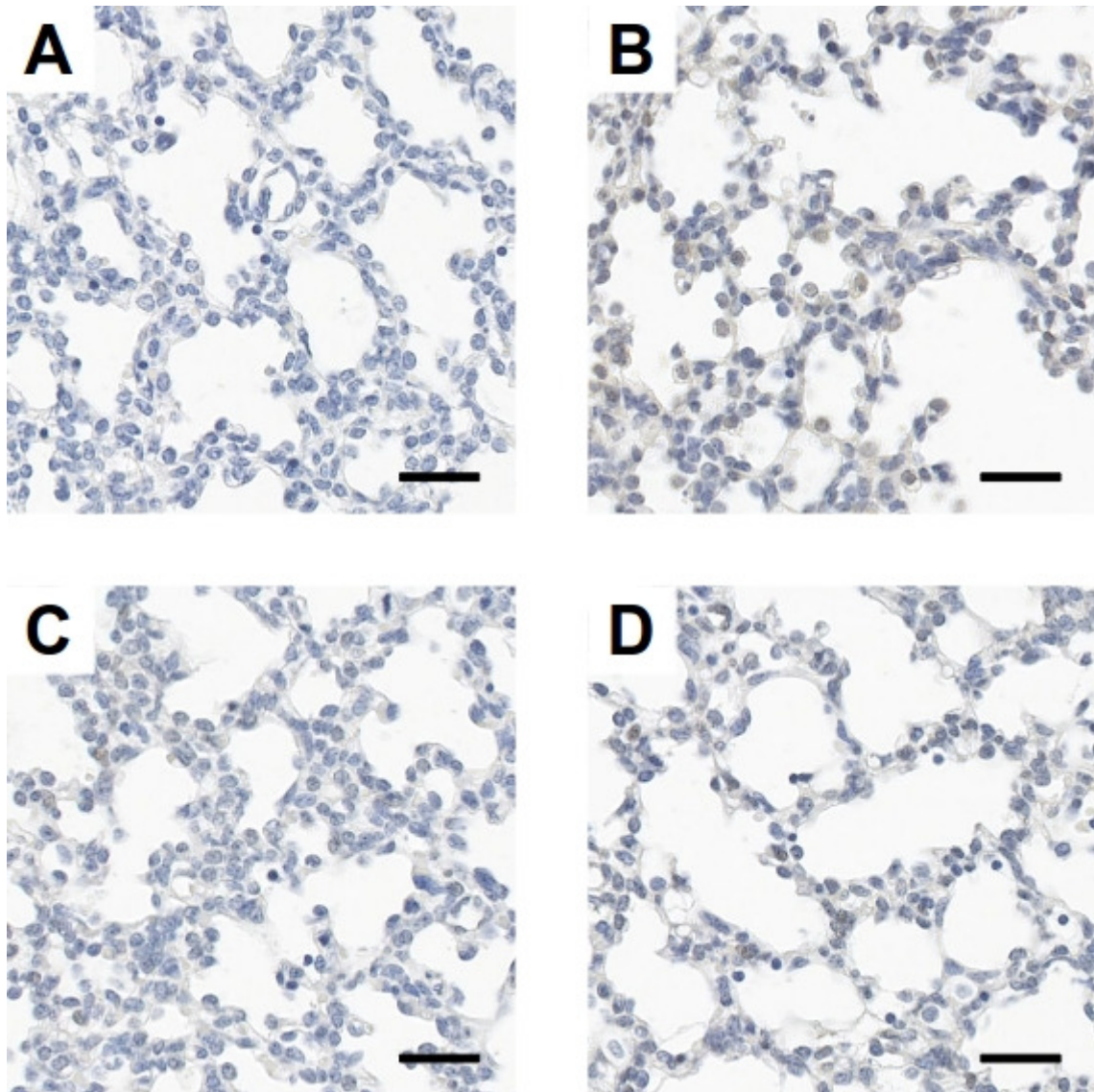


*Abbildung 36:  
Semi quantitative Analyse  
des STAT-3 im  
Lungengewebe. Zu keinem  
Zeitpunkt bestand ein  
signifikanter Unterschied  
( $p=0,531$ ).*

Die semiquantitative Analyse der immunhistochemischen Färbung zeigte nur einen tendenziellen Anstieg sieben Tage nach LPS-Infusion verglichen mit der zugehörigen Kontrollgruppe (Abbildung 36). Das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht.

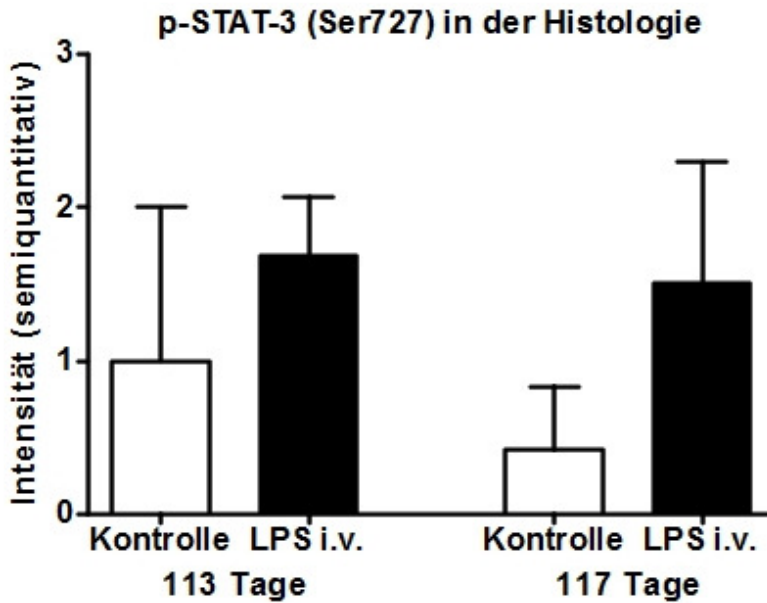
#### **3.4.4.2 Phospho-STAT-3 (Ser727)**

Histologische Schnitte des fetalen Lungengewebes wurden immunhistochemisch gegen die Ser727-phosphorylierte Form von STAT-3 gefärbt (Abbildung 37). Die inaktive Form von STAT-3 liegt vor allem im Zytoplasma vor und transloziert nach Aktivierung durch Phosphorylierung in den Zellkern. Entsprechend färbten sich das Zytoplasma schwach und die Zellkerne stärker positiv an. Gezeigt werden repräsentative Gewebeschnitte aller vier Versuchsgruppen.



*Abbildung 37: Ser727-phosphoryliertes STAT-3 in der fetalen Lunge. Der Balken entspricht einer Länge von 25 µm. Drei Tage nach intravenösem LPS (B) war eine Zunahme der Färbung der Zellkerne verglichen mit der zugehörigen Kontrollgruppe nach 113 Schwangerschaftstagen (A) detektierbar. Auch sieben Tage nach LPS i.v. (D) war eine deutlich vermehrte Färbung gegenüber der Kontrollgruppe nach 117 Schwangerschaftstagen (C) festzustellen.*

Nach LPS-Infusion war eine deutliche Zunahme an aktiviertem STAT-3 zu sehen (Abbildung 37). Die Gewebeschnitte wurden mittels einer Vierstufenskala semiquantitativ analysiert und miteinander verglichen.

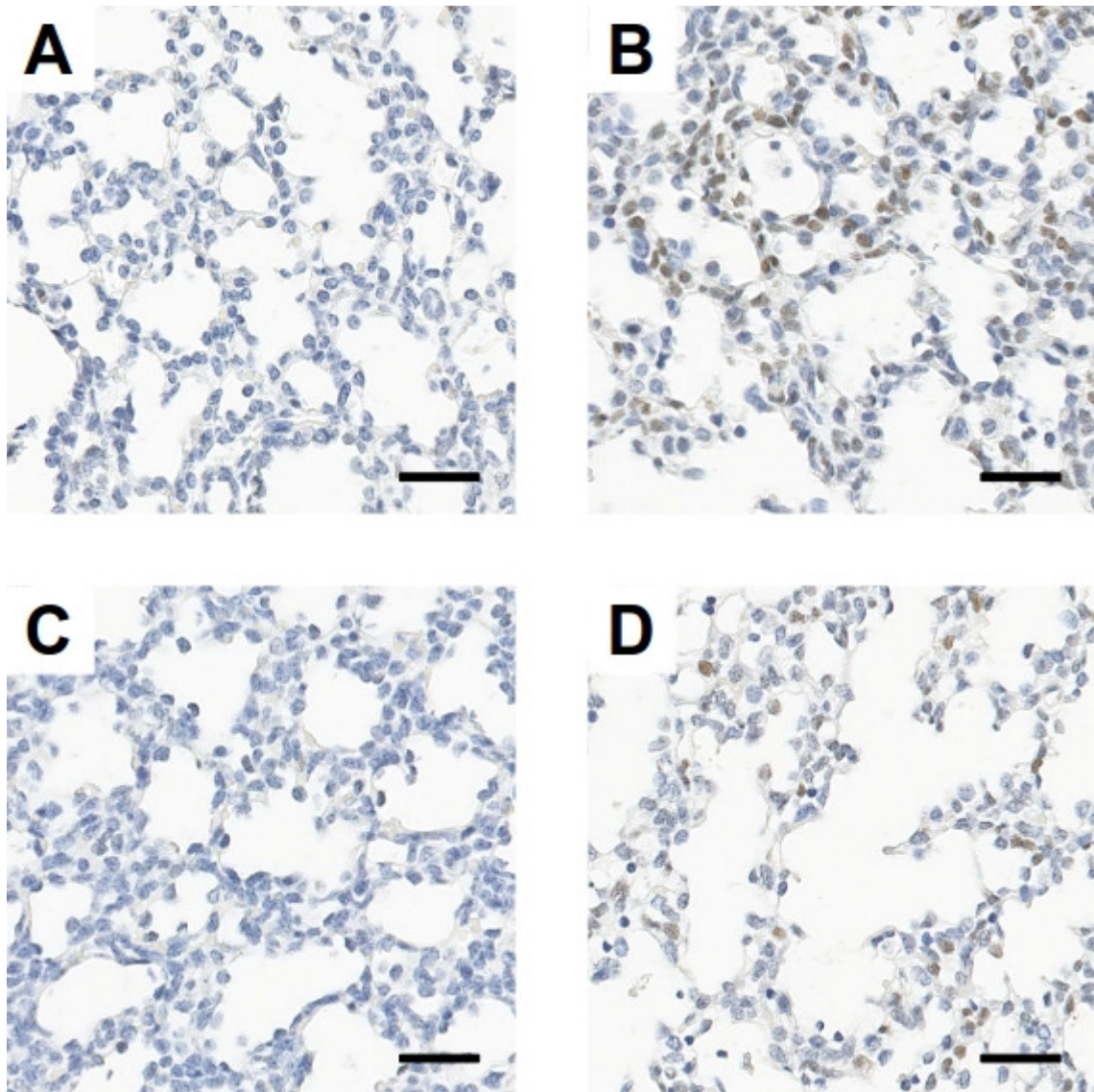


*Abbildung 38:  
Semiquantitative Analyse  
des Ser727-  
phosphorylierten STAT-3  
im Lungengewebe. Zu  
beiden Zeitpunkten nach  
intravenösem LPS war  
eine tendenzielle Zunahme  
positiver Zellen zu sehen,  
das Signifikanzniveau  
wurde aber nicht erreicht  
( $p=0,331$ ).*

Die semiquantitative Analyse der immunhistochemischen Färbung zeigte nur einen tendenziellen Anstieg nach LPS-Infusion verglichen mit der jeweils zugehörigen Kontrollgruppe (Abbildung 38). Das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht.

#### **3.4.4.3 Phospho-STAT-3 (Tyr705)**

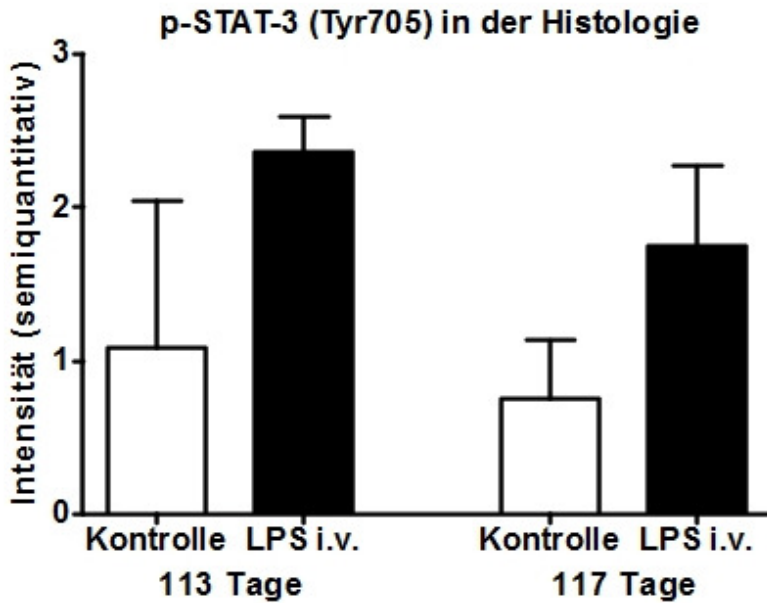
Histologische Schnitte des fetalen Lungengewebes wurden immunhistochemisch gegen die Tyr705-phosphorylierte, aktivierte Form von STAT-3 gefärbt (Abbildung 39). Nach Aktivierung erfolgt eine Translokation in den Zellkern. Entsprechend färbten sich das Zytoplasma schwach und die Zellkerne stärker positiv an. Gezeigt werden repräsentative Gewebeschnitte aller vier Versuchsgruppen.



*Abbildung 39: Tyr705-phosphoryliertes STAT-3 in der fetalen Lunge. Der Balken entspricht einer Länge von 25 µm. Drei Tage nach intravenösem LPS (B) war eine starke Zunahme der Färbung der Zellkerne verglichen mit der zugehörigen Kontrollgruppe nach 113 Schwangerschaftstagen (A) detektierbar. Auch sieben Tage nach LPS i.v. (D) war noch eine vermehrte Färbung gegenüber der Kontrollgruppe nach 117 Schwangerschaftstagen (C) festzustellen.*

Nach LPS-Infusion war eine Zunahme an aktiviertem STAT-3 zu sehen (Abbildung 39). Die Gewebeschnitte wurden mittels einer Vierstufenskala semiquantitativ analysiert und miteinander verglichen.





