

**Lungenmechanische Charakterisierung von  
heterozygoten *ABCA3*-Knockout-Mäusen**

**Marceline Huppmann**



**Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik  
im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. C. Klein**

**Lungenmechanische Charakterisierung von  
heterozygoten *ABCA3*-Knockout-Mäusen**

**Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München  
vorgelegt von**

**Marceline Huppmann  
aus  
München  
2011**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Andreas W. Flemmer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Rainer Kozlik-Feldmann  
Prof. Dr. med. Josef Rosenecker

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Susanne Herber-Jonat

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2011

Für meine Eltern

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Atemnotsyndrom des Früh- und Neugeborenen	1
1.2	Lungenentwicklung	2
1.2.1	Morphologie	2
1.2.2	Beginn der Surfactantproduktion	3
1.3	Surfactant	4
1.3.1	Entdeckung des Surfactant	4
1.3.2	Zusammensetzung des Surfactant	5
1.3.3	Funktionen des Surfactant	6
1.3.4	Produktion und Prozessierung des Surfactant	7
1.4	<i>ABC</i> -Transporter	8
1.4.1	<i>ABC</i> -Transporterprotein	8
1.4.2	<i>ABCA3</i> -Transporter	9
1.5	<i>ABCA3</i> -Defekte	12
1.5.1	Letal verlaufende Mutationen	12
1.5.2	Nicht letal verlaufende Mutationen	13
1.6	Das Tiermodell der <i>ABCA3</i> -Knockout-Maus	15
1.7	Tierversuch und Fragestellung	17
1.8	Zusammenfassung	18
<b>2</b>	<b>Methodik</b>	<b>19</b>
2.1	Genehmigung des Tierversuchs	19
2.2	Studienplanung	19

2.3	Biometrische Planung	20
2.3.1	Voraussetzungen	20
2.3.2	Fallzahlberechnung für die lungenmechanischen Untersuchungen	21
2.3.2.1	Erster Versuchsabschnitt	21
2.3.2.2	Zweiter Versuchsabschnitt	22
2.3.3	Gesamtanzahl	23
2.4	Tierversuch	23
2.4.1	Versuchstiere	23
2.4.1.1	Züchtung und Haltung	23
2.4.1.2	Anatomie der Lunge	24
2.4.2	Versuchsvorbereitung	25
2.4.2.1	Sauerstoffprovokation	25
2.4.2.2	Vorbereitung des Tieres und Narkose	25
2.4.2.3	Tracheotomie	25
2.4.2.4	Überwachung der Vitalparameter	26
2.4.3	Durchführung des Versuchs	26
2.4.3.1	Überwachung während der Beatmung	26
2.4.3.2	Beatmung und zeitlicher Ablauf der lungenmechanischen Untersuchungen	26
2.4.4	Gewinnung von Analyse-Material	27
2.4.4.1	Präparation der Lunge	27
2.4.4.2	Lavage und Entnahme von Lunge und Niere	27
2.5	Respirator	28
2.5.1	Beschreibung des Respirators	28
2.5.2	Zwei-Punkt-Kalibration des Respirators	31
2.6	Lungenmechanik	32
2.6.1	Klassische Lungenmechanik	32
2.6.1.1	Modell erster Ordnung	32
2.6.1.2	Resistance	33
2.6.1.3	Elastance und Compliance	33
2.6.1.4	Berechnung des resultierenden Inspirationsdrucks	34
2.6.1.5	Druck-Volumen-Kurve	35
2.6.1.6	Hysterese	36
2.6.1.7	Atemarbeit	37
2.6.1.8	Atemmechanische Kopplung von Resistance und Compliance	37
2.6.2	Oszillationstechniken	38
2.6.2.1	Forcierte Oszillationstechnik	38
2.6.2.2	Viskosität und Viskoelastizität	39
2.6.2.3	Das viskoelastische Modell	39
2.6.2.4	Impedance	40
2.6.2.5	Fast Fourier Transformation	41
2.6.2.6	Das Konstante-Phase-Modell	42

2.7	Durchführung der Messungen und Berechnung der Daten	44
2.7.1	Tiefe Inflation zur Bestimmung der totalen Lungenkapazität TLC	44
2.7.2	Sinusoidaler Atemzug zur Bestimmung von dynamischer Compliance und dynamischer Resistance	44
2.7.3	Druck-Volumen-Schleife zur Bestimmung der statischen Compliance und der statischen Resistance	46
2.7.4	Forcierte Oszillationstechnik zur Bestimmung der Impedance	48
2.8	Materialverarbeitung	50
2.8.1	Histologie	50
2.8.1.1	Erstellung histologischer Präparate	50
2.8.1.2	Histologische Untersuchung	50
2.8.1.3	Bestimmung der mittleren Sehnenlänge der Alveolen	51
2.8.2	Bestimmung des Quotienten Feucht-/Trockengewicht	52
2.8.3	Analyse der Lavage	52
2.8.3.1	Zytologie	52
2.8.3.2	Entzündungsmediatoren	52
2.8.3.2.1	Pathophysiologie	52
2.8.3.2.2	Bio-Plex <sup>®</sup> Immunoassay	53
2.8.3.3	Bestimmung des Proteingehalts nach der Bradford-Methode	54
2.9	Erstellung der Datenbank und statistische Auswertung	55
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
3.1	Versuchstiere	57
3.1.1	Anzahl der untersuchten Tiere	57
3.1.2	Geschlecht, Alter und Gewicht der Versuchstiere	59
3.2	Versuchsdurchführung	59
3.2.1	Probleme bei den Versuchen und der Materialgewinnung	59
3.2.2	Kontrolle der Beatmung	60
3.3	Lungenmechanik	61
3.3.1	Schwierigkeiten bei der Bestimmung lungenmechanischer Parameter	61
3.3.2	Zeitlicher Verlauf der lungenmechanischen Parameter	62
3.3.3	Lungenmechanik bei beiden Genotypen innerhalb der Therapiegruppen	67
3.3.4	Veränderungen der Lungenmechanik bei beiden Genotypen nach Sauerstoffprovokation	68

3.4	Pathologische Untersuchungen	71
3.4.1	Quotient Feucht-/Trockengewicht	71
3.4.2	Histologische Untersuchung	74
3.4.2.1	Probleme bei der histologischen Untersuchung	74
3.4.2.2	Mittlere Sehnenlänge der Alveolen	75
3.5	Biochemische Untersuchungen	77
3.5.1	Bronchoalveoläre Lavage	77
3.5.2	Leukozytenzahl in der bronchoalveolären Lavage	78
3.5.3	Zelldifferenzierung	82
3.5.4	Gesamtprotein in der bronchoalveolären Lavage	87
3.5.5	Interleukinbestimmungen in der bronchoalveolären Lavage	90
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>95</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>110</b>
6.1	Versuchsprotokoll	110
6.2	Berechnungen zur Inertance	111
6.3	Lungenmechanische Begriffe	112
6.4	Abkürzungsverzeichnis	113
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>115</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>121</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Atemnotsyndrom des Früh- und Neugeborenen

Bis zur Mitte des letzten Jahrhunderts galten Früh- und Neugeborene unter 1500 g in der Regel als nicht überlebensfähig. Die einzige Therapie bestand in der Zufuhr von Wärme und der Ernährung der Kinder. Durch die Einführung von Antibiotika, der Entwicklung von spezifischen Beatmungsmethoden und von Frühgeborenenernährung stieg die Überlebenswahrscheinlichkeit der Frühgeborenen in den folgenden Jahrzehnten deutlich an (Taeusch 2005).

Bei extrem frühgeborenen Kindern steht heute das respiratorische Versagen im Vordergrund. Klassische Ursache beim unreifen Frühgeborenen mit einem Gestationsalter unter 34 Wochen ist das **Atemnotsyndrom (ANS)** oder „**respiratory distress syndrome**“ (RDS). Ca. 1% aller reifen Neugeborenen ist von einem RDS betroffen. Nach Sectio tritt das RDS häufiger auf (Fedrick and Butler 1972). Ohne Therapie liegt die Inzidenz für Frühgeborene < 28 SSW bei 80%, bei Frühgeborenen > 28 SSW bei ca. 60% (Usher, Allen et al. 1971; Farrell and Avery 1975). 1972 zeigten Liggins et al. erstmals, dass die antenatale Gabe von Glucocorticoiden bei drohender Frühgeburt < 32 SSW die Inzidenz für das RDS signifikant reduziert (Liggins and Howie 1972). Nach weiteren Studien (Fargier, Salle et al. 1974; Wong, Beardsmore et al. 1982; Strittmatter, Wischnik et al. 1992) wurden 1995 von den National Institutes of Health Empfehlungen zur Anwendung von Corticosteroiden bei drohender Frühgeburtlichkeit herausgegeben (NIH Consensus Conference 1995). In der Folge sank die Inzidenz des RDS: Sie wird heute für Frühgeborene < 30 SSW mit 35%, für Frühgeborene mit 30 bis 34 SSW mit 25% und für Frühgeborene > 34 SSW mit < 5% angegeben (Robertson 2005).

Beim Frühgeborenen ist das RDS primär durch die morphologische und funktionelle Unreife der Lunge, die mit eingeschränkter Surfactant-Produktion einhergeht, bedingt. Beim Reifgeborenen entsteht das RDS durch eine Störung der Surfactant-Homöostase. Schwere Infektionen, Schock-Symptomatik oder eine

Mekoniumaspiration führen zu einem Ungleichgewicht zwischen Surfactant-Produktion und Verbrauch. Weiterhin müssen für das RDS beim Reifgeborenen auch genetische Ursachen genannt werden. Hierzu zählen Genmutationen, die z. B. zu funktionslosen oder fehlenden Surfactant-Proteinen B und C führen, sowie Mutationen, die einen Defekt im *ABCA3*-Transporterprotein verursachen und zu einer Dysregulation der Surfactant-Homöostase führen (Somaschini, Noguee et al. 2007). Ein Teil der Fälle des RDS beim Neugeborenen ist pathophysiologisch noch ungeklärt.

## **1.2 Lungenentwicklung**

### **1.2.1 Morphologie**

Beim Frühgeborenen besteht eine morphologische und funktionelle Unreife der Lunge. In der 23. und 24. Schwangerschaftswoche, die dem Beginn der Lebensfähigkeit entspricht, befindet sich die Lunge entwicklungsmorphologisch gesehen am Ende der kanalikulären Phase. Diese Phase beginnt bereits in der 16. Schwangerschaftswoche und dauert bis zur 26. Schwangerschaftswoche an (Burri 2006). Sie ist gekennzeichnet durch das Einsprossen von Kapillaren in das Mesenchym und die Bildung der Blut-Luft-Schranke (Wigglesworth 1988; Roth-Kleiner and Post 2003).

Noch vor Abschluss der kanalikulären Phase beginnt nach der 24. Schwangerschaftswoche die sakkuläre Phase (Burri 2006). In dieser Phase bilden sich traubenartige Aussackungen an den Enden des Lungenbaumes (Wigglesworth 1988). Diese Sacculi sind mit glattwandigen Typ-I- und Typ-II-Pneumozyten ausgekleidet. An den Spitzen der noch verdickten, sog. primären Septen können jetzt elastische Fasern nachgewiesen werden (Roth-Kleiner and Post 2003). Mit fortschreitender Entwicklung wird das Interstitium dünner und der Gasaustausch verbessert.

Ab der 36. Schwangerschaftswoche differenzieren sich diese Sacculi, parallel zu ihrer weiteren Neubildung, zu Alveolen (Burri 2006). Bei Geburt am Termin hat ein Neugeborenes < 50 Millionen Alveoli (Langston, Kida et al. 1984). Der Alveolarisierungsprozess setzt sich in den ersten Lebensjahren fort, so dass mit ca. acht Jahren die Lunge aus > 300 Millionen Alveolen besteht (Davies and Reid 1970).

Damit ist die Alveolisierung hauptsächlich ein postnataler Prozess mit Schwerpunkt in den ersten beiden Lebensjahren (Burri 2006).

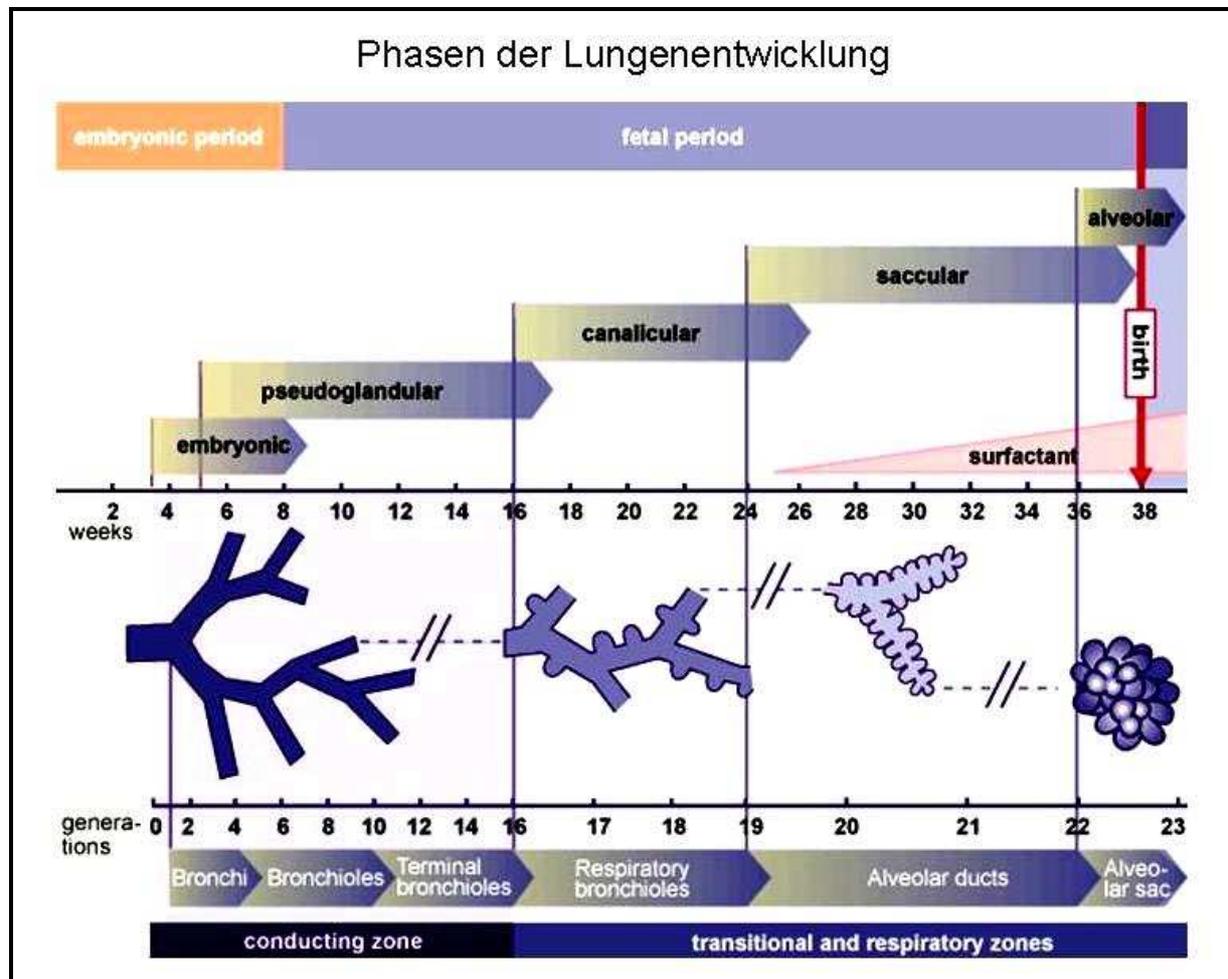


Abb. 1: Phasen der Lungenentwicklung zwischen 4. Schwangerschaftswoche und Geburt am Termin (<http://embryology.ch/allemand/rrespiratory/phasen07.html>; 08.12.2010)

### 1.2.2 Beginn der Surfactantproduktion

Mit 23 bis 24 Schwangerschaftswochen beginnt während der kanalikulären Phase die Differenzierung des respiratorischen Epithels in Pneumozyten Typ I und Typ II (Wigglesworth 1988). Die Pneumozyten Typ II nehmen langsam die Produktion von Surfactant auf (Roth-Kleiner and Post 2003). Die Surfactant-Konzentration des extrem Frühgeborenen ist noch niedrig und unterscheidet sich deutlich von der Surfactant-Konzentration eines am Termin geborenen Kindes (Bustos, Kulovich et al. 1979).

## 1.3 Surfactant

### 1.3.1 Entdeckung des Surfactant

Surfactant (engl.: **surface active agent**) ist ein Gemisch aus verschiedenen Phospholipiden und Proteinen im Verhältnis 10:1 (Griese 1999). Es wird in der Lunge von den Pneumozyten Typ II gebildet und führt u. a. zu einer Herabsetzung der Oberflächenspannung und damit zu besserer Entfaltung und erhöhter Compliance der Lunge.

Die ersten Forschungsergebnisse von Untersuchungen an Lungen von Frühgeborenen, die an einem Atemnotsyndrom verstorben waren, wurden bereits 1959 von Mary Ellen Avery und Jere Mead publiziert. Sie belegten erstmals, dass das morphologische Korrelat des ANS, das hyaline Membransyndrom, mit dem Mangel einer Substanz assoziiert war, die die Oberflächenspannung der Alveolen reduzierte (Avery and Mead 1959). Mit der Entdeckung dieser Substanz, die später Surfactant genannt wurde, war der Grundstein für die Erforschung des Surfactant-Systems gelegt. Die ersten erfolgreichen Therapieversuche mit Surfactant *in vivo* wurden 1972 an beatmeten frühgeborenen Kaninchen durchgeführt. Diese zeigten nach Instillation von Surfactant eine nahezu normale Lungenfunktion (Enhorning and Robertson 1972). 1980 wurden von Fujiwara et al. zum ersten Mal lebende humane Frühgeborene mit einem manifesten Atemnotsyndrom intratracheal mit Surfactant behandelt (Fujiwara, Maeta et al. 1980). Diese Therapie führte zu einer deutlichen Verbesserung des pulmonalen Gasaustausches. In den folgenden 20 Jahren wurden mehr als 10.000 Frühgeborene im Rahmen vieler Studien mit verschiedenen Surfactant-Präparaten behandelt, mit dem Ziel eine optimale Behandlungsstrategie bzgl. Dosis, Prophylaxe und Therapie zu definieren (Morley and Morley 1990; Kendig, Notter et al. 1991; Kattwinkel, Bloom et al. 1993; Courtney, Long et al. 1995; McMillan, Chernick et al. 1995; Sauve, Long et al. 1995; Walti, Paris-Llado et al. 1995; Bevilacqua, Parmigiani et al. 1996). Außerhalb von Studien wurde Surfactant in der Neonatologie seit Ende der 1980er Jahre auch therapeutisch eingesetzt. Mittels einer prophylaktischen Therapie konnten akute pulmonale Komplikationen von beatmeten Frühgeborenen um ca. zwei Drittel reduziert und die Sterblichkeit nahezu halbiert werden (Speer 2002).

### 1.3.2 Zusammensetzung des Surfactant

Den wesentlichen Anteil der Phospholipide im Surfactant macht Phosphatidylcholin aus, das zu mindestens 65% in gesättigter Form als Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) vorliegt (Griese 1999).

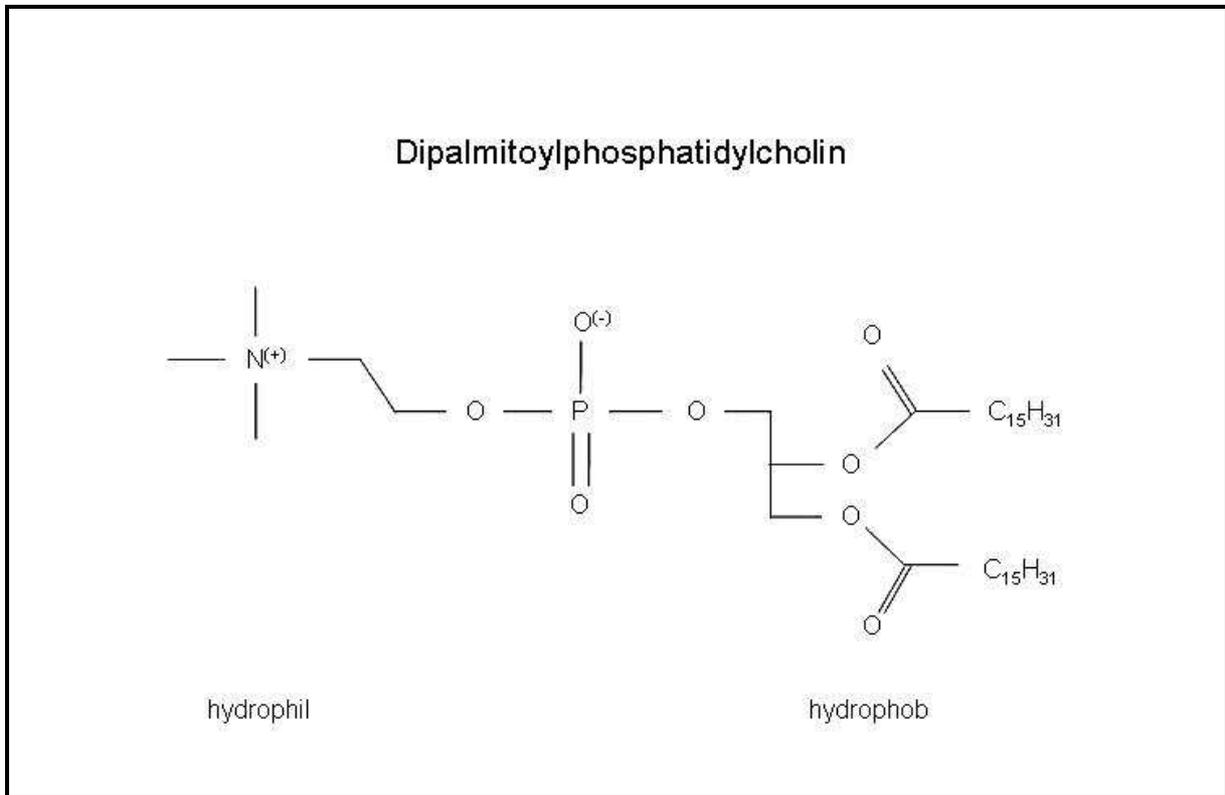


Abb. 2: Strukturformel von Dipalmitoylphosphatidylcholin DPPC (Nandi and Vollhardt 2002); Zeichnung modifiziert;

Weitere im Surfactant enthaltene Phospholipide sind Phosphatidylglycerol mit ca. 10% und geringe Mengen von Phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Sphingomyelin (Notter 1984; Creuwels, van Golde et al. 1997).

Zu den Proteinen, die im Surfactant enthalten sind, zählen, neben Serumproteinen, die sog. Surfactantproteine SP-A, SP-B, SP-C und SP-D. Diese Surfactantproteine werden in zwei Gruppen eingeteilt:

- die hydrophilen Surfactantproteine SP-A und SP-D und
- die hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C.

### Struktur der Surfactantproteine

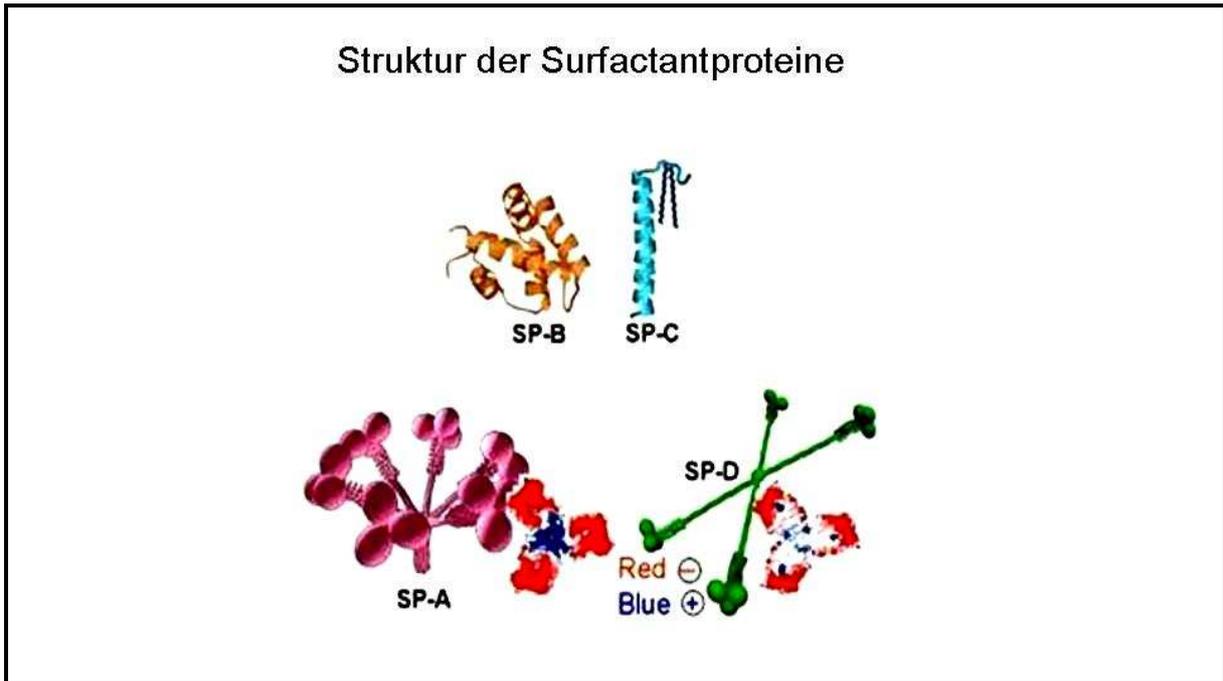


Abb. 3: Struktur der Surfactantproteine SP-A, SP-B, SP-C und SP-D (modifiziert nach <http://www.ucm.es/info/respira/index.php?sec=Overview+of+Lung+Surfactant>; 08.12.2010);

#### 1.3.3 Funktionen des Surfactant

Surfactant hat immunologische und biophysikalische Funktionen. An der immunologischen Funktion sind vor allem SP-A und SP-D beteiligt. Beide Proteine opsonieren verschiedene Erreger und Viren, wie z. B. *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* (nur unbekapselt), Staphylokokken, Pneumokokken, A-Streptokokken, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii* und *Cryptococcus neoformans* (Epstein, Eichbaum et al. 1996; Wright 2005). SP-A und SP-D modulieren die Phagozytose, die Chemotaxis und den oxidativen Burst (Freisetzung von Sauerstoffradikalen) der Makrophagen (Wright 2005). Außerdem binden beide Surfactantproteine bakterielle Toxine (Griese 1999). Die Surfactant-Phospholipide unterdrücken Proliferation, Immunglobulinproduktion und Zytotoxizität von Lymphozyten und hemmen die endotoxin-vermittelte Zytokinfreisetzung (TNF, Il-1 und Il-6) aus Makrophagen (Griese 1999).

Die biophysikalischen Funktionen des Surfactant beruhen vor allem auf dem Hauptanteil der Phospholipide, dem Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC). Diese amphiphilen Moleküle richten sich mit ihrem hydrophoben Fettsäureschwanz und der hydrophilen Kopfgruppe zwischen wässriger Phase und Gasphase aus. Die Adsorption der Lipide an die Luft-Flüssigkeit-Grenzschicht wird durch die

Surfactantproteine SP-B und SP-C beschleunigt (Weaver and Conkright 2001). Vor allem SP-B spielt hier eine wesentliche Rolle, da es die Adsorptionsrate um mehr als den Faktor 150 steigert (Griese 1999). Sind die DPPC-Moleküle in der Alveole eng gepackt, wird ein direkter Kontakt zwischen Luft und Flüssigkeit verhindert. Damit wird die Oberflächenspannung an der Phasengrenzfläche reduziert.

#### **1.3.4 Produktion und Prozessierung des Surfactant**

Die Phosphatidylcholine des Surfactant werden im endoplasmatischen Retikulum der Pneumozyten Typ II synthetisiert. Anschließend werden die Phosphatidylcholine in Vesikeln über den Golgi-Apparat zu den Lamellarkörperchen transportiert. Die Lamellarkörperchen sind die Speicher- und Sekretionsorganellen der Zelle. Ein durchschnittlicher Pneumozyt Typ II enthält  $150 \pm 30$  dieser Zellorganellen (Mulugeta, Gray et al. 2002). In den Lamellarkörperchen werden die Surfactant assoziierten Lipide und die Surfactantproteine SP-B und SP-C in dicht gepackten Lamellen gespeichert (s. Abb. 6). Die Lamellarkörperchen regulieren die Homöostase des Surfactant-Systems durch Exozytose von Surfactant in die Alveolen. SP-A wird unabhängig von den Lipiden sezerniert.

Im Gegensatz zur Synthese der Surfactant-Phospholipide ist der intrazelluläre Transport der Phospholipide nicht vollständig bekannt. In Säugetierlungen konnten verschiedene Protein-Transferproteine nachgewiesen werden, die wahrscheinlich als Transporter fungieren (Lumb 1989; Kaushal, Ghosh et al. 2001). Unter anderem konnte der *ABCA3*-Transporter, ein *ABC*-Transporter der Subklasse A, auf der Membran der Lamellarkörperchen der Pneumozyten Typ II nachgewiesen werden (Yamano, Funahashi et al. 2001; Mulugeta, Gray et al. 2002).

## 1.4 ABC-Transporter

### 1.4.1 ABC-Transporterprotein

Der *ABCA3*-Transporter gehört mit über 40 anderen Proteinen zur *ABC*-Superfamilie, der größten bekannten Transporterprotein-Familie (Dean, Hamon et al. 2001). Diese Membranproteine besitzen unter anderem eine ATP bindende Kasette (**ATP binding cassette**), die ihnen ihren Namen gegeben hat. Sie transportieren spezifische Substrate, vor allem hydrophobe Komponenten, durch die Zellmembran oder durch die Membranen von Zellorganellen, wie z. B. des endoplasmatischen Retikulums, der Peroxisomen und der Mitochondrien. Diese Transporter kommen bei Bakterien, bei Pflanzen und im Tierreich vor. Sie sind unter anderem verantwortlich für Resistenzen gegen Antibiotika (Dean, Hamon et al. 2001), Antimykotika (Schuetzer-Muehlbauer, Willinger et al. 2003) und Herbizide (Yuan, Tranel et al. 2007). Beim Menschen sind *ABC*-Transporter in nahezu allen Organen nachgewiesen worden (Dean, Rzhetsky et al. 2001; Abe-Dohmae, Ueda et al. 2006). In Tumorgewebe werden *ABC*-Transporter häufig stark exprimiert und können so ein Fehlschlagen der Chemotherapie verursachen (Klugbauer and Hofmann 1996; Gomes, van Paassen et al. 2006; Huang and Sadee 2006).

Fast alle *ABC*-Transporter sind unidirektional und führen einen aktiven und damit ATP-abhängigen gerichteten Transport durch. Bislang weiß man nur von wenigen Ausnahmen eines ATP-unabhängigen Transports. Am bekanntesten ist der *ABCC7*-Transporter, auch Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) genannt. *ABCC7* ist ein *ABC*-Transporter der Subklasse C und ist ein cAMP-regulierter Chlorid-Ionen-Kanal (Quinton 1999), dessen Mutation zur Zystischen Fibrose führt.

Die Subklasse der humanen *ABCA*-Transporter sind Monomere, die sich jeweils aus zwei transmembranalen hydrophoben Domänen und zwei hydrophilen ATP-bindenden Kassetten zusammensetzen. Die transmembranale Komponente besteht aus sechs membranumspannenden  $\alpha$ -Helices und bestimmt die Substratspezifität. Die ATP-bindenden Kassetten sind im Zytoplasma lokalisiert und liefern durch die Hydrolyse von ATP die für den transmembranalen Transport der Substrate benötigte Energie (Matsumura, Ban et al. 2006). Eine hydrophobe Schleife zwischen der ersten ATP-bindenden Kasette und der zweiten transmembranalen Domäne, die tief in die Membran eintaucht, ist ein typisches Merkmal der Subfamilie der *ABCA*-

Transporter, insbesondere für die *ABCA1*-, *ABCA2*- und *ABCA3*-Transporter (Albrecht and Viturro 2007).