*Abbildung 40:  
Semiquantitative Analyse  
des Tyr705-  
phosphorylierten STAT-3  
im Lungengewebe. Nach  
intravenösem LPS war zu  
beiden Zeitpunkten eine  
Steigerung zu registrieren,  
das Signifikanzniveau  
wurde jedoch nicht  
erreicht ( $p=0,098$ ).*

Die semiquantitative Analyse der immunhistochemischen Färbung zeigte eine Zunahme von Tyr705-phosphoryliertem STAT-3 drei Tage nach LPS-Infusion, verglichen mit der zugehörigen Kontrollgruppe (Abbildung 40). Sieben Tage nach LPS-Infusion bestand ebenfalls noch eine vermehrte Zellfärbung. Das Signifikanzniveau wurde jedoch zu beiden Zeitpunkten nicht erreicht.

### **3.5 Auswertung der Bronchoalveolären Lavage**

#### **3.5.1 Gesamtproteinmenge**

Da im Rahmen einer Entzündungsreaktion die kapilläre Durchlässigkeit erhöht ist, wurde als Nachweis einer geschädigten kapillären Barriere im Lungengewebe und der damit verbundenen kapillären Leckage die Gesamtproteinmenge in der bronchoalveolären Lavage gemessen. Die Messwerte wurden zur Vergleichbarkeit auf das Körpergewicht des jeweiligen Versuchstieres bezogen.

Nach LPS-Infusion war die Gesamtproteinmenge in der BAL zu beiden Messzeitpunkten signifikant erhöht, was als eine kapilläre Leckage im Rahmen einer systemischen Entzündung gewertet wurde (Abbildung 41). Drei Tage nach LPS-Infusion war die Gesamtproteinmenge verglichen mit der zugehörigen Kontrollgruppe zweifach erhöht. Sieben Tage nach LPS-Infusion war die Gesamtproteinmenge sogar dreifach gegenüber der altersentsprechenden Kontrollgruppe erhöht.

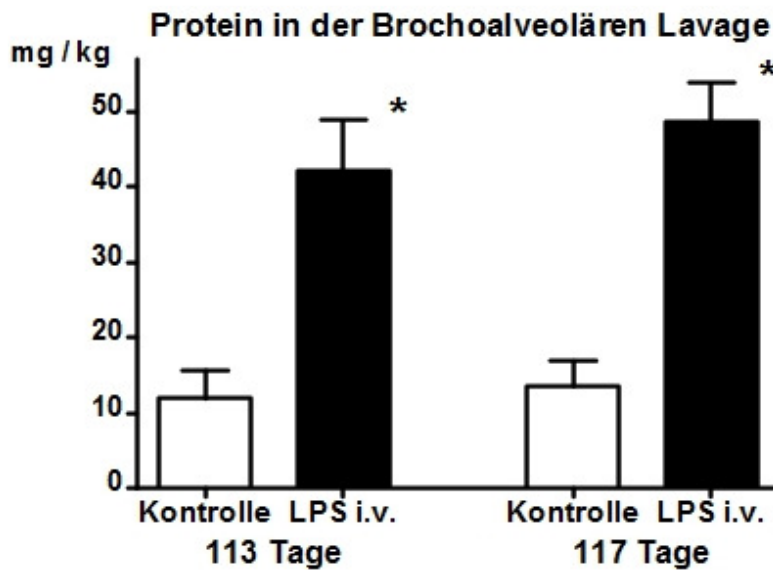


Abbildung 41: Gesamtproteinmenge in der BAL als Marker für eine kapilläre Leckage, bezogen auf das Körpergewicht. Zu beiden Messzeitpunkten war der Wert nach LPS-Infusion signifikant erhöht (\* $p < 0,05$  versus jeweiliger Kontrollgruppe). Modifiziert nach (Kramer 2009).

### 3.5.2 Interleukin-6

Um die Entzündung in der fetalen Lunge zu quantifizieren, wurde die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins Interleukin (IL)-6 in der BAL durch einen schafspezifischen ELISA gegen IL-6 bestimmt. Die gemessenen Werte wurden anschließend auf das jeweilige fetale Körpergewicht bezogen.

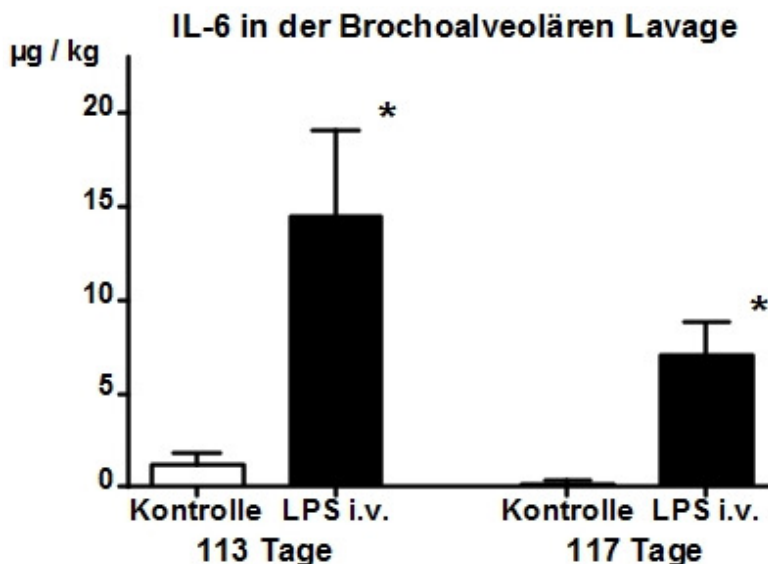


Abbildung 42: IL-6 in der BAL, bezogen auf das Körpergewicht. Zu beiden Messzeitpunkten nach LPS-Infusion waren die Werte signifikant erhöht (\* $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe). Modifiziert nach (Kramer 2009).

Die Konzentration von IL-6 war drei Tage nach LPS-Infusion verglichen mit den zugehörigen Kontrolltieren um ein Vielfaches erhöht (Abbildung 42), auch sieben Tage nach LPS-Infusion war die Konzentration noch erhöht. Zwischen den beiden Kontrollgruppen war hingegen kein signifikanter Unterschied messbar ( $p=0,18$ ).

## 3.6 Surfactantprotein (SP)-B

### 3.6.1 Nachweis von SP-B in der BAL

Die Prozessierung von Surfactantprotein-B wurde mittels Western Blot der bronchoalveolären Lavage analysiert (Abbildung 43) und die darin enthaltene Menge des Proteins berechnet (Abbildung 44).

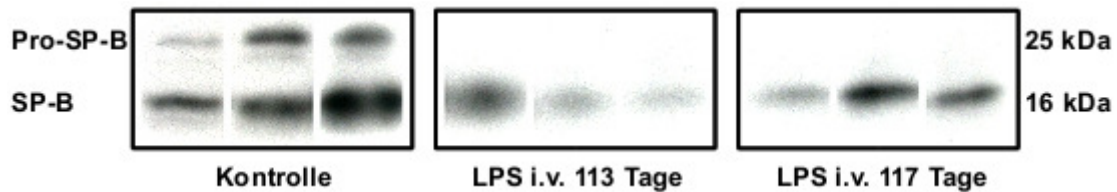


Abbildung 43: Surfactantprotein B in der BAL. Vollständig prozessiertes und Vorläufer-Surfactantprotein B in der BAL wurden mittels Western Blot detektiert. Pro-SP-B (Molekulargewicht ~25 kDa) war bei den Tieren beider Kontrollgruppen nach 113 und 117 Schwangerschaftstagen, jedoch nicht nach intraveösem LPS nachweisbar. Nach LPS i.v. war nur noch vollständig prozessiertes SP-B (Molekulargewicht ~16 kDa) zu finden. Modifiziert nach <sup>(Kramer 2009)</sup>.

Das teilweise prozessierte Vorläuferprotein von SP-B mit einem Molekulargewicht von ungefähr 25 kDa war sowohl in den Proben der 3-Tage-Kontrollgruppe als auch der 7-Tage-Kontrollgruppe nachweisbar. Drei Tage und auch sieben Tage nach LPS-Infusion lag SP-B ausschließlich vollständig prozessiert vor und lediglich das Homodimer mit einem Molekulargewicht von ungefähr 16 kDa konnte nachgewiesen werden. Anschließend wurde die Gesamtmenge an SP-B im Verhältnis zum Körpergewicht der Versuchstiere berechnet.

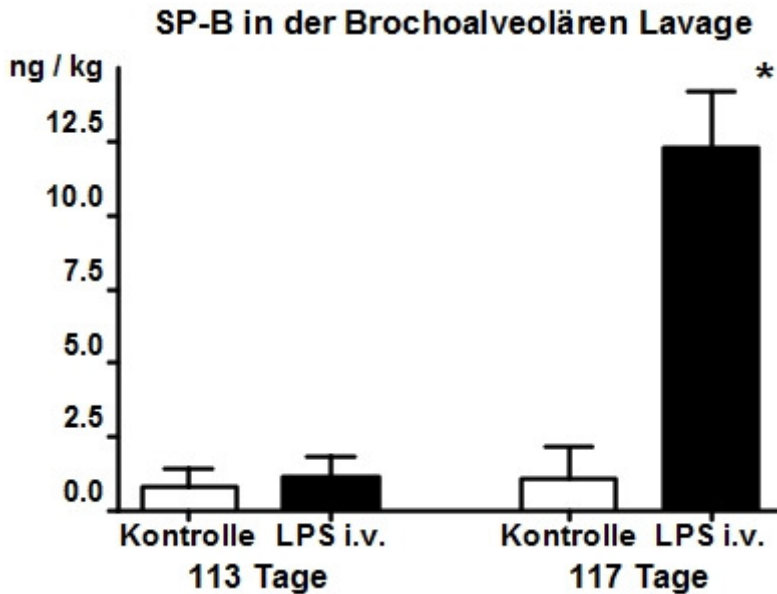


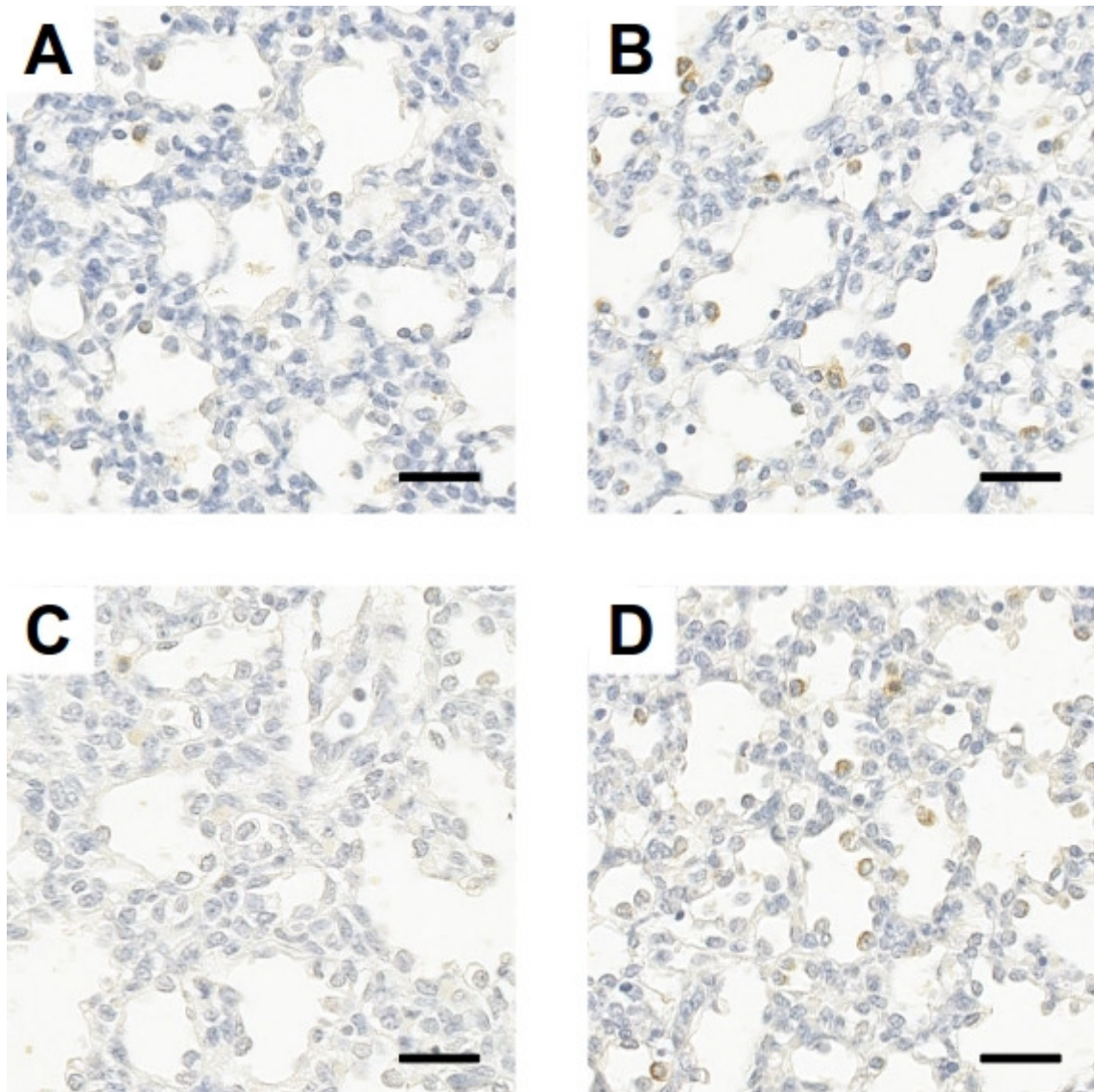
Abbildung 44:  
Quantifizierung von  
Surfactantprotein B in  
der BAL (\* $p < 0,05$   
versus Kontrollgruppe).  
Modifiziert nach <sup>(Kramer  
2009)</sup>.

Die Menge an SP-B in der BAL war sieben Tage nach LPS-Exposition gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abbildung 44). Hingegen war drei Tage nach LPS-Infusion noch kein signifikanter Anstieg des SP-B-Pools feststellbar.

### 3.6.2 Immunhistochemischer Nachweis von SP-B im Lungengewebe

Histologische Schnitte des fetalen Lungengewebes wurden immunhistochemisch gegen Surfactantprotein-B und dessen Vorläuferprotein pro-SP-B gefärbt. Es zeigte sich eine feingranuläre zytoplasmatische Färbung sowohl in Typ-2-Pneumozyten (Abbildung 45) als auch in Alveolarmakrophagen. Diese positive Färbung der Alveolarmakrophagen erklärt sich durch die Aufnahme von SP-B in diese Zellen durch Phagozytose <sup>(Whitsett 1995)</sup>.

Die histologischen Präparate wurden semiquantitativ analysiert, indem die Farbeintensität mehrerer zufällig ausgewählter Gesichtfelder mittels einer Fünfstufenskala eingeteilt und die Präparate anschließend miteinander verglichen wurden.



*Abbildung 45: Surfactantprotein B im Lungengewebe. Der Balken entspricht einer Länge von 25 µm. Drei Tage nach intravenösem LPS (B) waren Alveolar Typ II-Zellen im Vergleich mit der zugehörigen Kontrollgruppe nach 113 Schwangerschaftstagen (A) deutlich vermehrt gefärbt. Ebenso waren Alveolar Typ II-Zellen sieben Tage nach LPS i.v. (D) deutlich stärker gefärbt als bei der zugehörigen Kontrollgruppe nach 117 Schwangerschaftstagen (C).*

Bereits drei Tage nach intravenösem LPS war eine stark vermehrte immunhistochemische Färbung der Alveolar Typ II- Zellen feststellbar (Abbildung 46). Jedoch fand sich zu diesem Zeitpunkt noch keine Erhöhung der SP-B-Konzentration in der bronchoalveolären Lavage.

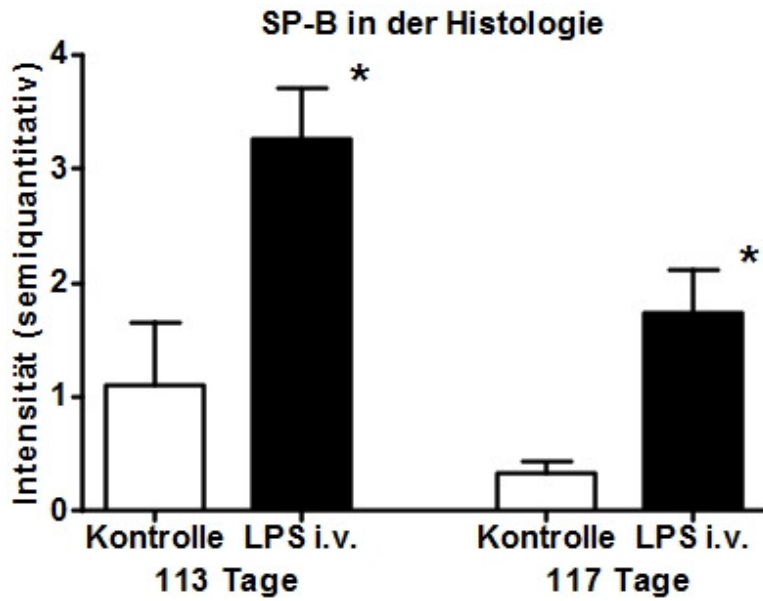


Abbildung 46:  
Semiquantitative Analyse  
von SP-B im  
Lungengewebe

. Zu beiden  
Messzeitpunkten war eine  
signifikante Zunahme der  
gefärbten Zellen  
nachweisbar (\* $p < 0,05$   
versus zugehöriger  
Kontrollgruppe).

Sieben Tage nach intravenösem LPS waren sowohl eine signifikant stärkere immunhistochemische Färbung der Alveolar Typ II- Zellen als auch eine deutlich gesteigerte Konzentration an SP-B in der BAL nachweisbar.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde die Rolle der systemischen Entzündungsreaktion des Feten in der Pathogenese der entzündungsassoziierten intrauterinen Lungenreifung untersucht. Es trat sowohl eine pulmonale Entzündung mit erhöhten IL-6-Konzentrationen als auch eine Simplifizierung der Alveolarsepten auf. Die intrauterine Exposition gegenüber intravenös verabreichtem LPS führte ferner zu einer Aktivierung von STAT-3 in der fetalen Lunge mit nachfolgender Zunahme von prozessiertem SP-B und gesteigerter Zellproliferation.

Bemerkenswerterweise war die ausschließlich intravaskuläre intrauterine Exposition gegenüber einem Entzündungsreiz ausreichend, die Lungenentwicklung zu beeinflussen. Der Zugangsweg des proinflammatorischen Stimulus erfolgte in der vorliegenden Studie über das Gefäßsystem. In vorhergehenden Studien wurde das Lipopolysaccharid in das Fruchtwasser injiziert und anschließend vom Feten aspiriert (Jobe 2000, Kramer 2011, Moss 2002). In diesen Studien erfolgte der Zugangsweg des Entzündungsreizes über die Alveolen des Feten.

In unserem Modell löste die intravenöse Applikation von Lipopolysaccharid innerhalb der ersten Stunden nach Infusion eine systemische intrauterine Inflammationsreaktion aus. Die fetalen Versuchstiere reagierten mit den typischen Symptomen schwerer Entzündungen, Tachykardie, Hypotension und Hypoxämie. Die intrauterin gemessenen Vitalparameter unterschieden sich 24 Stunden nach Versuchsbeginn nur noch geringfügig von denen der Kontrolltiere. Die durch einmalig intravenös appliziertes Lipopolysaccharid ausgelöste Reaktion des Vitalsystems erfolgt akut, jedoch nicht anhaltend. Jedoch scheinen während der fetalen Entwicklung durch einen einmaligen Entzündungsreiz zumindest im Lungengewebe Veränderungen einzutreten, die möglicherweise bleibende Auswirkungen haben. Andere Studien weisen darauf hin, dass ebenfalls in weiteren Organen, wie Gehirn, Milz, Leber und Darm, Veränderungen durch einen einmaligen Entzündungsreiz entstehen (Bieghs 2010, Kuypers 2012). Beispielsweise scheint die kurzfristige intrauterine Exposition gegenüber einer Chorioamnionitis einen negativen Effekt auf die Entwicklung des Darmes zu haben (Wolfs 2009). Es wurden auch Veränderungen des Thymus, der Leber, der Haut sowie systemische zelluläre

Reaktionen unterschiedlicher Art nachgewiesen <sup>(Kramer 2011)</sup>.

In unserem Modell wurde die Lungenentwicklung bereits innerhalb von drei Tagen negativ beeinflusst. Nach dieser Zeit waren strukturelle Veränderungen nachweisbar, wie die Umverteilung der Elastinfasern im Bereich zukünftiger Alveolen zeigt. Außerdem war innerhalb von 3 Tagen nach intrauteriner Exposition gegenüber der systemischen Entzündung eine kapilläre Leckage vorhanden. Die Gesamtproteinmenge in der BAL war gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Durch eine verminderte kapilläre Barriere treten vermehrt Proteine und weitere makromolekulare Bestandteile aus dem Blutplasma in den Alveolarraum aus. In unseren Versuchstieren entstand damit eine Schädigung der Barrierefunktion innerhalb von drei Tagen nach Beginn der intrauterinen Inflamationsreaktion. Möglicherweise erklärt sich auch der punktuelle Anstieg des Hämoglobinwertes bereits wenige Stunden nach LPS-Infusion durch eine systemische Flüssigkeitsumverteilung aufgrund einer generellen kapillären Leckage, auch außerhalb des untersuchten Lungengewebes. Diese Theorie geht jedoch über die Fragestellung der vorliegenden Arbeit hinaus.

In unserem Tiermodell entsteht nach systemischer LPS-Infusion eine pulmonale Inflamationsreaktion. Histologisch zeigt sich eine Inflammation durch Infiltration des Gewebes mit neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen <sup>(Gotsch 2007)</sup>. Eine Inflammation erfüllt drei wichtige Ziele: die Verbreitung von Zellen und Molekülen, um die Infektion einzudämmen, eine physikalische Barriere für die Infektion zu bilden und die Wiederherstellung geschädigten Gewebes zu fördern <sup>(Gotsch 2007)</sup>. Jedoch führt die intrauterine Entzündung in unserem Modell scheinbar nicht zu einer Restitutio ad Integrum, was das Ziel einer Inflamationsreaktion im Rahmen einer Gewebeschädigung beim Erwachsenen ist. Die Organe des Feten sind noch in der Entwicklung, ihre Funktionsfähigkeit nimmt im Schwangerschaftsverlauf erst nach und nach zu. Die Physiologie des Feten ist mit der eines Erwachsenen nicht vergleichbar. Prozesse, die zur Wiederherstellung eines funktionierenden Organismus des Erwachsenen dienen, sind in der fetalen Entwicklung nicht zielführend. Insbesondere die fetale Lunge ist kein Gewebe, dessen Integrität zur vollen Funktion lediglich wiederhergestellt werden muss. Sie ist ein noch wachsendes, sich differenzierendes



Organ. Die intravenöse Applikation von LPS greift maßgeblich in diesen Prozess ein und führt zu einer bleibenden Schädigung der fetalen Lunge mit einschneidenden strukturellen Veränderungen, die sich jedoch nicht nur an der verringerten kapillären Barrierefunktion zeigt. Die nachgewiesene Umverteilung der Elastinfasern im pulmonalen Gewebe weist auch auf eine strukturelle Schädigung der sich noch entwickelnden Lunge hin. Regulär angeordnete Elastinfasern markieren die Stelle zukünftiger Alveolarsepten und damit das Wachstum neuer Alveolen. Damit kommt Elastin eine entscheidende Bedeutung bei der Entwicklung einer funktionierenden Lunge zu. In unserem Modell führte der vorübergehende Anstieg der Zellproliferation nicht zu einer normalen Verteilung der Elastinfasern mit nachfolgender normaler Entwicklung. Hingegen führte die fetale Entzündungsreaktion zu einer Umverteilung des Elastins, wie sie bei einer bronchopulmonalen Dysplasie beschrieben ist <sup>(Bourbon 2005, Pierce 1997)</sup>. Die genaue Rolle des Elastins bei der Entwicklung einer BPD ist jedoch bislang nicht vollständig geklärt. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass die Inflammationsreaktion, die mit akuten und chronischen neonatalen Lungenerkrankungen einhergeht, die pulmonale Elastaseaktivität erhöht <sup>(Bland 2005)</sup>. Bei Neugeborenen, die im Verlauf eine BPD entwickelten, war ebenfalls eine erhöhte Elastaseaktivität nachweisbar <sup>(Groneck 1994, Merritt 1983)</sup>. Dies könnte eine Erklärung für die nachgewiesenen Abnormalitäten hinsichtlich der Verteilung und des Auftretens des pulmonalen Elastins im Rahmen einer BPD sein. Möglicherweise ist in unserem Modell einer intrauterinen Inflammation ebenfalls die pulmonale Elastaseaktivität erhöht, wodurch in gleicher Weise die nachgewiesene irreguläre Elastinverteilung und damit in der Folge die Ausbildung neuer Alveolen gestört sein könnte. Die Elastaseaktivität wurde jedoch im Rahmen dieser Studie nicht untersucht.

Neben einer Schädigung der Barrierefunktion und strukturellen Veränderungen wie der Umverteilung des intrapulmonalen Elastins durch die intrauterine Inflammation aufgrund des intravenös injizierten Lipopolysaccharids einerseits wurde andererseits zur gleichen Zeit eine zunehmende Lungenreifung nachgewiesen. Diese Lungenreifung ließ sich zum einen biochemisch anhand eines Anstiegs an vollständig prozessiertem Surfactantprotein-B sowohl im Lungengewebe als auch in der bronchoalveolären Lavage messen, zum anderen auch funktionell durch eine gesteigerte Compliance der

fetalen Lunge. Eine signifikante Zunahme der für SP-B positiv gefärbten Zellen im Lungengewebe war zu beiden Zeitpunkten nach LPS-Infusion nachweisbar, wobei die Steigerung jedoch nach drei Tagen deutlich größer als nach sieben Tagen war. In der bronchoalveolären Lavage hingegen konnte ein signifikanter Anstieg an SP-B erst nach sieben Tagen gefunden werden. Dieses Resultat kann als Indiz für eine gesteigerte SP-B-Produktion in den Alveolar Typ II - Zellen bereits drei Tage nach intravenösem LPS mit jedoch noch bevorstehender Sekretion in der Zeitspanne zwischen drei und sieben Tage nach LPS-Infusion gewertet werden. Eine funktionelle Verbesserung aufgrund der gesteigerten SP-B-Produktion ist erst nach Ausschüttung des SP-B in den Alveolarraum zu erwarten.

Die histologisch untersuchten strukturellen Veränderungen führten zu nachweisbar dünneren Alveolarsepten. Diese wiederum erleichtern den pulmonalen Gasaustausch. Der strukturelle Phänotyp mit gesteigerter Compliance und reduziertem Alveolarwanddurchmesser war ebenfalls erst sieben Tage nach intravenösem LPS nachweisbar. Diese Veränderungen imponieren als Lungenreifung und sind den Veränderungen nach intraamniotischer LPS-Gabe sehr ähnlich <sup>(Kramer 2011)</sup>.

Die Kinetik der Lungenreifung nach intravenös verabreichtem LPS unterschied sich nicht von der intraamniotischen Applikation <sup>(Kramer 2001)</sup>. Die nachgewiesene Lungenreifung zeigte sich nach sieben Tagen, jedoch noch nicht drei Tage nach LPS-Infusion. Nach einer intraamniotischen Injektion ist ebenfalls vor 7 Tagen keine Lungenreifung im Sinne einer Zunahme der Compliance oder einem Anstieg der SP-B Sekretion nachweisbar. Die experimentellen Daten der beiden Modelle legen die Vermutung nahe, dass die pulmonale Entzündungsreaktion sehr schnell aktiviert werden kann, jedoch die strukturellen Veränderungen, die als Lungenreifung imponieren, erst nach sieben Tagen eintreten.

Neben einer Funktion in der Lungenreifung mit Reduktion der Oberflächenspannung in der belüfteten Lunge kann der Anstieg von SP-B auch Ausdruck einer immunologischen Reaktion sein. In-vivo- und in-vitro-Studien haben die antiinflammatorischen Eigenschaften von SP-B und Phospholipiden gezeigt. SP-B kann eine Entzündung nach intratrachealer Endotoxininstillation limitieren <sup>(Epaud 2003, Ikegami 2005)</sup>. Es konnte gezeigt

werden, dass SP-B, SP-C und Phospholipide die Transkription von TNF- $\alpha$  in Monocyten reduzieren <sup>(Baur 1998, Speer 1991)</sup>. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Surfactantpräparate aus SP-B und Phospholipiden als Beitrag zur Beendigung einer Entzündung die Phagozytose apoptotischer Zellen steigern <sup>(Kramer 2003, Willems 2012)</sup>. Daher könnte die Zunahme des Surfactantpools in erster Linie antiinflammatorische Auswirkungen haben und könnte ein Mechanismus der fetalen Anpassung sein, was klinisch als Lungenreifung imponiert und dadurch die Anpassung und die Überlebenschance nach einer Frühgeburt optimiert <sup>(Kramer 2005)</sup>. Diese Hypothese geht jedoch über die Fragestellung in der vorliegenden Studie hinaus.