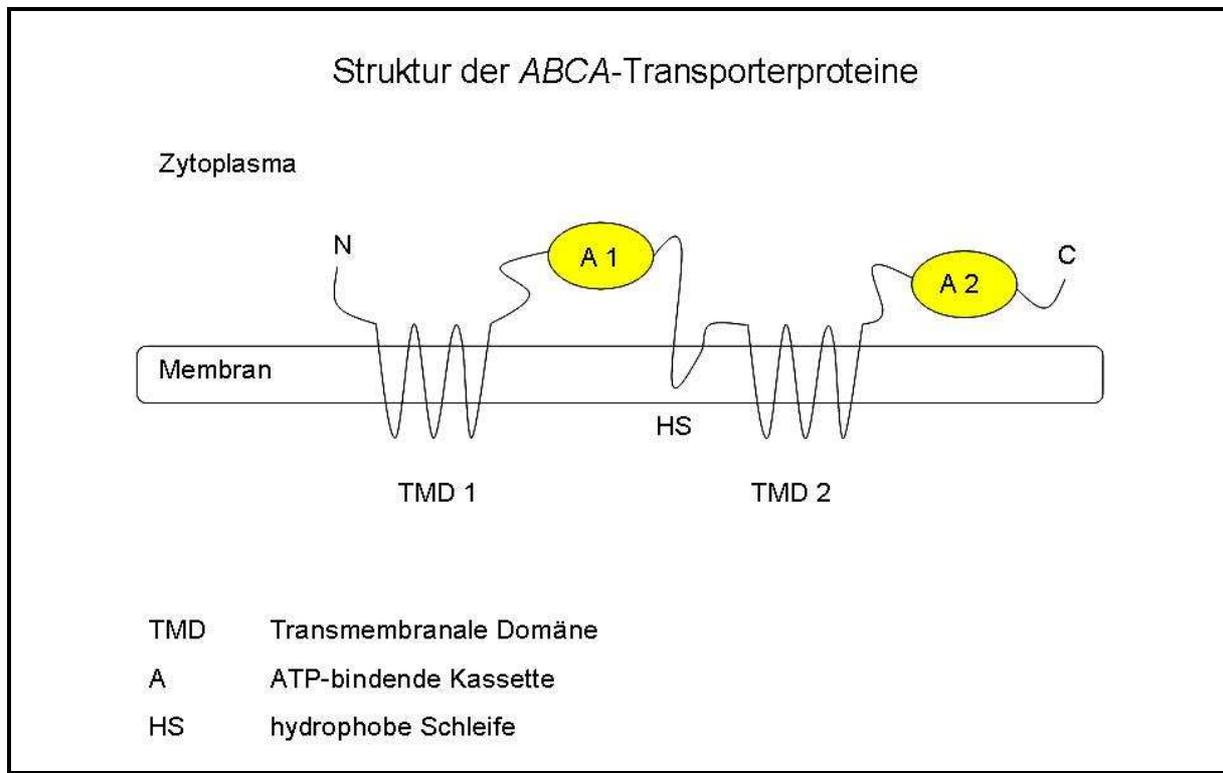


Abb. 4: Struktur der *ABCA*-Transporterproteine (Albrecht and Viturro 2007); Zeichnung modifiziert;

#### 1.4.2 *ABCA3*-Transporter

Das *ABCA3*-Transporterprotein besteht aus 1704 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa. Das Protein wird von einem einzelnen Gen, dem *ABCA3*-Gen, codiert, das auf dem Chromosom 16p13.3 lokalisiert ist (Connors, Van Raay et al. 1997; Albrecht and Viturro 2007). Das Gen besteht aus über 80.000 Nukleotid-Basenpaaren und enthält 33 Exons. Es wird transkribiert in eine 6.500 Basenpaare lange mRNA, die die Reihenfolge der Aminosäuren für die Synthese des Proteins codiert.

Das *ABCA3*-Transporterprotein wird im Lungengewebe von Pneumozyten Typ II exprimiert und konnte in der Membran der Lamellarkörperchen lokalisiert werden (Yamano, Funahashi et al. 2001). Experimentelle Untersuchungen an Ratten zeigten, dass die Expression des *ABCA3*-Gens mit zunehmendem Gestationsalter ansteigt und zum Zeitpunkt der Geburt einen Peak erreicht (Yoshida, Ban et al. 2004). Zudem

konnte in vivo die Expression durch die Gabe von Glukokortikoiden gesteigert werden (Yoshida, Ban et al. 2004).

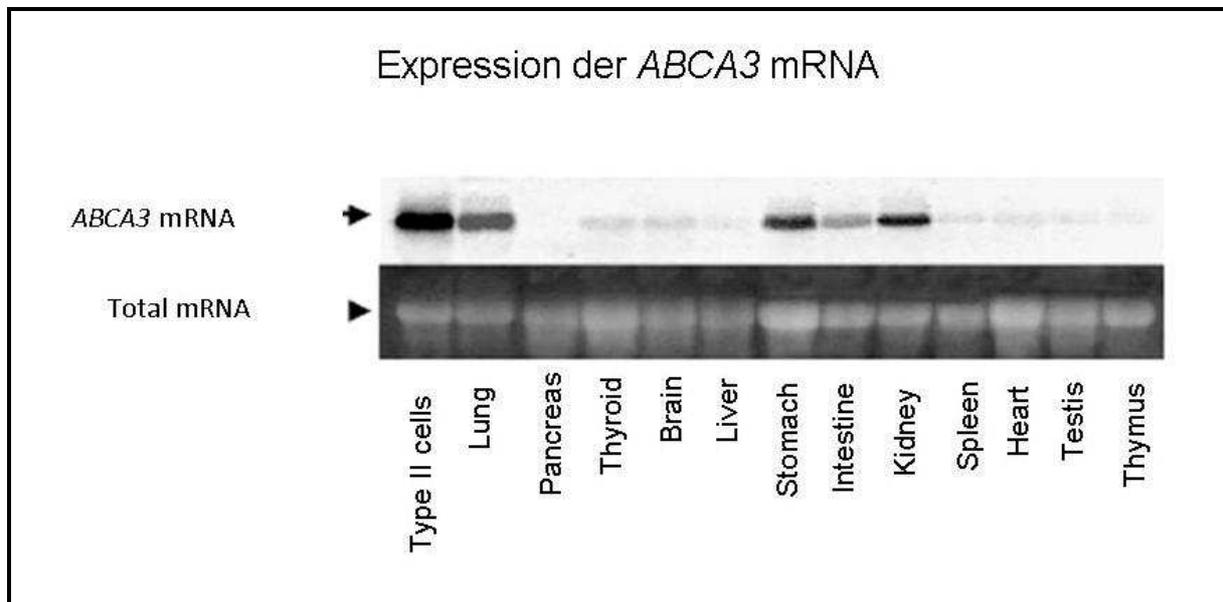


Abb. 5: Northern Blot zur Expression der *ABCA3* mRNA in Pneumozyten Typ II (Hammel, Michel et al. 2007);

Als Substrate des *ABCA3*-Transporters werden Phosphatidylcholine, Sphingomyelin, Cholesterol und Phosphatidylglycerol angenommen (Cheong, Madesh et al. 2006; Ban, Matsumura et al. 2007). Es wurde beobachtet, dass Defekte des *ABCA3*-Transporters zu einer verminderten Konzentration von Phosphatidylcholinen im Surfactant und damit zu einer eingeschränkten Funktion des Surfactant führen (Garmany, Moxley et al. 2006). Untersuchungen an Zellkulturen haben gezeigt, dass das *ABCA3*-Protein Phosphatidylcholine und Cholesterin in Lysosomen oder in strukturell ähnliche Vesikel transportieren kann (Matsumura, Sakai et al. 2007). Möglicherweise entstehen durch Verschmelzung mehrerer dieser Vesikel sog. Multivesikularkörperchen, die durch Reifungsprozesse und weitere Fusionen unter dem Einfluss des *ABCA3*-Transporterproteins und des Surfactantproteins SP-B schließlich zu Lamellarkörperchen werden (Foster, Zhang et al. 2003; Cheong, Madesh et al. 2006). Im Tierversuch wurden bei homozygot *ABCA3*-defizienten Mäusen keine ausgebildeten Lamellarkörperchen gefunden, sondern nur kleinere deformierte, aber strukturell ähnliche Zellorganellen mit peripheren dichten Einschlüssen (Ban, Matsumura et al. 2007).

## Elektronenmikroskopie der Pneumozyten Typ II

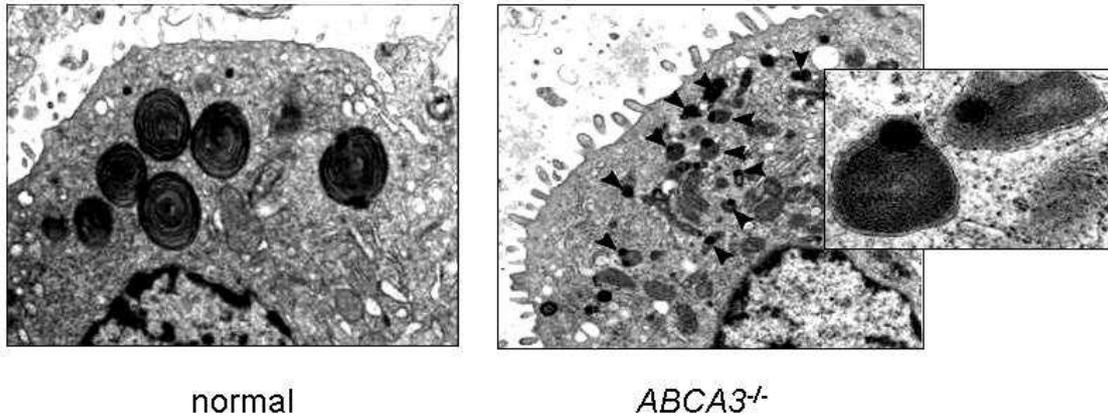


Abb. 6: Elektronenmikroskopische Befunde von normalen und *ABCA3*-defizienten Pneumozyten Typ II (Shulenin, Noguee et al. 2004)

In den Lamellarkörperchen wird das Surfactantprotein SP-C eingelagert (Nagata, Yamamoto et al. 2004). Die Lamellarkörperchen regulieren über die Sezernierung von Surfactantbestandteilen die Surfactant-Homöostase (Cheong, Zhang et al. 2007). In diesen Zellorganellen finden auch die letzten Schritte der post-translationalen Modifikation von SP-C statt (Foster, Zhang et al. 2003). Auch an diesem Prozess scheint der *ABCA3*-Transporter direkt oder indirekt beteiligt zu sein, da eine erniedrigte Expression von *ABCA3* sowohl in der Zellkultur als auch in der Lunge von homozygot *ABCA3*-defizienten Mäusen zu einer verminderten Expression und einem eingeschränkten Prozessing der Surfactantproteine führt (Cheong, Madesh et al. 2006; Cheong, Zhang et al. 2007).

## 1.5 **ABCA3-Defekte**

### 1.5.1 **Letal verlaufende Mutationen**

Über die klinische Relevanz von *ABCA3*-Gendefekten und die verschiedenen Auswirkungen der Defekte der *ABCA3*-Transporter beim Menschen ist bisher noch relativ wenig bekannt.

In den letzten Jahren wurden wiederholt Mutationen des *ABCA3*-Gens im Zusammenhang mit konnatalen Fehlfunktionen des Surfactant-Metabolismus beschrieben. Bei Neugeborenen mit letalem RDS unbekannter Ätiologie war die Frequenz einer *ABCA3*-Mutation höher als der Nachweis von Störungen auf Ebene der Surfactantproteine SP-B oder SP-C (Somaschini, Noguee et al. 2007). Inzwischen wird angenommen, dass *ABCA3*-Defekte sogar die häufigste Ursache für eine Störung der Surfactant-Homöostase sind (Bullard, Wert et al. 2006; Hamvas, Cole et al. 2007). Bei 16 von 21 Kindern mit schwerem neonatalen Surfactant-Mangel, bei denen SP-B- und SP-C-Mutationen ausgeschlossen waren, konnten Shulenin et al. verschiedene Mutationen des *ABCA3*-Gens als Ursache für die zu Grunde liegende chronische interstitielle Lungenerkrankung finden (Shulenin, Noguee et al. 2004). Die meisten gefundenen Mutationen waren Nonsense- oder Leseraster-Mutationen und führten zur Inaktivierung des Gens oder des Proteins. Teilweise handelte es sich um homozygote Merkmalsträger, teilweise wurden auf beiden Allelen unterschiedliche Mutationen gefunden. In zwei Fällen wurde nur auf einem Allel eine Mutation detektiert. In den vorliegenden Daten der Literatur bleibt aber unklar, welche Rolle eine Heterozygotie für den Merkmalsträger spielt.

Von den 16 Patienten mit nachgewiesener *ABCA3*-Mutation stammen fünf aus konsanguinen Familien. Viele Patienten haben in der Familienanamnese ein Geschwisterkind mit ähnlicher Symptomatik. Deshalb vermutet man einen autosomal-rezessiven Erbgang (Shulenin, Noguee et al. 2004).

Klinisch und radiologisch zeigten diese Kinder die Symptome eines schweren Atemnotsyndroms. Bei neun untersuchten Patienten ergab sich der gleiche histopathologische Befund:

- eine Hyperplasie der Pneumozyten Typ II,
- eine Häufung von Makrophagen mit unterschiedlicher Menge an proteinhaltigem Material in den distalen Atemwegen und
- eine Verdickung des Interstitiums.

Diese Befunde lassen sich sowohl mit einer infantilen desquamativen interstitiellen Pneumonie (DIP) als auch mit einer neonatalen pulmonalen Alveolarproteinose (PAP) vereinbaren. Lichtmikroskopisch wurde ein homogenes Zytoplasma ohne die typischen Einschlüsse der Lamellarkörperchen gesehen. Elektronenmikroskopisch waren keine ausgereiften, sondern nur amorphe Lamellarkörperchen nachweisbar, die dichter gepackte konzentrische Membranen mit exzentrischen Einschlüssen enthielten. Auch Edwards et al. konnten diese ultrastrukturellen Unterschiede bei Zwillingen mit Mutationen im *ABCA3*-Gen nachweisen (Edwards, Cutz et al. 2005).

Spezifische Therapiemöglichkeiten für Lungenerkrankungen, die durch *ABCA3*-Mutationen entstehen, sind bisher nicht bekannt. Trotz der intensivmedizinischen Betreuung inklusive Beatmung und rezidivierender intratrachealer Surfactant-Gaben verstirbt die Mehrzahl der von fatalem neonatalen Surfactant-Mangel betroffenen Neugeborenen noch in der Neonatalperiode an respiratorischem Versagen (Shulenin, Noguee et al. 2004). Ursache für die Wirkungslosigkeit der exogenen Surfactant-Therapie könnte eine Mutation des *ABCA3*-Transporters sein, die zur Sekretion von schädigenden Lipiden führt (Shulenin, Noguee et al. 2004) und so den möglicherweise vorhandenen endogenen oder den applizierten Surfactant inaktiviert (Hartl and Griese 2005).

### **1.5.2 Nicht letal verlaufende Mutationen**

In den letzten Jahren fanden sich aber auch zunehmend Hinweise, dass nicht alle *ABCA3*-Mutationen letal verlaufen. Eines der zwei Kinder mit einer heterozygoten Mutation (Q1591P) aus der oben beschriebenen Studie hat die Neonatalperiode überlebt und war zum Zeitpunkt der Veröffentlichung sechs Jahre alt (Shulenin, Noguee et al. 2004).

Bullard et al. wählten aus einem Patientenkollektiv von 195 Kindern mit chronischer interstitieller Lungenerkrankung unbekannter Ätiologie vier Kinder mit dem histologisch gesicherten Bild einer desquamativen interstitiellen Lungenerkrankung aus und sequenzierten das *ABCA3*-Gen. Drei dieser vier Kinder hatten auf einem Allel die Mutation E292V und auf dem anderen Allel eine weitere Mutation. Bei der Mutation E292V ist die hydrophobe Aminosäure Glutamat durch die polare, geladene Aminosäure Valin ersetzt. Da sich diese Mutation in einer evolutionsgeschichtlich

stabilen Region befindet und in einem Kontrollkollektiv von 100 Erwachsenen ohne Lungenerkrankung auf keinem der 200 Allele gefunden wurde, kann nicht von einem benignen Gen-Polymorphismus ausgegangen werden (Bullard, Wert et al. 2006; Noguee 2006).

In der o. g. Studie wurden die verbliebenen 191 Kinder mit chronisch interstitieller Lungenerkrankung für die Mutation E292V gescreent. Bei sieben Kindern mit unterschiedlicher klinischer Symptomatik wurde die heterozygote Mutation E292V ebenfalls gefunden (Bullard, Wert et al. 2005). Inzwischen gibt es Hinweise, dass diese Mutation auch ein erhöhtes Risiko für ein RDS des Neugeborenen bedeutet (Garmany, Wambach et al. 2008).

Garmany et al. fanden 17 weitere *ABCA3*-Mutationen bei acht Kindern, die sich nach Geburt mit Atemnotsyndrom präsentierten und auf Grund von progressiven Lungenerkrankungen bis zum Alter von 20 Monaten transplantiert wurden (Garmany, Moxley et al. 2006). Bei allen betroffenen Kindern konnte im Surfactant sowohl ein erniedrigtes Level an Phosphatidylcholin als auch an desaturiertem Phosphatidylcholin nachgewiesen werden. Die Fähigkeit des Surfactant, die Oberflächenspannung zu senken, war deutlich reduziert. Brasch und Schimanski fanden bei zehn von 14 verstorbenen Neugeborenen mit Verdacht auf hereditären Surfactant-Mangel weitere *ABCA3*-Mutationen, die zu einer verminderten oder fehlenden Protein-Expression des Transporters führten (Brasch, Schimanski et al. 2006).

Diese Untersuchungen legen nahe, dass unterschiedliche Mutationen des *ABCA3*-Gens eine Ursache für die verschiedensten interstitiellen Lungenerkrankungen im Kindesalter sein können. Ob diese Erkrankungen auf dem Boden einer echten Heterozygotie oder auf dem Boden einer Compound-Heterozygotie mit bisher unbekanntem Mutationen entstanden sind, ist nicht geklärt. Einige Mutationen des *ABCA3*-Gens wurden inzwischen hinsichtlich der Auswirkungen auf das Transporter-Protein und seine Funktion in Zellkulturen untersucht. Die Mutationen konnten in zwei Kategorien klassifiziert werden (Matsumura, Ban et al. 2006):

- Typ I-Mutationen betreffen die transmembranalen Strukturen des Proteins und beeinflussen die Substratspezifität. Diese Mutationen führen zu einem abnormalen intrazellulären Reifungsprozess des

Transporter-Proteins, welches anschließend z.B. im endoplasmatischen Reticulum verbleibt. Dies würde auch die veränderte Struktur der Lamellarkörperchen durch fehlende *ABCA3*-Membranproteine erklären.

- Typ II-Mutationen betreffen die ATP-bindenden Kassetten und führen zu einer eingeschränkten ATP-Hydrolyse und damit zu einer verminderten bis hin zu einer vollständig fehlenden Funktion des Transporter-Proteins.

## 1.6 Das Tiermodell der *ABCA3*-Knockout-Maus

Zur Untersuchung der verschiedenen *ABCA3*-Gendefekte wurde ein Mausmodell entwickelt. Zum einen wurde die Maus auf Grund der Verfügbarkeit von embryonalen Stammzellen und der damit verbundenen Möglichkeit der genetischen Veränderung als Modell ausgewählt. Zum anderen ist die Physiologie der Lunge der Maus mit der des Menschen gut vergleichbar. Außerdem entsprechen die Gene der Maus, die bisher für die Zusammensetzung und Produktion des Surfactant als relevant erkannt wurden, ausreichend gut den bekannten Genen des Menschen (Clark, Wert et al. 1995; Glasser, Detmer et al. 2003).

Die Züchtung der *ABCA3*-Knockout-Maus basiert auf dem Stamm C57BL/6. Bei Mäusen dieses Stammes wurde gezielt das *ABCA3*-Gen inaktiviert (Hammel, Michel et al. 2007). Heterozygote Paare haben entsprechend der Mendelschen Gesetze für einen autosomal-rezessiven Erbgang Nachkommen von Wildtyp-Tieren, heterozygoten und homozygoten Tieren im Verhältnis 1:2:1.

Die heterozygot *ABCA3*-defizienten Tiere sind klinisch nicht von den Wildtyp-Tieren zu unterscheiden. Sie gedeihen normal und sind fertil. Auch in der Licht- und der Elektronenmikroskopie können die Lungen der Heterozygoten und der Wildtypen nicht eindeutig differenziert werden (Hammel, Michel et al. 2007).

Im Gegensatz zu den heterozygoten Tieren zeigen homozygot *ABCA3*-defiziente Tiere direkt nach Geburt eine keuchende, schnappende Atmung und bleiben zyanotisch. Es gelingt ihnen nicht, eine normale Inflation und Entfaltung der Lunge zu erreichen. Als Folge der respiratorischen Insuffizienz ist die motorische Aktivität

deutlich reduziert. Letztendlich versterben homozygot defiziente Tiere post partum im Rahmen eines respiratorischen Versagens (Fitzgerald, Xavier et al. 2007; Hammel, Michel et al. 2007). In einer neueren Studie von Besnard et al. überlebten 30% der homozygot *ABCA3*-defekten Tiere (Besnard, Matsuzaki et al. 2009); sie entwickelten ein Lungenemphysem.

Die Lungen der verstorbenen Tiere erscheinen makroskopisch gaslos und schwimmen nicht in normaler Kochsalzlösung. Diese negative Lungenschwimmprobe bedeutet, dass keine Inflation der Lunge stattgefunden hat. Lichtmikroskopisch sind die Lungen atelektatisch. Elektronenmikroskopisch können in den Pneumozyten Typ II keine Lamellarkörperchen nachgewiesen werden, sondern nur den Lysosomen ähnelnde Strukturen (Hammel, Michel et al. 2007) .

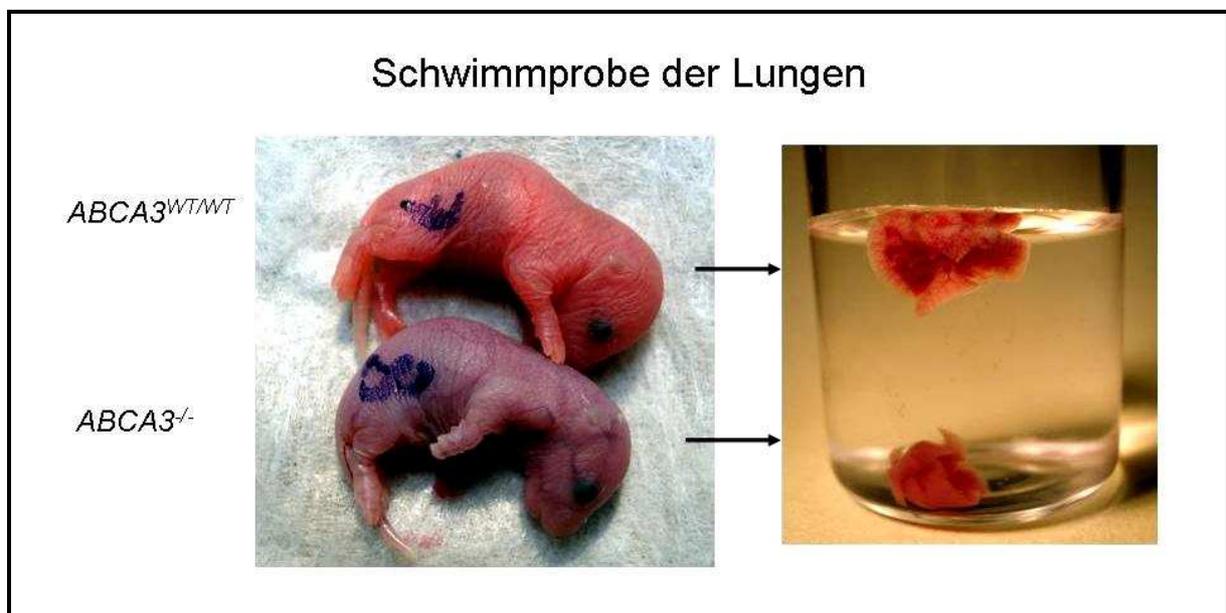


Abb. 7: Lungenschwimmprobe: Die Lungen der homozygot *ABCA3*-defizienten Mäuse enthalten kein Gas und schwimmen nicht (Hammel, Michel et al. 2007).

Respiratorisches Versagen und schnelles Eintreten des Todes bei den homozygoten Tieren entsprechen dem klinischen Verlauf beim Menschen mit einem schweren *ABCA3*-Defekt, der autosomal-rezessiv vererbt wird. Ob die Heterozygotie für einen *ABCA3*-Defekt lungenmechanische Veränderungen nach sich zieht und damit für das Individuum relevant ist, ist bislang unbekannt. Dieser Frage nachzugehen ist Inhalt der vorliegenden Arbeit.

## 1.7 Tierversuch und Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lungenmechanik der heterozygoten Merkmalsträger der *ABCA3*-Knockout-Mauslinie detailliert charakterisiert und mit der von Wildtyp-Mäusen des gleichen Stammes verglichen. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, ob der Heterozygotenstatus mit einer veränderten Lungenmechanik einhergeht. Möglicherweise stellt eine Heterozygotie im *ABCA3*-Gen eine Prädisposition für verschiedene Lungenerkrankungen dar, da sie die mechanischen Eigenschaften des Lungengewebes verändert.

Die Untersuchungen wurden an 10-15 Wochen alten Mäusen durchgeführt. Die Studie erfolgte verblindet und setzte sich aus zwei Studienabschnitten zusammen:

- lungenmechanische Charakterisierung nach Raumlufthaltung, d.h. ohne Provokation und
- lungenmechanische Charakterisierung im Anschluss an eine 72-stündige Sauerstoffprovokation.

Die kontinuierliche Sauerstoffexposition ergab bei verschiedenen anderen Untersuchungen diskrete Veränderungen des Lungengewebes, die sich auf die Lungenmechanik der Tiere auswirken können (Tokieda, Iwamoto et al. 1999). Die oxidative Provokation wurde bereits von Tokieda et al. verwendet, um den Einfluss des oxidativen Stress auf die Lungenmechanik von heterozygot SP-B-defekten Mäusen zu untersuchen (Tokieda, Iwamoto et al. 1999).

Die lungenmechanische Charakterisierung der heterozygoten *ABCA3*-Knockout-Mäuse erfolgte im Finalversuch. Die Tiere wurden standardisierten Beatmungsmanövern unterzogen. Ergänzend wurden histologische Untersuchungen des Lungengewebes und Analysen der bronchoalveolären Lavage durchgeführt.

## 1.8 Zusammenfassung

Mit der Erforschung des *ABCA3*-Transporter-Mangels soll ein Beitrag geleistet werden zum grundlegenden Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie des Surfactant-Systems, das an vielen angeborenen oder erworbenen Lungenerkrankungen direkt oder indirekt beteiligt ist.

Denkbar ist, dass mit der Heterozygotie für den *ABCA3*-Defekt ein schlechterer Verlauf von einigen Lungenerkrankungen erklärt werden kann. Zu diesen Erkrankungen könnten die transiente Tachypnoe des Neugeborenen oder auch Asthma bronchiale und die Zystische Fibrose zählen (Shulenin, Nogee et al. 2004). Weiterhin gibt es Vermutungen, dass *ABCA3*-Mutationen den Verlauf des Atemnotsyndroms bei extrem Frühgeborenen beeinflussen und die Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie fördern (Karjalainen, Haataja et al. 2008).

## 2 Methodik

### 2.1 Genehmigung des Tierversuchs

Die Vergleichsstudie „Charakterisierung der Lungenmechanik von heterozygoten *ABCA3*-Knockout-Mäusen“ wurde von der Regierung von Oberbayern unter den Registrierungsnummer 55.2-1-54-2531-24-08 genehmigt.

### 2.2 Studienplanung

In der Studie wurden Lungenfunktionsparameter von *ABCA3*-Knockout-Mäusen des Stammes C57BL/6 erhoben. Die Ergebnisse von Heterozygoten (*ABCA3*<sup>WT/-</sup>) und Wildtypen (*ABCA3*<sup>WT/WT</sup>) wurden statistisch miteinander verglichen.

Die Versuche wurden in zwei Abschnitten durchgeführt:

- Erster Versuchsabschnitt: Vergleich *ABCA3*<sup>WT/-</sup> versus *ABCA3*<sup>WT/WT</sup> in Raumluft; diese Gruppe wird im Folgenden als „21% FiO<sub>2</sub> / + Beatmung“ bezeichnet.
- Zweiter Versuchsabschnitt: Vergleich *ABCA3*<sup>WT/-</sup> versus *ABCA3*<sup>WT/WT</sup> in 95% Sauerstoff-Umgebung; diese Gruppe wird im Folgenden als „95% FiO<sub>2</sub> / + Beatmung“ bezeichnet

Entsprechend den oben genannten Versuchsgruppen wurden des Weiteren heterozygote Tiere und Wildtyp-Tiere in Raumluft bzw. nach Sauerstoffprovokation ohne nachfolgende Beatmung als Kontrollgruppen untersucht. Diese Gruppen werden im Folgenden als „21% FiO<sub>2</sub> / - Beatmung“ und als „95% FiO<sub>2</sub> / - Beatmung“ bezeichnet. Ziel dieser Untersuchungen war die Abgrenzung der beatmungsbedingten Pathologien von den strukturellen Veränderungen des Lungengewebes und der inflammatorischen Reaktion nach isolierter Sauerstoffprovokation.

Als Hauptzielgröße der Studie wurde der Wert der „Totalen Lungenkapazität“ nach 30-minütiger standardisierter Beatmung definiert.

Nebenzielgrößen waren folgende weitere Parameter der Lungenmechanik, die jeweils im zeitlichen Verlauf und nach 30-minütiger Beatmung erhoben wurden:

1. statische Compliance
2. Resistance
3. Resistance und Reactance des respiratorischen Systems
4. Gewebe-Elastance
5. Gewebe-Dämpfung
6. Hysterese

Nach Beendigung der Beatmung wurden weitere Parameter zur semiquantitativen Bestimmung von entzündlichen und strukturellen Veränderungen erhoben:

7. Zellgehalt, Lipid- und Proteinmenge der Lavage-Flüssigkeit
8. konventionelle Histologie
9. Bestimmung des Lungenwassers durch Wägung

## **2.3 Biometrische Planung**

Die biometrische Planung erfolgte unter Mitarbeit von Dr. Jürgen Peters (Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität München).

### **2.3.1 Voraussetzungen**

Zum Zeitpunkt der Planung der statistischen Analyse der Versuche und der Fallzahlberechnung für die lungenmechanischen Untersuchungen lagen keine Vorbefunde zur Messung von lungenmechanischen Parametern bei der heterozygoten *ABCA3*-Maus vor.

Anhand von früheren Untersuchungen konnten Aussagen über die Streuung der Hauptzielgröße „Totale Lungenkapazität“ in der *ABCA3*-Wildtyp-Maus getroffen werden. Diese Daten stimmen mit Ergebnissen aus der Literatur überein, so dass auf dieser Basis eine Fallzahlberechnung für die Hauptzielgröße durchgeführt wurde.

Der Fehler 1. Art ( $\alpha$ -Fehler) wurde auf 5%, der Fehler 2. Art ( $\beta$ -Fehler) auf 20% (Power 0,8) festgelegt. Eine Veränderung des Mittelwerts um 30% wurde als biologisch relevant angesehen.