Das fetale Immunsystem ist von Anfang an in die entzündungsvermittelte Lungenreifung involviert <sup>(Kallapur 2007, Kallapur 2005, Kramer 2007)</sup>. Experimente wurden durchgeführt, im Rahmen derer durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren der Influx von neutrophilen Granulozyten verhindert wurde. In Abwesenheit dieser eutrophilen Granulozyten wurde die Lungenreifung nahezu vollständig unterdrückt <sup>(Kallapur 2005)</sup>, was eine essentielle Rolle dieser Zellen bei der entzündungsassoziierten pränatalen Lungenreifung nahelegt. Aus unserer Studie lässt sich schließen, dass eine systemische fetale Entzündungsreaktion ausreicht, um eine intrauterine Lungenreifung zu initiieren. Verglichen mit den Ergebnissen vorhergehender Arbeiten wird die Lungenreifung durch eine rein intravenöse Applikation des Lipopolysaccharids nicht schneller hervorgerufen als durch die intraamniotische Applikation <sup>(Kramer 2001)</sup>. Ein direkter Vergleich beider Applikationswege im Rahmen einer experimentellen Studie ist jedoch bislang ebenso wenig erfolgt wie die kombinierte Applikation von Lipopolysaccharid sowohl intraamniotisch als auch intrauterin.

Obwohl verschiedene LPS- und Endotoxinmodelle in der Sepsisforschung geläufig sind, kann bislang keines die genauen Umstände einer gramnegativen Sepsis des Menschen widerspiegeln <sup>(Bhatia 2009)</sup>. Jedoch existiert derzeit keine bessere Möglichkeit, eine systemische Entzündungsreaktion zu simulieren, ohne die unberechenbaren Auswirkungen einer Bakteriämie auf den Organismus in Kauf zu nehmen. In unserer Fragestellung ermöglicht eine rein intravenöse Infusion von Lipopolysaccharid die Begrenzung der Inflammation auf den Feten. Das Modell simuliert eine systemische

Entzündungsreaktion des Feten, wie sie auch beim Menschen im Rahmen einer Chorioamnionitis als „Fetal Inflammatory Response Syndrome“ (FIRS) vorkommen kann <sup>(Gantert 2010)</sup>. Das FIRS ist charakterisiert durch die Aktivierung des fetalen unspezifischen Immunsystems. Das FIRS ist ein unabhängiger Risikofaktor neonataler Komplikationen wie einem Atemnotsyndrom, einer Pneumonie, neonataler Sepsis, intraventrikulärer Blutung, periventrikulärer Leukomalazie oder nekrotisierender Enterokolitis <sup>(Gomez 1998)</sup>. Auch langfristige Schäden wie die Bronchopulmonale Dysplasie oder Hirnschäden treten assoziiert mit einem FIRS auf <sup>(Gotsch 2007, Kuypers 2012)</sup>. Das FIRS ist das Gegenstück zum SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) des Erwachsenen <sup>(Gomez 1998)</sup>, welches neben einer Sepsis die Haupttodesursache auf Intensivstationen ist <sup>(Bhatia 2009)</sup>. Die Definition des SIRS <sup>(Bone 1992)</sup> durch Änderung der Körpertemperatur, Tachykardie, gestörter Respiration und veränderter Leukozytenzahl kann jedoch auf die Situation des Feten nicht angewendet werden, da, abgesehen von der Herzfrequenz, die Vitalzeichen vor der Geburt nicht bestimmt werden können <sup>(Gotsch 2007)</sup>. Als Messparameter steht postnatal die Bestimmung von IL-6 sowohl im peripheren Blut als auch im Nabelschnurblut zur Verfügung. Daher stützt sich die Definition des FIRS auf den laborchemischen Nachweis dieses Zytokins und geht mit einer Erhöhung der Konzentration von Interleukin-6 über 11 pg/ml einher <sup>(Gomez 1998)</sup>. Passend zu dieser Definition und den vermuteten langfristigen Schäden nach einem FIRS ist bei einer aufgetretenen BPD die Konzentration von IL-6 im Nabelschnurblut perinatal erhöht <sup>(Yoon 1999)</sup>. Die Ergebnisse unserer tierexperimentellen Studie legen nahe, dass der IL-6-Signalweg in die Lungenschädigung und die anschließende Reparatur nach einer pränatalen Entzündung involviert ist. IL-6 ist ein wichtiger Mediator der Entzündungsreaktion, der seine Funktion unter anderem über den STAT-3-Signalweg ausübt <sup>(Zhong 1994)</sup>. STAT-3 wird sowohl eine inflammatorische als auch eine anti-inflammatorische Rolle zugeschrieben <sup>(Pfitzner 2004, Quinton 2008)</sup>. In Alveolarepithelzellen wird STAT-3 im Rahmen einer durch Verabreichung von LPS hervorgerufenen Inflammationsreaktion rasch durch Phosphorylierung an der Tyrosin 705-Bindungsstelle aktiviert <sup>(Severgnini 2004)</sup>. Eine vollständige STAT-3-vermittelte transkriptionelle Aktivität tritt auf, wenn zusätzlich eine Phosphorylierung an der Serin 727-Bindungsstelle erfolgt <sup>(Shen 2004)</sup>. In der durch uns durchgeführten Studie war im Lungengewebe nach

intravenöser LPS-Infusion eine Phosphorylierung sowohl an Tyrosin 705 als auch an Serin 727 immunhistochemisch nachweisbar, und damit eine maximale Aktivität von STAT-3. In den durchgeführten Experimenten war dieser Signalweg der akute-Phase-Reaktion sowohl nach 3 Tagen als auch noch 7 Tagen nach Initiierung der Inflammationsreaktion aktiviert. Die genaue Rolle der Serin-Phosphorylierung von STAT-3 ist jedoch bislang nicht geklärt <sup>(Decker 2000)</sup>. Eine Mutation der Serin 727-Phosphorylierungsstelle führte im Mausmodell zu einem frühen postnatalen Tod. Die Mutation hatte jedoch keinen Einfluss auf das Vorkommen von SP-B <sup>(Shen 2004)</sup>.

STAT-3 werden unterschiedliche Aufgaben zugesprochen, von denen die herausragendste sicher die Gewebeprotektion ist <sup>(Quinton 2008)</sup>. STAT-3 ist im Alveolarepithel notwendig, um eine Schädigung der Lunge im Rahmen einer Pneumonie durch *E. coli* zu verhindern <sup>(Quinton 2008)</sup>. In der Frühphase einer Infektion ist STAT-3 im Alveolarepithel für eine maximale Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten notwendig <sup>(Quinton 2008)</sup>. Im späteren Verlauf verhindert STAT-3 eine weitere Schädigung der Lunge <sup>(Quinton 2008)</sup>.

Eine weitere wichtige Rolle spielt STAT-3 bei der Surfactantproduktion <sup>(Yan 2002)</sup>. In Kulturen von H441-Zellen, einer Zelllinie mit Eigenschaften humaner Clara-Zellen, war eine STAT-3-abhängige Expression von SP-B-mRNA durch IL-6, insbesondere bei gleichzeitiger Inkubation mit Glukokortikoiden, nachweisbar <sup>(Ladenburger 2010)</sup>. Hierbei war unter Inkubation der Zellen mit Glukokortikoiden und IL-6, einer Konstellation wie sie bei drohender Frühgeburt und gleichzeitiger Chorioamnionitis in vergleichbarer Weise *in vivo* vorkommt, eine Steigerung der Expression von SP-B-mRNA nachweisbar. Diese ausgeprägte Steigerung war durch einen rein additiven Effekt beider Stimulantien nicht erklärbar. Eine Inhibition des IL-6 / STAT-3-Signalwegs (Abbildung 18) verhinderte diesen zuvor beobachteten Effekt <sup>(Ladenburger 2010)</sup>.

Nach intratrachealer Instillation von *E. coli* in Mauslungen ist eine Aktivität von STAT-3, gemessen an dem Gehalt von p-STAT-3 (Tyr705), bis zu 48 Stunden nachweisbar <sup>(Quinton 2008)</sup>. Entgegen diesen Ergebnissen reichte in der hier durchgeführten Studie eine einmalige Infusion von LPS aus, eine noch nach 7 Tagen nachweisbare Aktivität von STAT-3 auszulösen. Diese einmalige fetale Verabreichung von LPS in steriler

Umgebung reichte offensichtlich aus, eine über mehrere Tage anhaltende Entzündungsreaktion auszulösen. Auch in anderen experimentellen Modellen einer Chorioamnionitis bleibt die pulmonale Entzündungsreaktion über viele Tage bestehen (Kramer 2001, Newnham 2003). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass das fetale Immunsystem sowohl in der proinflammatorischen Achse als auch in der antiinflammatorischen Achse Defizite im Vergleich zur Funktion des erwachsenen Immunsystems aufweist (Gantert 2010, Kramer 2007). Daher sollte im Rahmen der weiterführenden Forschung die Rolle des fetalen Immunsystems in der Pathogenese fetaler Organschäden untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

Eine intrauterine Infektion ist eine ernstzunehmende Erkrankung mit möglicherweise schwerwiegenden Folgen für den Feten. Frühgeborene, die einer Chorioamnionitis ausgesetzt waren, haben jedoch eine geringere Mortalitätsrate <sup>(Costeloe 2000)</sup>. Eine pränatale pulmonale Inflammation geht einher mit einem verminderten Risiko eines Atemnotsyndroms, jedoch mit einem erhöhten Risiko einer bronchopulmonalen Dysplasie mit beeinträchtigter Alveolarisation <sup>(Jobe 2005)</sup>.

Vorhergehende experimentelle Arbeiten belegen die Initiierung einer Lungenreifung durch intraamniotisch verabreichtes Lipopolysaccharid <sup>(Kramer 2001)</sup>. Hierbei wurde durch Aspiration der Amnionflüssigkeit eine fetale pulmonale Inflammationsreaktion in Gang gesetzt.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit lautete, dass eine durch intravenös appliziertes Lipopolysaccharid induzierte fetale systemische Inflammation die intrauterine Lungenreifung ebenfalls beeinflusst.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche erfolgten an 21 fetalen Schafen beider Geschlechter in einem Gestationsalter von 107 Tagen. Alle Tiere wurden zunächst mit intrauterinen Kathetern versehen. Nach einer Erholungsphase von 3 Tagen erhielten die Kontrolltiere (N=12) intravenös Kochsalzlösung, die Tiere der Versuchsgruppe (N=9) erhielten intravenös 100ng Lipopolysaccharid. Lungenstruktur und Lungenreifung der fetalen Schafe wurden mittels unterschiedlicher biochemischer und histologischer Untersuchungen nach 3 (N=5) und nach 7 (N=4) Tagen beurteilt.

Die Infusion der Lipopolysaccharidlösung scheint zumindest innerhalb des Versuchszeitraums von bis zu sieben Tagen keinen Einfluss auf das Körpergewicht des Feten zu haben. Die herbeigeführte systemische Entzündung trägt jedoch zu einer pränatalen Verletzung mit strukturellen Veränderungen in der Lunge des Feten bei. Sowohl eine Lungenreifung als auch eine gestörte strukturelle Lungenentwicklung traten nach einer kurzfristigen fetalen Inflammation ein.

Die Konzentration an Interleukin-6 in der bronchoalveolären Lavage stieg 3 Tage nach Applikation des Lipopolysaccharids mehr als 40fach an. Sowohl die Prozessierung von

Pro-Surfactant Protein (SP)-B zu reifem SP-B als auch erhöhte Konzentrationen an SP-B konnten nach 7 Tagen nachgewiesen werden. Ebenfalls war eine Steigerung des phosphorylierten STAT-3 im Lungengewebe zu erkennen. Die Ablagerung von Elastinfasern an Septierungsstellen der Alveolen wurde innerhalb von 3 Tagen nach Lipopolysaccharidapplikation negativ beeinflusst.

Aus den Erkenntnissen dieser Arbeit könnten neue Therapieansätze sowohl für das Atemnotsyndrom des Frühgeborenen als auch der bronchopulmonalen Dysplasie resultieren, die eine Modulation der Entzündungsreaktion zum Ziel haben. Alle therapeutischen Ansätze werden einen Weg zwischen den positiven Effekten der Lungenreifung mit daraus folgender gesteigerter Compliance, reduzierter Alveolarwanddicke und vermehrtem prozessiertem SP-B und den schädlichen Einwirkungen auf die Lungenstruktur mit abweichender Elastinverteilung und kapillärer Leckage finden müssen. Bedauerlicherweise haben wir keinerlei Daten zur Klärung der Frage, ob die in unserem Modell durchgeführte einmalige Infusion von LPS eine anhaltende oder permanente Störung der alveolären Entwicklung hervorbringt. Die strukturelle Veränderung des Lungengewebes, die den Veränderungen im Rahmen einer BPD ähneln <sup>(Bourbon 2005)</sup> lassen jedoch eine permanente Organschädigung befürchten.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in einer internationalen Zeitschrift nach Begutachtung durch unabhängige Experten im Fachgebiet publiziert <sup>(Kramer 2009)</sup>.



## 6 Literaturverzeichnis

- American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (1992): Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.
- Akira S (1997): IL-6-regulated transcription factors. *The international journal of biochemistry & cell biology* 29(12):1401-18.
- Albertine KH, Jones GP, Starcher BC, Bohnsack JF, Davis PL, Cho SC, et al. (1999): Chronic lung injury in preterm lambs. Disordered respiratory tract development. *Am J Respir Crit Care Med* 159(3):945-58.
- Alcorn D, Adamson TM, Lambert TF, Maloney JE, Ritchie BC, Robinson PM (1977): Morphological effects of chronic tracheal ligation and drainage in the fetal lamb lung. *J Anat* 123(Pt 3):649-60.
- Alcorn D, Adamson TM, Maloney JE, Robinson PM (1980): Morphological effects of chronic bilateral phrenectomy or vagotomy in the fetal lamb lung. *J Anat* 130(Pt 4):683-95.
- Alcorn DG, Adamson TM, Maloney JE, Robinson PM (1981): A morphologic and morphometric analysis of fetal lung development in the sheep. *Anat Rec* 201(4):655-67.
- Alexander JM, Gilstrap LC, Cox SM, McIntire DM, Leveno KJ (1998): Clinical chorioamnionitis and the prognosis for very low birth weight infants. *Obstet Gynecol* 91(5 Pt 1):725-9.
- Allen C, Bowdin S, Harrison RF, Sutcliffe AG, Brueton L, Kirby G, et al. (2008): Pregnancy and perinatal outcomes after assisted reproduction: a comparative study. *Ir J Med Sci* 177(3):233-41.
- Allen MC, Cristofalo EA, Kim C (2011): Outcomes of preterm infants: morbidity replaces mortality. *Clin Perinatol* 38(3):441-54.
- Althabe F (2012): Born too soon: the global action report on preterm birth. World Health Organization,
- Amy RW, Bowes D, Burri PH, Haines J, Thurlbeck WM (1977): Postnatal growth of the mouse lung. *J Anat* 124(Pt 1):131-51.
- Andonotopo W, Medic M, Salihagic-Kadic A, Milenkovic D, Maiz N, Scazzocchio E (2005): The assessment of fetal behavior in early pregnancy: comparison between 2D and 4D sonographic scanning. *J Perinat Med* 33(5):406-14.
- Andrews WW, Goldenberg RL, Faye-Petersen O, Cliver S, Goepfert AR, Hauth JC (2006): The Alabama Preterm Birth study: polymorphonuclear and mononuclear cell placental infiltrations, other markers of inflammation, and outcomes in 23- to 32-week preterm newborn infants. *Am J Obstet Gynecol* 195(3):803-8.
- Augusto LA, Li J, Synguelakis M, Johansson J, Chaby R (2002): Structural basis for interactions between lung surfactant protein C and bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 277(26):23484-92.
- Bachurski CJ, Ross GF, Ikegami M, Kramer BW, Jobe AH (2001): Intra-amniotic endotoxin increases pulmonary surfactant proteins and induces SP-B processing in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280(2):L279-85.