Vor Durchführung der Versuche konnte nicht festgelegt werden, ob es sich um eine Normalverteilung handelt. Deshalb wurde für die Analyse der Ergebnisdaten ein Nicht-parametrisches Testverfahren ausgewählt (Mann-Whitney-U Test). Für das angewandte Testverfahren wurde bei  $p < 0,05$  die zugehörige Nullhypothese (*kein Unterschied zwischen den getesteten Stichproben*) verworfen, und die Alternativhypothese (*Unterschied zwischen den getesteten Stichproben*) angenommen.

## **2.3.2 Fallzahlberechnung für die lungenmechanischen Untersuchungen**

### **2.3.2.1 Erster Versuchsabschnitt**

Aus früheren Versuchen an der *ABCA3*-Wildtyp-Maus lagen für die Hauptzielgröße „Totale Lungenkapazität“ (TLC) Daten zur Streuung dieses Parameters vor. Die TLC wurde in ml/kg Körpergewicht gemessen:

TLC (C57BL/6, 15min Beatmung,  $n=5$ ):  $67,58 \pm 4,94$  ml/kg Körpergewicht

Diese Streuung entspricht den Angaben von Tokieda et al. aus Versuchen zur Messung der Lungenmechanik bei SP-B-Wildtyp-Mäusen in Raumluft (Tokieda, Iwamoto et al. 1999). Die in o. g. Studie gemessene Streuung lag bei ca. 10% des gemessenen Mittelwerts. Die ermittelten Absolutwerte sind mit den eigenen Daten aber nicht direkt vergleichbar, da eine andere Messmethode zur Anwendung gekommen ist.

In Anlehnung an die Arbeit von Tokieda et al. wurde davon ausgegangen, dass die Streuung des Zielparameters in der Versuchsgruppe der heterozygot *ABCA3*-defizienten Mäuse deutlich höher ist: Tokieda et al. ermittelten in der Versuchsgruppe der heterozygot SP-B-defizienten Mäuse eine dreifach höhere Streuung sowohl beim Parameter der totalen Lungenkapazität als auch bei der statischen Compliance.

Für die aktuelle Fallzahlberechnung wurde daher sowohl für die Wildtypen als auch für die Heterozygoten eine gemeinsame Standardabweichung von 30% (entspricht ca.  $\pm 20,27$  ml/kg) zu Grunde gelegt.

Unter Berücksichtigung der zu erwartenden Standardabweichungen der erhobenen Parameter (natürliche Streuung biologischer Messgrößen), der Festlegung des statistischen Fehlers 1. Art ( $\alpha$ -Fehler) auf 5% sowie der Festlegung des statistischen Fehlers 2. Art ( $\beta$ -Fehler) auf 20% (Power: 0.8) sollten pro Versuchstiergruppe  $n=14$

komplett auswertbare Datensätze vorliegen (Fallzahlberechnung SigmaStat™ Version 3.0, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Die Fallzahlberechnung erfolgte für den t-Test.

Die resultierende Gruppengröße wurde um den Betrag von jeweils 5% aufgestockt, da mit dem Mann-Whitney-U-Test ein Nicht-parametrisches Testverfahren angewendet werden sollte. Hieraus resultierte eine Teilgruppengröße von  $n = 15$ .

### **2.3.2.2 Zweiter Versuchsabschnitt**

Es konnte nicht sicher davon ausgegangen werden, dass der heterozygot vorliegende Gendefekt bei den in Raumluft gehaltenen Tieren tatsächlich zu einer klinisch messbaren und relevanten Änderung führt. Deshalb wurde in Anlehnung an die Arbeit von Tokieda et al. (Tokieda, Iwamoto et al. 1999) bei nicht statistisch signifikanten Ergebnissen im ersten Versuchsabschnitt eine 72-stündige Sauerstoffprovokation der Tiere vor der Beatmung vorgesehen.

Eigene Daten zu lungenmechanischen Parametern nach Sauerstoffprovokation lagen weder für die heterozygoten noch für die *ABCA3*-Wildtyp-Mäuse vor. In der o. g. Arbeit von Tokieda et al. lag die Streuung des Zielparameters „Totale Lungenkapazität“ nach Sauerstoffprovokation bei ca.  $\pm 30\%$ . Dies traf sowohl für die Gruppe der SP-B-Wildtyp-Mäuse als auch für die Gruppe der heterozygot SP-B-defizienten-Mäuse zu.

Für die Fallzahlberechnung für den zweiten Versuchsabschnitt wurde daher ebenfalls diese Streuung zugrunde gelegt. Gleiches galt für die Festlegung des minimalen biologisch relevanten Unterschieds bei 30%. Die statistischen Fehler erster und zweiter Art wurden analog zum ersten Versuchsabschnitt definiert. Die Fallzahlberechnung für den t-Test ergab für die zweite Versuchsgruppe ebenfalls  $n=14$  vollständig auswertbare Datensätze (Fallzahlberechnung SigmaStat™ Version 3.0, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Diese Fallzahlberechnung erfolgte für den t-Test. Die Anzahl wurde um jeweils 5% aufgestockt, da der Nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test angewendet werden sollte. Die Teilgruppengröße wurde entsprechend auf  $n=15$  festgelegt.

### 2.3.3 Gesamtanzahl

Insgesamt ergab sich somit eine Gesamtanzahl von 60 Versuchstieren für die lungenmechanischen Untersuchungen. Zusätzlich sollten in jedem Versuchsabschnitt jeweils acht Wildtyp-Tiere und acht heterozygote Tiere ohne Beatmung untersucht werden. So ergab sich eine Gesamtanzahl von 92 Tieren.

#### Geplante Anzahl an Tieren pro Versuchsgruppe

Versuchsgruppe	Genotyp	
	<i>ABCA3<sup>WT/WT</sup></i>	<i>ABCA3<sup>WT/-</sup></i>
21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	8	8
95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	8	8
21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	15	15
95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	15	15

Tab. 1: Geplante Tiere pro Versuchsgruppe

## 2.4 Tierversuch

### 2.4.1 Versuchstiere

#### 2.4.1.1 Züchtung und Haltung

Die *ABCA3*-Knockout-Mäuse wurden auf der Basis des Stammes C57BL/6 in Zusammenarbeit mit dem Helmholtz Zentrum München, Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Neuherberg (Institut für Experimentelle Genetik, Prof. Martin Hrabé de Angelis) generiert. Sowohl die Kontrolltiere als auch die *ABCA3* Knockout-Tiere wurden nach § 9 Abs. 2 Satz 3 Nr. 7 Satz 1 eigens für diese Versuche in der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVT) der Kliniken des Standorts Innenstadt des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München gezüchtet. Für die Haltung der Mauslinie gelten spezifisch pathogenfreie Bedingungen (SPF-Bedingungen).

Die Versuchstiere wurden in einzelbelüfteten Käfigen (individually ventilated cages – IVC) gehalten. Trinkwasser und Standardlaborfutter waren stets ad libitum

zugänglich. Als Einstreu wurde Standardeinstreu für Labornager verwendet. Die Tiere wurden einem zwölfstündig wechselnden Hell-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt. Mindestens sieben Tage vor dem Versuch wurden die Tiere zur Akklimatisierung in Transportkäfigen zur Versuchsdurchführung an den Standort Großhadern verbracht und dort in übliche Käfige umgesetzt (jeweils zu viert entsprechend der Gruppen, in denen sie vorher zusammen gelebt hatten).

#### 2.4.1.2 Anatomie der Lunge

Die Lunge der Maus besteht aus zwei Lungenflügeln, einem rechten und einem linken. Im Gegensatz zum Menschen teilt sich der linke Lungenflügel nicht in einzelne Lappen auf. Der rechte Lungenflügel hingegen besteht aus vier Lungenlappen, den Lobi superior, medius, inferior und postcavalis. Der Lobus postcavalis zweigt vom rechten Bronchialbaum ab, liegt aber kaudal des Herzens in der Mittellinie vor dem Ösophagus und hinter der Vena cava inferior.

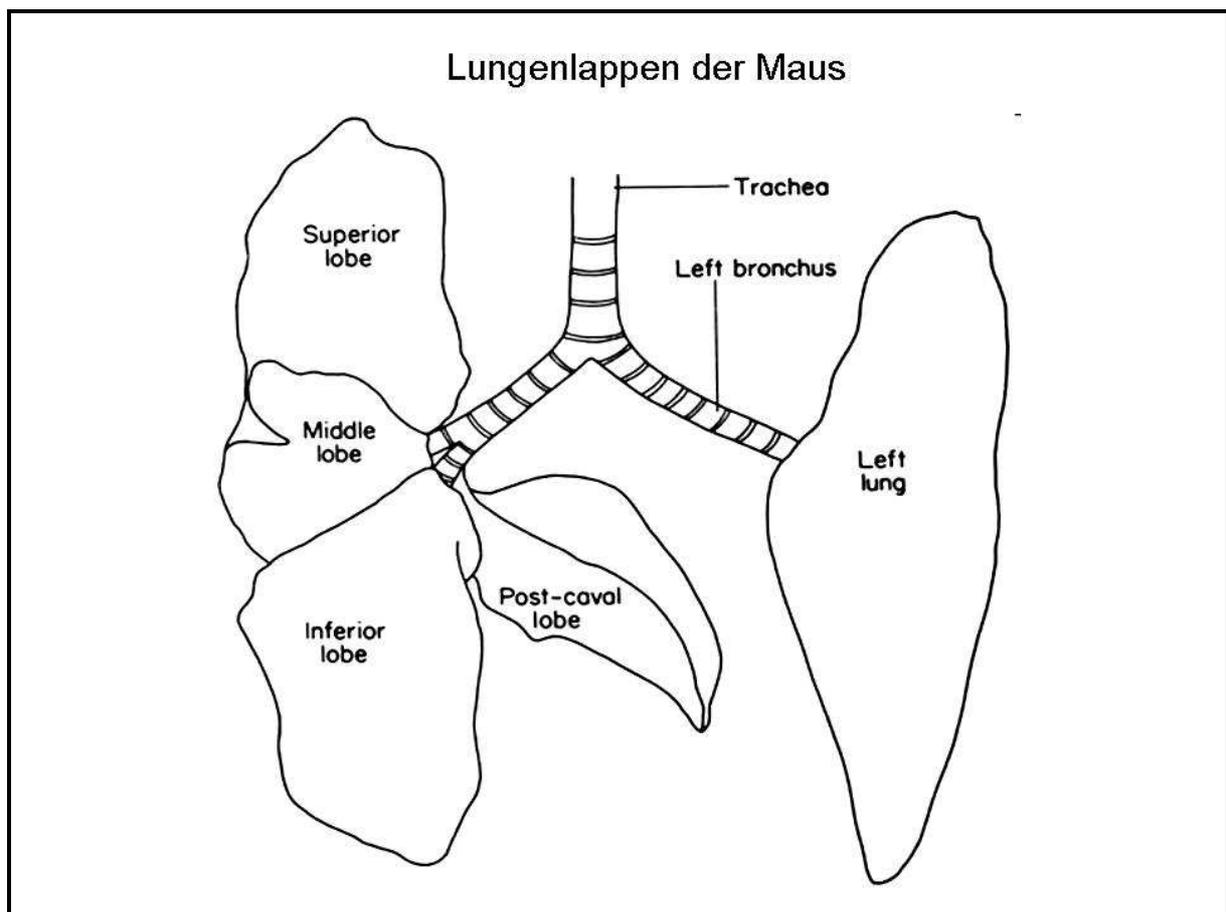


Abb. 8: Anatomische Darstellung der Lungenlappen der Maus (Cook 1965)

## **2.4.2 Versuchsvorbereitung**

### **2.4.2.1 Sauerstoffprovokation**

Die für die Sauerstoffexposition vorgesehenen Tiere wurden mindestens eine Woche vor der Provokation in Gruppen von maximal vier Tieren zusammengesetzt. Für die Sauerstoffexposition wurden die Käfige in einen abgedichteten Inkubator verbracht, in den der Sauerstoff eingebracht wurde. Die Zielkonzentration des Sauerstoffs lag bei 95%. Die Ableitung erfolgte passiv an der Ausströmöffnung des Inkubators. Überatmosphärischer Druck entstand nicht. Die Sauerstoffkonzentration im Inkubator wurde kontinuierlich gemessen und entsprach dem Zielwert. Die Sauerstoffexposition erfolgte für 72 Stunden, jeweils von morgens bis morgens. Anschließend wurden die Tiere den gleichen experimentellen Prozeduren unterzogen wie die in Raumluft gehaltenen Tiere.

### **2.4.2.2 Vorbereitung des Tieres und Narkose**

Vor dem Versuch wurde jede Maus zunächst in einer separaten Box gewogen. Anschließend wurde die Maus durch eine intraperitoneale Injektion von 0,3 ml einer Mischung aus Medetomidin (0,5 mg/kg KG), Midazolam (5 mg/kg KG) und Fentanyl (0,05 mg/kg KG) narkotisiert. Nachdem das Tier eingeschlafen war, wurde durch Zwicken zwischen den Zehen der Hinterläufe ein Schmerzreiz gesetzt. Rief dies keine Reaktion mehr hervor, wurde das Tier in Rückenlage auf die Versuchseinrichtung gelagert und mit der Präparation begonnen.

### **2.4.2.3 Tracheotomie**

Die Vorderpfoten der Maus wurden fixiert. Für die Tracheotomie wurde zunächst mit einer spitzen Schere die Haut über der Kehle in der Mediallinie längs inzidiert. Anschließend erfolgte die stumpfe Präparation der Trachea durch Spreizen des darüberliegenden Muskelgewebes mittels stumpfer Schere. Nach vollständiger Präparation der Trachea und sauberer Trennung vom Ösophagus wurde die Trachea mit einem Vinyl-Faden umschlungen. Möglichst kaudal wurde ein einfacher Knoten angelegt. Anschließend wurde mit einer spitzen Schere die Trachea durch einen Querschnitt zwischen zwei Knorpelspangen eröffnet und ein Stahltubus (Harvard Apparatus GmbH, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) mit einem Außendurchmesser von 1,2 mm eingeführt. Mit dem bereits vorbereiteten Knoten wurde der Tubus in der Trachea fixiert und zusätzlich mit einem weiteren

Knoten gesichert. Anschließend wurde der Tubus mit der bereits laufenden Beatmungsmaschine verbunden. Die Beatmung erfolgte unter inspiratorischer Volumenkontrolle mit einem Tidalvolumen von 10 ml/kg bei einer Frequenz von 180/min (FlexiVent®, Scireq, Toronto, Kanada). Der inspiratorische Druck war auf maximal 30 cmH<sub>2</sub>O limitiert, der PEEP war auf 4 cmH<sub>2</sub>O eingestellt. Die Beatmung erfolgte mit trockener, nicht angewärmter Luft. Am Inspirationsventil des Respirators wurde Sauerstoff mit einem Flow von 0,5l/min zugemischt, so dass ein FiO<sub>2</sub> von ca. 50% resultierte.

#### **2.4.2.4 Überwachung der Vitalparameter**

Zur Überwachung der Maus während des Versuches wurde eine rektale Temperatursonde eingeführt und ein EKG mittels Stechelektroden angelegt (HP CMS Monitor, Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, Deutschland) Zur Regulation der Körpertemperatur diente einerseits eine Heizmatte, auf der die Versuchseinheit aufgebaut war, andererseits eine zugeschaltete Wärmelampe.

### **2.4.3 Durchführung des Versuchs**

#### **2.4.3.1 Überwachung während der Beatmung**

Während der normofrequenten Beatmung wurden die Beatmungsparameter überprüft und dokumentiert. Ebenso wurden Herzfrequenz und Temperatur aufgezeichnet. Gegebenenfalls wurde die Wärme nachreguliert. Zur Überwachung der adäquaten Beatmung wurde bei den Tieren aus der Schwanzarterie eine Blutgasanalyse durchgeführt.

#### **2.4.3.2 Beatmung und zeitlicher Ablauf der lungenmechanischen Untersuchungen**

Im Anschluss an die Intubation und Initiierung der Überwachung wurden die Tiere mit Vecuronium (1,0 – 2,0 mg/ kg KG) intraperitoneal relaxiert, um eine Beeinflussung der lungenmechanischen Messungen durch Spontanatemzüge zu vermeiden. Zunächst wurden zwei Rekrutierungsmanöver durchgeführt, um eine vollständige Rekrutierung der Lunge vor Beginn der standardisierten Messungen zu erreichen. Hierfür erfolgte eine langsame Inflation der Lunge über drei Sekunden bis zu einem Spitzendruck von 30 cmH<sub>2</sub>O. Dieser Druck wurde für weitere drei Sekunden konstant gehalten. Anschließend wurde der Druck auf das PEEP-Niveau (4 cmH<sub>2</sub>O)

abgesenkt. Nach dem Rekrutierungsmanöver wurden zum Zeitpunkt 0 min die Basalwerte der Beatmung und Lungenmechanik erfasst.

Die Messung der verschiedenen Parameter der Lungenmechanik erfolgte anhand vier verschiedener Beatmungsmanöver automatisiert und computergesteuert (s. u.). Zwischen den Messzeitpunkten (alle 5 min) wurden die Tiere normofrequent beatmet. Durch Unterbrechung der Standard-Ventilation nach Beendigung jeder Messreihe konnten nicht erfolgreiche Messungen nachgeholt werden.

Die Messungen zum Zeitpunkt 0 min wurden manuell durchgeführt. Das automatische Beatmungsskript wurde exakt fünf Minuten später gestartet. Es wiederholte alle fünf Minuten die vier Beatmungsmanöver bis insgesamt fünf komplette Messreihen vorlagen. Nach Beendigung des Beatmungsskriptes wurde die normofrequente Beatmung für weitere fünf Minuten unverändert fortgesetzt.

#### **2.4.4 Gewinnung von Analyse-Material**

##### **2.4.4.1 Präparation der Lunge**

Zur Präparation der Lunge wurde unter laufender Beatmung das Abdomen unterhalb des Rippenbogens durch einen Querschnitt mittels spitzer Schere eröffnet. Nach der Eröffnung der Peritonealhöhle wurde durch Inzision des Zwerchfells beidseits die Lunge exponiert und so ein Pneumothorax verhindert. Anschließend konnte der Thorax durch Durchtrennen des Sternums bis zur Eintrittsstelle der Trachealkanüle eröffnet werden ohne die Lunge zu verletzen. Aus dem austretenden Blut wurde ggf. eine Blutgasanalyse durchgeführt, wenn diese vorher aus der Schwanzarterie nicht möglich gewesen war. Der Thorax wurde seitlich aufgeklappt und fixiert. Der Thymus wurde stumpf entfernt. Anschließend folgten die Darstellung des linken Hauptbronchus und das Abklemmen des linken Lungenlappens am Hilus. Dieser Lungenlappen wurde später zur Bestimmung der Feucht-Trockengewicht-Ratio verwendet.

##### **2.4.4.2 Lavage und Entnahme von Lunge und Niere**

Über die Trachealkanüle wurde jetzt zweimalig eine bronchoalveoläre Lavage der vier rechten Lungenlappen Lobi superior, medius, inferior et postcavalis mit 0,8 ml PBS (33 ml/kg KG) durchgeführt. Die periphere Füllung der Lunge war jeweils gut sichtbar. Die Recovery dieser instillierten Flüssigkeit betrug ca. 80%. Anschließend wurden die verbliebenen Strukturen wie Ösophagus, Aorta und restliches

Bindegewebe kaudal und kranial der Lunge durchtrennt und die Lunge en bloc entnommen.

Zunächst wurde der Lobus superior abgebunden und reseziert. Dieser Lungenlappen wurde für eine spätere Bestimmung der Surfactantproteine und des Phospholipidgehaltes kryokonserviert (nicht Bestandteil dieser Arbeit). Der bereits abgeklemmte linke Lungenlappen wurde ebenfalls abgebunden und reseziert. Nach sofortiger Bestimmung seines Feuchtgewichts wurde er in einen Trockenschrank mit 95°C für 48h getrocknet. Die drei verbliebenen rechten Lungenlappen wurden zum Expandieren über die noch liegende Trachealkanüle mit 0,8 ml Formalin 3% gefüllt. Nach Abbinden der Trachea und Präparation des Herzens wurde das Gewebe in 3%igem Formalin für mindestens 24 Stunden fixiert.

Bei den Versuchen nach Sauerstoffprovokation wurde ebenfalls der linke Lungenlappen zur Bestimmung des Feucht-Trockengewichtes reseziert. Die Lobi superior, medius et postcavalis wurden mit 1 ml NaCl 0,9% homogenisiert, der Überstand abzentrifugiert und getrennt vom homogenisierten Gewebe bei -80°C tiefgefroren. Der Lobus inferior wurde für die histologischen Untersuchungen konserviert. Auf Grund der sehr geringen Größe war eine Füllung des Lungenlappens mit Formalin zur Expansion über das Bronchialsystem nicht möglich, so dass eine Unterdruck-Expansion durchgeführt wurde. Dazu wurde der Lungenlappen in eine mit 2,5 ml Formalin gefüllte 5 ml - Spritze gegeben. Durch Zurückziehen des Spritzenstempels wurde Unterdruck erzeugt. Dadurch haben sich die Bronchien mit Formalin gefüllt.

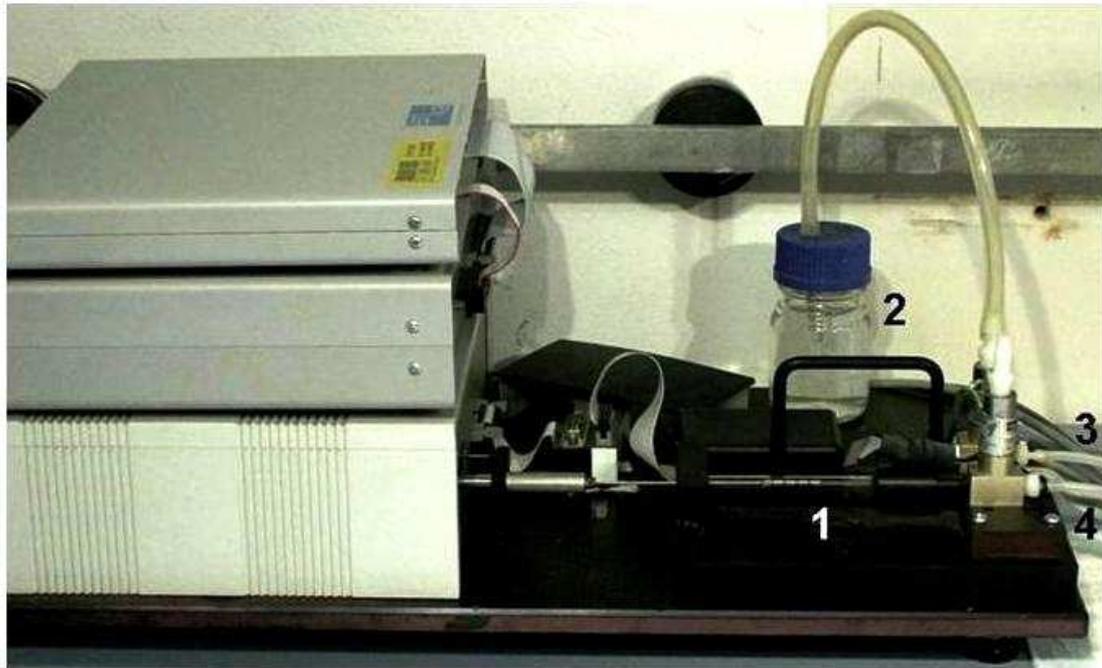
Zur Überprüfung der genetischen Identität wurde jeweils die linke Niere entnommen und bis zur Typisierung zunächst kryokonserviert.

## **2.5 Respirator**

### **2.5.1 Beschreibung des Respirators**

Für die Beatmung der Maus wurde der Kleintier-Respirator FlexiVent® der Firma Squirec (Montreal, Kanada) verwendet. Der FlexiVent® ist ein computergesteuerter Kolben-Pumpen-Respirator (siehe Abb. 9).

## Kleintier-Respirator



1 Kolben  
2 PEEP-Generator  
3 expiratorischer Schenkel  
4 inspiratorischer Schenkel

Abb. 9: Photographie des Kleintier-Respirators FlexiVent®

Der FlexiVent®-Respirator dient einerseits zur volumenkontrollierten, drucklimitierten Beatmung des Versuchstieres. Andererseits können akkurate, reproduzierbare Messungen des mechanischen respiratorischen Systems unter kontrollierten experimentellen Bedingungen erfolgen, indem wiederholt vordefinierte Beatmungsmanöver durchgeführt werden. Je nach verwendetem Modul können Tiere von 10 g bis zu 45 kg erfolgreich ventiliert werden. In dieser Versuchsanordnung wurde das Modul FV-M1 verwendet, das ein maximales Kolbenhubvolumen von 1,65 ml hat. Um die Standard-Beatmungseinstellungen und die Test-Manöver auf die individuelle Lungengröße anzupassen, können respiratorische Parameter wie Tidalvolumen, maximaler positiver inspiratorischer Druck (PIP), positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) und die Frequenz vorgegeben werden.

In unserer Versuchsreihe erfolgte eine standardisierte, volumenkontrollierte, drucklimitierte Beatmung (Tidalvolumen 10 ml/kg,  $P_{\max} = 30 \text{ cmH}_2\text{O}$ , PEEP = 4 cmH<sub>2</sub>O) mit einer Frequenz von 180/min (=3 Hz) bei 100% Sauerstoff. Diese Beatmungsparameter stellen sowohl eine ausreichende Oxygenierung als auch eine ausreichende Ventilation der Versuchstiere sicher. Dies wurde durch Blutgasanalysen überprüft.

Computergesteuert wird im Kolben des Respirators mit der vorgegebenen Frequenz von 180/min ein vorgegebenes Tidalvolumen von 10 ml/kg über den Beatmungsschlauch Richtung Maus appliziert. Die Maus ist mit einem Y-Stück direkt am Tubus an die in- und expiratorischen Schenkel des Beatmungsgerätes angeschlossen. Am inspiratorischen Schenkel werden über die Kolbenpumpe Spitzendruck (PIP, positiver inspiratorischer Druck), Flow und Tidalvolumen gesteuert. Zusätzlich erfolgt eine kontinuierliche Sauerstoffzufuhr. Am Expirationsschenkel wird über ein Wasserschloss ein positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 4 cmH<sub>2</sub>O generiert, so dass ein Kollabieren der Lunge in der Expirationsphase verhindert wird. Zur Messung des applizierten Drucks ist ein zweites Y-Stück tubusnah am expiratorischen Schenkel eingefügt.

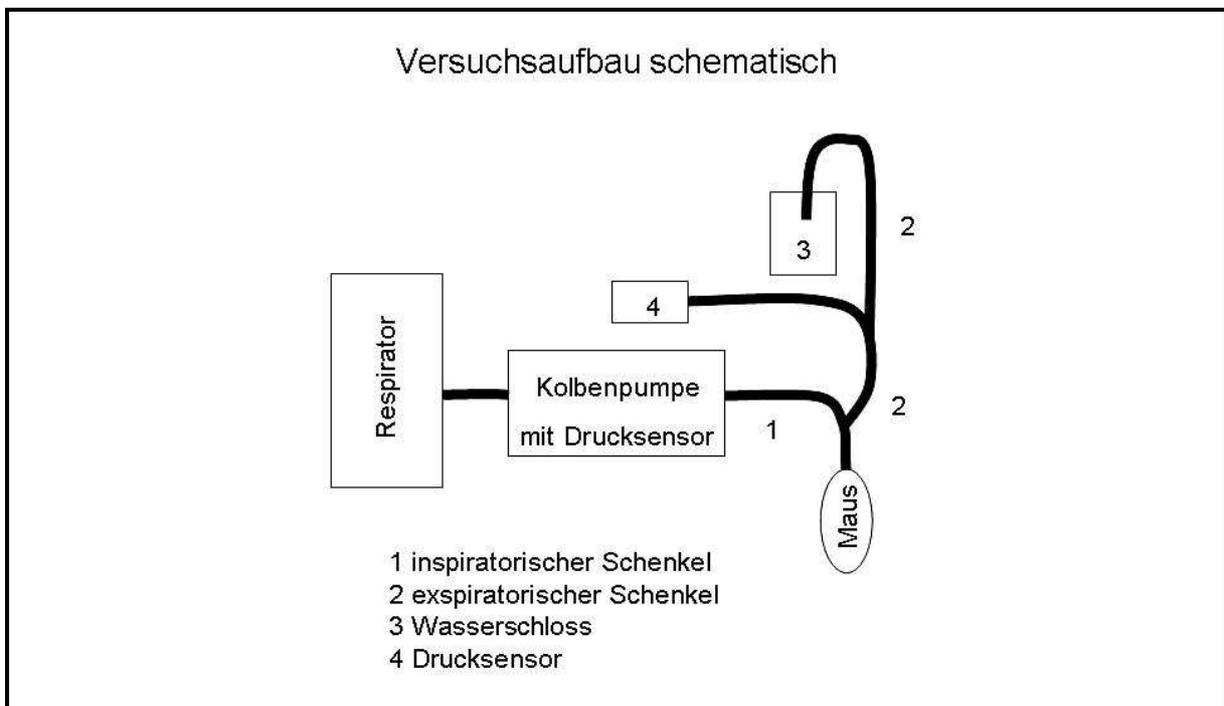


Abb. 10: Schematische Zeichnung des Versuchsaufbaus

### **2.5.2 Zwei-Punkt-Kalibration des Respirators**

Zu Beginn des Versuchs wurde eine Zwei-Punkt-Kalibration der Drucksensoren durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst eine Druck-Kalibration des gesamten Beatmungssystems incl. der Beatmungsschläuche und des Tubus als offenes System entsprechend einer Nullpunkt-Kalibration. Anschließend wurde am System ein definierter Druck von 150 mmH<sub>2</sub>O angelegt. Nach der Zwei-Punkt-Kalibration durchläuft das System die vorher definierten Atemmanöver am offenen und manuell verschlossenen System. Dadurch werden im Gerät die Druckänderungen während der Atemmanöver am gesamten System, das aus Kolben, Beatmungsschlauch und Tubus besteht, kalibriert. Diese Druckänderungen werden bei den lungenmechanischen Messungen und Kalkulationen berücksichtigt. Damit sind auch diffizile Messungen kleinster Volumina möglich. Nach Abschluss der Kalibration wurde mit der volumenkontrollierten Ventilation begonnen.

## 2.6 Lungenmechanik

### 2.6.1 Klassische Lungenmechanik

#### 2.6.1.1 Modell erster Ordnung

Die Luftströmung bei der Ventilation der Lunge wird von verschiedenen statischen und dynamischen Kräften bestimmt. Die Kontraktion der Atemwegsmuskulatur führt während der Inspiration zu einem negativen Druck in den Alveolen gegenüber dem atmosphärischen Druck am Mund. Durch diesen Druckunterschied entsteht ein Atemgasfluss (*flow*) in Richtung der Alveolen. Die Expiration erfolgt durch einen umgekehrten Druckausgleich: Das Entspannen der Atemmuskulatur verursacht einen erhöhten intrathorakalen Druck gegenüber dem atmosphärischen Druck. Dadurch wird wieder ein Flow generiert.

Modellhaft kann man sich den Respirationstrakt als eine Kombination aus starrem Rohr, das die Atemwege darstellt, und einem elastischen Ballon, der für die Lunge steht, vorstellen.

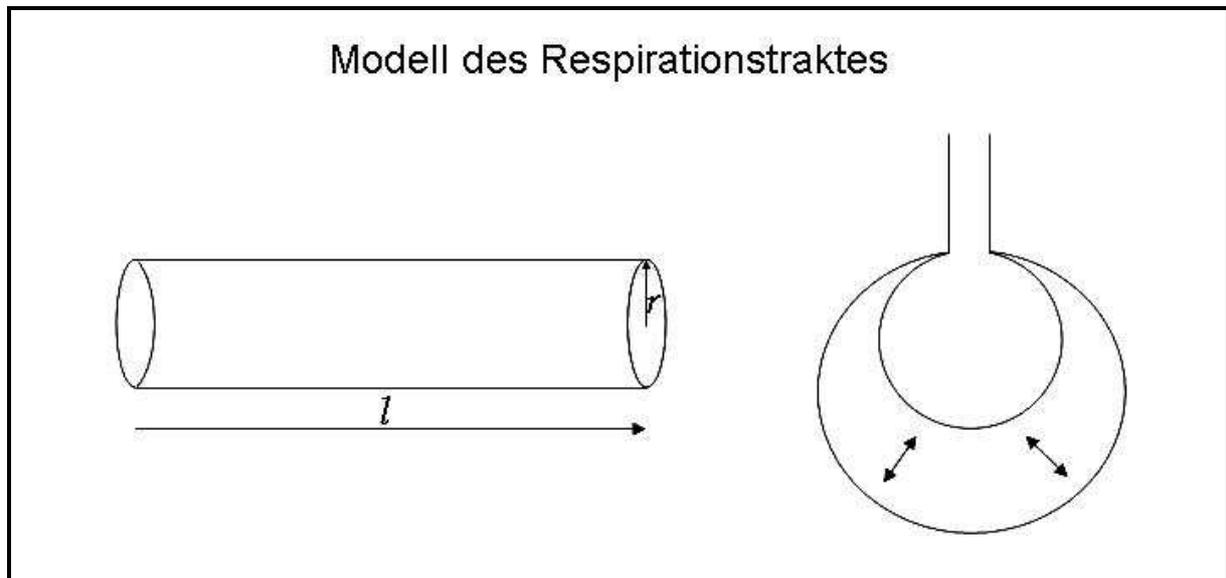


Abb. 11: Starres Rohr und elastischer Ballon als Modell des Respirationstraktes

Der Widerstand, der bei der Inspiration überwunden werden muss, setzt sich zusammen aus

- dem Strömungswiderstand in den Atemwegen (Resistance),
- den elastischen Widerständen der Lunge (Compliance)
- und den Beschleunigungswiderständen (Trägheit des Systems, Inertance).

### 2.6.1.2 Resistance

Der Strömungswiderstand in den Atemwegen wird auch als Resistance  $R_{aw}$  (Atemwegswiderstand) bezeichnet. Zur Berechnung der Resistance wird auf das Modell des starren Rohres zurückgegriffen (siehe Abb.11). Das starre Rohr hat eine Länge  $l$  und einen Radius  $r$ . Die Druckdifferenz zwischen Anfang und Ende des Rohres generiert den Flow. Der Atemgasfluss ist definiert als  $flow = \frac{\Delta V}{t}$ .

Analog zum Ohm'schen Gesetz  $R = \frac{U}{I}$  mit Widerstand  $R$ , Spannung  $U$  und Stromstärke  $I$  wird die Resistance  $R_{aw}$  definiert:  $R_{aw} = \frac{\Delta p}{flow}$ . Bei laminarer

Strömung gilt für den Flow das Hagen-Poiseuille'sche Gesetz:  $flow = \frac{\pi * r^4}{8l * \eta} * \Delta p$ .

Damit ist die Resistance  $R_{aw} = \frac{\Delta p}{flow} = \frac{8l * \eta}{\pi * r^4} \left[ \frac{cmH_2O * s}{l} \right]$ .

Die Resistance ist also direkt proportional zur Länge des Atemweges und zur Gasviskosität  $\eta$  und indirekt proportional zum Radius des Atemweges und zur Kreiszahl  $\pi$ . Der Radius des Atemweges geht dabei mit der vierten Potenz ein. Eine kleine Größenzunahme des Atemweges führt damit zu einer deutlichen Reduktion der Resistance.

Die Resistance des gesamten respiratorischen Systems  $R_{rs}$  setzt sich aus dem Atemwegswiderstand  $R_{aw}$  und dem Reibungswiderstand des Lungengewebes und des Brustkorbs zusammen. Im Modell erster Ordnung werden diese Reibungswiderstände vernachlässigt.

### 2.6.1.3 Elastance und Compliance

Der zweite Widerstand, der bei einer Inspiration überwunden werden muss, ist der elastische Widerstand.

Die Elastance  $E$  eines Gewebes ist umso größer, je größer der Druck ist, der pro Volumenänderung benötigt wird:  $E = \frac{\Delta p}{\Delta V}$ . Der reziproke Wert entspricht der

Compliance  $C$ :  $C = \frac{1}{E}$ .

Die Compliance ist ein Maß für die Dehnbarkeit der Lunge. Zum besseren Verständnis dient das Bild des elastischen Ballons (siehe Abb. 11). Die Compliance ist definiert als das Verhältnis der Volumenänderung zu einer Druckänderung:

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta p}$$

Die Compliance des gesamten respiratorischen Systems  $C_{RS}$  setzt sich aus der Compliance von Lunge  $C_L$  und Brustkorb  $C_W$  zusammen. Da man von einem parallel geschalteten System ausgehen kann, werden nach dem Kirchhoff'schen Gesetz die

Reziprokwerte addiert: 
$$\frac{1}{C_{RS}} = \frac{1}{C_L} + \frac{1}{C_W}$$

#### 2.6.1.4 Berechnung des resultierenden Inspirationsdrucks

Der Inspirationsdruck, der zur Überwindung der o. g. Widerstände aufgebaut werden muss, setzt sich aus drei Komponenten zusammen:  $P = P_{res} + P_{el} + P_{in}$  (Irvin and Bates 2003).

$P_{res}$  beschreibt den Druck gegen den resistiven Widerstand der Atemwege,  $P_{el}$  den Druck gegen den elastischen Widerstand der Lunge und  $P_{in}$  den Druck, der zur Überwindung des inerten Widerstandes (Trägheitswiderstand) aufgewendet werden muss. Der inerte Druck spielt erst bei sehr hohen Frequenzen eine Rolle und ist für die Berechnung des resultierenden Drucks bei normaler Atemfrequenz vernachlässigbar (Irvin and Bates 2003).

Deshalb lässt sich oben stehende Gleichung reduzieren auf:  $P = P_{res} + P_{el}$ .

Für  $P_{res}$  gilt:  $P_{res} = R * flow = R * \frac{\Delta V}{t}$  (siehe oben).  $P_{el}$  ist nach dem Hook'schen

Gesetz definiert:  $P_{el} = E * \Delta V$ .  $E$  steht für die Elastance. Mit  $E = \frac{1}{C}$  ergibt sich für

den elastischen Widerstand  $P_{el}$ :  $P_{el} = E * \Delta V = \frac{1}{C} * \Delta V$ .  $C$  steht für die Compliance.

Unter Berücksichtigung dieser beiden Formeln ergibt sich für den resultierenden Inspirationsdruck folgende Gleichung:  $P = R * flow + \frac{1}{C} * \Delta V$ .

### 2.6.1.5 Druck-Volumen-Kurve

Die Veränderungen der Compliance in Abhängigkeit von Druck und Volumen werden in einer Druck-Volumen-Kurve deutlich. Zur Aufzeichnung einer Druck-Volumen-Kurve werden zu jedem Zeitpunkt Druck und Volumen gemessen. Aus der Druck-Volumen-Kurve kann dann die quasi-statische Compliance ermittelt werden.

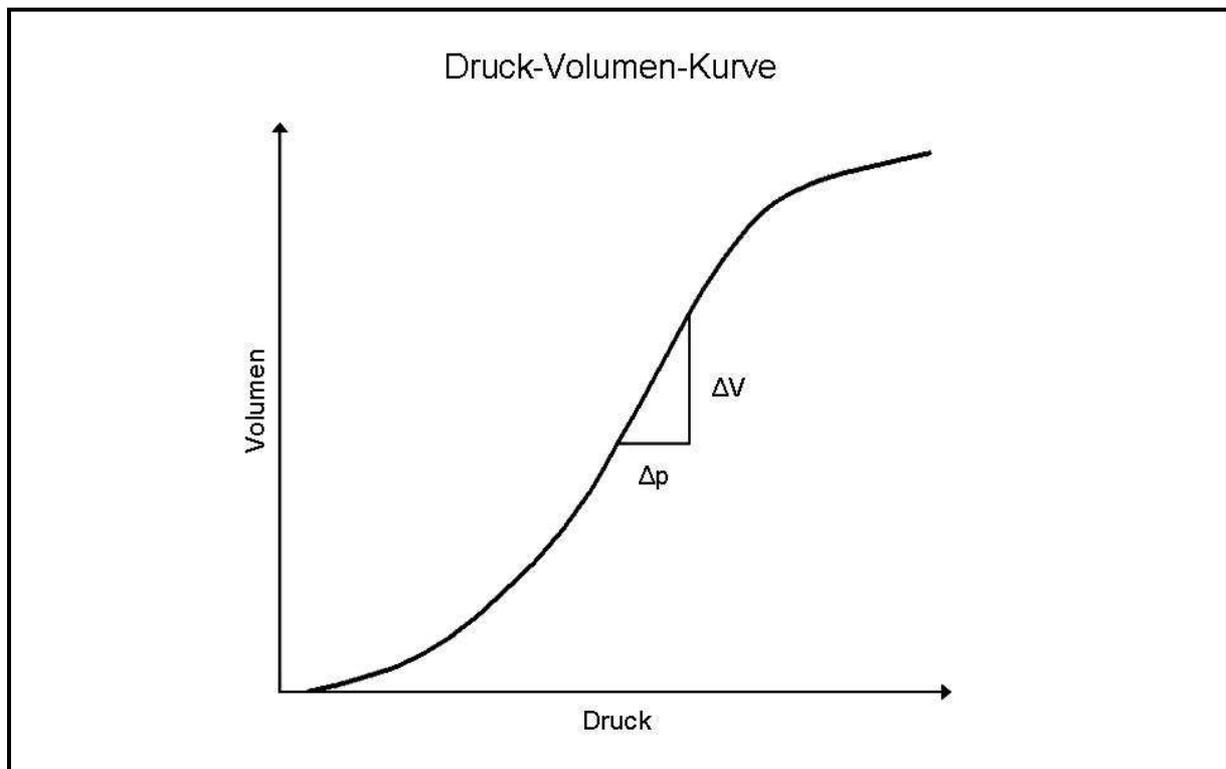


Abb. 12: Druck-Volumen-Kurve der Inspiration

Die Druck-Volumen-Kurve der Inspiration hat eine charakteristische S-Form. Man erkennt, dass die Compliance mit  $C = \frac{\Delta V}{\Delta p}$  der Steigung der Druck-Volumen-Kurve entspricht. Im mittleren Kurvenabschnitt ist die Compliance am höchsten und damit die Atemarbeit am geringsten. Der sehr flache Anstieg der Kurve bei sehr niedrigen Lungenvolumina ist auf den Verschluss kleiner Atemwege und den Kollaps von Alveolarbezirken zurückzuführen. Hier müssen vergleichsweise hohe Drücke zur Inspiration aufgewendet werden. Am Ende der Kurve entsteht wiederum eine Abflachung, da die Alveolarsepten durch Überdehnung ihre Elastizität verlieren.

### 2.6.1.6 Hysterese

Zeichnet man eine quasi-statische Druck-Volumen-Kurve der Expiration auf, so erkennt man, dass sie sich von der inspiratorischen Kurve unterscheidet: die Compliance während der Expiration ist größer. Beide Kurven zusammen bilden eine Schleife, die als Hysterese-Schleife bezeichnet wird. Diese Schleife beschreibt die Unterschiede der Druck-Volumen-Beziehung während der Inspiration und der Expiration.

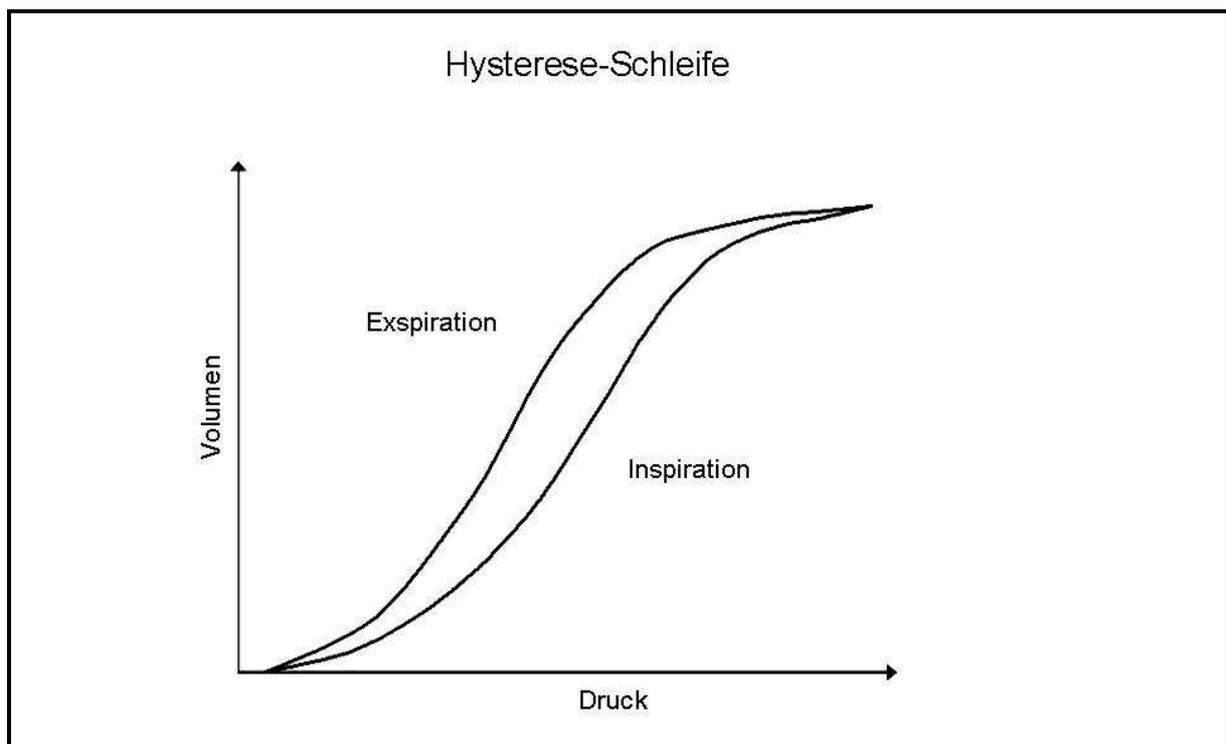


Abb. 13: Hysterese-Schleife; die Fläche der Hysterese-Schleife entspricht der Atemarbeit.

Mit Hysterese wird das verzögerte Eintreten einer Wirkung bzw. das Zurückbleiben einer Wirkung hinter dem jeweiligen Stand der sie bedingenden veränderlichen Kraft beschrieben. Die Hysterese ist damit ein Maß für die Trägheit eines Systems. Die von der Hysterese-Schleife eingeschlossene Fläche entspricht der aufgewendeten Arbeit für den durchgeführten Atemzug.

### 2.6.1.7 Atemarbeit

Die Atemarbeit ist definiert als:  $W = p^* \Delta V$ . Da sich der Druck während der Atemarbeit laufend ändert, muss das Produkt durch das Integral ersetzt werden:

$$W = \int_{V_0}^{V_t} p^* \Delta V .$$

### 2.6.1.8 Atemmechanische Kopplung von Resistance und Compliance

Mechanisch gesehen sind die Atemwege und das Lungenparenchym in Reihe geschaltet. Diese Kopplung kann mit Hilfe der Zeitkonstanten  $\tau$  beschrieben werden:  $\tau = C \cdot R$ .

Die Zeitkonstante ist ein Maß für die Zeit, die ein exponentiell absinkender Prozess benötigt, um auf  $\frac{1}{e}$  (ca. 36,8%) seines Ausgangswertes abzusinken. Übertragen auf das respiratorische System bedeutet dies, dass nach einer Zeitkonstante 63,2% des Lungenvolumens ausgeatmet sind. Für eine vollständige Expiration werden drei bis fünf Zeitkonstanten benötigt (Hammer and Newth 1995).

Eine Erniedrigung der Compliance führt zu einer Verkürzung, eine Erhöhung der Resistance zu einer Verlängerung der Zeitkonstante.

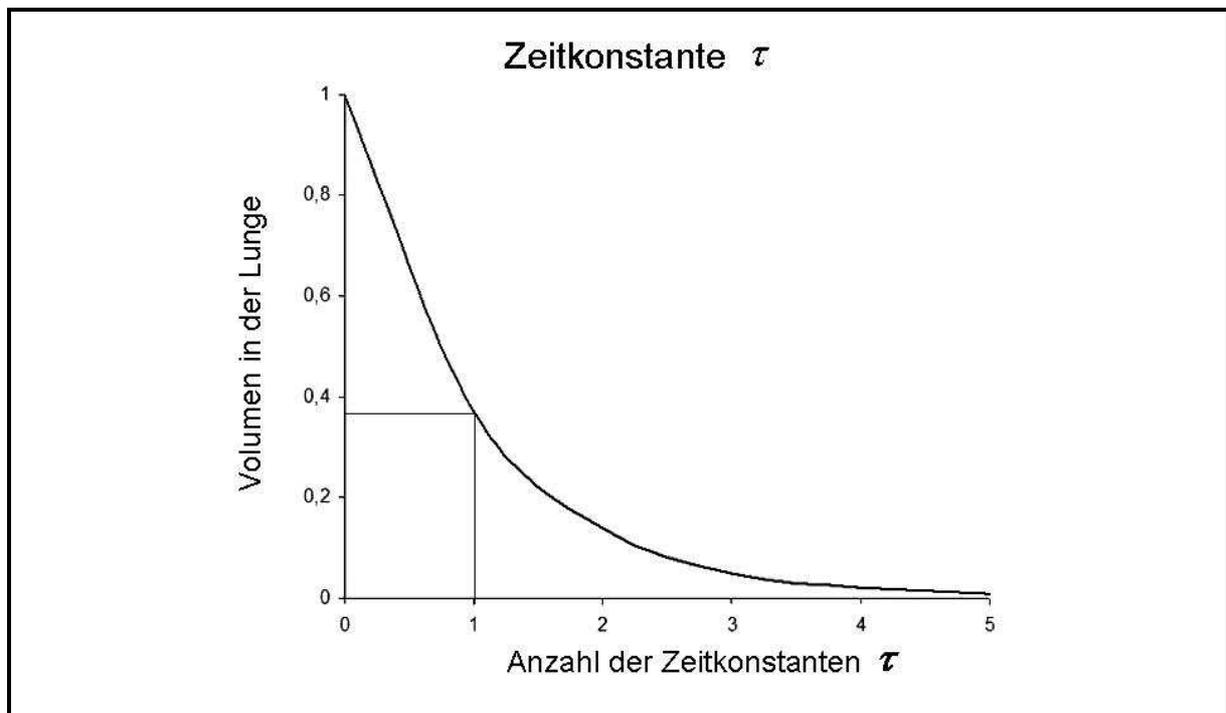


Abb. 14: Zeitkonstante

## **2.6.2 Oszillationstechniken**

### **2.6.2.1 Forcierte Oszillationstechnik**

Oszillationstechniken sind Meßmethoden, mit deren Hilfe die Schwingungseigenschaften des gesamten respiratorischen Systems durch ein oszillierendes Signal bestimmt werden. Die forcierte Oszillationstechnik (FOT) wurde erstmals 1956 von Dubois et al. vorgestellt (Dubois, Brody et al. 1956). Sie dient der Bestimmung der komplexen Impedance (Scheinwiderstand) der Lunge (Irvin and Bates 2003).

Dabei werden zwei Methoden unterschieden: Die Messung der Input-Impedance und die Messung der Transfer-Impedance (Frey 2005). Bei der Input-Impedance-Messung wird das anregende oszillierende Signal über ein Mundstück oder über einen trachealen Tubus appliziert. Bei der Transfer-Impedance-Messung wird das Lungengewebe über eine Lautsprechermembran von außen über den Thorax angeregt. Die Messung der Schwingungsreaktion der Lunge erfolgt bei beiden Verfahren am Mund. In dieser Arbeit wurde die Input-Impedance-Messung verwendet.

Bei der FOT wird die Lunge durch ein definiertes oszillierendes Signal angeregt. Der resultierende Druck und der generierte Flow werden gemessen. Das stimulierende Signal muss einerseits groß genug sein, damit es eine Reaktion hervorruft. Andererseits muss es klein genug sein, damit die Reaktion des respiratorischen Systems nicht verändert wird und linear erfolgt (Irvin and Bates 2003). Als anregendes Signal wird eine komplexe Oszillation verwendet, deren Frequenz aus dem Primzahl-Vielfachen einer Sinusschwingung mit 0,1 Hz besteht. Damit wird vermieden, dass harmonische Schwingungen erzeugt werden (Hantos, Daroczy et al. 1992).

Im Gegensatz zur klassischen Lungenmechanik, bei der, wie oben erläutert, von einem mechanischen Modell erster Ordnung mit starrem Rohr und elastischem Ballon ausgegangen wird, basiert die forcierte Oszillationstechnik auf einem viskoelastischen Modell (Irvin and Bates 2003). In diesem Modell zweiter Ordnung wird das Wirken zusätzlicher, frequenzabhängiger Kräfte in der Lunge deutlich.

### 2.6.2.2 Viskosität und Viskoelastizität

Unter Viskosität versteht man die Zähigkeit eines physikalischen Körpers auf eine aufgewendete Kraft zu reagieren. In der Lungenmechanik ist die Dehnungsviskosität gemeint. Die Viskosität ist temperatur- und frequenzabhängig.

Mit Viskoelastizität wird die temperatur- und frequenzabhängige Elastizität eines Materials beschrieben: Nach Zuführen einer externen Kraft dehnt sich das Material nur unvollständig. Die verbleibende Energie wird in Dämpfungsenergie umgesetzt. Nach Entfernen der externen Kraft relaxiert das Material zunächst wieder verzögert. Die Energie, die durch die Dämpfung gespeichert wurde, wird langsam abgebaut. Die komplexen Beziehungen des viskosen und des elastischen Verhaltens der Lunge werden im viskoelastischen Modell veranschaulicht.

### 2.6.2.3 Das viskoelastische Modell

Das viskoelastische Modell ist ein homogenes mechanisches Modell, das aus einem Atemwegswiderstand  $R_1$  und einem Kelvin-Körper besteht (Irvin and Bates 2003).

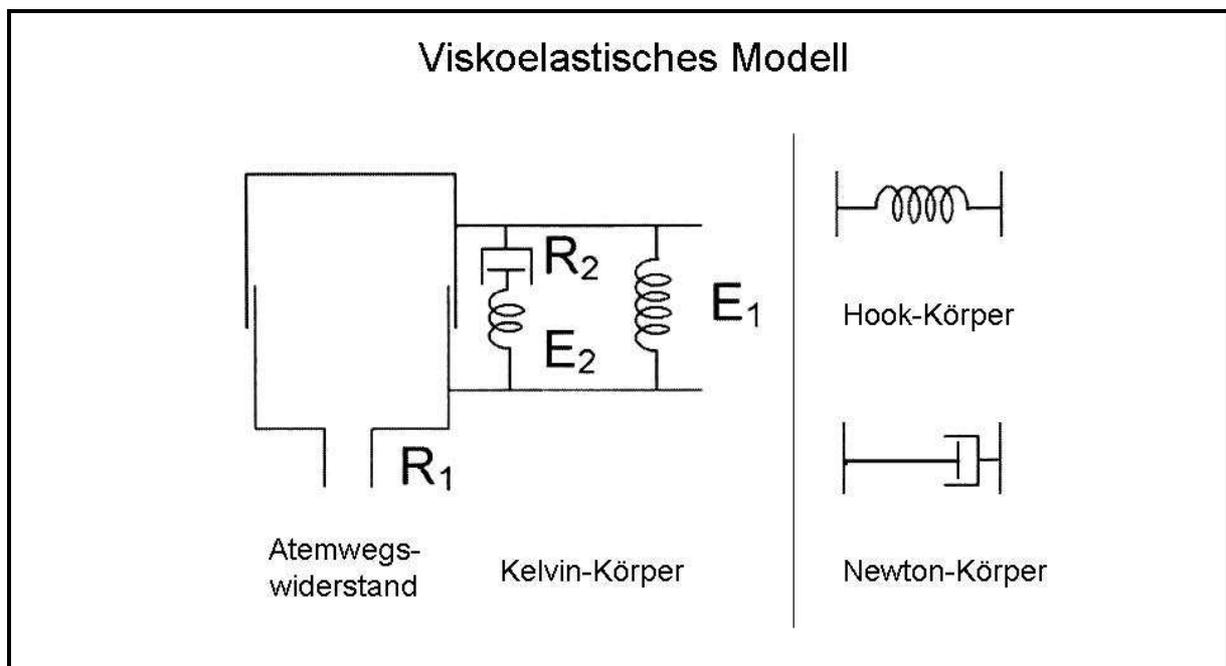


Abb. 15: Viskoelastisches Modell aus Atemwegswiderstand und Kelvin-Körper (Irvin and Bates 2003); Zeichnung modifiziert;

Der Kelvin-Körper besteht aus der Kombination von zwei Federn (Hook-Körper) und einem Dämpfer (Newton-Körper), die die elastische und die viskoelastische

Verformung der Lunge mechanisch darstellen. Der Hook-Körper  $E_1$  spiegelt den rein-elastischen Anteil der Verformung wieder. Die Reihenschaltung von Hook-Körper  $E_2$  und Newton-Körper  $R_2$  entspricht einem Maxwell-Körper und gibt den viskoelastischen Anteil der Verformung wieder.

Auf beide Module des Kelvin-Körpers wirkt die gleiche Kraft. Bei niedriger Krafteinwirkung steht im Maxwell-Körper die Dämpfung im Vordergrund. Erst bei großer Krafteinwirkung überwiegt auch in diesem Element die elastische Verformung.

Die beiden parallelen Wirkungen der Kraft lassen sich wie folgt zusammenfassen: Bei niedriger Krafteinwirkung zeigt die Lunge eine Kombination von viskosem und elastischem Verhalten. Bei höherer Krafteinwirkung spielt die Viskosität keine entscheidende Rolle mehr.

#### 2.6.2.4 Impedance

Die Impedance ist der Scheinwiderstand  $Z$ . Der Scheinwiderstand ist definiert als das Verhältnis der größten Druckdifferenz zur größten Flowdifferenz während eines

Atemzuges:  $|Z| = \frac{\Delta p}{\Delta flow}$ . Wenn also der respiratorische Widerstand hoch ist, führt

ein vorgegebener Druck  $p$  zu einem niedrigen Flow ( $flow$ ) und damit zu einer hohen Impedance  $Z$ . Die Impedance ist zudem frequenzabhängig.

Die Lungenimpedance besteht aus einem realen und einem imaginären Anteil. Der reale Teil der Impedance entspricht der frequenzabhängigen Resistance. Der imaginäre Anteil der Lungenimpedance wird Reactance genannt und reflektiert die frequenzabhängige respiratorische Compliance und die frequenzabhängige Inertance (Trägheit der Atemwegsluft):

$$\text{Impedance } Z = \text{Resistance } R + \text{Reactance } X$$

$$\text{Impedance } Z = \text{Resistance } R + (\text{Compliance } C + \text{Inertance } I)$$

Zur mathematischen Veranschaulichung wird die Impedance als Vektor mit definierter Länge und Phasenwinkel  $\phi$  dargestellt (Frey 2005). Der Phasenwinkel beschreibt die Phasenverschiebung zwischen Druck  $P(\omega)$  und Flow  $flow(\omega)$ .

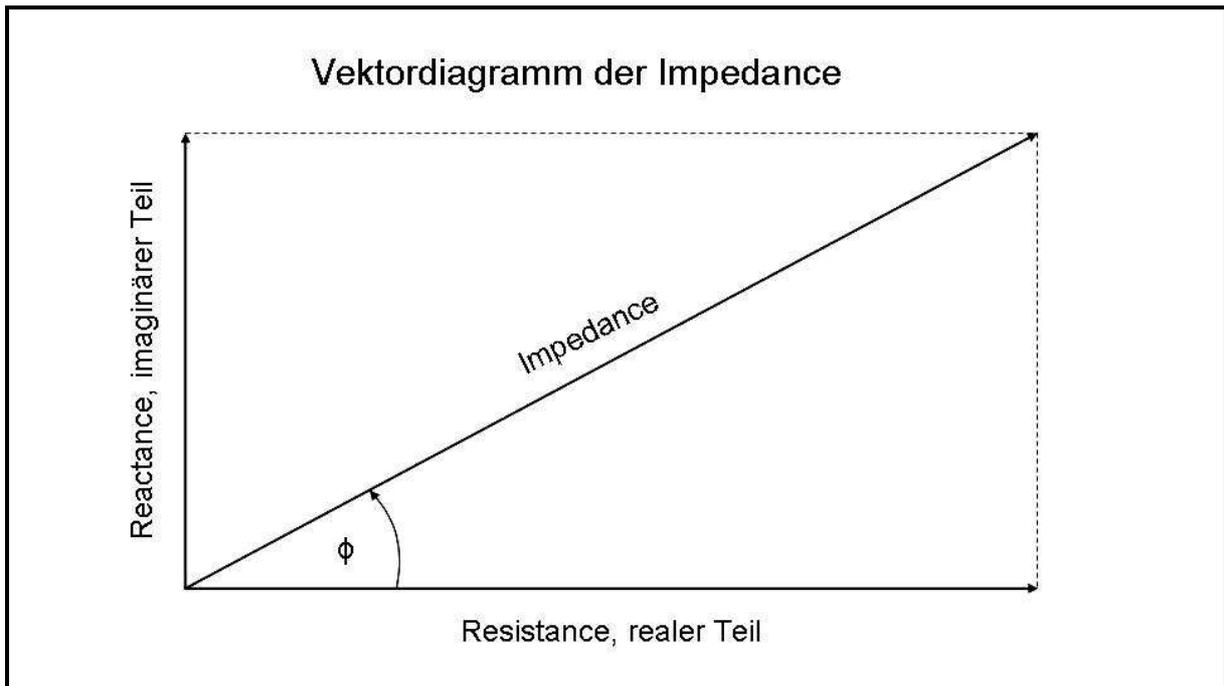


Abb. 16: Vektordiagramm der Impedance mit Phasenwinkel  $\phi$  (Frey 2005); Zeichnung modifiziert;

Zur Bestimmung der Impedance wird bei der FOT ein sinusförmiger Druck  $P(\omega)$  einer vorgegebenen variierenden Frequenz  $\omega$  in das respiratorische System appliziert. Der resultierende Flow  $flow(\omega)$  wird gemessen. Für die respiratorische Impedance  $Z_{rs}$

$$\text{ergibt sich damit: } Z_{rs} = \frac{\Delta P(\omega)}{\Delta flow(\omega)}.$$

Mit der FOT werden also Resistance, Compliance und Inertance in Abhängigkeit von der Frequenz des Flow-Signals bestimmt. Die Daten zu Druck und Volumen und dem daraus errechneten Flow werden mit der Fast Fourier Transformation in den Frequenzbereich umgerechnet (Irvin and Bates 2003). Aus ihren Beziehungen können dann der reelle und der imaginäre Anteil der Impedance in Abhängigkeit von der Frequenz berechnet werden.

### 2.6.2.5 Fast Fourier Transformation

Die Fast Fourier Transformation dient dazu, einen zeitlichen Verlauf in einen frequentiellen Verlauf zu transformieren. Ein komplexes Signal (hier eine Summe von Sinusfunktionen) wird in Abhängigkeit unterschiedlicher Amplituden und Phasenrelationen ausgedrückt. Nach den Prinzipien der Überlagerung wird ein periodisches Signal in eine Anzahl sinusoider Komponenten zerlegt, deren Summe wieder das ursprüngliche Signal ergibt.