- Baud O, Foix-L'Hélias L, Kaminski M, Audibert F, Jarreau PH, Papiernik E, et al. (1999): Antenatal glucocorticoid treatment and cystic periventricular leukomalacia in very premature infants. *N Engl J Med* 341(16):1190-6.
- Bauer J, Herrmann F (1991): Interleukin-6 in clinical medicine. *Ann Hematol* 62(6):203-10.
- Baur FM, Brenner B, Goetze-Speer B, Neu S, Speer CP (1998): Natural porcine surfactant (Curosurf) down-regulates mRNA of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and TNF-alpha type II receptor in lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *Pediatr Res* 44(1):32-6.
- Beer A (1852): Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Annalen der Physik und Chemie* 86:78–88.
- Bhandari A, Bhandari V (2007): Bronchopulmonary dysplasia: an update. *Indian J Pediatr* 74(1):73-7.
- Bhatia M, He M, Zhang H, Mochhala S (2009): Sepsis as a model of SIRS. *Front Biosci* 14:4703-11.
- Bieghs V, Vlassaks E, Custers A, van Gorp PJ, Gijbels MJ, Bast A, et al. (2010): Chorioamnionitis induced hepatic inflammation and disturbed lipid metabolism in fetal sheep. *Pediatr Res* 68(6):466-72.
- Blanco LN, Massaro GD, Massaro D (1989): Alveolar dimensions and number: developmental and hormonal regulation. *Am J Physiol* 257(4 Pt 1):L240-7.
- Bland RD (2005): Neonatal chronic lung disease in the post-surfactant era. *Biol Neonate* 88(3):181-91.
- Boccaccio C, Ando M, Tamagnone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C, et al. (1998): Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* 391(6664):285-8.
- Boggaram V (2003): Regulation of lung surfactant protein gene expression. *Front Biosci* 8:d751-64.
- Bolt RJ, van Weissenbruch MM, Lafeber HN, Delemarre-van de Waal HA (2001): Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr Pulmonol* 32(1):76-91.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. (1992): Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101(6):1644-55.
- Bourbon J, Boucherat O, Chailley-Heu B, Delacourt C (2005): Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 57(5 Pt 2):38R-46R.
- Briese V (1999): Amnioninfektionssyndrom. *Der Gynäkologe* 32:507-11.
- Bry K, Lappalainen U, Hallman M (1996): Cytokines and production of surfactant components. *Semin Perinatol* 20(3):194-205.
- Bry K, Lappalainen U, Hallman M (1997): Intraamniotic interleukin-1 accelerates surfactant protein synthesis in fetal rabbits and improves lung stability after premature birth. *J Clin Invest* 99(12):2992-9.

- Bryden MM, Evans H, Binns W (1973): Embryology of the sheep. 3. The respiratory system, mesenteries and celom in the fourteen to thirty-four day embryo. *Anat Rec* 175(4):725-35.
- Burnette WN (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112(2):195-203.
- Burri PH (1974): The postnatal growth of the rat lung. 3. Morphology. *Anat Rec* 180(1):77-98.
- Burri PH (2006): Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biol Neonate* 89(4):313-22.
- Burri PH, Dbaly J, Weibel ER (1974): The postnatal growth of the rat lung. I. Morphometry. *Anat Rec* 178(4):711-30.
- Carlton DP, Albertine KH, Cho SC, Lont M, Bland RD (1997): Role of neutrophils in lung vascular injury and edema after premature birth in lambs. *J Appl Physiol* 83(4):1307-17.
- Castranova V, Rabovsky J, Tucker JH, Miles PR (1988): The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicol Appl Pharmacol* 93(3):472-83.
- Charafeddine L, D'Angio CT, Phelps DL (1999): Atypical chronic lung disease patterns in neonates. *Pediatrics* 103(4 Pt 1):759-65.
- Chellam VG, Rushton DI (1985): Chorioamnionitis and funiculitis in the placentas of 200 births weighing less than 2.5 kg. *Br J Obstet Gynaecol* 92(8):808-14.
- Chiumello D, Pristine G, Slutsky AS (1999): Mechanical ventilation affects local and systemic cytokines in an animal model of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 160(1):109-16.
- Clark JC, Weaver TE, Iwamoto HS, Ikegami M, Jobe AH, Hull WM, et al. (1997): Decreased lung compliance and air trapping in heterozygous SP-B-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16(1):46-52.
- Clark JC, Wert SE, Bachurski CJ, Stahlman MT, Stripp BR, Weaver TE, et al. (1995): Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17):7794-8.
- Clements JA (1957): Surface tension of lung extracts. *Proc Soc Exp Biol Med* 95(1):170-2.
- Coalson JJ, Winter V, deLemos RA (1995): Decreased alveolarization in baboon survivors with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 152(2):640-6.
- Coalson JJ, Winter VT, Siler-Khodr T, Yoder BA (1999): Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 160(4):1333-46.
- Collins JJ, Kuypers E, Nitsos I, Jane Pillow J, Polglase GR, Kemp MW, et al. (2012): LPS-induced chorioamnionitis and antenatal corticosteroids modulate Shh signaling in the ovine fetal lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303(9):L778-87.
- Cordingley JL (1972): Pores of Kohn. *Thorax* 27(4):433-41.

- Costeloe K, Hennessy E, Gibson AT, Marlow N, Wilkinson AR (2000): The EPICure study: outcomes to discharge from hospital for infants born at the threshold of viability. *Pediatrics* 106(4):659-71.
- Coumans AB, Garnier Y, Supcun S, Jensen A, Berger R, Hasaart TH (2004): The effects of low-dose endotoxin on the umbilicoplacental circulation in preterm sheep. *J Soc Gynecol Investig* 11(5):289-93.
- Crowley PA (1995): Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994. *Am J Obstet Gynecol* 173(1):322-35.
- Cunningham M, Stocks J (1978): Werdnig-Hoffmann disease. The effects of intrauterine onset on lung growth. *Arch Dis Child* 53(12):921-5.
- Dammann O, Leviton A (2006): Inflammation, brain damage and visual dysfunction in preterm infants. *Semin Fetal Neonatal Med* 11(5):363-8.
- Dammann O, Leviton A, Gappa M, Dammann CE (2005): Lung and brain damage in preterm newborns, and their association with gestational age, prematurity subgroup, infection/inflammation and long term outcome. *BJOG* 112 Suppl 1.
- Darnell JE, Jr. (1997): STATs and gene regulation. *Science* 277(5332):1630-5.
- Davies G, Reid L (1970): Growth of the alveoli and pulmonary arteries in childhood. *Thorax* 25(6):669-81.
- Davies P, Reid L, Lister G, Pitt B (1988): Postnatal growth of the sheep lung: a morphometric study. *Anat Rec* 220(3):281-6.
- de Bont ES, Martens A, van Raan J, Samson G, Fetter WP, Okken A, et al. (1993): Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 plasma levels in neonatal sepsis. *Pediatr Res* 33(4 Pt 1):380-3.
- Decker T, Kovarik P (2000): Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19(21):2628-37.
- DiCosmo BF, Geba GP, Picarella D, Elias JA, Rankin JA, Stripp BR, et al. (1994): Airway epithelial cell expression of interleukin-6 in transgenic mice. Uncoupling of airway inflammation and bronchial hyperreactivity. *J Clin Invest* 94(5):2028-35.
- DiFiore JW, Wilson JM (1994): Lung development. *Seminars in pediatric surgery* 3(4):221-32.
- Docimo SG, Crone RK, Davies P, Reid L, Retik AB, Mandell J (1991): Pulmonary development in the fetal lamb: morphometric study of the alveolar phase. *Anat Rec* 229(4):495-8.
- Doyle LW, Rogerson S, Chuang SL, James M, Bowman ED, Davis PG (1999): Why do preterm infants die in the 1990s? *The Medical journal of Australia* 170(11):528-32.
- Drury PP, Bennet L, Booth LC, Davidson JO, Wassink G, Gunn AJ (2015): Studies of perinatal asphyxial brain injury in the fetal sheep. *Animal Models of Neurodevelopmental Disorders: Springer*, S. 85-105.
- Duncan JR, Cock ML, Scheerlinck J-PY, Westcott KT, McLean C, Harding R, et al. (2002): White matter injury after repeated endotoxin exposure in the preterm ovine fetus. *Pediatr Res* 52(6):941-9.
- Duncan JR, Cock ML, Suzuki K, Scheerlinck J-PY, Harding R, Rees SM (2006): Chronic endotoxin exposure causes brain injury in the ovine fetus in the absence of hypoxemia. *J Soc Gynecol Investig* 13(2):87-96.

- Eliakim R, DeSchryver-Kecskemeti K, Nogee L, Stenson WF, Alpers DH (1989): Isolation and characterization of a small intestinal surfactant-like particle containing alkaline phosphatase and other digestive enzymes. *J Biol Chem* 264(34):20614-9.
- Elimian A, Garry D, Figueroa R, Spitzer A, Wiencek V, Quirk JG (2007): Antenatal betamethasone compared with dexamethasone (betacode trial): a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 110(1):26-30.
- Emerson GA, Bry K, Hallman M, Jobe AH, Wada N, Ervin MG, et al. (1997): Intra-amniotic interleukin-1 alpha treatment alters postnatal adaptation in premature lambs. *Biol Neonate* 72(6):370-9.
- Emery JL, Mithal A (1960): The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood. *Arch Dis Child* 35:544-7.
- Engvall E, Perlmann P (1972): Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 109(1):129-35.
- Epaud R, Ikegami M, Whitsett JA, Jobe AH, Weaver TE, Akinbi HT (2003): Surfactant protein B inhibits endotoxin-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28(3):373-8.
- Farrell EE, Silver RK, Kimberlin LV, Wolf ES, Dusik JM (1989): Impact of antenatal dexamethasone administration on respiratory distress syndrome in surfactant-treated infants. *Am J Obstet Gynecol* 161(3):628-33.
- Feldman DM, Carbone J, Belden L, Borgida AF, Herson V (2007): Betamethasone vs dexamethasone for the prevention of morbidity in very-low-birthweight neonates. *Am J Obstet Gynecol* 197(3):284.e1-4.
- Fink MP, Heard SO (1990): Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 49(2):186-96.
- Fukuda Y, Ferrans VJ, Crystal RG (1983): The development of alveolar septa in fetal sheep lung. An ultrastructural and immunohistochemical study. *Am J Anat* 167(4):405-39.
- Gantert M, Been JV, Gavilanes AWD, Garnier Y, Zimmermann LJI, Kramer BW (2010): Chorioamnionitis: a multiorgan disease of the fetus? *J Perinatol* 30 Suppl:S21-30.
- Garber SJ, Zhang H, Foley JP, Zhao H, Butler SJ, Godinez RI, et al. (2006): Hormonal regulation of alveolarization: structure-function correlation. *Respir Res* 7:47.
- Garnier Y, Coumans A, Berger R, Jensen A, Hasaart TH (2001): Endotoxemia severely affects circulation during normoxia and asphyxia in immature fetal sheep. *J Soc Gynecol Investig* 8(3):134-42.
- Garnier Y, Coumans AB, Berger R, Hasaart TH (2006): Pulmonary perfusion during lipopolysaccharide (LPS) induced fetal endotoxemia in the preterm fetal sheep. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 124(2):150-7.
- Garnier Y, Coumans AB, Jensen A, Hasaart TH, Berger R (2003): Infection-related perinatal brain injury: the pathogenic role of impaired fetal cardiovascular control. *J Soc Gynecol Investig* 10(8):450-9.
- Garnier Y, Kadyrov M, Gantert M, Einig A, Rath W, Huppertz B (2008): Proliferative responses in the placenta after endotoxin exposure in preterm fetal sheep. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 138(2):152-7.

- Gilbert WM (2006): The cost of preterm birth: the low cost versus high value of tocolysis. *BJOG* 113 Suppl 3:4-9.
- Girgis RE, Basha MA, Maliarik M, Popovich J, Jr., Iannuzzi MC (1995): Cytokines in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with active pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 152(1):71-5.
- Glasser SW, Burhans MS, Korfhagen TR, Na CL, Sly PD, Ross GF, et al. (2001): Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11):6366-71.
- Glasser SW, Korfhagen TR, Bruno MD, Dey C, Whitsett JA (1990): Structure and expression of the pulmonary surfactant protein SP-C gene in the mouse. *J Biol Chem* 265(35):21986-91.
- Glumoff V, Väyrynen O, Kangas T, Hallman M (2000): Degree of lung maturity determines the direction of the interleukin-1- induced effect on the expression of surfactant proteins. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22(3):280-8.
- Goepfert AR, Andrews WW, Carlo W, Ramsey PS, Cliver SP, Goldenberg RL, et al. (2004): Umbilical cord plasma interleukin-6 concentrations in preterm infants and risk of neonatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol* 191(4):1375-81.
- Goerke J (1998): Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta* 1408(2-3):79-89.
- Goldenberg RL, Andrews WW, Faye-Petersen OM, Cliver SP, Goepfert AR, Hauth JC (2006): The Alabama preterm birth study: corticosteroids and neonatal outcomes in 23- to 32-week newborns with various markers of intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 195(4):1020-4.
- Goldenberg RL, Culhane JF (2003): Infection as a cause of preterm birth. *Clin Perinatol* 30(4):677-700.
- Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW (2000): Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 342(20):1500-7.
- Gomez-Pomar E, Concina VA, Samide A, Westgate P, Bada HS (2018): Bronchopulmonary dysplasia: comparison between the two most used diagnostic criteria. *Frontiers in pediatrics* 6:397.
- Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM (1998): The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 179(1):194-202.
- Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Pineles BL, Erez O, et al. (2007): The fetal inflammatory response syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 50(3):652-83.
- Groneck P, Gotze-Speer B, Oppermann M, Eiffert H, Speer CP (1994): Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: a sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high-risk preterm neonates. *Pediatrics* 93(5):712-8.
- Groneck P, Speer CP (1995): Inflammatory mediators and bronchopulmonary dysplasia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 73(1):F1-3.
- Guyer B, Martin JA, MacDorman MF, Anderson RN, Strobino DM (1997): Annual summary of vital statistics--1996. *Pediatrics* 100(6):905-18.
- Hack M, Fanaroff AA (2000): Outcomes of children of extremely low birthweight and gestational age in the 1990s. *Semin Neonatol* 5(2):89-106.