### 2.6.2.6 Das Konstante-Phase-Modell

Auf der Messung der Impedance beruht ein noch komplexeres Modell der Lunge, das nicht nur Werte für Resistance und Compliance festlegt, sondern klarer zwischen zentralen und peripheren Veränderungen in der Lunge unterscheidet. Dieses Modell ist bekannt als das Konstante-Phase-Modell von Hantos et al. (Hantos, Daroczy et al. 1992).

Beim viskoelastischen Modell wird angenommen, dass die Lunge ein Ein-Kompartiment-Modell ist: das Modell besteht aus einem Widerstand  $R$ , einem elastischen Element (Compliance  $C$ ) und einem Trägheitselement (Inertance  $I$ ).

Der Widerstand  $R$  entspricht dem Atemwegswiderstand. Die Compliance  $C$  beschreibt die viskoelastischen Eigenschaften des Lungengewebes, die sich aus Gewebe-Dämpfung und Gewebe-Elastance zusammensetzen. Die Inertance  $I$  ist ein Maß für die Trägheit der Luft in den Atemwegen.

Der Druck  $P(\omega)$  und der durch den Druck generierte Flow  $flow(\omega)$  sind nur dann in Phase, wenn die Reactance null ist, also Compliance und Inertance zusammen den Wert null ergeben. Nur dann trifft die oben bereits genannte Gleichung mit

$Z_{rs} = \frac{P(\omega)}{flow(\omega)}$  zu und die Impedance ist dann lediglich eine Funktion des

Amplitudenverhältnisses von Druck  $P(\omega)$  und Flow  $flow(\omega)$ .

Eine Phasenverschiebung entsteht sowohl durch die Compliance als auch durch die Inertance. Die Compliance führt zu einer negativen Phasenverschiebung. Die Inertance verursacht eine positive Phasenverschiebung zwischen Druck- und Flow-Kurve (Frey 2005).

Mathematisch wird die Impedance als komplexe Zahl ausgedrückt, die aus einem realen Anteil, der Resistance, und einem imaginären Anteil, der Reactance, besteht.

Die Beziehungen der einzelnen Größen zueinander werden in der folgenden

Gleichung ausgedrückt:  $Z_{rs} = R_{aw} + j\omega I_{aw} + \frac{G_L - jH_L}{\omega^\alpha}$  (Hantos, Daroczy et al.

1992; Irvin and Bates 2003).

In die Gleichung gehen die Resistance mit dem Atemwegswiderstand  $R_{aw}$  und die Reactance ein. Der Atemwegswiderstand  $R_{aw}$  entspricht der frequenzabhängigen Newton-Resistance  $R_\eta$ .

Die Reactance besteht aus der Trägheit der Atemluft in den Atemwegen (Inertance  $I_{aw}$ ) und der Compliance. Die Compliance ist abhängig von der Frequenz und setzt sich aus der Gewebe-Dämpfung  $G_L$  und der Gewebe-Elastance  $H_L$  zusammen.

In obiger Gleichung ist  $j$  die Einheit der imaginären Zahlen und ist definiert als:

$j = \sqrt{-1}$ . Mit  $j$  wird die Phasenverschiebung zwischen Resistance und Reactance in Abhängigkeit von der Kreisfrequenz  $\omega$  ausgedrückt.  $\omega$  ist definiert als:  $\omega = 2\pi f$ .

Die Frequenzabhängigkeit der Impedanz  $Z_{rs}$  wird durch  $\alpha$  dargestellt:

$\alpha = \left(\frac{2}{\pi}\right) \arctan\left(\frac{1}{\eta}\right)$ .  $\eta$  steht in dieser Gleichung für  $\eta = \frac{G_L}{H_L}$  und ist damit ein Maß für

die Gewebe-Beschaffenheit der Lunge, die sowohl die Gewebe-Dämpfung als auch die Gewebe-Elastizität berücksichtigt (Flemmer, Jani et al. 2007).

## **2.7 Durchführung der Messungen und Berechnung der Daten**

Zur Messung der lungenmechanischen Parameter wurde jeweils alle fünf Minuten die Standard-Beatmung unterbrochen. Die einzelnen Atemmanöver wurden automatisiert in standardisierter Reihenfolge durchgeführt. Zu Beginn eines jeden Messzyklus fanden zwei Rekrutierungsmanöver mit einem Spitzendruck bis 30 cmH<sub>2</sub>O statt, um mögliche atelektatische Lungenabschnitte zu rekrutieren und somit vor jeder Messung gleiche Ausgangsbedingungen zu garantieren.

### **2.7.1 Tiefe Inflation zur Bestimmung der totalen Lungenkapazität TLC**

Jeweils erster Parameter der Lungenmechanik eines jeden Untersuchungszyklus war die Messung der totalen Lungenkapazität (TLC). Die TLC ist das Luftvolumen, das sich nach maximaler Inspiration in der Lunge befindet.

Zur Messung der TLC folgte nach einer Expiration über drei Sekunden eine langsame Inflation der Lunge bis zu einem Spitzendruck von 30 cmH<sub>2</sub>O. Der Spitzendruck wurde für weitere drei Sekunden gehalten, so dass ein inspiratorisch gehaltenes Plateau des Lungenvolumens erreicht wurde (s. Abb. 17). Das end-inspiratorisch applizierte Volumen wurde gemessen. Es gibt ausreichend genau die TLC wieder (Tankersley, Rabold et al. 1999).

### **2.7.2 Sinusoidaler Atemzug zur Bestimmung von dynamischer Compliance und dynamischer Resistance**

Zur Bestimmung der dynamischen Compliance und der dynamischen Resistance wurde anschließend ein standardisierter Atemzug mit der eingestellten Beatmungsfrequenz vorgegeben. Die Form des Atemzugs ähnelte einer Sinuskurve (s. Abb. 18).

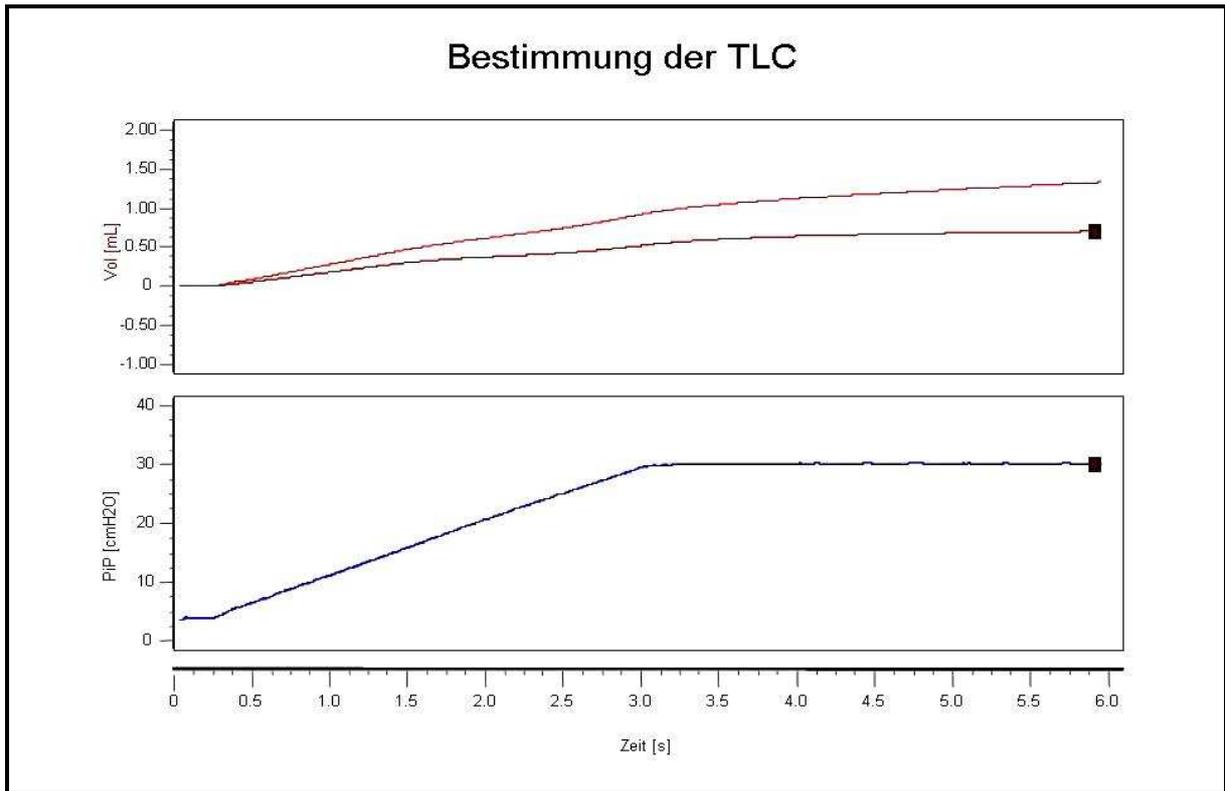


Abb. 17: Bestimmung der TLC durch das end-inspiratorisch applizierte Volumen

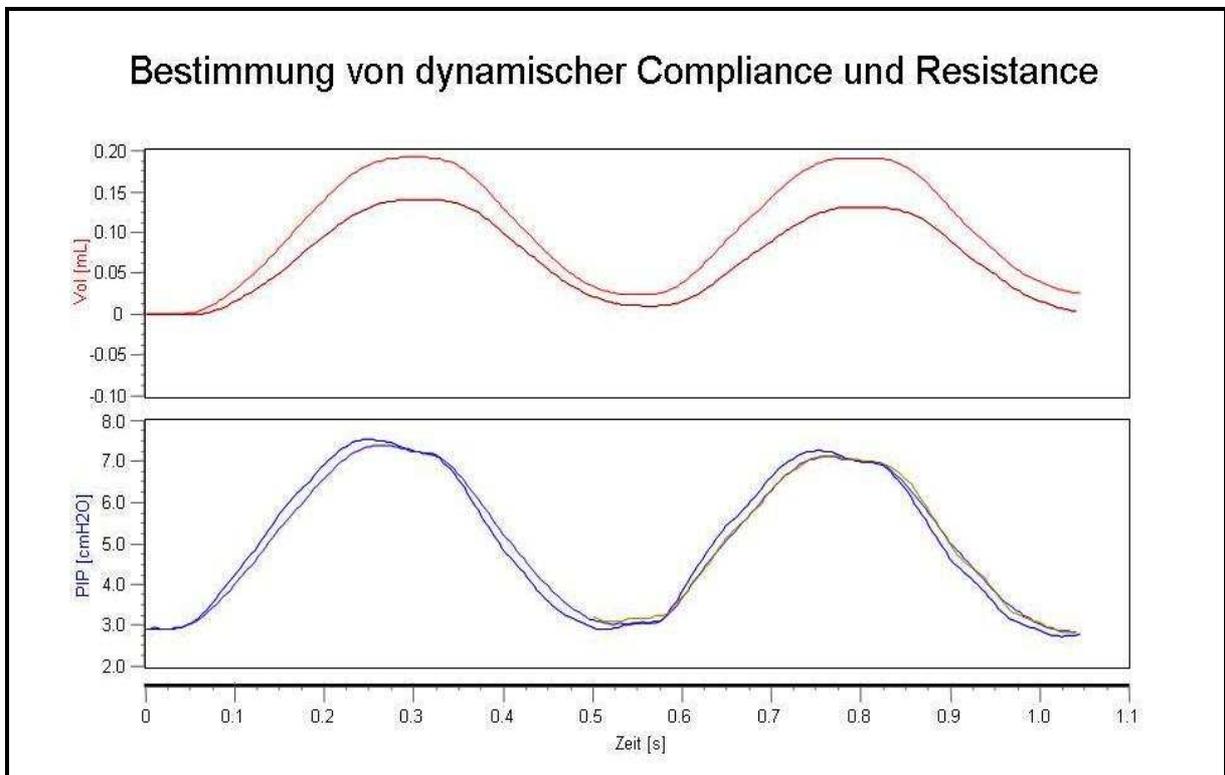


Abb. 18: Bestimmung von dynamischer Compliance und dynamischer Resistance durch einen standardisierten Atemzug

Die dynamische Compliance  $C_{dyn}$  errechnet sich mit  $C_{dyn} = \frac{\Delta V}{\Delta p} = \frac{V_{Tex}}{PIP - PEEP}$ .  $PIP$  ist der applizierte Spitzendruck während des standardisierten Atemzuges und  $PEEP$  der end-expiratorische Druck.  $V_{Tex}$  ist das expiratorisch gemessene Tidalvolumen. Aus der dynamischen Compliance kann mit  $E_{dyn} = \frac{1}{C_{dyn}}$  die dynamische Elastance berechnet werden.

Mit der Gleichung  $P = R_{dyn} * flow + \frac{1}{C_{dyn}} * \Delta V$  (siehe oben) kann die dynamische Resistance  $R_{dyn}$  berechnet werden:  $R_{dyn} = (P - \frac{\Delta V}{C_{dyn}}) * \frac{1}{flow}$ . In dieser Gleichung ist  $P$  der applizierte Spitzendruck,  $flow$  der Atemwegsfluss,  $C_{dyn}$  die berechnete Compliance und  $\Delta V$  das expiratorische Tidalvolumen.

Eigentlich entspricht  $P$  nicht dem applizierten Spitzendruck, sondern dem maximalen intrathorakalen Druck. Bei großen Tieren kann dieser z. B. intraösophageal gemessen werden. Bei der Maus kann man ihn am offenen Thorax messen oder aber die berechnete Hypothese zu Grunde legen, dass die Thoraxwand im Vergleich zur Lunge nur sehr wenig zum intrathorakalen Druck beiträgt (Tankersley, Rabold et al. 1999; Lai and Chou 2000). Entsprechend wurde zur Berechnung der applizierte Spitzendruck  $PIP$  verwendet.

Der generierte Atemwegsfluss  $flow$  berechnet sich aus  $flow = \frac{\Delta V}{t} = \frac{V_{Tex}}{t}$ . Die Zeit  $t$  entspricht der Zeit, die für die Expiration benötigt wird. Damit ergibt sich für  $R_{dyn}$  aus der oben genannten Gleichung:  $R_{dyn} = (P - \frac{\Delta V}{C_{dyn}}) * \frac{1}{flow} = (P - \frac{V_{Tex}}{C_{dyn}}) * \frac{t}{V_{Tex}}$ .

### 2.7.3 Druck-Volumen-Schleife zur Bestimmung der statischen Compliance und der statischen Resistance

Als dritte Messung folgte die Aufzeichnung einer Druck-Volumen-Schleife (engl.: pressure-volume-Loop, PV-Loop) zur Bestimmung der quasi-statischen mechanischen Eigenschaften.

Die PV-Loop beginnt nach einer Expiration mit einer langsamen Inflation bis zum Erreichen der TLC bei einem Plateaudruck von 30 cmH<sub>2</sub>O. Anschließend folgt eine langsame Deflation (Lai and Chou 2000).

Während des Beatmungsmanövers werden der benötigte Druck und das applizierte Volumen zu jedem Zeitpunkt aufgezeichnet.

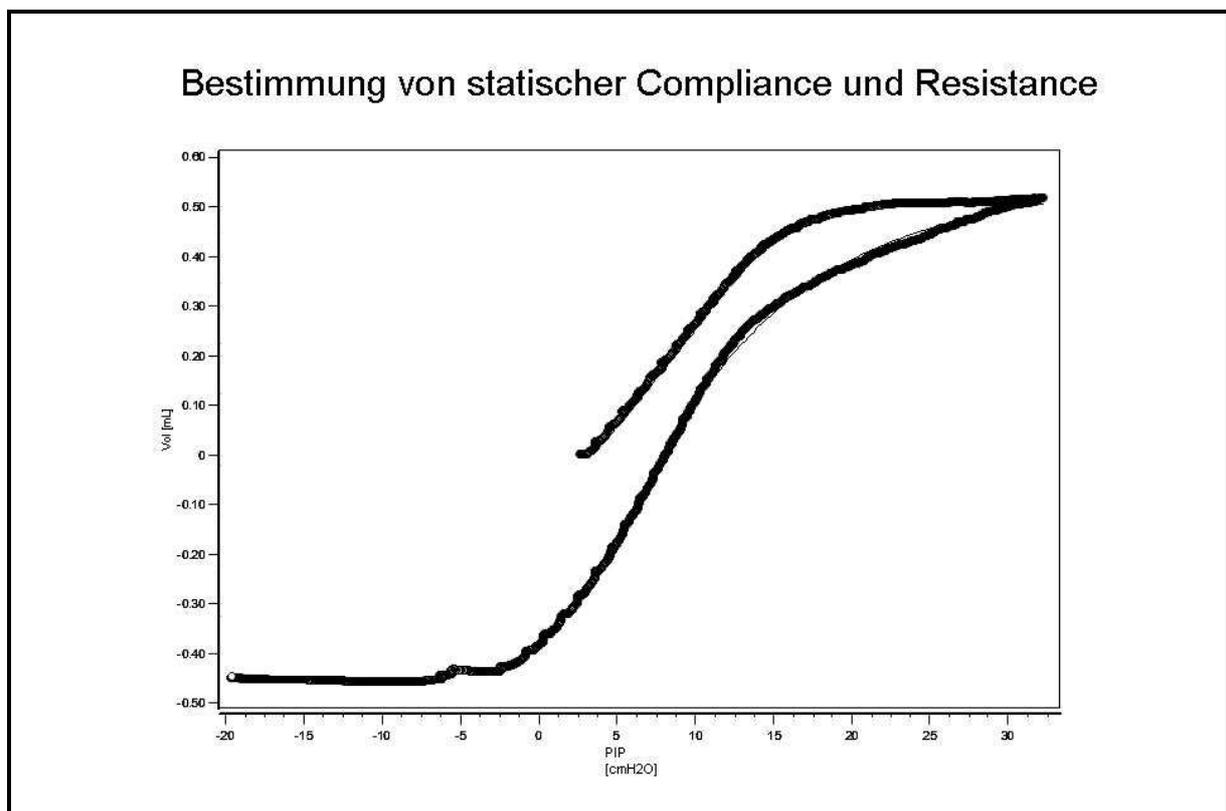


Abb. 19: Bestimmung von statischer Compliance und statischer Resistance durch eine Druck-Volumen-Schleife

Die statische Compliance  $C_{stat}$  errechnet sich analog zur dynamischen Compliance

$C_{dyn}$  mit  $C_{stat} = \frac{\Delta V}{\Delta p} = \frac{V}{P - PEEP}$  (siehe oben).  $P$  ist der applizierte Plateaudruck

während des Atemmanövers und  $PEEP$  der end-expiratorische Druck.  $V$  ist das applizierte Lungenvolumen.

Zur Berechnung des Volumens  $V$  in Abhängigkeit vom applizierten Druck wurde die Salazar-Knowles-Gleichung auf den gemessenen Plateaudruck angewendet (Salazar and Knowles 1964):  $V = V_{max} - Ae^{-KP}$ , wobei  $V_{max}$  das Volumen ist, das auf einen unendlich großen Druck  $P$  extrapoliert ist (Lovgren, Jania et al. 2006).  $A$  und  $K$  sind Konstanten,  $e$  ist die Eulersche Zahl.

Aus der statischen Compliance kann mit  $E_{stat} = \frac{1}{C_{stat}}$  die dynamische Elastance  $E_{stat}$  berechnet werden.

Herleitung und Berechnung der statischen Resistance  $R_{stat}$  erfolgen analog zur oben beschriebenen Herleitung und Berechnung der dynamischen Resistance:

$R_{stat} = (P - \frac{\Delta V}{C_{stat}}) * \frac{1}{flow}$ .  $\Delta V$  entspricht dem mit der Salazar-Knowels-Gleichung berechneten Volumen  $V$ .

#### 2.7.4 Forcierte Oszillationstechnik zur Bestimmung der Impedance

Nach einer kurzen Erholungsphase mit Standard-Ventilation erfolgte jeweils als letzte Messung die Impedanzmessung der Lunge durch forcierte Oszillations-Technik (FOT). Hierzu wurde eine druckgenerierte, über acht Sekunden andauernde pseudorandomisierte Oszillation appliziert. Die Oszillation bestand aus dem Primzahl-Vielfachen einer Sinusschwingung mit 0,1 Hz und hatte eine Amplitude von 3 ml/kg. Die Oszillation beinhaltete Frequenzen zwischen 0,5 und 19,6 Hz (Flemmer, Jani et al. 2007). Die Daten wurden bei 256 Hz gesammelt. Sie wurden innerhalb von 4-Sekunden-Fenstern analysiert, wobei die Fenster sich jeweils zu 66% überlappten. Mit der FOT werden die Atemwegsträgheit, die Gewebe-Elastance, die Gewebe-Dämpfung und die Newton-Resistance bestimmt. Die Newton-Resistance wird auch als Widerstand der zentralen Atemwege bezeichnet. Der mathematische Zusammenhang ist im Konstante-Phase-Modell beschrieben (s.o.):

$Z_{rs} = R_{aw} + j\omega I_{aw} + \frac{G_L - jH_L}{\omega^\alpha}$  (Hantos, Daroczy et al. 1992; Irvin and Bates 2003).

Bei der Maus kann die Trägheit der Atemluft in den Atemwegen bei Frequenzen unter 20 Hz vernachlässigt werden (Tomioka, Bates et al. 2002). Mit Hilfe des verwendeten Auswertungsprogramms Flexdat der Firma Scireq (Montreal, Canada) wurden mittels Fast Fourier Transformation Daten für Resistance, Gewebe-Elastance und Gewebe-Dämpfung errechnet.

## Bestimmung von Resistance und Reactance mit FOT

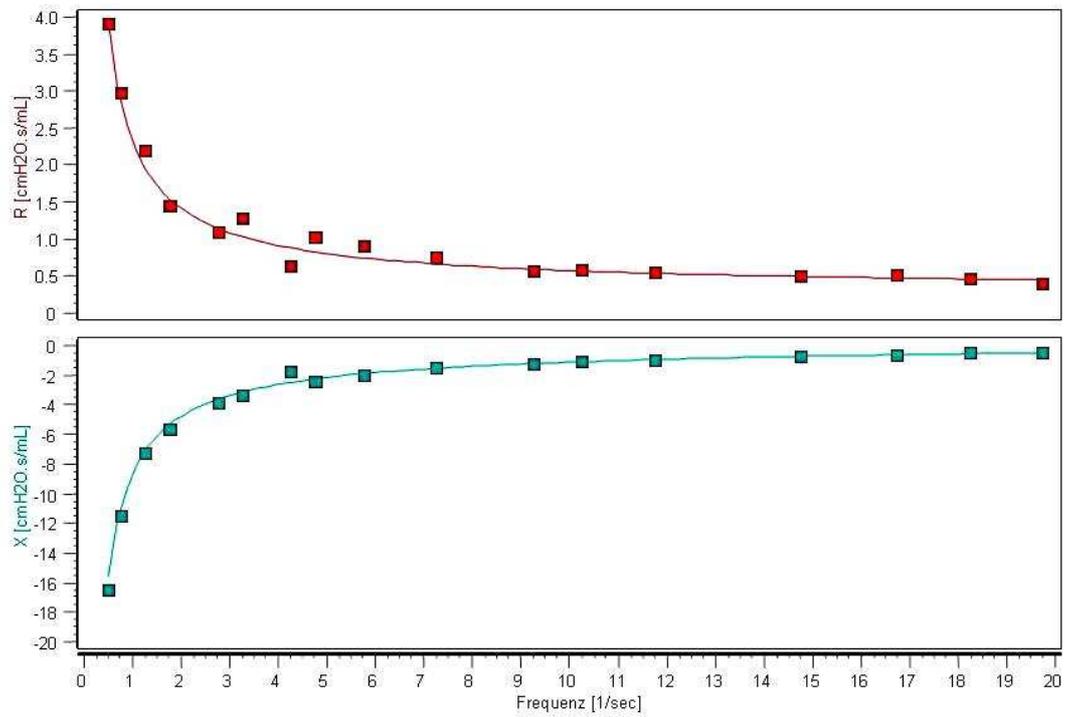


Abb. 20: Bestimmung von Resistance  $R$  und Reactance  $X$  durch die forcierte Oszillationstechnik

## **2.8 Materialverarbeitung**

### **2.8.1 Histologie**

#### **2.8.1.1 Erstellung histologischer Präparate**

Nach Ablauf der 24-stündigen Mindest-Fixierungszeit des Lungengewebes in Formalin wurden die Gewebestückchen in ein in Formalin getränktes Tuch eingeschlagen und auf einen Gitterträger gesetzt. Mit dem Tuch wird während des Waschvorganges ein Verrutschen der Präparate auf dem Gitterträger verhindert. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde das Formalin ausgewaschen. Der Waschvorgang dauerte jeweils eine Stunde; zunächst wurde zweimal mit 70%igem Alkohol, anschließend je dreimal mit 96%igem und 100%igem Alkohol gewaschen. Danach folgten zwei Waschungen mit Xylol für jeweils 1,5 Stunden. Zur endgültigen Fixierung wurden die Präparate auf den Gitterträgern zweimal bei 63°C in flüssigem Paraffin für jeweils 1,5 Stunden gewaschen. Anschließend wurden die Gitterträger entnommen. Das flüssige Paraffin wurde abgossen. Mit einer Pinzette wurden die Präparate in kleine Förmchen mit flüssigem Paraffin umgesetzt und manuell fixiert, bis das Paraffin mittels einer Kühlplatte angekühlt war und der Verfestigungsprozess einsetzte. Die Förmchen wurden mit flüssigem Paraffin aufgegossen, um eine komplette Einbettung der Präparate zu erreichen. Nach vollständiger Abkühlung wurden die festen Paraffin-Blöcke aus den Förmchen gelöst und mit einem Mikrotom in 1,0 µm dicke Schnitte geschnitten (Schlittenmikrotom, R. Jung GmbH, Nußloch, Deutschland). Anschließend wurden die Präparate auf Objektträgern fixiert und erhielten eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).

#### **2.8.1.2 Histologische Untersuchung**

Die histologische Untersuchung der Präparate wurde von Dr. A. Ö. Yildirim (Institute of Lung Biology and Disease, iLBD, Helmholtz Zentrum München) in Zusammenarbeit mit Prof. O. Eickelberg (Chairman, Experimental Pneumology, Comprehensive Pneumology Centre München, CPC) durchgeführt.

Bei der mikroskopischen Untersuchung sollten folgende Pathologien am Lungengewebe mit einem vorher festgelegten Score (siehe Tab. 2) bewertet werden: emphysematöse Veränderungen, Schrumpfung des Lungengewebes, Septumverdickung und Inflammationsreaktion.

### Kriterien der histologischen Bewertung

	mild	moderat	stark
Emphysem (Verlust an Alveolen)	20-30%	30-50%	> 50%
Schrumpfung (in Prozent)	20-30%	30-50%	> 50%
Septumverdickung (in Prozent)	20-30%	30-50%	> 50%
Entzündung (Entzündungszellen)	wenige	1 oder 2- lagiger Ring	3 oder mehr- lagiger Ring

Tab. 2: Kriterien der histologischen Bewertung

#### 2.8.1.3 Bestimmung der mittleren Sehnenlänge der Alveolen

Anschließend wurde computerunterstützt die „mean chord length“ (MCL), die mittlere Sehnenlänge der Alveolen, gemessen. Die MCL repräsentiert die Distanz zwischen den Alveolarsepten und somit die Alveolengröße. Eine Vergrößerung der Alveolen führt folglich zu einer Vergrößerung der MCL. Die MCL ist definiert als mittlerer Abstand zwischen benachbarten Alveolarsepten. Die Alveolarwand wird in die Messung nicht mit einbezogen, so dass die MCL von der Dicke der Alveolarwand unabhängig ist.

Die Auswertung wurde bei einer Schnittgröße von 2000x2000 µm und einer 20-fachen Vergrößerung durchgeführt. Es wurde ein kombiniertes System aus Testlinien und Testpunkten verwendet.

Zunächst wurde ein vertikales Liniennetz über das Sichtfenster gelegt. Die Kreuzungspunkte der Linien mit Alveolarepithel bzw. den Wänden der Ductus alveolares wurden markiert. Anschließend wurde ein Netz aus Testpunkten über das Sichtfenster gelegt. Diese Punkte wurden markiert, wenn sie auf ein Alveolarseptum fielen. Die Anzahl der markierten Punkte aus dem Liniennetz ( $l$ ) wurde ins Verhältnis gesetzt zur Anzahl der markierten Punkte aus dem Netz der Testpunkte ( $p$ ):  $l/p$ . Diese Vorgehensweise wird als „total vertical projections“ (TVP) bezeichnet und

ermöglicht die direkte Bestimmung der absoluten Länge eines Objektes. Die MCL berechnet sich nach folgender Formel:

$$MCL = \frac{\frac{l}{P} * \sum_{i=1}^n P_i}{\frac{\sum_{i=1}^n L_i}{2}}$$

In dieser Formel ist  $P$  definiert als Anzahl der Testpunkte.  $L$  ist definiert als Anzahl der Testlinien.

## **2.8.2 Bestimmung des Quotienten Feucht-/Trockengewicht**

Das Feuchtgewicht des Lungengewebes wurde unmittelbar nach Entnahme bestimmt. Anschließend wurde das Lungengewebe in einem Trockenschrank bei 95°C verwahrt. Nach mindestens 48 Stunden wurde das Trockengewicht bestimmt und die Ratio Feucht-/Trockengewicht berechnet.

## **2.8.3 Analyse der Lavage**

### **2.8.3.1 Zytologie**

Die Lavageflüssigkeit wurde in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und bei 4°C für 15 min bei 2000 U/min ( $RCF = 559 g$ ) zentrifugiert (Rotina 35 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde abpipettiert und für die Interleukin-Bestimmung bei – 80°C tiefgefroren. Die Zellen wurden in 400 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl im Zell-Counter Coulter AcT8 gemessen. Die resuspendierten Zellen wurden in zwei Portionen à 200 µl mit jeweils 200 µl PBS in den Cytospin (Shandon Elliott) pipettiert und zur Fixierung auf einen Objektträger für 15 min mit 1500 U/min zentrifugiert. Nach dem Trocknen erhielten die Präparate eine Mai-Grünwald-Färbung. Bei 100-facher Vergrößerung wurden 100 Zellen pro Präparat von einem verblindeten Untersucher morphologisch differenziert.

### **2.8.3.2 Entzündungsmediatoren**

#### **2.8.3.2.1 Pathophysiologie**

Die mechanische Beatmung der Lunge schädigt das Lungengewebe. Pathophysiologisch gesehen läuft eine Entzündungsreaktion ab. Zur Einschätzung des Grades der Entzündungsreaktion bei den Versuchstieren wurden die Akut-Phase-Proteine TNF- $\alpha$ , Il-1 $\beta$ , Il-6 und MIP-2 in der bronchoalveolären Lavage und

bei den Sauerstoffprovokationsversuchen zusätzlich im homogenisierten Lungengewebe bestimmt. MIP-2, das „macrophage inflammatory protein 2“ ist ein funktionelles Analogon des humanen Interleukin II-8 (Tekamp-Olson, Gallegos et al. 1990).

#### **2.8.3.2.2 Bio-Plex® Immunoassay**

Zur quantitativen Bestimmung der Zytokine in der Lavage und im Überstand des homogenisierten Lungengewebes wurde das Protein Assay Bio-Plex® Pro™ Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) verwendet. Mit dem Bio-Plex® System können aus 50 µl Gewebeüberstand bzw. 25 µl Lavage-Flüssigkeit simultan bis zu 100 verschiedene Zytokine bestimmt werden.

Das System basiert auf einem Immunoassay der Sandwich-Technik. Für jedes zu bestimmende Zytokin werden monoklonale Antikörper an spezifische Beads gebunden. Beads sind polystyrene Mikrosphären, die mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen versetzt sind. Die Relation der beiden Farbstoffe zueinander ist für jedes Bead spezifisch.

Die verschiedenen Beads mit den verschiedenen monoklonalen Antikörpern werden in eine Mikrotiterplatte gegeben. Nach einem Waschvorgang werden die zu untersuchenden Proben zugefügt.