- Hack M, Fanaroff AA (1993): Outcomes of extremely immature infants--a perinatal dilemma. *N Engl J Med* 329(22):1649-50.
- Halliday HL (2005): Evidence-based neonatal care. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 19(1):155-66.
- Halliday HL (1996): Natural vs synthetic surfactants in neonatal respiratory distress syndrome. *Drugs* 51(2):226-37.
- Hannaford K, Todd DA, Jeffery H, John E, Blyth K, Gilbert GL (1999): Role of ureaplasma urealyticum in lung disease of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 81(3):F162-7.
- Hardie WD, Bruno MD, Huelsman KM, Iwamoto HS, Carrigan PE, Leikauf GD, et al. (1997): Postnatal lung function and morphology in transgenic mice expressing transforming growth factor-alpha. *Am J Pathol* 151(4):1075-83.
- Harms K, Osmers R, Kron M, Schill M, Kuhn W, Speer CP, et al. (1994): [Mortality of premature infants 1980-1990: analysis of data from the Gottingen perinatal center]. *Zeitschrift fur Geburtshilfe und Perinatologie* 198(4):126-33.
- Hart K (1908): Die Färbung der elastischen Fasern mit dem von Weigert angegebenen Farbstoff. *Zentbl Alleg Pathol* 19:1-3.
- Hawgood S, Ochs M, Jung A, Akiyama J, Allen L, Brown C, et al. (2002): Sequential targeted deficiency of SP-A and -D leads to progressive alveolar lipoproteinosis and emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(5):L1002-10.
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T (1990): Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265(3):621-36.
- Helfgott DC, May LT, Sthoeger Z, Tamm I, Sehgal PB (1987): Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts. *J Exp Med* 166(5):1300-9.
- Hislop AA, Wigglesworth JS, Desai R (1986): Alveolar development in the human fetus and infant. *Early Hum Dev* 13(1):1-11.
- Hislop AA, Wigglesworth JS, Desai R, Aber V (1987): The effects of preterm delivery and mechanical ventilation on human lung growth. *Early Hum Dev* 15(3):147-64.
- Hitti J, Krohn MA, Patton DL, Tarczy-Hornoch P, Hillier SL, Cassen EM, et al. (1997): Amniotic fluid tumor necrosis factor-alpha and the risk of respiratory distress syndrome among preterm infants. *Am J Obstet Gynecol* 177(1):50-6.
- Hokuto I, Ikegami M, Yoshida M, Takeda K, Akira S, Perl AK, et al. (2004): Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia. *J Clin Invest* 113(1):28-37.
- Hu LM, Davies P, Adzick NS, Harrison MR, Reid LM (1987): The effects of intrauterine pneumonectomy in lambs. A morphometric study of the remaining lung at term. *Am Rev Respir Dis* 135(3):607-12.
- Husain AN, Siddiqui NH, Stocker JT (1998): Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Hum Pathol* 29(7):710-7.
- Hutten MC, Kramer BW (2014): Patterns and etiology of acute and chronic lung injury: insights from experimental evidence. *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics* 16(5):448-59.
- Ihle JN (2001): The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 13(2):211-7.

- Ikegami M, Jobe AH, Newnham J, Polk DH, Willet KE, Sly P (1997): Repetitive prenatal glucocorticoids improve lung function and decrease growth in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 156(1):178-84.
- Ikegami M, Whitsett JA, Martis PC, Weaver TE (2005): Reversibility of lung inflammation caused by SP-B deficiency. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289(6):L962-70.
- Ingenito EP, Mora R, Cullivan M, Marzan Y, Haley K, Mark L, et al. (2001): Decreased surfactant protein-B expression and surfactant dysfunction in a murine model of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25(1):35-44.
- Jackson JC, Truog WE, Standaert TA, Juul SE, Murphy JH, Chi EY, et al. (1991): Effect of high-frequency ventilation on the development of alveolar edema in premature monkeys at risk for hyaline membrane disease. *Am Rev Respir Dis* 143(4 Pt 1):865-71.
- Jobe AH (2005): Antenatal associations with lung maturation and infection. *J Perinatol* 25 Suppl 2:S31-5.
- Jobe AH (2011): The new bronchopulmonary dysplasia. *Curr Opin Pediatr* 23(2):167-72.
- Jobe AH, Bancalari E (2001): Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 163(7):1723-9.
- Jobe AH, Ikegami M (2001): Antenatal infection/inflammation and postnatal lung maturation and injury. *Respir Res* 2(1):27-32.
- Jobe AH, Ikegami M (1998): Mechanisms initiating lung injury in the preterm. *Early Hum Dev* 53(1):81-94.
- Jobe AH, Newnham J, Willet K, Sly P, Ikegami M (1998): Fetal versus maternal and gestational age effects of repetitive antenatal glucocorticoids. *Pediatrics* 102(5):1116-25.
- Jobe AH, Newnham JP, Willet KE, Moss TJ, Gore Ervin M, Padbury JF, et al. (2000): Endotoxin-induced lung maturation in preterm lambs is not mediated by cortisol. *Am J Respir Crit Care Med* 162(5):1656-61.
- Jobe AH, Newnham JP, Willet KE, Sly P, Ervin MG, Bachurski C, et al. (2000): Effects of antenatal endotoxin and glucocorticoids on the lungs of preterm lambs. *Am J Obstet Gynecol* 182(2):401-8.
- Jobe AJ (1999): The new BPD: an arrest of lung development. *Pediatr Res* 46(6):641-3.
- Johansson J, Curstedt T (1997): Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *European journal of biochemistry* 244(3):675-93.
- Jorch G (2006): Frühgeborene: Rat und Hilfe für betroffene Eltern; [empfohlen vom Bundesverband "Das frühgeborene Kind" eV]. Urania,
- Kallapur SG, Jobe AH, Ball MK, Nitsos I, Moss TJM, Hillman NH, et al. (2007): Pulmonary and systemic endotoxin tolerance in preterm fetal sheep exposed to chorioamnionitis. *J Immunol* 179(12):8491-9.
- Kallapur SG, Moss TJM, Ikegami M, Jasman RL, Newnham JP, Jobe AH (2005): Recruited inflammatory cells mediate endotoxin-induced lung maturation in preterm fetal lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 172(10):1315-21.
- Kallapur SG, Willet KE, Jobe AH, Ikegami M, Bachurski CJ (2001): Intra-amniotic endotoxin: chorioamnionitis precedes lung maturation in preterm lambs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280(3):L527-36.



- Kendall JZ, Lakritz J, Plopper CG, Richards GE, Randall GC, Nagamani M, et al. (1990): The effects of hydrocortisone on lung structure in fetal lambs. *J Dev Physiol* 13(3):165-72.
- Kennedy JD (1999): Lung function outcome in children of premature birth. *J Paediatr Child Health* 35(6):516-21.
- Kent A, Lomas F, Hurrion E, Dahlstrom JE (2005): Antenatal steroids may reduce adverse neurological outcome following chorioamnionitis: neurodevelopmental outcome and chorioamnionitis in premature infants. *J Paediatr Child Health* 41(4):186-90.
- Kikkawa Y, Motoyama EK, Gluck L (1968): Study of the lungs of fetal and newborn rabbits. Morphologic, biochemical, and surface physical development. *Am J Pathol* 52(1):177-210.
- Kim SH, Kook MC, Shin YK, Park SH, Song HG (2004): Evaluation of antigen retrieval buffer systems. *J Mol Histol* 35(4):409-16.
- Kingma PS, Whitsett JA (2006): In defense of the lung: surfactant protein A and surfactant protein D. *Curr Opin Pharmacol* 6(3):277-83.
- Kirito K, Uchida M, Yamada M, Miura Y, Komatsu N (1997): A distinct function of STAT proteins in erythropoietin signal transduction. *J Biol Chem* 272(26):16507-13.
- Kishimoto T (1989): The biology of interleukin-6. *Blood* 74(1):1-10.
- Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, et al. (2006): Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol* 43(9):1293-315.
- Kitaoka H, Burri PH, Weibel ER (1996): Development of the human fetal airway tree: analysis of the numerical density of airway endtips. *Anat Rec* 244(2):207-13.
- Klebanoff MA, Keim SA (2011): Epidemiology: the changing face of preterm birth. *Clin Perinatol* 38:339-50.
- Kölliker A (1879): *Entwicklungsgeschichte des Menschen und der höheren Tiere*. Engelmann Verlag Leipzig,
- Kosuge S, Ohkuchi A, Minakami H, Matsubara S, Uchida A, Eguchi Y, et al. (2000): Influence of chorioamnionitis on survival and morbidity in singletons live-born at < 32 weeks of gestation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79(10):861-5.
- Kramer B, Speer CP (1999): [Lung hypoplasia: an underestimated diagnosis?]. *Z Geburtshilfe Neonatol* 203(4):143-51.
- Kramer BW (2008): Antenatal inflammation and lung injury: prenatal origin of neonatal disease. *J Perinatol* 28 Suppl 1:S21-7.
- Kramer BW (2011): Chorioamnionitis - new ideas from experimental models. *Neonatology* 99(4):320-5.
- Kramer BW, Albertine KH, Moss TJM, Nitsos I, Ladenburger A, Speer CP, et al. (2008): All-trans retinoic acid and intra-amniotic endotoxin-mediated effects on fetal sheep lung. *Anat Rec (Hoboken)* 291(10):1271-7.
- Kramer BW, Garnier Y (2007): B.W. Kramer and Y. Garnier, Chorioamnionitis—an inflammatory multi-organ response of the fetus? *Geburtsh Frauenheilk* 67:602–10.

- Kramer BW, Ikegami M, Jobe AH (2002): Intratracheal endotoxin causes systemic inflammation in ventilated preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 165(4):463-9.
- Kramer BW, Jobe AH (2005): The clever fetus: responding to inflammation to minimize lung injury. *Biol Neonate* 88(3):202-7.
- Kramer BW, Jobe AH, Ikegami M (2003): Monocyte function in preterm, term, and adult sheep. *Pediatr Res* 54(1):52-7.
- Kramer BW, Joshi SN, Moss TJM, Newnham JP, Sindelar R, Jobe AH, et al. (2007): Endotoxin-induced maturation of monocytes in preterm fetal sheep lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293(2):L345-53.
- Kramer BW, Kaemmerer U, Kapp M, Herbst D, Marx A, Berg D, et al. (2005): Decreased expression of angiogenic factors in placentas with chorioamnionitis after preterm birth. *Pediatr Res* 58(3):607-12.
- Kramer BW, Kallapur SG, Moss TJ, Nitsos I, Newnham JP, Jobe AH (2009): Intra-amniotic LPS modulation of TLR signaling in lung and blood monocytes of fetal sheep. *Innate Immun* 15(2):101-7.
- Kramer BW, Kramer S, Ikegami M, Jobe AH (2002): Injury, inflammation, and remodeling in fetal sheep lung after intra-amniotic endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(2):L452-9.
- Kramer BW, Ladenburger A, Kunzmann S, Speer CP, Been JV, van Iwaarden JF, et al. (2009): Intravenous lipopolysaccharide-induced pulmonary maturation and structural changes in fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 200(2):195.e1-10.
- Kramer BW, Moss TJ, Willet KE, Newnham JP, Sly PD, Kallapur SG, et al. (2001): Dose and time response after intraamniotic endotoxin in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 164(6):982-8.
- Kramer MS, Demissie K, Yang H, Platt RW, Sauve R, Liston R (2000): The contribution of mild and moderate preterm birth to infant mortality. Fetal and Infant Health Study Group of the Canadian Perinatal Surveillance System. *Jama* 284(7):843-9.
- Kuan SF, Rust K, Crouch E (1992): Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides. Surfactant protein D is an *Escherichia coli*-binding protein in bronchoalveolar lavage. *J Clin Invest* 90(1):97-106.
- Kuypers E, Collins JJP, Kramer BW, Ofman G, Nitsos I, Pillow JJ, et al. (2012): Intra-amniotic LPS and antenatal betamethasone: inflammation and maturation in preterm lamb lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302(4):L380-9.
- Kuypers E, Ophelders D, Jellema RK, Kunzmann S, Gavilanes AW, Kramer BW (2012): White matter injury following fetal inflammatory response syndrome induced by chorioamnionitis and fetal sepsis: lessons from experimental ovine models. *Early Hum Dev* 88(12):931-6.
- Ladenburger A, Seehase M, Kramer BW, Thomas W, Wirbelauer J, Speer CP, et al. (2010): Glucocorticoids potentiate IL-6-induced SP-B expression in H441 cells by enhancing the JAK-STAT signaling pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299(4):L578-84.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.

- Lahra MM, Jeffery HE (2004): A fetal response to chorioamnionitis is associated with early survival after preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 190(1):147-51.
- Lambermont VA, Kuypers E, Collins JJ, Pillow JJ, Newnham JP, Polglase GR, et al. (2014): Effects of intra-amniotic lipopolysaccharide exposure on the fetal lamb lung as gestation advances. *Pediatric research* 75(4):500.
- Lang F, Lang P (2007): *Basiswissen Physiologie. 2., vollständig neu bearbeitete und aktualisierte Auflage* ed.
- Langston C, Kida K, Reed M, Thurlbeck WM (1984): Human lung growth in late gestation and in the neonate. *Am Rev Respir Dis* 129(4):607-13.
- Laplace PS (1798): *Traite de Mécanique Celeste. Fünf Bände.*
- Lettieri L, Vintzileos AM, Rodis JF, Albin SM, Salafia CM (1993): Does "idiopathic" preterm labor resulting in preterm birth exist? *Am J Obstet Gynecol* 168(5):1480-5.
- Li YH, Brauner A, Jonsson B, Van der Ploeg I, Söder O, Holst M, et al. (2001): Inhibition of macrophage proinflammatory cytokine expression by steroids and recombinant IL-10. *Biol Neonate* 80(2):124-32.
- Liggins GC (1969): Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol* 45(4):515-23.
- Liggins GC, Howie RN (1972): A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 50(4):515-25.
- Lindahl P, Karlsson L, Hellström M, Gebre-Medhin S, Willetts K, Heath JK, et al. (1997): Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development. *Development* 124(20):3943-53.
- Löffler G, Petrides PE (1998): *Biochemie und Pathobiochemie.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-75.
- Ludwig (1995): Surfactant update: International Symposium on current aspects and developments. *Z Geburtshilfe Neonatol* 199(6 Suppl):1-16.
- Magnani JE, Donn SM (2019): Persistent Respiratory Distress in the Term Neonate: Genetic Surfactant Deficiency Diseases. *Current pediatric reviews.*
- Massaro D, Massaro GD (2001): Pulmonary alveolus formation: critical period, retinoid regulation and plasticity. *Novartis Found Symp* 234:229-36; discussion 36.
- Massaro GD, Massaro D (1992): Formation of alveoli in rats: postnatal effect of prenatal dexamethasone. *Am J Physiol* 263(1 Pt 1):L37-41.
- Massaro GD, Massaro D (1996): Formation of pulmonary alveoli and gas-exchange surface area: quantitation and regulation. *Annu Rev Physiol* 58:73-92.
- Massaro GD, Massaro D (1993): Postnatal lung growth: evidence that the gas-exchange region grows fastest at the periphery. *Am J Physiol* 265(4 Pt 1):L319-22.
- Massaro GD, Massaro D (1996): Postnatal treatment with retinoic acid increases the number of pulmonary alveoli in rats. *Am J Physiol* 270(2 Pt 1):L305-10.
- May M, Ströbel P, Preissshofen T, Seidenspinner S, Marx A, Speer CP (2004): Apoptosis and proliferation in lungs of ventilated and oxygen-treated preterm infants. *Eur Respir J* 23(1):113-21.