Die monoklonalen Antikörper reagieren mit den Zytokinen der zu untersuchenden Probe. Es entsteht ein Antigen-Antikörper-Komplex. Nach mehreren Waschvorgängen zur Elimination von ungebundenem Protein wird ein biotinylierter Detektionsantikörper zugegeben, der spezifisch an einer zweiten Stelle an das Antigen bindet. Es entsteht ein Sandwich, ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, der dieser Technik ihren Namen gab (s. Abb. 21).

Anschließend wird Streptavidin-Phycoerythrin zugegeben. Dieses sog. Reporter Konjugat fluoresziert und bindet spezifisch an den Detektionsantikörper. Es markiert somit jeden Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex.

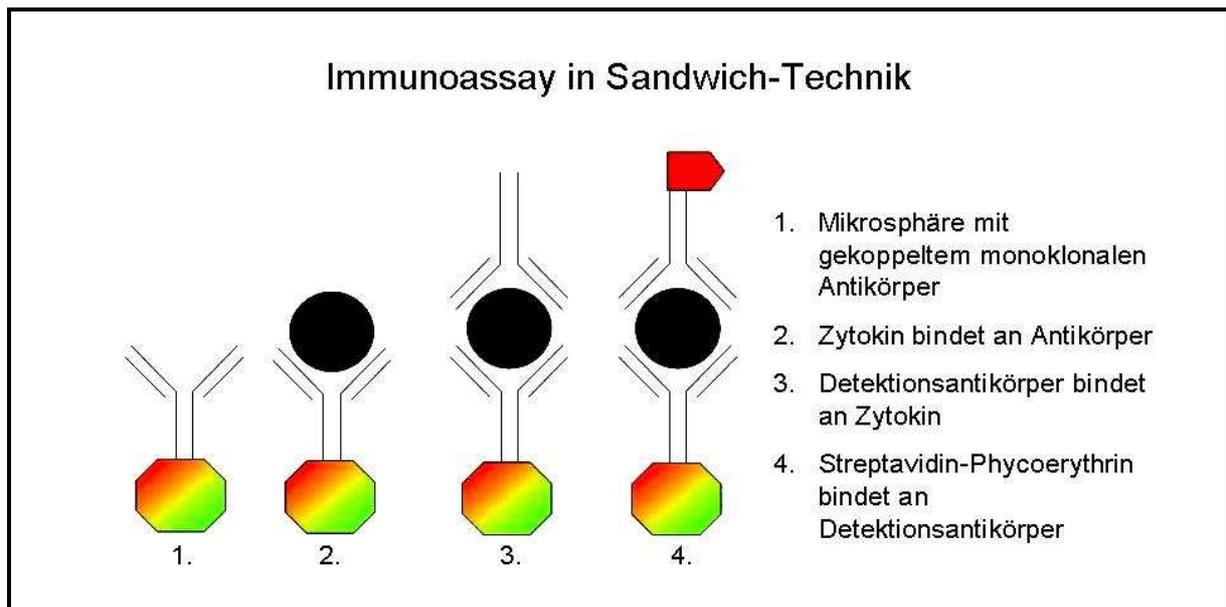


Abb. 21: Schematische Darstellung des Immunoassay in Sandwich-Technik

Die Bestimmung und Quantifizierung der Zytokine erfolgt mit einem Doppel-Laser System. Der erste Laser identifiziert die Beads an Hand des Farbcodes. Der zweite Laser misst bei den identifizierten Beads die Quantität des Reporter Signals an Hand der Fluoreszenz des Streptavidin-Phycoerythrins.

### 2.8.3.3 Bestimmung des Proteingehalts nach der Bradford-Methode

Zur quantitativen Bestimmung der Proteine in der bronchoalveolären Lavage und im homogenisierten Lungengewebe wurde die Bradford-Methode (Coomassie Bradford Protein Assay Kit, Pierce Protein Research Products) angewendet. Beim Bradford-Test fungiert der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) in saurer Lösung als Komplexbildner mit kationischen und mit hydrophoben Seitenketten der Proteine. Der ungebundene Farbstoff ist rötlich, liegt in kationischer Form vor und hat ein Absorptionsmaximum von 470 nm. Die Komplexbildung mit Proteinen führt zu einer Stabilisierung des Farbstoffes in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonatform. Dabei kommt es zu einem Farbumschlag nach blau. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich auf 595 nm. Die Absorption bei 595 nm kann photometrisch mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagens gemessen werden, da der Extinktionskoeffizient der Farbstoff-Protein-Komplexe sehr viel höher ist als der des freien Farbstoffes. Mit Hilfe einer Standard-Messreihe kann die Proteinkonzentration der Lösung bestimmt werden.

Auf einer 96-Well-Mikrotiter-Platte wurde zunächst eine Standard-Messreihe mit Kontroll-Reihe angelegt. Als Standard wurde eine Albuminlösung mit 2 mg/ml verwendet. Anschließend wurde in jedes Well der Mikrotiter-Platte jeweils 5 µl der zu untersuchenden Probe (Überstand der bronchoalveolären Lavage oder des homogenisierten Lungengewebes) pipettiert. Mit Hinzufügen von 250 µl CBBG kam es zu einem sofortigen Farbumschlag. Nach Abwarten einer Reaktionszeit von fünf Minuten wurde die Absorption bei 620 nm gemessen. Mit Hilfe der Standard-Messreihe wurde in Excel eine Extinktionskurve erstellt und der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  bestimmt. Aus der gemessenen optischen Dichte  $od$  konnte die jeweilige Proteinkonzentration  $[P]$  durch die Formel  $[P] = \frac{od}{\epsilon}$  berechnet werden.

## 2.9 Erstellung der Datenbank und statistische Auswertung

Die aufgezeichneten Beatmungsparameter der Versuche wurden aus dem Programm FlexiVent im Text-Datei Format exportiert und anschließend in Excel importiert. Dort erfolgte die Sichtung der Daten nach Plausibilität und die Erstellung der Datenbank.

Bei allen lungenmechanischen Daten wurde als Bewertungsgrundlage der COD-Wert herangezogen. Als COD-Wert bezeichnet man den „coefficient of determination“. Er beschreibt einen Quotienten, der das Verhältnis vom erhobenen Wert zu dem Wert darstellt, der auf Grund des statistischen Modells prognostiziert wurde („Goodness-of-Fit-Test“). Dieser Wert ist damit ein Maß für die Anpassungsgüte des statistischen Modells. Für die lungenmechanischen Parameter wurde ein COD-Wert von > 95% gefordert; lediglich bei den Impedance-Messungen wurde ein COD-Wert von > 90% toleriert.

Auch die Daten der pathologischen und histologischen Untersuchungen des Gewebes, die Daten der zytologischen Untersuchung der Lavage und die Daten der Protein- und Interleukin-Bestimmung wurden in die Datenbank aufgenommen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistik-Programm PASW Statistics 18.0 für Windows (IBM SPSS Software, IBM Deutschland GmbH, München,

Deutschland). Da eine Normalverteilung der Werte bei homozygoten und heterozygoten Tieren nicht vorausgesetzt werden konnte, wurde zur Analyse der Daten zwischen diesen beiden Gruppen der Mann-Whitney-U-Test als Nicht-parametrisches Testverfahren angewendet. Die Nullhypothese *„Es besteht kein Unterschied zwischen den getesteten Stichproben“* wurde bei  $p < 0,05$  verworfen und die Alternativhypothese *„Es besteht ein Unterschied zwischen den getesteten Stichproben“* angenommen. Die Wahrscheinlichkeit, für die das Confidence Intervall berechnet werden sollte, wurde mit 95% festgelegt.

Auf Grund der unterschiedlichen Versuchsverfahren mit bzw. ohne Sauerstoffprovokation und mit bzw. ohne Beamtung wurden vier verschiedene Versuchsgruppen mit unterschiedlicher Anzahl gebildet. Die Mittelwerte der jeweils analysierten Variablen aus den vier Gruppen wurden nach Testung auf Normalverteilung nach Genotypen getrennt mit der Varianzanalyse ANOVA verglichen. Die Nullhypothese *„Alle untersuchten Gruppen weisen in der Grundgesamtheit einen gleich hohen Wert auf“* wurde bei  $p < 0,05$  abgelehnt. Die Wahrscheinlichkeit für das Confidence Intervall wurde ebenfalls auf 95% festgelegt. Um die Mittelwerte zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu vergleichen, wurde der Post-Hoc-Mehrfachvergleich durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Versuchstiere

##### 3.1.1 Anzahl der untersuchten Tiere

Entsprechend der biometrischen Studienplanung sollten 92 Tiere untersucht werden. Die lungenmechanischen Untersuchungen konnten bei 63 Tieren durchgeführt werden. In der Versuchsgruppe der beatmeten Tiere ohne Sauerstoffprovokation lag eine ungleiche Verteilung der Genotypen vor. In der Versuchsgruppe der beatmeten Tiere nach Sauerstoffexposition wurden rückwirkend drei Tiere von der Analyse ausgeschlossen, da andere Versuchsbedingungen vorlagen: In einem Fall gelang die Intubation erst zeitverzögert, ein Tier verstarb während der Präparation und ein Tier wurde überhitzt. Die Experimente wurden nicht wiederholt, da wir nach Erstellen der Statistik nicht davon ausgingen, dass eine Erhöhung der Tierzahl auf die ursprünglich berechneten 15 Tiere ein statistisch signifikantes Ergebnis hervorbringen würde. Ohne vorherige Beatmung konnten zunächst 31 Tiere untersucht werden. Auf Grund der niedrigen Qualität der histologischen Präparate wurde die histologische Diagnostik an sechs Tieren nach ausschließlicher Sauerstoffexposition wiederholt. Die Aufteilung auf die einzelnen Versuchsgruppen ist in Tabelle 3 ersichtlich. Die Tiere wurden den geplanten Experimenten unterzogen. Abbildung 22 kann entnommen werden, bei wie vielen Tieren die lungenmechanischen Messungen durchgeführt werden konnten und welches Material für die weiteren Untersuchungen gewonnen wurde.

**Anzahl der untersuchten Tiere**

	<i>ABCA3</i> <sup>WT/WT</sup>	<i>ABCA3</i> <sup>WT/-</sup>
21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	8	7
95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	8 (+3)	8 (+3)
21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	22	13
95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	11	14

Tab. 3: Anzahl der Wildtypen und der heterozygoten Tiere pro Versuchsgruppe; in Klammern ist die Anzahl der wiederholten Experimente für die pathologische Diagnostik angegeben.

Übersicht über die Anzahl der lungenmechanischen Messungen  
und der weiteren Untersuchungen

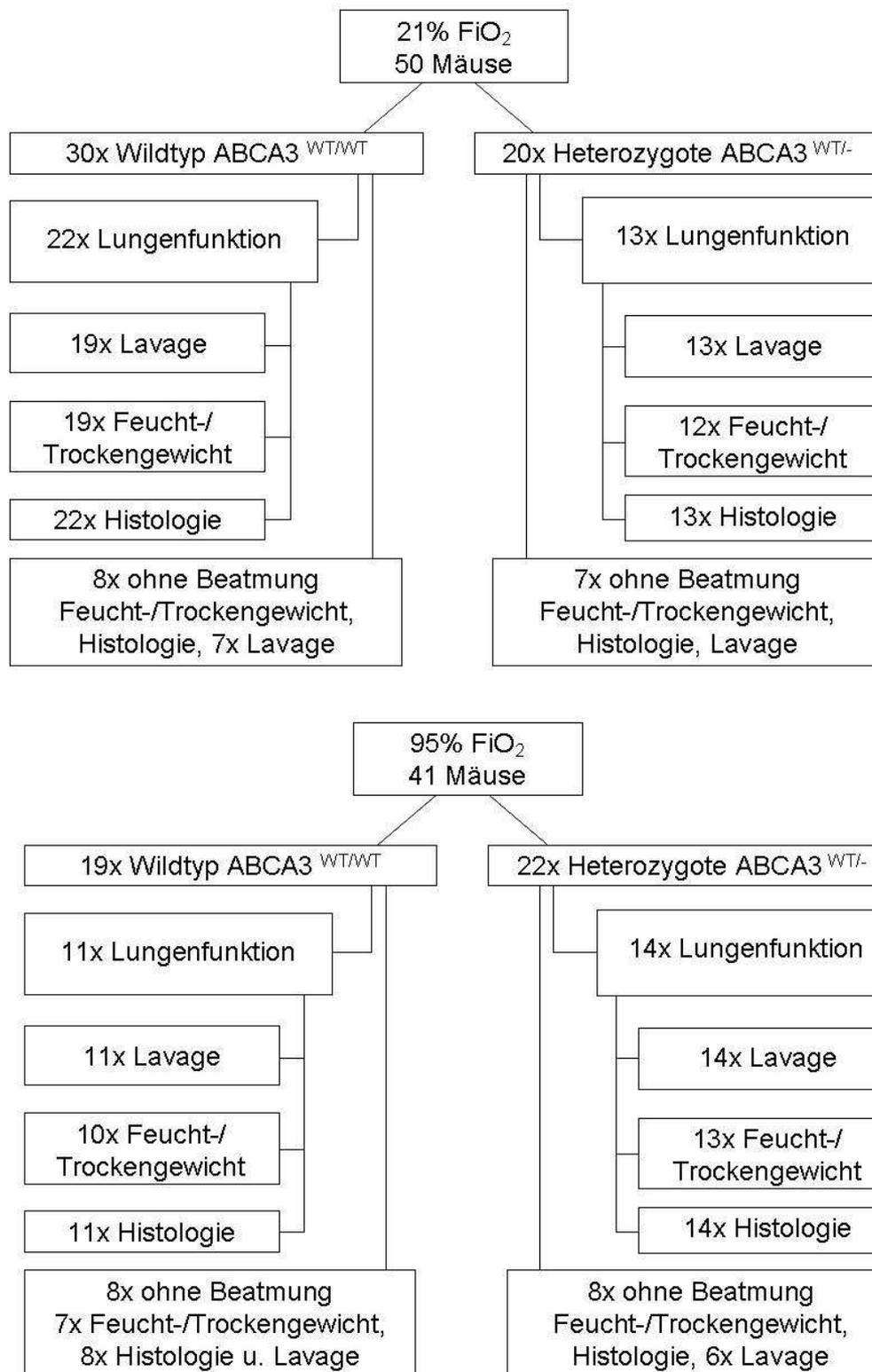


Abb. 22: Übersicht über die Anzahl der valide durchgeführten lungenmechanischen Messungen und die weitere Materialgewinnung für morphologische und inflammatorische Diagnostik.

### **3.1.2 Geschlecht, Alter und Gewicht der Versuchstiere**

Für die Experimente wurden nur erwachsene weibliche Tiere verwendet. Die  $ABCA3^{WT/WT}$ -Mäuse wurden im mittleren Alter von 11,7 Wochen (95%-CI [11,4; 12,1]), die  $ABCA3^{WT/-}$ -Mäuse im mittleren Alter von 11,4 Wochen (95%-CI [11,2; 11,7]) untersucht (n. s.; Mann-Whitney-U-Test). Die Analyse jeder einzelnen Versuchsgruppe ergab eine homogene Altersverteilung.

Das mittlere Gewicht der  $ABCA3^{WT/WT}$ -Mäuse betrug 19,6g (95%-CI [19,1; 20,1]). Die  $ABCA3^{WT/-}$ -Mäuse waren im Mittel 18,9g (95%-CI [18,3; 19,6]) schwer (n. s.; Mann-Whitney-U-Test). Die einzelnen Versuchsgruppen waren auch bzgl. des Gewichts homogen.

## **3.2 Versuchsdurchführung**

### **3.2.1 Probleme bei den Versuchen und der Materialgewinnung**

Alle Tiere der verschiedenen Versuchsgruppen sollten dem gleichen Prozedere unterworfen werden. Ziel war stets die Erhebung von vollständigen Datensätzen. Bei den beatmeten Tieren sollten zunächst die Daten zur Lungenfunktion erfasst werden. Anschließend sollten, wie auch bei allen nicht beatmeten Tieren, eine Lavage durchgeführt, Feucht- und Trockengewicht der Lunge bestimmt und histologische Präparate angelegt werden.

Die Lungenfunktionsmessung erfolgte bei allen 60 beatmeten Tieren. Die bronchoalveoläre Lavage konnte bei sechs der insgesamt 91 Tiere nicht durchgeführt werden. Ursächlich war ein Abriss der Trachea während der Präparation. Auf Grund des geringen Durchmessers der Hauptbronchien war eine erneute Kanülierung mit dem Ziel einer anschließenden Durchführung der bronchoalveolären Lavage nicht möglich. Feucht- und Trockengewicht wurden bei 87 der 91 Tiere bestimmt. In vier Fällen konnte der Lungenlappen vor Durchführung der Lavage nicht vollständig abgeklemmt werden; in zwei weiteren Fällen deuteten sehr hohe Werte auf Fehlbestimmungen hin, so dass die Ratios Feucht-/Trockengewicht nicht in die Auswertung einfließen und nur 85 Datensätze vorliegen. Histologische Präparate konnten von allen 91 Tieren angelegt werden. Die fehlenden Daten verteilen sich homogen auf alle Versuchsgruppen.

### 3.2.2 Kontrolle der Beatmung

Die Effektivität der Beatmung wurde während des Experiments durch eine Blutgasanalyse (BGA) überwacht. Insgesamt konnte bei 41 der 60 beatmeten Tiere erfolgreich eine BGA durchgeführt werden, bei der mindestens der pH- und der pCO<sub>2</sub>-Wert bestimmt werden konnten. Der gemessene pH-Wert lag durchschnittlich bei 7,26 (7,05 – 7,41; SD ±0,08), der pCO<sub>2</sub>-Wert durchschnittlich bei 47,7 mmHg (29,3 – 86,3; SD ±13,22). Damit ist davon auszugehen, dass die gewählten Beatmungsparameter einen physiologischen Gasaustausch gewährleisteten. Weder für den pH- noch für den pCO<sub>2</sub>-Wert wurden signifikant unterschiedliche Werte gemessen.

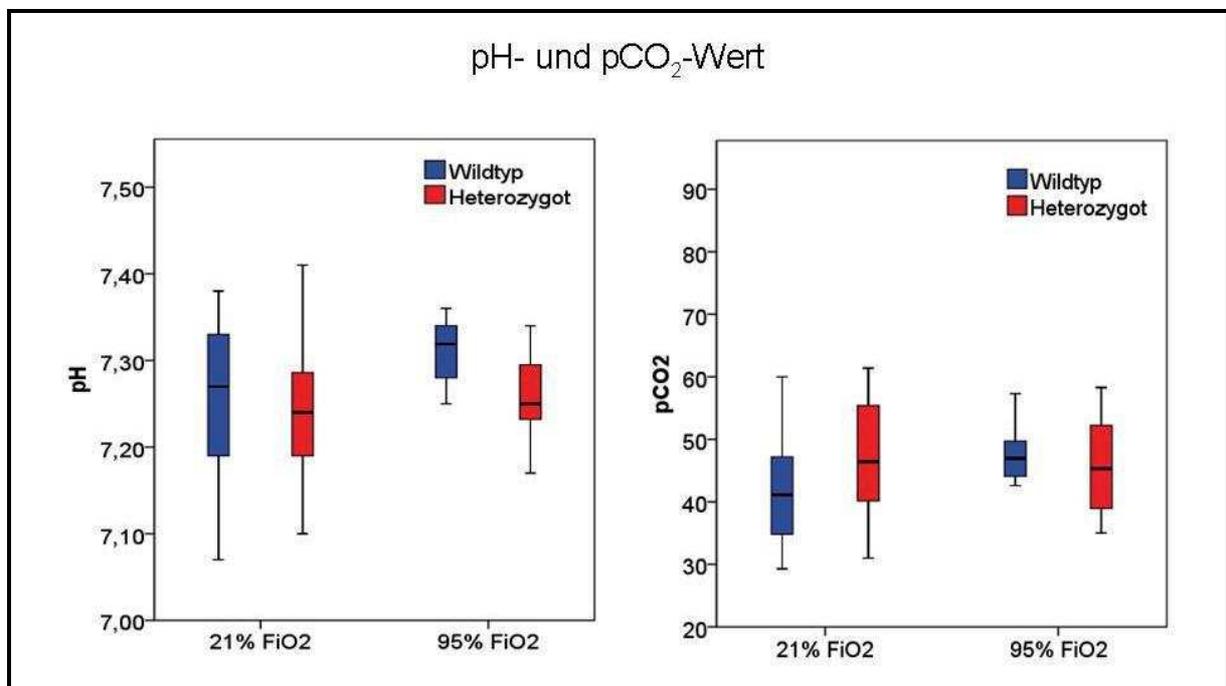


Abb. 23: pH- und pCO<sub>2</sub>-Werte in den Versuchsgruppen; keine signifikanten Unterschiede.

### **3.3 Lungenmechanik**

#### **3.3.1 Schwierigkeiten bei der Bestimmung lungenmechanischer Parameter**

Einige lungenmechanische Parameter konnten durch die oben beschriebenen Beatmungsmanöver eindeutig bestimmt werden, so z. B. die totale Lungkapazität (TLC), die Resistance und die dynamische Compliance. Die Messung der statischen Compliance war lediglich für die Inspiration valide, da der expiratorische Teil der Hysterese-Schleife nicht auf den Ausgangspunkt zurückkehrte. Die Daten zur statischen Compliance werden deshalb nicht weiter dargestellt.

Bei der Impedance-Messung mittels forcierter Oszillationstechnik (FOT) wurden alle Werte zum Zeitpunkt 5 min von der Analyse ausgeschlossen, da viele Tiere zu diesem Zeitpunkt noch intermittierend Spontanatmung zeigten. Dies traf vor allem auf die Gruppe der Wildtyp-Tiere nach Sauerstoffprovokation zu. Die Analysen zur Impedance-Messung wurden deshalb zum Zeitpunkt 10 min durchgeführt.

In Tabelle 4 ist dargestellt, wie viele Messungen eines Parameters in jeder Versuchsgruppe zu den unterschiedlichen Zeitpunkten valide durchgeführt werden konnten.

**Anzahl der lungenmechanischen Messergebnisse für beide Genotypen  
bei 21% FiO<sub>2</sub> und 95% FiO<sub>2</sub>**

		<i>ABCA<sub>3</sub><sup>WT/WT</sup></i>		<i>ABCA<sub>3</sub><sup>WT/-</sup></i>	
		21% FiO <sub>2</sub>	95% FiO <sub>2</sub>	21% FiO <sub>2</sub>	95% FiO <sub>2</sub>
TLC	5 min	22	11	13	14
	25 min	20	11	13	14
R <sub>dyn</sub>	5 min	22	11	13	14
	25 min	20	11	13	14
C <sub>dyn</sub>	5 min	22	11	13	14
	25 min	20	11	13	14
R <sub>N</sub>	5 min	20	5	10	10
	10 min	22	10	12	14
	25 min	19	10	12	14
G	5 min	20	5	10	10
	10 min	22	10	12	14
	25 min	19	10	12	14
H	5 min	20	5	10	10
	10 min	22	10	12	14
	25 min	19	10	12	14
I	5 min	20	5	10	10
	10 min	22	10	12	14
	25 min	19	10	12	14

Tab. 4: Anzahl der validen Messungen pro Versuchsgruppe und Zeitpunkt

### 3.3.2 Zeitlicher Verlauf der lungenmechanischen Parameter

In den folgenden Abbildungen (Abb. 24 bis 27) werden die zeitlichen Verläufe der lungenmechanischen Parameter ohne bzw. nach Sauerstoffprovokation dargestellt.

### Zeitlicher Verlauf von TLC und dynamischer Compliance

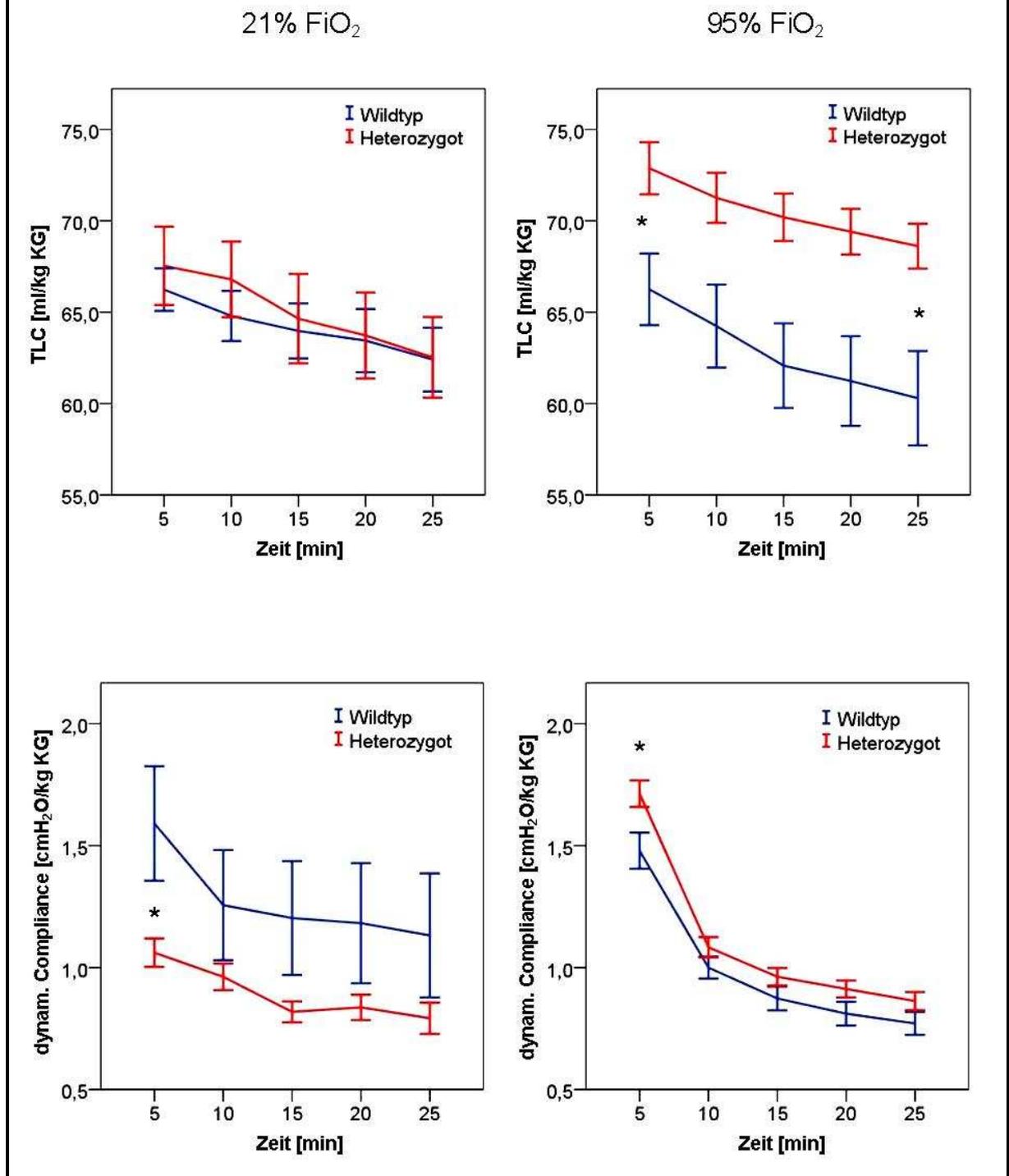


Abb. 24: Zeitlicher Verlauf der Mittelwerte (MW) für Totale Lungenkapazität (TLC) und dynamische Compliance. Die blauen Linien stellen die Werte der Wildtypen dar, die roten die Werte der heterozygoten Tiere. Die Fehlerbalken repräsentieren den einfachen Standardfehler (MW ± SEM; \* p < 0,05 *ABCA3*<sup>WT/WT</sup> vs. *ABCA3*<sup>WT/-</sup>).

Zeitlicher Verlauf von dynamischer Resistance und Newton-Resistance

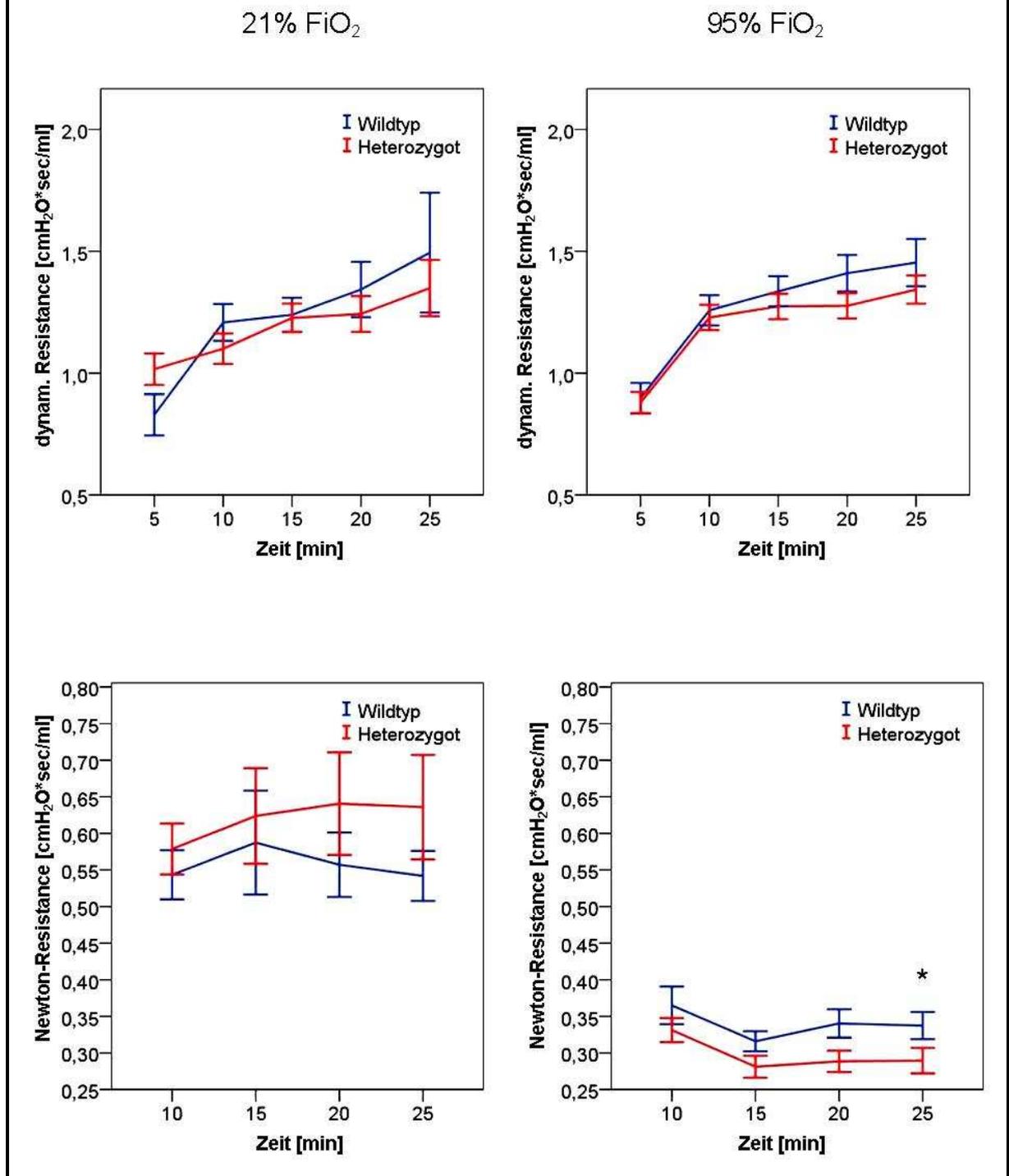


Abb. 25: Zeitlicher Verlauf der Mittelwerte (MW) für dynamische Resistance und Newton-Resistance. Die blauen Linien stellen die Werte der Wildtypen dar, die roten die Werte der heterozygoten Tiere. Die Fehlerbalken repräsentieren den einfachen Standardfehler (MW ± SEM; \* p < 0,05 ABCA3<sup>WT/WT</sup> vs. ABCA3<sup>WT/-</sup>).