- McCormack FX (1998): Structure, processing and properties of surfactant protein A. *Biochim Biophys Acta* 1408(2-3):109-31.
- Merkus PJ, ten Have-Opbroek AA, Quanjer PH (1996): Human lung growth: a review. *Pediatr Pulmonol* 21(6):383-97.
- Merritt TA, Cochrane CG, Holcomb K, Bohl B, Hallman M, Strayer D, et al. (1983): Elastase and alpha 1-proteinase inhibitor activity in tracheal aspirates during respiratory distress syndrome. Role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *J Clin Invest* 72(2):656-66.
- Mescher EJ, Platzker AC, Ballard PL, Kitterman JA, Clements JA, Tooley WH (1975): Ontogeny of tracheal fluid, pulmonary surfactant, and plasma corticoids in the fetal lamb. *J Appl Physiol* 39(6):1017-21.
- Messer J, Eyer D, Donato L, Gallati H, Matis J, Simeoni U (1996): Evaluation of interleukin-6 and soluble receptors of tumor necrosis factor for early diagnosis of neonatal infection. *J Pediatr* 129(4):574-80.
- Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M (2012): IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 122(4):143-59.
- Miles PR, Bowman L, Rao KM, Baatz JE, Huffman L (1999): Pulmonary surfactant inhibits LPS-induced nitric oxide production by alveolar macrophages. *Am J Physiol* 276(1 Pt 1):L186-96.
- Miyazaki Y, Araki K, Vesin C, Garcia I, Kapanci Y, Whitsett JA, et al. (1995): Expression of a tumor necrosis factor-alpha transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. A mouse model of progressive pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 96(1):250-9.
- Morgenroth K (1986): Das Surfactantsystem der Lunge - morphologische Grundlagen und klinische Bedeutung. VII, 110 S.
- Moss TJM, Nitsos I, Kramer BW, Ikegami M, Newnham JP, Jobe AH (2002): Intra-amniotic endotoxin induces lung maturation by direct effects on the developing respiratory tract in preterm sheep. *Am J Obstet Gynecol* 187(4):1059-65.
- Murphy KE (2007): Betamethasone compared with dexamethasone for preterm birth: a call for trials. *Obstet Gynecol* 110(1):7-9.
- Mushkat Y, Ascher-Landsberg J, Keidar R, Carmon E, Pauzner D, David MP (2001): The effect of betamethasone versus dexamethasone on fetal biophysical parameters. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 97(1):50-2.
- Mutius E, Gappa M, Eber E, Frey U (2013): *Pädiatrische Pneumologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Neergard KV (1929): Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Z Gesamte Exp Med* 66(1):373-94.
- Nelson KB, Dambrosia JM, Grether JK, Phillips TM (1998): Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Annals of neurology* 44(4):665-75.
- Newnham JP, Kallapur SG, Kramer BW, Moss TJM, Nitsos I, Ikegami M, et al. (2003): Betamethasone effects on chorioamnionitis induced by intra-amniotic endotoxin in sheep. *Am J Obstet Gynecol* 189(5):1458-66.

- Nogee LM, de Mello DE, Dehner LP, Colten HR (1993): Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 328(6):406-10.
- Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, et al. (1994): A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest* 93(4):1860-3.
- Northway WH, Jr., Moss RB, Carlisle KB, Parker BR, Popp RL, Pitlick PT, et al. (1990): Late pulmonary sequelae of bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 323(26):1793-9.
- Northway WH, Jr., Rosan RC, Porter DY (1967): Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 276(7):357-68.
- O'Brodovich HM, Mellins RB (1985): Bronchopulmonary dysplasia. Unresolved neonatal acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 132(3):694-709.
- O'Shea TM, Klinepeter KL, Meis PJ, Dillard RG (1998): Intrauterine infection and the risk of cerebral palsy in very low-birthweight infants. *Paediatr Perinat Epidemiol* 12(1):72-83.
- Obladen M (2005): History of surfactant up to 1980. *Biol Neonate* 87(4):308-16.
- Obladen M, Maier RF (2006): *Neugeborenenintensivmedizin - Evidenz und Erfahrung*, 7. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Palomar LM, Nogee LM, Sweet SC, Huddleston CB, Cole FS, Hamvas A (2006): Long-term outcomes after infant lung transplantation for surfactant protein B deficiency related to other causes of respiratory failure. *J Pediatr* 149(4):548-53.
- Parra Ortiz E (2013): Effects of Pulmonary Surfactant Proteins SP-B and SP-C on the Physical Properties of Biological Membranes. Universidad Complutense de Madrid.
- Pfitzner E, Kliem S, Baus D, Litterst CM (2004): The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases. *Curr Pharm Des* 10(23):2839-50.
- Philip AG (1995): Neonatal mortality rate: is further improvement possible? *J Pediatr* 126(3):427-33.
- Pierce RA, Albertine KH, Starcher BC, Bohnsack JF, Carlton DP, Bland RD (1997): Chronic lung injury in preterm lambs: disordered pulmonary elastin deposition. *Am J Physiol* 272(3 Pt 1):L452-60.
- Pinkerton KE, Willet KE, Peake JL, Sly PD, Jobe AH, Ikegami M (1997): Prenatal glucocorticoid and T4 effects on lung morphology in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 156(2 Pt 1):624-30.
- Polk DH, Ikegami M, Jobe AH, Sly P, Kohan R, Newnham J (1997): Preterm lung function after retreatment with antenatal betamethasone in preterm lambs. *Am J Obstet Gynecol* 176(2):308-15.
- Pringle KC (1986): Human fetal lung development and related animal models. *Clin Obstet Gynecol* 29(3):502-13.
- Quinton LJ, Jones MR, Robson BE, Simms BT, Whitsett JA, Mizgerd JP (2008): Alveolar epithelial STAT3, IL-6 family cytokines, and host defense during *Escherichia coli* pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38(6):699-706.

- Ray P, Tang W, Wang P, Homer R, Kuhn C, 3rd, Flavell RA, et al. (1997): Regulated overexpression of interleukin 11 in the lung. Use to dissociate development-dependent and -independent phenotypes. *J Clin Invest* 100(10):2501-11.
- Redline RW (2005): Severe fetal placental vascular lesions in term infants with neurologic impairment. *Am J Obstet Gynecol* 192(2):452-7.
- Redline RW, Wilson-Costello D, Hack M (2002): Placental and other perinatal risk factors for chronic lung disease in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 52(5):713-9.
- Reinhardt (2004): Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Rieger C, von der Hardt H, Sennhauser FH, Wahn U, Zach M (1999): Pädiatrische Pneumologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Rietschel ET, Schade U, Jensen M, Wollenweber HW, Lüderitz O, Greisman SG (1982): Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicemia. *Scand J Infect Dis Suppl* 31:8-21.
- Roberts AB, Mitchell J (1995): Pulmonary hypoplasia and fetal breathing in preterm premature rupture of membranes. *Early Hum Dev* 41(1):27-37.
- Rojas MA, Gonzalez A, Bancalari E, Claire N, Poole C, Silva-Neto G (1995): Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. *J Pediatr* 126(4):605-10.
- Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal PB (1990): Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor. Association with infection. *J Clin Invest* 85(5):1392-400.
- Rooney SA, Young SL, Mendelson CR (1994): Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J* 8(12):957-67.
- Rotmensch S, Liberati M, Vishne TH, Celentano C, Ben-Rafael Z, Bellati U (1999): The effect of betamethasone and dexamethasone on fetal heart rate patterns and biophysical activities. A prospective randomized trial. *Acta Obstet Gynecol Scand* 78(6):493-500.
- Satin AJ, Maberry MC, Leveno KJ, Sherman ML, Kline DM (1992): Chorioamnionitis: a harbinger of dystocia. *Obstet Gynecol* 79(6):913-5.
- Schindler C, Levy DE, Decker T (2007): JAK-STAT Signaling: From Interferons to Cytokines. *J Biol Chem* 282:20059-63.
- Schittny JC, Mund SI, Stampanoni M (2008): Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294(2):L246-54.
- Schmidt RF, Lang F, Thews G (2005): Physiologie des Menschen. Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Seehase M, Gantert M, Ladenburger A, Garnier Y, Kunzmann S, Thomas W, et al. (2011): Myocardial response in preterm fetal sheep exposed to systemic endotoxaemia. *Pediatr Res* 70(3):242-6.
- Serrano AG, Perez-Gil J (2006): Protein-lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system. *Chemistry and physics of lipids* 141(1-2):105-18.
- Severgnini M, Takahashi S, Rozo LM, Homer RJ, Kuhn C, Jhung JW, et al. (2004): Activation of the STAT pathway in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(6):L1282-92.

- Shen Y, Schlessinger K, Zhu X, Meffre E, Quimby F, Levy DE, et al. (2004): Essential role of STAT3 in postnatal survival and growth revealed by mice lacking STAT3 serine 727 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 24(1):407-19.
- Shim S-S, Romero R, Hong J-S, Park C-W, Jun JK, Kim BI, et al. (2004): Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 191(4):1339-45.
- Shimoya K, Taniguchi T, Matsuzaki N, Moriyama A, Murata Y, Kitajima H, et al. (2000): Chorioamnionitis decreased incidence of respiratory distress syndrome by elevating fetal interleukin-6 serum concentration. *Hum Reprod* 15(10):2234-40.
- Silver RM, Schwinger B, McGregor JA (1993): Interleukin-6 levels in amniotic fluid in normal and abnormal pregnancies: preeclampsia, small-for-gestational-age fetus, and premature labor. *Am J Obstet Gynecol* 169(5):1101-5.
- Soll RF, Blanco F (2001): Natural surfactant extract versus synthetic surfactant for neonatal respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* (2):CD000144.
- Southern EM (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98(3):503-17.
- Speer CP (2006): Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story. *Semin Fetal Neonatal Med* 11(5):354-62.
- Speer CP, Gahr M (2004): Pädiatrie, 2. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Speer CP, Götze B, Curstedt T, Robertson B (1991): Phagocytic functions and tumor necrosis factor secretion of human monocytes exposed to natural porcine surfactant (Curosurf). *Pediatr Res* 30(1):69-74.
- Stannigel H (1992): Current therapy of respiratory distress syndrome in the newborn infant. *Der Gynäkologe* 25(3):164-8.
- Stephanou A, Latchman DS (2005): Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth factors* 23(3):177-82.
- Stevenson DK, Verter J, Fanaroff AA, Oh W, Ehrenkranz RA, Shankaran S, et al. (2000): Sex differences in outcomes of very low birthweight infants: the newborn male disadvantage. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 83(3):F182-5.
- Subtil D, Tiberghien P, Devos P, Therby D, Leclerc G, Vaast P, et al. (2003): Immediate and delayed effects of antenatal corticosteroids on fetal heart rate: a randomized trial that compares betamethasone acetate and phosphate, betamethasone phosphate, and dexamethasone. *Am J Obstet Gynecol* 188(2):524-31.
- Szabo G, Kodys K, Miller-Graziano CL (1991): Elevated monocyte interleukin-6 (IL-6) production in immunosuppressed trauma patients. II. Downregulation by IL-4. *J Clin Immunol* 11(6):336-44.
- Takaro T, Parra SC, Peduzzi PN (1985): Anatomical relationships between type II pneumocytes and alveolar septal gaps in the human lung. *Anat Rec* 213(4):540-50.
- Tauscher MK, Berg D, Brockmann M, Seidenspinner S, Speer CP, Groneck P (2003): Association of histologic chorioamnionitis, increased levels of cord blood cytokines, and intracerebral hemorrhage in preterm neonates. *Biol Neonate* 83(3):166-70.

- Thews G, Vaupel P (2005): *Vegetative Physiologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Thomas W, Speer CP (2011): Chorioamnionitis: important risk factor or innocent bystander for neonatal outcome? *Neonatology* 99(3):177-87.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9):4350-4.
- Ueda T, Ikegami M, Rider ED, Jobe AH (1994): Distribution of surfactant and ventilation in surfactant-treated preterm lambs. *J Appl Physiol* (1985) 76(1):45-55.
- Van Iwaarden JF, Pikaar JC, Storm J, Brouwer E, Verhoef J, Oosting RS, et al. (1994): Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides. *Biochem J* 303 ( Pt 2):407-11.
- van Rozendaal BA, van Golde LM, Haagsman HP (2001): Localization and functions of SP-A and SP-D at mucosal surfaces. *Pediatric pathology & molecular medicine* 20(4):319-39.
- Veldhuizen R, Nag K, Orgeig S, Possmayer F (1998): The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim Biophys Acta* 1408(2-3):90-108.
- Villamor-Martinez E, Alvarez-Fuente M, Ghazi AMT, Degraeuwe P, Zimmermann LJI, Kramer BW, et al. (2019): Association of Chorioamnionitis With Bronchopulmonary Dysplasia Among Preterm Infants: A Systematic Review, Meta-analysis, and Metaregression. *JAMA network open* 2(11):e1914611.
- Vogtmann C, Ruckhaberle KE, Handrick W, Huckel D, Viehweg B (1993): Value of perinatal characteristics for diagnosis of perinatal infections. *Zentralblatt fur Gynäkologie* 115(2):61-7.
- Vorbroker DK, Profitt SA, Nogee LM, Whitsett JA (1995): Aberrant processing of surfactant protein C in hereditary SP-B deficiency. *Am J Physiol* 268(4 Pt 1):L647-56.
- Vrijlandt EJLE, Gerritsen J, Boezen HM, Grevink RG, Duiverman EJ (2006): Lung function and exercise capacity in young adults born prematurely. *Am J Respir Crit Care Med* 173(8):890-6.
- Wang JX, Norman RJ, Kristiansson P (2002): The effect of various infertility treatments on the risk of preterm birth. *Hum Reprod* 17(4):945-9.
- Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispé JR (1998): Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol* 275(1 Pt 1):L110-7.
- Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S (1996): Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics* 97(2):210-5.
- Watts DH, Krohn MA, Hillier SL, Eschenbach DA (1992): The association of occult amniotic fluid infection with gestational age and neonatal outcome among women in preterm labor. *Obstet Gynecol* 79(3):351-7.
- Weaver TE, Conkright JJ (2001): Function of surfactant proteins B and C. *Annu Rev Physiol* 63:555-78.
- Weaver TE, Whitsett JA (1991): Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins. *Biochem J* 273(Pt 2):249-64.



- Weeks JW, Reynolds L, Taylor D, Lewis J, Wan T, Gall SA (1997): Umbilical cord blood interleukin-6 levels and neonatal morbidity. *Obstet Gynecol* 90(5):815-8.
- Wendel DP, Taylor DG, Albertine KH, Keating MT, Li DY (2000): Impaired distal airway development in mice lacking elastin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23(3):320-6.
- Whitsett JA, Noguee LM, Weaver TE, Horowitz AD (1995): Human surfactant protein B: structure, function, regulation, and genetic disease. *Physiol Rev* 75(4):749-57.
- Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE (2010): Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annu Rev Med* 61:105-19.
- Wigglesworth JS, Desai R (1982): Is fetal respiratory function a major determinant of perinatal survival? *Lancet* 1(8266):264-7.
- Willems CH, Urlichs F, Seidenspinner S, Kunzmann S, Speer CP, Kramer BW (2012): Poractant alfa (Curosurf(R)) increases phagocytosis of apoptotic neutrophils by alveolar macrophages in vivo. *Respir Res* 13:17.
- Willet KE, Jobe AH, Ikegami M, Newnham J, Brennan S, Sly PD (2000): Antenatal endotoxin and glucocorticoid effects on lung morphometry in preterm lambs. *Pediatr Res* 48(6):782-8.
- Willet KE, McMenamin P, Pinkerton KE, Ikegami M, Jobe AH, Gurrin L, et al. (1999): Lung morphometry and collagen and elastin content: changes during normal development and after prenatal hormone exposure in sheep. *Pediatr Res* 45(5 Pt 1):615-25.
- Wolfs TGAM, Buurman WA, Zoer B, Moonen RMJ, Derikx JPM, Thuijls G, et al. (2009): Endotoxin induced chorioamnionitis prevents intestinal development during gestation in fetal sheep. *PLoS ONE* 4(6):e5837.
- Wolfs TGAM, Jellema RK, Turrisi G, Becucci E, Buonocore G, Kramer BW (2012): Inflammation-induced immune suppression of the fetus: a potential link between chorioamnionitis and postnatal early onset sepsis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 25 Suppl 1:8-11.
- Wright JR (2005): Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* 5(1):58-68.
- Yan C, Naltner A, Martin M, Naltner M, Fangman JM, Gurel O (2002): Transcriptional stimulation of the surfactant protein B gene by STAT3 in respiratory epithelial cells. *J Biol Chem* 277(13):10967-72.
- Yoon BH, Jun JK, Romero R, Park KH, Gomez R, Choi JH, et al. (1997): Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 177(1):19-26.
- Yoon BH, Romero R, Jun JK, Park KH, Park JD, Ghezzi F, et al. (1997): Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 177(4):825-30.
- Yoon BH, Romero R, Kim KS, Park JS, Ki SH, Kim BI, et al. (1999): A systemic fetal inflammatory response and the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 181(4):773-9.

- Yoon BH, Romero R, Park JS, Chang JW, Kim YA, Kim JC, et al. (1998): Microbial invasion of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* is associated with a robust host response in fetal, amniotic, and maternal compartments. *Am J Obstet Gynecol* 179(5):1254-60.
- Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim M, Oh SY, Kim CJ, et al. (2000): The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin 6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 183(5):1124-9.
- Zeltner TB, Burri PH (1987): The postnatal development and growth of the human lung. II. Morphology. *Respir Physiol* 67(3):269-82.
- Zeltner TB, Caduff JH, Gehr P, Pfenninger J, Burri PH (1987): The postnatal development and growth of the human lung. I. Morphometry. *Respir Physiol* 67(3):247-67.
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. (1994): Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* (80- ) 264(5155):95-8.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überlebenschance eines Frühgeborenen in Prozent in Abhängigkeit vom Gestationsalter .....	2
Abbildung 2: Die Stadien der Lungenentwicklung des Menschen.....	4
Abbildung 3: Lunge eines Feten im pseudoglandulären Stadium.....	5
Abbildung 4: Lunge eines Feten im kanalikulären Stadium.....	6
Abbildung 5: Lunge eines Feten im sakkulären Stadium .....	7
Abbildung 6: Primäres Septum im sakkulären Stadium .....	8
Abbildung 7: Klassische Alveolarisation mit beginnender Bildung sekundärer Septen.....	9
Abbildung 8: Teilung bestehender Lufträume durch Reifung der Alveolarepten .....	9
Abbildung 9: Fusion der Kapillarnetze zu einer einschichtigen Alveolarwand im Rahmen der mikrovaskulären Reifung .....	10
Abbildung 10: Späte Alveolarisation.....	11
Abbildung 11: Negative Einflussfaktoren auf die Alveolarisation.....	13
Abbildung 12: Prä- und postnatale Einflüsse, die zu einer gestörten Entwicklung der Lunge führen, protektive Einflussfaktoren und Reparaturmechanismen.....	14
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Luft-Blut-Schranke.....	16
Abbildung 14: Intraalveolärer Luftstrom ohne und mit Surfactantfilm .....	17
Abbildung 15: Die Chorioamnionitis als Multiorganerkrankung des Feten .....	20
Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Aufnahme der alveolären Struktur einer reifen Lunge und der Struktur einer an einem Surfactantmangel-syndrom erkrankten Lunge .....	21
Abbildung 17: Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants.....	31
Abbildung 18: Interleukin-6 - STAT-3 - Signalweg .....	38
Abbildung 19: Auswirkungen von Lipopolysaccharid-Gaben in Abhängigkeit der Häufigkeit auf den Fetus. ....	40
Abbildung 20: Vergleich der intrauterinen Lungenentwicklung von Mensch und Schaf .....	41
Abbildung 21: Instrumentation der fetalen Schafe.....	46
Abbildung 22: Design des Experiments .....	47
Abbildung 23: Versuchsaufbau zur Bestimmung der Compliance der fetalen Lunge ...	48
Abbildung 24: Schema eines Sandwich-ELISA zur Detektion von IL-6.....	51
Abbildung 25: Schema eines Western Blots zur Detektion von SP-B .....	52

Abbildung 26: Schema einer immunhistochemischen Färbung mittels der LSAB-Methode .....	57
Abbildung 27: Intrauterin gemessene fetale Vitalparameter eine Stunde vor bis 72 Stunden nach Versuchsbeginn.....	61
Abbildung 28: Compliance der fetalen Lunge .....	63
Abbildung 29: Morphologische Veränderungen im Lungengewebe.....	64
Abbildung 30: Alveolarwanddurchmesser im fetalen Lungengewebe.....	65
Abbildung 31: Elastinverteilung im fetalen Lungengewebe .....	66
Abbildung 32: Regulär verteiltes Elastin im fetalen Lungengewebe .....	67
Abbildung 33: Zellproliferation im Lungengewebe.....	68
Abbildung 34: Semiquantitative Analyse der Zellproliferation im fetalen Lungengewebe .....	69
Abbildung 35: STAT-3 in der fetalen Lunge .....	70
Abbildung 36: Semiquantitative Analyse des STAT-3 im Lungengewebe.....	71
Abbildung 37: Ser727-phosphoryliertes STAT-3 in der fetalen Lunge .....	72
Abbildung 38: Semiquantitative Analyse des Ser727-phosphorylierten STAT-3 im Lungengewebe .....	73
Abbildung 39: Tyr705-phosphoryliertes STAT-3 in der fetalen Lunge.....	74
Abbildung 40: Semiquantitative Analyse des Tyr705-phosphorylierten STAT-3 im Lungengewebe .....	75
Abbildung 41: Gesamtproteinmenge in der BAL als Marker für eine kapilläre Leckage .....	76
Abbildung 42: Interleukin-6 in der BAL.....	76
Abbildung 43: Surfactantprotein B in der BAL .....	77
Abbildung 44: Quantifizierung von Surfactantprotein B in der BAL.....	78
Abbildung 45: Surfactantprotein B im Lungengewebe.....	79
Abbildung 46: Semiquantitative Analyse von SP-B im Lungengewebe.....	80

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Auszug möglicher Ursachen einer Frühgeburt. ....	1
Tabelle 2: Zeitliche Abfolge der Stadien der prä- und postnatalen Lungen- entwicklung des Menschen .....	3
Tabelle 3: Positive und negative Einflüsse von maternal injizierten Glukokorti- koiden bei drohender Frühgeburt. ....	25
Tabelle 4: Vergleich der klassischen und der neuen BPD .....	27
Tabelle 5: Auflistung der in der Immunhistochemie verwendeten primären Anti- körper mit der jeweiligen Verdünnung und Inkubationszeit.....	58
Tabelle 6: Fetales Körpergewicht nach Sectio.....	62

## Abkürzungen

Abb. ....	Abbildung
ABC-Methode .....	Avidin-Biotin-Cytochemische Methode
BAL .....	Bronchoalveoläre Lavage
BPD .....	Bronchopulmonale Dysplasie
BSA .....	Bovines Serumalbumin
cm .....	Zentimeter
CO <sub>2</sub> .....	Kohlenstoffdioxid
Cu <sup>2+</sup> .....	Kupfer
DAB .....	Diaminobenzidin
ELISA .....	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FIRS .....	Fetal Inflammatory Response Syndrome
FRC .....	funktionelle Residualkapazität
g .....	Gramm
H <sub>2</sub> O .....	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Wasserstoffperoxid
HRP .....	Horseradish Peroxidase
IE .....	Internationale Einheiten
IGF .....	Insulin-like Growth Factor
IL .....	Interleukin
JAK .....	Januskinase
kDa .....	Kilodalton
kg .....	Kilogramm
KG .....	Körpergewicht
l .....	Liter
LBP .....	Lipopolysaccharid-bindendes-Protein
LPS .....	Lipopolysaccharid
LSAB-Methode .....	Labelled Streptavidin Biotin-Methode
µg .....	Mikrogramm
mg .....	Milligramm

µl.....	Mikroliter
ml.....	Milliliter
µm.....	Mikrometer
mm.....	Millimeter
N.....	Normalität, Äquivalentkonzentration
NaOH.....	Natriumhydroxid
nm.....	Nanometer
O <sub>2</sub> .....	Sauerstoff
PBS.....	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
PDGF.....	Platelet-Derived Growth Factor
PVDF.....	Polyvinylfluorid
RDS.....	respiratory distress syndrome
s.....	siehe
S.....	Seite
SD.....	Standardabweichung
SDS.....	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid
SEM.....	Standardfehler
SP.....	Surfactantprotein
STAT.....	Signal Transducer and Activator of Transcription
Tab.....	Tabelle
TBS.....	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung
TNF.....	Tumor Nekrose Faktor
V.....	Volt
VLBW.....	very low birthweight infants
WHO.....	World Health Organisation

## **Danksagung**

Mein erster Dank gilt Professor Dr. med. Boris Kramer für die Überlassung des Themas, die langjährige Unterstützung und insbesondere für seinen Einsatz im Rahmen des Promotionsverfahrens. Nicht vergessen möchte ich auch seine Frau Susanne und seine drei Kinder Maximilian, Sophie und Benjamin, die mich auf ihre charmante Art stetig motiviert haben, diese Arbeit fertig zu stellen.

Ich danke auch Herrn Professor Dr. med. Christian Speer für die Möglichkeit, mit seinem Team unter hervorragenden Bedingungen in seinen Laboratorien über mehrere Jahre gearbeitet haben zu dürfen.

Für die ausgezeichnete technische Unterstützung danke ich Frau Michaela Kapp, Frau Silvia Seidenspinner, Frau Barbara Ottensmeier, Frau Margret Wechner und Frau Daniele Herbst.

Im Besonderen bedanken möchte ich mich für die zahlreichen inhaltlichen Diskussionen und Anleitungen bei der Durchführung verschiedener Experimente durch Herrn Professor Dr. med. Steffen Kunzmann und Frau Professorin Dr. rer. hum. biol. Ulrike Kämmerer.

Den Kollegen Herrn Privatdozent Dr. med. Yves Garnier und Dr. med. Markus Gantert danke ich ebenso wie dem ganzen Team an der Experimentellen Perinatologie der Universität Maastricht für die Durchführung des tierexperimentellen Teils dieser Arbeit. Herrn Dr. med. Matthias Hütten danke ich für das kritische Lesen der Arbeit und die zahlreichen hieraus resultierenden Anregungen.

Frau Renate Will danke ich für das ausführliche Lektorat der Arbeit.

Insbesondere Danken möchte ich meiner lieben Verlobten für ihre große organisatorische und emotionale Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Dissertationsschrift. Ihr ist diese Arbeit gewidmet.

Frau Professorin Dr. med. Christine Wulff danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Nicht vergessen möchte ich meine Eltern, die durch ihre moralische und finanzielle Unterstützung einen großen Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit haben.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Ladenburger  
Vorname: Andreas  
Nationalität: Deutsch

## Schulische Ausbildung:

27.06.2000 Abitur am Theodor-Heuss-Gymnasium, Aalen

## Zivildienst:

01.07.2000-30.04.2001 Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz Aalen

## Hochschulstudium:

04/2001-09/2003 Vorklinisches Studium der Humanmedizin  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

10/2003-06/2008 Klinisches Studium der Humanmedizin  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

05.06.2008 Erteilung der Approbation als Arzt

## Ärztliche Tätigkeit:

11/2008-02/2010 Wissenschaftlicher Assistenzarzt der Klinik für  
Orthopädie und Unfallchirurgie der RWTH Aachen  
Schwerpunkt Orthopädie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. F. U. Niethard

03/2011-05/2013 Assistenzarzt der Orthopädischen Klinik  
König-Ludwig-Haus Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Rudert

03/2013-09/2018 Assistenzarzt der Chirurgischen Klinik II  
des Sana Klinikums Offenbach

05.04.2017 Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie

seit 10/2018 Oberarzt der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädische  
Chirurgie des Sana Klinikums Offenbach  
Chefarzt: Priv.-Doz. Dr. med. R. M. Sellei

07.04.2021 Erwerb der Zusatzbezeichnung Spezielle Unfallchirurgie