## Zeitlicher Verlauf von Gewebe-Dämpfung und Gewebe-Elastizität

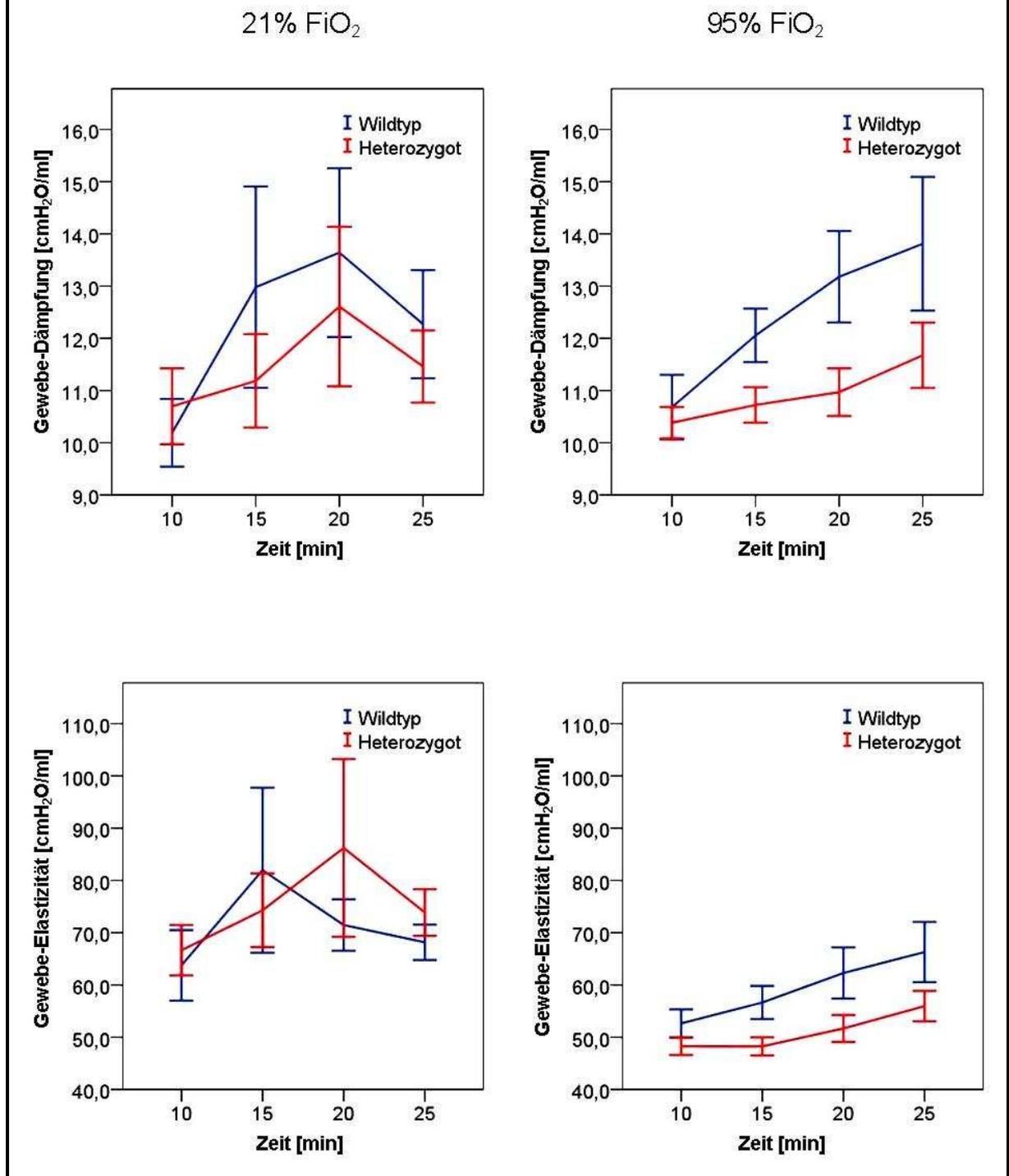


Abb. 26: Zeitlicher Verlauf der Mittelwerte (MW) für Gewebe-Dämpfung und Gewebe-Elastizität. Die blauen Linien stellen die Werte der Wildtypen dar, die roten die Werte der heterozygoten Tiere. Die Fehlerbalken repräsentieren den einfachen Standardfehler. Keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen.

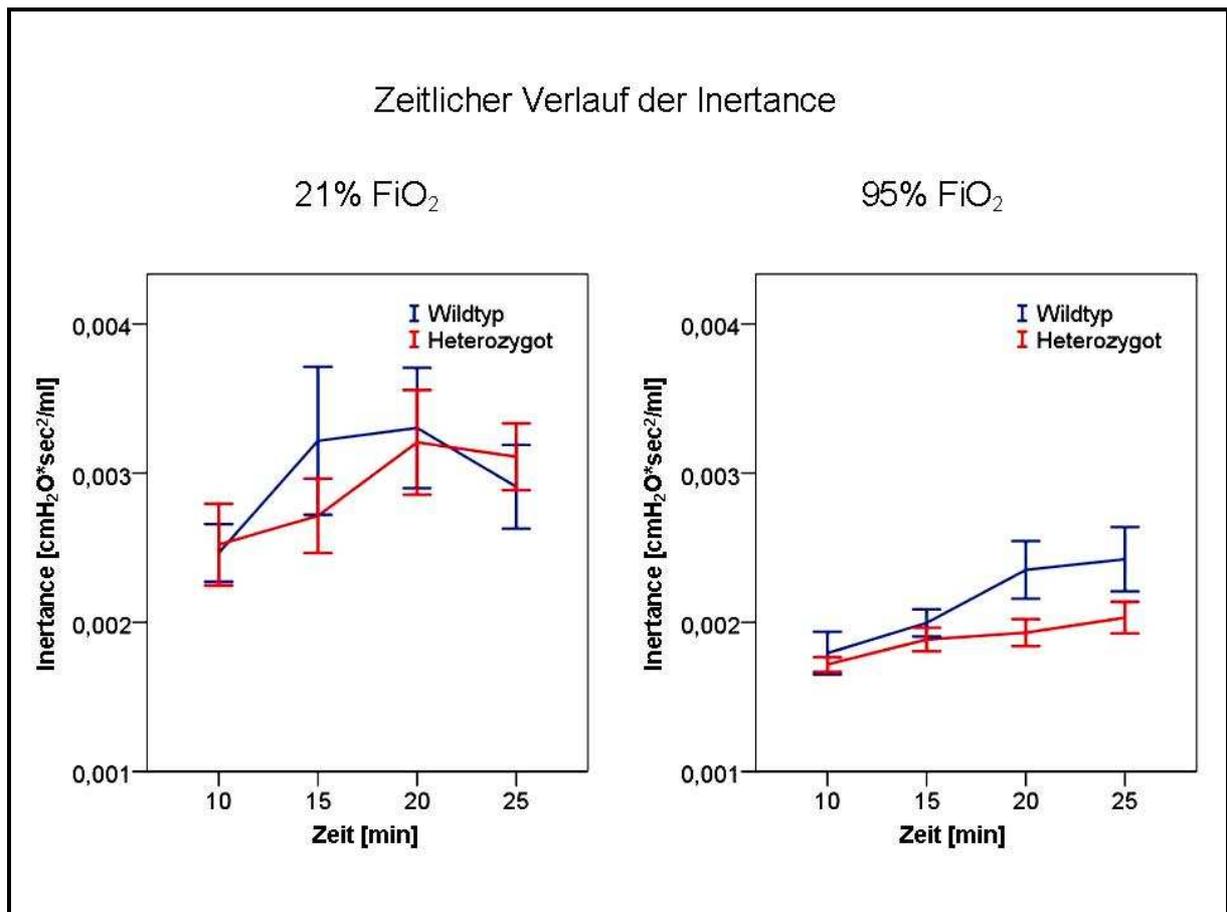


Abb. 27: Zeitlicher Verlauf der Mittelwerte (MW) für die Inertance. Die blauen Linien stellen die Werte der Wildtypen dar, die roten die Werte der heterozygoten Tiere. Die Fehlerbalken repräsentieren den einfachen Standardfehler. Keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen.

### 3.3.3 Lungenmechanik bei beiden Genotypen innerhalb der Therapiegruppen

Ohne Sauerstoffprovokation konnte zwischen Wildtypen und heterozygoten Tieren ein Unterschied nur für die dynamische Compliance zu Beginn des Versuchs gezeigt werden. Nach Sauerstoffprovokation unterscheiden sich die Wildtyp-Mäuse von den heterozygoten Mäusen bzgl. der TLC und der Newton-Resistance.

Der folgenden Tabelle können die Mittelwerte der lungenmechanischen Parameter der Wildtyp- und der heterozygoten Tiere ohne Sauerstoffprovokation entnommen werden. Die p-Werte für den Vergleich der jeweiligen Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Test sind ebenfalls aufgeführt. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

**Vergleich der lungenmechanischen Parameter bei 21% FiO<sub>2</sub> zwischen beiden Genotypen**

		21% FiO <sub>2</sub>		p-Wert
		<i>ABCA<sub>3</sub><sup>WT/WT</sup></i>	<i>ABCA<sub>3</sub><sup>WT/-</sup></i>	
TLC	5	66,23 [63,81; 68,66]	67,54 [62,87; 72,21]	0,511
	25	62,41 [58,76; 66,06]	62,53 [57,72; 67,34]	1,000
R <sub>dyn</sub>	5	0,83 [0,65; 1,00]	1,02 [0,88; 1,16]	0,229
	25	1,49 [0,98; 2,00]	1,35 [1,10; 1,60]	0,778
C <sub>dyn</sub>	5	1,26 [1,16; 1,36]	1,06 [0,93; 1,19]	<b>0,033</b>
	25	0,77 [0,68; 0,86]	0,79 [0,71; 0,87]	0,438
R <sub>N</sub>	10	0,54 [0,47; 0,61]	0,58 [0,50; 0,66]	0,403
	25	0,54 [0,47; 0,61]	0,64 [0,48; 0,79]	0,236
G	10	10,19 [8,84; 11,54]	10,70 [9,10; 12,30]	0,511
	25	12,27 [10,09; 14,45]	11,46 [9,94; 12,98]	0,857
H	10	63,75 [49,72; 77,78]	66,65 [56,05; 77,25]	0,191
	25	68,16 [61,04; 75,28]	73,87 [64,03; 83,70]	0,326
I	10	0,0025 [0,0021; 0,0029]	0,0025 [0,0019; 0,0031]	0,845
	25	0,0029 [0,0023; 0,0035]	0,0031 [0,0026; 0,0036]	0,220

Tab. 5: Vergleich der Werte der lungenmechanischen Parameter ohne Sauerstoffprovokation zwischen beiden Genotypen. Es werden die Mittelwerte der lungenmechanischen Parameter mit 95%-Confidence Intervall und die p-Werte angegeben. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

Anschließend folgt die Tabelle mit den Mittelwerten, 95%-Confidence Intervallen und p-Werten für den Vergleich der lungenmechanischen Parameter beider Genotypen nach Sauerstoffprovokation. Signifikante Werte sind hervorgehoben.

**Vergleich der lungenmechanischen Parameter bei 95% FiO<sub>2</sub>  
zwischen beiden Genotypen**

		95% FiO <sub>2</sub>		p-Wert
		min	<i>ABCA<sub>3</sub><sup>WT/WT</sup></i>	
TLC	5	66,25 [61,89; 70,62]	72,88 [69,79; 75,96]	<b>0,009</b>
	25	60,29 [54,55; 66,04]	86,61 [65,96; 71,26]	<b>0,011</b>
R <sub>dyn</sub>	5	0,90 [0,76; 1,04]	0,88 [0,78; 0,97]	0,979
	25	1,45 [1,24; 1,67]	1,34 [1,22; 1,47]	0,403
C <sub>dyn</sub>	5	1,48 [1,31; 1,64]	1,71 [1,59; 1,83]	<b>0,021</b>
	25	0,77 [0,67; 0,88]	0,86 [0,78; 0,94]	0,166
R <sub>N</sub>	10	0,36 [0,31; 0,42]	0,33 [0,30; 0,37]	0,341
	25	0,34 [0,30; 0,38]	0,29 [0,25; 0,33]	<b>0,048</b>
G	10	10,68 [9,28; 12,08]	10,38 [9,74; 11,03]	0,886
	25	13,81 [10,91; 16,71]	11,67 [10,32; 13,03]	0,285
H	10	52,65 [46,56; 58,75]	48,28 [44,66; 51,89]	0,192
	25	66,30 [53,28; 79,32]	55,97 [49,67; 62,26]	0,138
I	10	0,0018 [0,0015; 0,0021]	0,0017 [0,0016; 0,0018]	0,977
	25	0,0024 [0,0019; 0,0029]	0,0020 [0,0018; 0,0023]	0,235

Tab. 6: Vergleich der Werte der lungenmechanischen Parameter nach Sauerstoffprovokation zwischen beiden Genotypen. Es werden die Mittelwerte der lungenmechanischen Parameter mit 95%-Confidence Intervall und die p-Werte angegeben. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

### 3.3.4 Veränderungen der Lungenmechanik bei beiden Genotypen nach Sauerstoffprovokation

Im Folgenden werden für jeden Genotyp die lungenmechanischen Parameter zwischen den beiden Therapiegruppen verglichen. Bei den Wildtyp-Mäusen zeigen sich signifikante Unterschiede in der Lungenfunktion ohne und nach

Sauerstoffprovokation für die Newton-Resistance und die Inertance. Bei den heterozygoten Tieren gibt es unterschiedliche lungenmechanische Werte ohne und nach Sauerstoffprovokation für TLC, dynamische Compliance, Newton-Resistance, Gewebe-Elastizität und Inertance.

In Tabelle 7 werden zunächst für die Wildtyp-Tiere die Mittelwerte der lungenmechanischen Parameter mit 95%-Confidence Intervall und die p-Werte für den Vergleich der nativen Versuche mit den Experimenten nach Sauerstoffprovokation gezeigt.

**Vergleich der lungenmechanischen Parameter der Wildtyp-Mäuse  
zwischen 21% FiO<sub>2</sub> und 95% FiO<sub>2</sub>**

		<i>ABCA<sub>3</sub><sup>WT/WT</sup></i>		p-Wert
		21% FiO <sub>2</sub>	95% FiO <sub>2</sub>	
TLC	5	66,23 [63,81; 68,66]	66,25 [61,89; 70,62]	0,985
	25	62,41 [58,76; 66,06]	60,29 [54,55; 66,04]	0,502
R <sub>dyn</sub>	5	1,26 [1,16; 1,36]	0,90 [0,76; 1,04]	0,955
	25	0,77 [0,68; 0,86]	1,45 [1,24; 1,67]	0,359
C <sub>dyn</sub>	5	1,26 [1,16; 1,36]	1,48 [1,31; 1,64]	<b>0,029</b>
	25	0,77 [0,68; 0,86]	0,77 [0,67; 0,88]	0,674
R <sub>N</sub>	10	0,54 [0,47; 0,61]	0,36 [0,31; 0,42]	<b>0,001</b>
	25	0,54 [0,47; 0,61]	0,34 [0,30; 0,38]	<b>0,000</b>
G	10	10,19 [8,84; 11,54]	10,68 [9,28; 12,08]	0,458
	25	12,27 [10,09; 14,45]	13,81 [10,91; 16,71]	0,266
H	10	63,75 [49,72; 77,78]	52,65 [46,56; 58,75]	0,366
	25	68,16 [61,04; 75,28]	66,30 [53,28; 79,32]	0,701
I	10	0,0025 [0,0021; 0,0029]	0,0018 [0,0015; 0,0021]	<b>0,025</b>
	25	0,0029 [0,0023; 0,0035]	0,0024 [0,0019; 0,0029]	<b>0,050</b>

Tab. 7: Vergleich der Werte der lungenmechanischen Parameter der Wildtyp-Tiere bei 21% FiO<sub>2</sub> und 95% FiO<sub>2</sub>. Es werden die Mittelwerte der lungenmechanischen Parameter mit 95%-Confidence Intervall und die p-Werte angegeben. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

Tabelle 8 enthält die Mittelwerte mit 95%-Confidence Intervall für die heterozygoten Tiere ohne und nach Sauerstoffprovokation. Der p-Wert für den Vergleich beider Therapiegruppen ist ebenfalls aufgelistet.

**Vergleich der lungenmechanischen Parameter der heterozygoten Mäuse  
zwischen 21% FiO<sub>2</sub> und 95% FiO<sub>2</sub>**

		<i>ABCA<sub>3</sub><sup>WT/-</sup></i>		p-Wert
		21% FiO <sub>2</sub>	95% FiO <sub>2</sub>	
	min			
TLC	5	67,54 [62,87; 72,21]	72,88 [69,79; 75,96]	0,085
	25	62,53 [57,72; 67,34]	86,61 [65,96; 71,26]	<b>0,033</b>
R <sub>dyn</sub>	5	1,02 [0,88; 1,16]	0,88 [0,78; 0,97]	0,054
	25	1,35 [1,10; 1,60]	1,34 [1,22; 1,47]	0,573
C <sub>dyn</sub>	5	1,06 [0,93; 1,19]	1,71 [1,59; 1,83]	<b>0,000</b>
	25	0,79 [0,71; 0,87]	0,86 [0,78; 0,94]	0,222
R <sub>N</sub>	10	0,58 [0,50; 0,66]	0,33 [0,30; 0,37]	<b>0,000</b>
	25	0,64 [0,48; 0,79]	0,29 [0,25; 0,33]	<b>0,000</b>
G	10	10,70 [9,10; 12,30]	10,38 [9,74; 11,03]	0,980
	25	11,46 [9,94; 12,98]	11,67 [10,32; 13,03]	0,860
H	10	66,65 [56,05; 77,25]	48,28 [44,66; 51,89]	<b>0,009</b>
	25	73,87 [64,03; 83,70]	55,97 [49,67; 62,26]	<b>0,003</b>
I	10	0,0025 [0,0019; 0,0031]	0,0017 [0,0016; 0,0018]	<b>0,027</b>
	25	0,0031 [0,0026; 0,0036]	0,0020 [0,0018; 0,0023]	<b>0,000</b>

Tab. 8: Vergleich der Werte der lungenmechanischen Parameter der heterozygoten Tiere bei 21% FiO<sub>2</sub> und 95% FiO<sub>2</sub>. Es werden die Mittelwerte der lungenmechanischen Parameter mit 95%-Confidence Intervall und die p-Werte angegeben. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

### 3.4 Pathologische Untersuchungen

#### 3.4.1 Quotient Feucht-/Trockengewicht

Der Quotient Feucht-/Trockengewicht konnte bei 84 Tieren valide bestimmt werden. Die Anzahl der bestimmten Werte pro Versuchsgruppe ist in der folgenden Tabelle ersichtlich.

**Anzahl der Bestimmungen des Quotienten Feucht-/Trockengewicht**

	<i>ABCA3</i> <sup>WT/WT</sup>	<i>ABCA3</i> <sup>WT/-</sup>
21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	8 (8)	7 (7)
95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	7 (8)	8 (8)
21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	19 (22)	12 (13)
95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	10 (11)	13 (14)

Tab. 9: Häufigkeit der validen Bestimmung des Quotienten Feucht-/Trockengewicht pro Genotyp in den Versuchsgruppen. Die Gesamtzahl der untersuchten Tiere pro Versuchsgruppe ist in Klammern angegeben.

Der Wert für die Ratio Feucht-/Trockengewicht ist nach isolierter Sauerstoffprovokation bzw. nach ausschließlicher Beatmung bei den heterozygoten Tieren signifikant höher als bei den Wildtypen. Auch im Vergleich zu den drei anderen Provokationsformen wurde nach isolierter Sauerstoffprovokation bei den heterozygoten Tieren ein höherer Wert für den Quotienten Feucht-/Trockengewicht ermittelt.

Die Mittelwerte der verschiedenen Versuchsgruppen werden im Balkendiagramm in Abbildung 28 dargestellt. Für jede Versuchsgruppe wurde der Einfluss des Genotyps auf die Ratio Feucht-/Trockengewicht mittels Mann-Whitney-U-Test untersucht. In der Tabelle 10 werden die Mittelwerte für jede Versuchsgruppe und die p-Werte für den Vergleich beider Genotypen in den Versuchsgruppen aufgelistet.

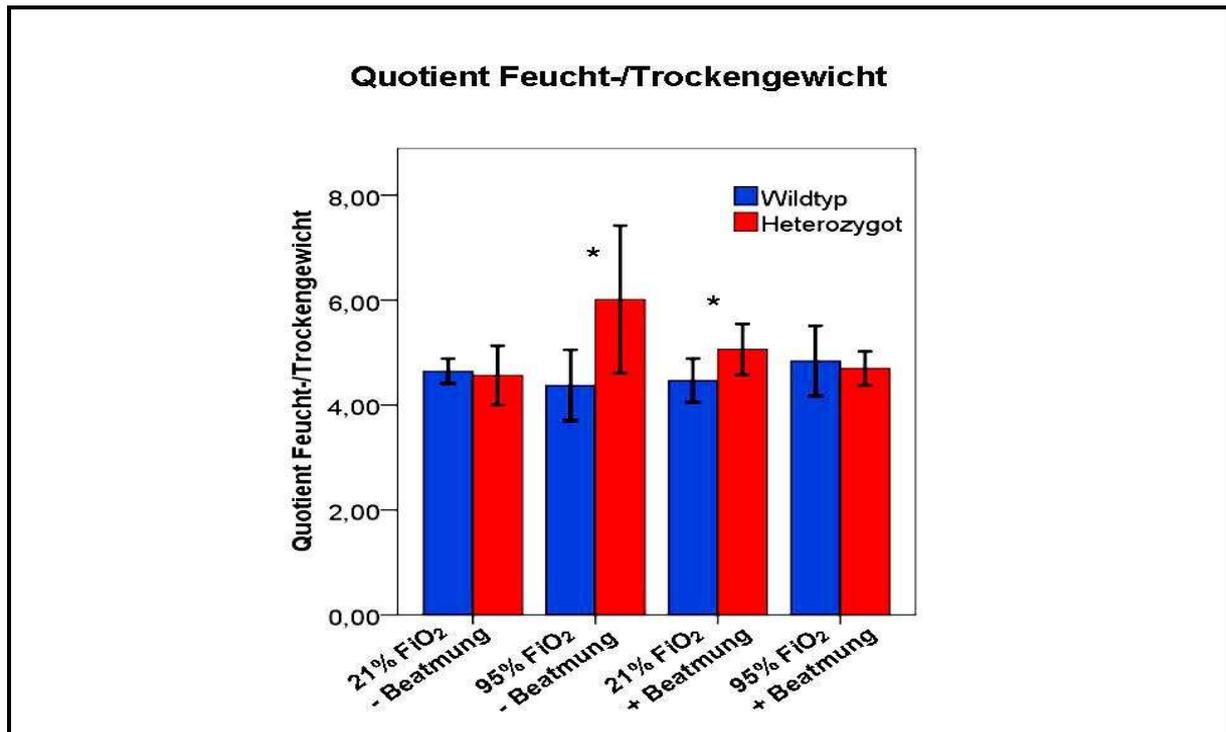


Abb. 28: Balkendiagramm der Mittelwerte (MW) des Quotienten Feucht-/Trockengewicht für die einzelnen Versuchsgruppen. Die Wildtypen werden durch blaue, die heterozygoten Tiere durch rote Balken dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren den einfachen Standardfehler (MW ± SEM; \* p < 0,05  $ABCA3^{WT/WT}$  vs.  $ABCA3^{WT/-}$ ).

### Vergleich des Quotienten Feucht-/Trockengewicht zwischen beiden Genotypen

	$ABCA3^{WT/WT}$	$ABCA3^{WT/-}$	p
21% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	4,65 [4,45; 4,84]	4,57 [4,04; 5,09]	0,199
95% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	4,38 [3,75;5,00]	6,01 [4,84; 7,19]	<b>0,023</b>
21% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	4,47 [4,27; 4,67]	5,06 [4,75; 5,37]	<b>0,001</b>
95% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	4,84 [4,36; 5,32]	4,70 [4,50; 4,89]	1,000

Tab. 10: Vergleich der Mittelwerte der Ratio Feucht-/Trockengewicht zwischen beiden Genotypen in den verschiedenen Versuchsgruppen. Es werden die Mittelwerte mit 95%-Confidence Intervall und die p-Werte angegeben. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

Der Einfluss der Provokationsart auf den Quotienten Feucht-/Trockengewicht wurde mit dem Post-Hoc-Mehrfachvergleich für beide Genotypen untersucht. In der folgenden Tabelle sind die p-Werte für die unterschiedlichen Provokationsmethoden für beide Genotypen aufgelistet.

**Vergleich des Quotienten Feucht-/Trockengewicht  
zwischen den Versuchsgruppen**

		p-Wert	
		<i>ABCA3</i> <sup>WT/WT</sup>	<i>ABCA3</i> <sup>WT/-</sup>
21% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	<b>0,003</b>
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	1,000
95% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	<b>0,003</b>
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	<b>0,045</b>
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,423	<b>0,002</b>
21% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	<b>0,045</b>
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,399	1,000
95% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,423	<b>0,002</b>
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,399	1,000

Tab. 11: Post-Hoc-Mehrfachvergleich der Mittelwerte der Ratio Feucht-/Trockengewicht zwischen den Versuchsgruppen für beide Genotypen. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

### 3.4.2 Histologische Untersuchung

#### 3.4.2.1 Probleme bei der histologischen Untersuchung

Die histologische Untersuchung der Lungen der Versuchstiere gestaltete sich insgesamt sehr schwierig, da mit dem Lobus postcavalis nur ein sehr kleiner Lungenlappen zur Beurteilung zur Verfügung stand. Leider konnte der Lungenlappen nur in der Gruppe der ohne Sauerstoffprovokation beatmeten Tiere über die Trachea mit Formalin expandiert werden. In den anderen Versuchsgruppen wurde der Lobus postcavalis erst nach Entnahme des Lungengewebes für das Homogenisat expandiert. Auf Grund des sehr kleinen Volumens des Lobus inferior und des sehr kleinen Hauptbronchus dieses Lungenlappens gelang eine Expansion durch Füllen des Lungenlappens mit Formalin nicht. Stattdessen wurde eine Expansion mittels Unterdruck durchgeführt. Mit dieser Expansionsmethode konnte keine gleichmäßige Füllung der Lungenperipherie mit Formalin erreicht werden. Dadurch kam es zu einer unterschiedlich ausgeprägten Schrumpfung des peripheren Lungengewebes.

Auf Grund der niedrigen Qualität der histologischen Präparate war eine mikroskopische Untersuchung bzgl. Emphysem, Septumverdickung und Entzündungszellen nach dem beschriebenen Score (siehe Tab.2) nicht möglich. Diese Daten werden nicht weiter dargestellt.

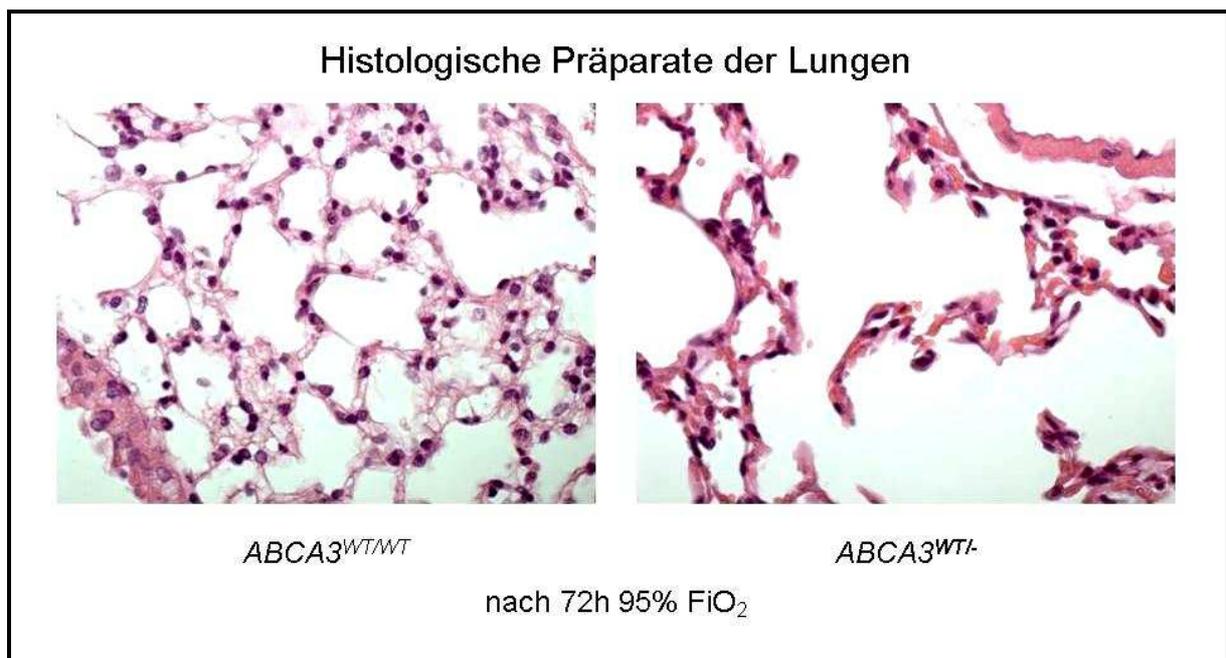


Abb. 29: Histologische Präparate der Lungen einer Wildtyp-Maus und einer heterozygoten Maus nach isolierter Sauerstoffprovokation.

Auch die Ausprägung eines peripheren Lungenemphysems durch Bestimmung der MCL konnte bei vielen Präparaten nicht eindeutig festgestellt werden. Bei der sehr kleinen Größe des Präparates konnte nicht auf die ausschließliche Beurteilung der zentralen Lungenabschnitte ausgewichen werden. Letzten Endes konnten pro Versuchsgruppe und Genotyp zunächst fünf Präparate ausgewertet werden. Lediglich in der Gruppe der heterozygoten Tiere mit ausschließlicher Sauerstoffprovokation konnten nur zwei Präparate für die Auswertung herangezogen werden. Um weitere auswertbare Daten zu erhalten wurde ein kleiner Teil der Experimente zur pathologischen Diagnostik wiederholt. Dazu wurde der Lobus inferior von sechs Mäusen, jeweils drei Wildtyp-Mäusen und drei heterozygoten Mäusen, nach 72-stündiger 95%iger Sauerstoffprovokation präpariert, Überdruckexpandiert und histologisch untersucht. Die Ergänzung der Präparate in dieser Gruppe wurde bewusst gewählt, um spezifisch die Veränderungen nach isolierter Sauerstoffprovokation zu dokumentieren. Insgesamt liegen damit 43 Präparate vor (acht Wildtyp-Mäuse nach isolierter Sauerstoffprovokation, sonst jeweils fünf Tiere pro Gruppe).

#### **3.4.2.2 Mittlere Sehnenlänge der Alveolen**

Die Ergebnisse der Bestimmung der mittleren Sehnenlänge der Alveolen (MCL) werden in Abbildung 30 dargestellt.

Die Auswertung der Werte für die MCL ergibt keine Unterschiede für beide Genotypen. Lediglich die heterozygoten Tiere haben nach Beatmung ohne Sauerstoff einen tendenziell höheren Wert für die MCL als die Wildtypen.

In jeder Versuchsgruppe wurden die Werte für die MCL auf Unterschiede bzgl. der beiden Genotypen mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. In Tabelle 12 werden die Mittelwerte mit 95%-Confidence Intervall für jede Versuchsgruppe und die p-Werte für den Vergleich beider Genotypen in den Versuchsgruppen aufgelistet.

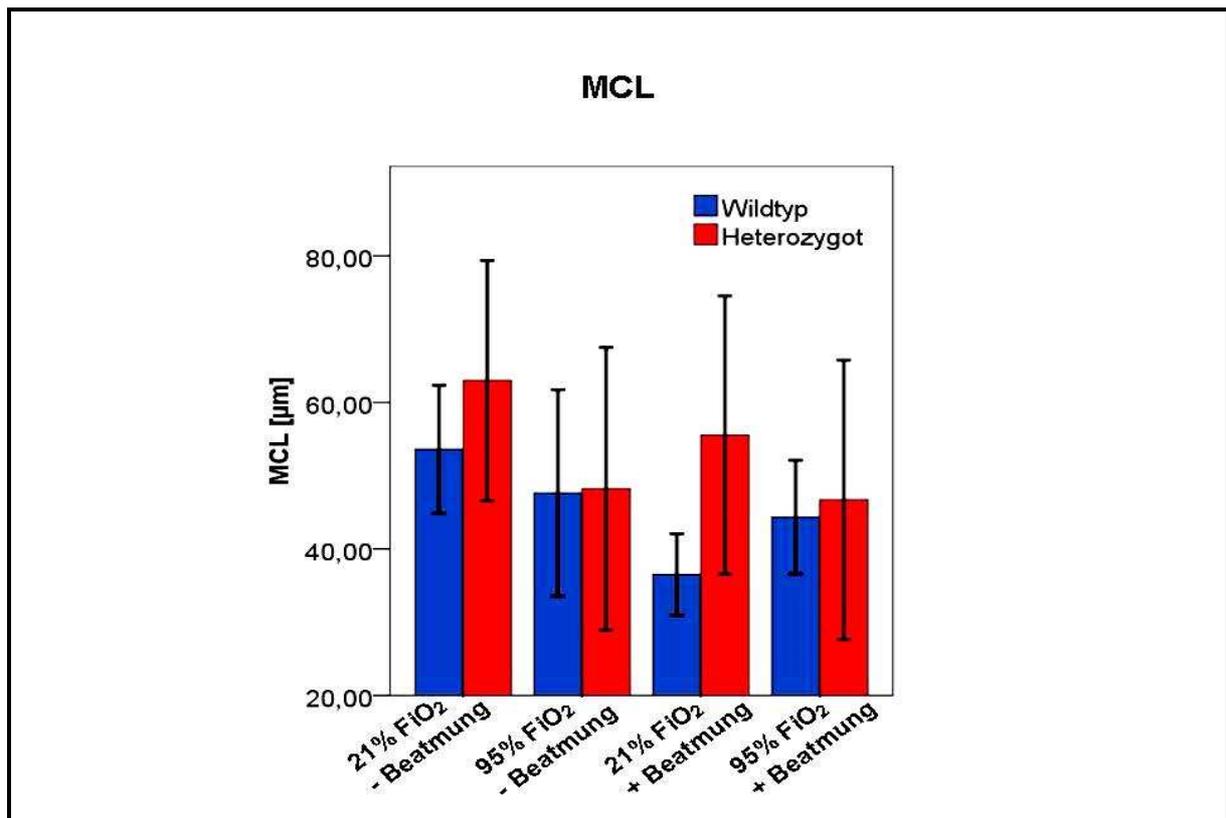


Abb. 30: Balkendiagramm der Mittelwerte (MW) der MCL für die einzelnen Versuchsgruppen. Die Wildtypen werden durch blaue, die heterozygoten Tiere durch rote Balken dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren den einfachen Standardfehler (MW  $\pm$  SEM). Keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen.

### Vergleich der MCL zwischen beiden Genotypen

	<i>ABCA3</i> <sup>WT/WT</sup>	<i>ABCA3</i> <sup>WT/-</sup>	p
21% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	53,59 [42,73; 64,45]	62,98 [42,62; 83,33]	0,310
95% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	47,65 [35,86; 59,43]	39,83 [31,50; 48,16]	0,461
21% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	36,52 [29,63; 43,42]	47,48 [36,55; 58,41]	0,063
95% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	44,34 [34,71; 53,98]	38,31 [32,12; 44,50]	0,190

Tab. 12: Vergleich der Mittelwerte der MCL [µm] zwischen beiden Genotypen in den verschiedenen Versuchsgruppen. Es werden die Mittelwerte mit 95%-Confidence Intervall und die p-Werte angegeben. Keine signifikanten p-Werte.

Die unterschiedlichen Auswirkungen der Provokationsart auf die MCL wurden mit dem Post-Hoc-Mehrfachvergleich für beide Genotypen getrennt untersucht. Die p-Werte sind in der folgenden Tabelle getrennt für Wildtypen und heterozygote Tiere dargestellt.

### Vergleich der MCL zwischen den Versuchsgruppen

		p-Wert	
		<i>ABCA3</i> <sup>WT/WT</sup>	<i>ABCA3</i> <sup>WT/-</sup>
21% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	<b>0,029</b>
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,107	0,245
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	<b>0,019</b>
95% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	<b>0,029</b>
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,459	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	1,000
21% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,107	0,245
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,459	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	1,000
95% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	<b>0,019</b>
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	1,000
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	1,000

Tab. 13: Post-Hoc-Mehrfachvergleich der Mittelwerte der MCL [ $\mu\text{m}$ ] zwischen den Versuchsgruppen für beide Genotypen. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

## 3.5 Biochemische Untersuchungen

### 3.5.1 Bronchoalveoläre Lavage

Die Recovery der Lavage betrug ca. 60-80% von 1,6 ml des applizierten PBS. Die Lavage konnte bei 85 Tieren durchgeführt werden. Die Verteilung auf die einzelnen Versuchsgruppen kann Tabelle 14 entnommen werden.

### Anzahl der Lavagen

	<i>ABCA3<sup>WT/WT</sup></i>	<i>ABCA3<sup>WT/-</sup></i>
21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	7 (8)	7 (7)
95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	8 (8)	6 (8)
21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	19 (22)	13 (13)
95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	11 (11)	14 (14)

Tab. 14: Anzahl der validen Lavagen für beide Genotypen in den Versuchsgruppen. Die Gesamtzahl der untersuchten Tiere pro Versuchsgruppe ist in Klammern angegeben.

### 3.5.2 Leukozytenzahl in der bronchoalveolären Lavage

Die Leukozytenzahl in der BAL konnte insgesamt bei 80 Tieren valide bestimmt werden. Zusätzlich zu nicht durchführbaren Lavagen konnten bei vier Tieren die Werte für die Leukozytenzahl in der BAL nicht bestimmt werden, da die Zellkonzentration in der BAL-Probe zu gering war. Die Daten dieser Tiere wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Anzahl der analysierten Lavage-Daten pro Gruppe kann der folgenden Tabelle entnommen werden.

### Anzahl der Bestimmung der Leukozytenzahl in der BAL

	<i>ABCA3<sup>WT/WT</sup></i>	<i>ABCA3<sup>WT/-</sup></i>
21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	7 (8)	6 (7)
95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	8 (8)	6 (8)
21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	18 (22)	13 (13)
95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	8 (11)	14 (14)

Tab. 15: Häufigkeit der Bestimmung der Leukozytenzahl in der BAL für beide Genotypen in den Versuchsgruppen. Die Gesamtzahl der untersuchten Tiere pro Versuchsgruppe ist in Klammern angegeben.

Die verschiedenen Provokationsbehandlungen mit Sauerstoff bzw. mit Beatmung oder durch eine Kombination von beidem führen zu einer unterschiedlich ausgeprägten Einwanderung von Leukozyten in den Alveolarraum.

Bei den heterozygoten Tieren ist bei den nativen Versuchen die Leukozytenzahl in der BAL signifikant erhöht. Bei beiden Genotypen findet sich nach kombinierter Provokation mit Sauerstoff und Beatmung eine signifikant erhöhte Leukozytenzahl in der BAL. Die BAL der Wildtyp-Tiere zeigt nach isolierter Provokation mit Sauerstoff und nach kombinierter Provokation eine signifikant höhere Leukozytenzahl als bei den nativen Versuchen.

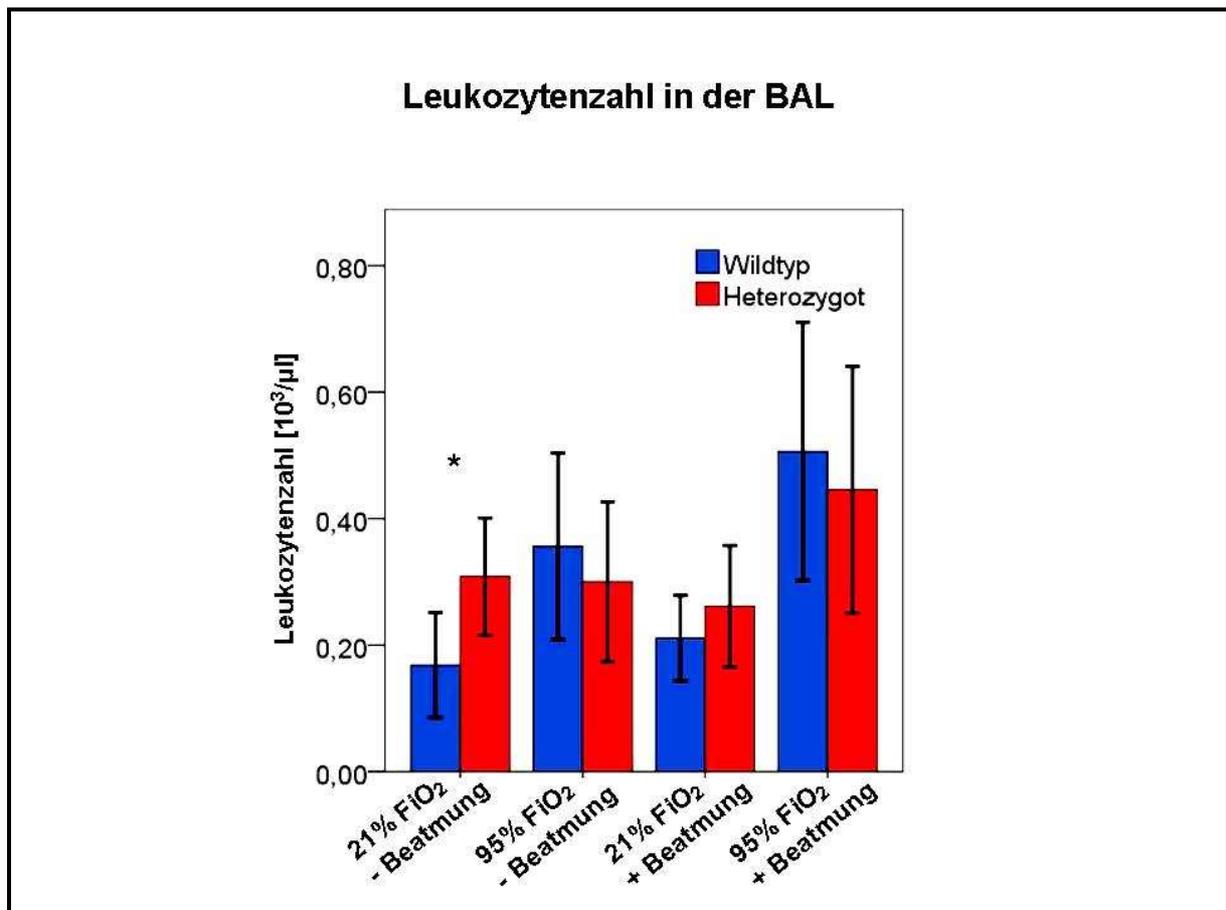


Abb. 31: Balkendiagramm der Mittelwerte (MW) der Leukozytenzahl für die einzelnen Versuchsgruppen. Die Werte der Wildtypen werden durch blaue, die der Heterozygoten durch rote Balken dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren den einfachen Standardfehler (MW  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$   $ABCA3^{WT/WT}$  vs.  $ABCA3^{WT/-}$ ).

In Tabelle 16 werden die Mittelwerte der Leukozytenzahl pro Versuchsgruppe mit den jeweiligen 95%-Confidence Intervallen aufgezeigt. Weiterhin sind die p-Werte für den Vergleich der Mittelwerte der Leukozytenzahl zwischen beiden Genotypen eingetragen (Mann-Whitney-U-Test).

### Vergleich der Leukozytenzahl zwischen beiden Genotypen

	<i>ABCA3<sup>WT/WT</sup></i>	<i>ABCA3<sup>WT/-</sup></i>	p
21% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	0,17 [0,09; 0,25]	0,31 [0,21; 0,41]	<b>0,021</b>
95% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	0,36 [0,23; 0,48]	0,30 [0,17; 0,43]	0,487
21% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	0,21 [0,18; 0,25]	0,26 [0,20; 0,32]	0,189
95% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	0,51 [0,34; 0,68]	0,45 [0,33; 0,56]	0,372

Tab. 16: Vergleich der Mittelwerte der Leukozytenzahl zwischen beiden Genotypen in den Versuchsgruppen. Es werden die Mittelwerte mit 95%-Confidence Intervall und die p-Werte angegeben. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

Die einzelnen p-Werte für den Vergleich der vier verschiedenen Provokationen können für jeden Genotyp Tabelle 17 entnommen werden. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

### Vergleich der Leukozytenzahl zwischen den Versuchsgruppen

		p-Wert	
		<i>ABCA3</i> <sup>WT/WT</sup>	<i>ABCA3</i> <sup>WT/-</sup>
21% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	<b>0,034</b>	1,000
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	<b>0,000</b>	0,354
95% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	<b>0,034</b>	1,000
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,053	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,120	0,275
21% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,053	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	<b>0,000</b>	<b>0,013</b>
95% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	<b>0,000</b>	0,354
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,120	0,275
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	<b>0,000</b>	<b>0,013</b>

Tab. 17: Post-Hoc-Mehrfachvergleich der Mittelwerte der Leukozytenzahl zwischen den Versuchsgruppen für beide Genotypen. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

### 3.5.3 Zelldifferenzierung

Die Zelldifferenzierung konnte nur bei insgesamt 60 Tieren durchgeführt werden, da die Cytospin-Präparate von niedriger Qualität waren: In ca. 1/3 der Fälle waren auf den Objektträgern nur Zellfragmente zu sehen. Eine eindeutige Zuordnung zu den einzelnen Zelllinien war deshalb nicht möglich. Deshalb wurde nur ein Teil der Präparate für die Analyse verwendet.

**Häufigkeit der Zelldifferenzierung in der BAL**

	<i>ABCA3</i> <sup>WT/WT</sup>	<i>ABCA3</i> <sup>WT/-</sup>
21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	4 (8)	3 (7)
95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	8 (8)	5 (8)
21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	17 (22)	12 (13)
95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	6 (11)	5 (14)

Tab. 18: Häufigkeit der Zelldifferenzierung in der BAL für beide Genotypen in den Versuchsgruppen. Die Gesamtzahl der untersuchten Tiere pro Versuchsgruppe ist in Klammern angegeben.

In Abbildung 32 sind die Mittelwerte der Makrophagen, Lymphozyten, segment- und stabkernigen neutrophilen Granulozyten und der eosinophilen Granulozyten für jede Versuchsgruppe einzeln dargestellt.

Im Folgenden werden nur die Werte für die Alveolarmakrophagen, die Lymphozyten und die segmentkernigen neutrophilen Granulozyten dargestellt, da stabkernige neutrophile Granulozyten und eosinophile Granulozyten nur in sehr kleiner Anzahl vorkommen.

Der prozentuale Anteil an segmentkernigen neutrophilen Granulozyten steigt bei beiden Genotypen nach allen Provokationsformen im Vergleich zum Ausgangswert. Für die Wildtypen ergeben sich signifikante Unterschiede, bei den heterozygoten Tieren wird kein signifikantes Niveau erreicht.

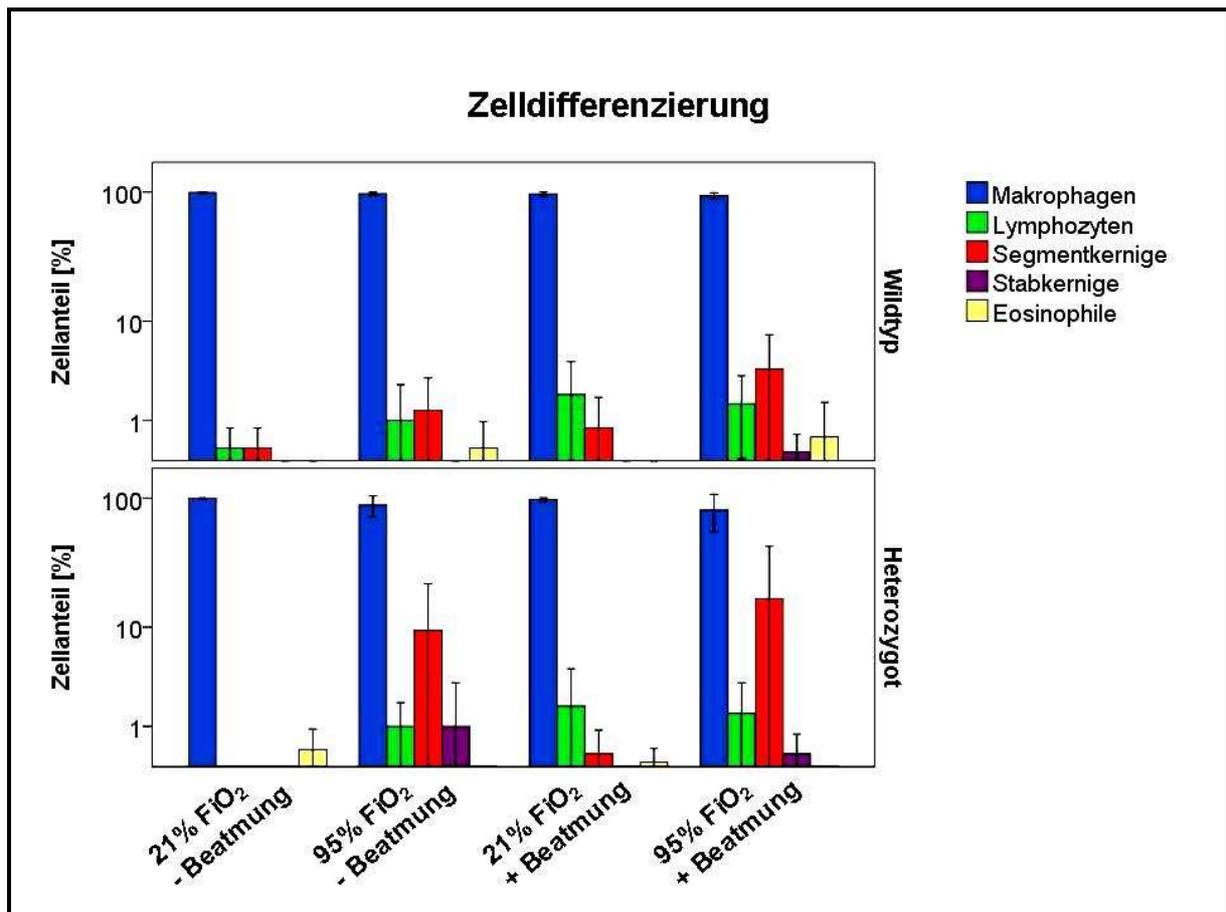


Abb. 32: Balkendiagramm der Mittelwerte (MW) der Makrophagen, Lymphozyten, segment- und stabkernigen neutrophilen Granulozyten und der eosinophilen Granulozyten in den verschiedenen Versuchsgruppen. Die Fehlerbalken repräsentieren den einfachen Standardfehler (MW ± SEM; \*  $p < 0,05$   $ABCA3^{WT/WT}$  vs.  $ABCA3^{WT/-}$ ).

In der folgenden Tabelle werden die Mittelwerte der oben genannten Zellen pro Versuchsgruppe mit den jeweiligen 95%-Confidence Intervallen aufgezeigt. Weiterhin sind die p-Werte für den Vergleich der Mittelwerte der Zelldifferenzierung zwischen beiden Genotypen eingetragen (Mann-Whitney-U-Test).

**Vergleich des Anteils an Makrophagen, Lymphozyten und Segmentkernigen  
in der BAL zwischen beiden Genotypen**

Prozedere	Interleukin	<i>ABCA3</i> <sup>WT/WT</sup>	<i>ABCA3</i> <sup>WT/-</sup>	p-Wert
21% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	Makrophagen	99,50 [97,91; 101,09]	99,67 [98,23; 101,10]	1,000
	Lymphozyten	0,25 [-0,55; 1,05]	konstant	1,000
	Segmentkernige	0,25 [-0,55; 1,05]	konstant	1,000
95% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	Makrophagen	97,38 [95,33; 99,42]	88,60 [69,45; 107,75]	0,866
	Lymphozyten	1,00 [-0,41; 2,41]	1,00 [-0,24; 2,24]	0,630
	Segmentkernige	1,38 [-0,10; 2,85]	9,40 [-6,42; 25,22]	0,576
21% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	Makrophagen	97,12 [95,48; 98,75]	97,83 [96,21; 99,46]	0,553
	Lymphozyten	2,12 [0,90; 3,34]	1,83 [0,21; 3,46]	0,493
	Segmentkernige	0,76 [0,15; 1,38]	0,25 [-0,14; 0,64]	0,183
95% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	Makrophagen	93,83 [88,55; 99,12]	85,00 [55,72; 114,28]	1,000
	Lymphozyten	1,67 [-0,05; 3,38]	1,50 [-1,26; 4,26]	0,952
	Segmentkernige	3,83 [-0,23; 7,89]	17,00 [-24,47; 58,47]	0,924

Tab. 19: Vergleich der Mittelwerte des prozentualen Anteils an Makrophagen, Lymphozyten und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten in der BAL zwischen beiden Genotypen in den verschiedenen Versuchsgruppen. Es werden die Mittelwerte mit 95%-Confidence Intervall und die p-Werte angegeben. Keine signifikanten p-Werte.

In Tabelle 20 sind die p-Werte für den Mittelwertvergleich des prozentualen Anteils an Makrophagen, Lymphozyten und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten für die Wildtypen in den unterschiedlichen Therapiegruppen dargestellt. In Tabelle 21 wird der Sachverhalt analog für die heterozygoten Tiere gezeigt.

**Vergleich des Anteils an Makrophagen, Lymphozyten und Segmentkernigen in der BAL der Wildtyp-Mäuse zwischen den Versuchsgruppen**

		<i>ABCA3<sup>WT/WT</sup></i> p-Wert		
		Makro- phagen	Lympho- zyten	Segment- kernige
21% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	1,000	1,000
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	0,616	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,071	1,000	<b>0,050</b>
95% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,326	1,000	1,000
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	1,000	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	1,000	0,167
21% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	0,616	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	1,000	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,259	1,000	<b>0,016</b>
95% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,071	1,000	<b>0,050</b>
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,326	1,000	0,167
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,259	1,000	<b>0,016</b>

Tab. 20: Post-Hoc-Mehrfachvergleich des prozentualen Anteils an Makrophagen, Lymphozyten und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten in der BAL der Wildtypen zwischen den Versuchsgruppen. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

**Vergleich des Anteils an Makrophagen, Lymphozyten und Segmentkernigen  
in der BAL der heterozygoten Mäuse zwischen den Versuchsgruppen**

		<i>ABCA3</i> <sup>WT/-</sup> p-Wert		
		Makro- phagen	Lympho- zyten	Segment- kernige
21% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	1,000	1,000
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	1,000	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,727	1,000	0,416
95% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	1,000	1,000
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	1,000	0,924
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	1,000	1,000
21% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	1,000	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	1,000	0,924
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,397	1,000	0,127
95% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,727	1,000	0,416
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	1,000	1,000
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,397	1,000	0,127

Tab. 21: Post-Hoc-Mehrfachvergleich des prozentualen Anteils an Makrophagen, Lymphozyten und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten in der BAL der heterozygoten Tiere zwischen den Versuchsgruppen. Keine signifikanten p-Werte.

### 3.5.4 Gesamtprotein in der bronchoalveolären Lavage

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford in der BAL bestimmt. Die Anzahl der vorliegenden Daten ist in Tabelle 22 aufgelistet.

#### Häufigkeit der Bestimmung der Proteinkonzentration in der BAL

	<i>ABCA3</i> <sup>WT/WT</sup>	<i>ABCA3</i> <sup>WT/-</sup>
21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	7 (8)	5 (7)
95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	8 (8)	6 (8)
21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	19 (22)	13 (13)
95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	11 (11)	14 (14)

Tab. 22: Anzahl der Daten zur Proteinkonzentration in der BAL für beide Genotypen in den Versuchsgruppen. Die Gesamtzahl der untersuchten Tiere pro Versuchsgruppe ist in Klammern angegeben.

Für jede Versuchsgruppe konnten unterschiedliche Werte für die Proteinkonzentration ermittelt werden.

Bei beiden Genotypen führen sämtliche Provokationsformen zu einem Anstieg der Proteinkonzentration. Bei Kombination von Sauerstoff und Beatmung ist der Anstieg der Proteinkonzentration signifikant. Die Wildtypen haben in dieser Therapiegruppe im Vergleich zu den heterozygoten Tieren zudem eine signifikant höhere Proteinkonzentration.

Die Mittelwerte der Proteinkonzentration werden für jede Versuchsgruppe in einem Balkendiagramm (Abb. 33) dargestellt. Die genauen Mittelwerte mit den jeweiligen 95%-Confidence Intervallen können Tabelle 23 entnommen werden. Die p-Werte für den Vergleich der Mittelwerte der Proteinkonzentration (Mann-Whitney-U-Test) sind ebenfalls aufgezeigt. Die einzelnen p-Werte für den Vergleich der vier verschiedenen Provokationen sind für jeden Genotyp in Tabelle 24 aufgelistet. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

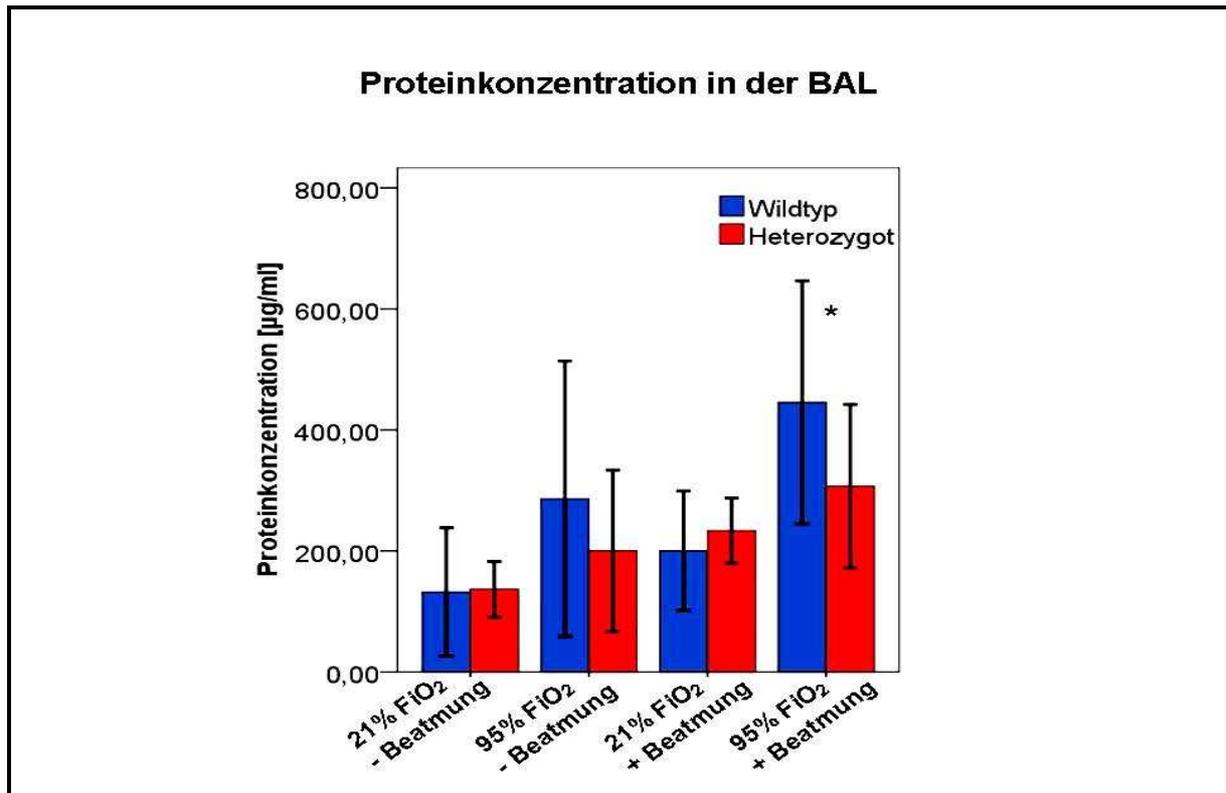


Abb. 33: Balkendiagramm der Mittelwerte (MW) der Proteinkonzentration in der BAL für die einzelnen Versuchsgruppen. Die Werte der Wildtypen werden durch blaue, die der Heterozygoten durch rote Balken dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren den einfachen Standardfehler (MW ± SEM; \* p < 0,05  $ABCA3^{WT/WT}$  vs.  $ABCA3^{WT/-}$ ).

### Vergleich der Proteinkonzentration in der BAL zwischen beiden Genotypen

	$ABCA3^{WT/WT}$	$ABCA3^{WT/-}$	p
21% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	132,34 [34,18; 230,50]	136,66 [79,44; 193,88]	0,639
95% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	286,54 [96,25; 476,82]	200,28 [60,16; 340,41]	0,573
21% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	200,59 [153,06; 248,12]	233,59 [201,01; 266,18]	0,108
95% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	445,58 [310,62; 580,54]	307,00 [228,92; 385,08]	<b>0,033</b>

Tab. 23: Vergleich der Mittelwerte der Proteinkonzentration zwischen beiden Genotypen in den Versuchsgruppen. Es werden die Mittelwerte mit 95%-Confidence Intervall und die p-Werte angegeben. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

### Vergleich der Proteinkonzentration zwischen den Versuchsgruppen

		p-Wert	
		<i>ABCA3</i> <sup>WT/WT</sup>	<i>ABCA3</i> <sup>WT/-</sup>
21% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,387	1,000
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	0,519
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	<b>0,001</b>	<b>0,021</b>
95% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,387	1,000
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,209	0,262
21% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	0,519
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	<b>0,001</b>	0,460
95% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	<b>0,001</b>	<b>0,021</b>
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,209	0,262
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	<b>0,001</b>	0,460

Tab. 24: Post-Hoc-Mehrfachvergleich der Mittelwerte der Proteinkonzentration zwischen den Versuchsgruppen für beide Genotypen. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

### 3.5.5 Interleukinbestimmungen in der bronchoalveolären Lavage

Die Anzahl der Messungen für die Interleukine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und MIP-2 in jeder Gruppe können der folgenden Tabelle entnommen werden.

**Häufigkeit der Bestimmung der Interleukine in der BAL**

	<i>ABCA3</i> <sup>WT/WT</sup>	<i>ABCA3</i> <sup>WT/-</sup>
21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	7 (8)	7 (7)
95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	8 (8)	6 (8)
21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	19 (22)	13 (13)
95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	11 (11)	14 (14)

Tab. 25: Häufigkeit der Bestimmung der Interleukine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und MIP-2 in der BAL für beide Genotypen in den Versuchsgruppen. Die Gesamtzahl der untersuchten Tiere pro Versuchsgruppe ist in Klammern angegeben.

Bei der Bestimmung des IL-1 $\beta$  in der BAL wurden Werte < 41,59 pg/dl nicht ausreichend genau erfasst, da die Konzentration der Standard-Lösung bei der Durchführung des Multiplex-ELISA nicht niedrig genug gewählt wurde. In den beiden Gruppen der beatmeten Tiere lagen die IL-1 $\beta$ -Werte ausschließlich, bei den nicht-beatmeten Tieren größtenteils unter dieser Grenze. Die Werte für IL-1 $\beta$  können deshalb nicht weiter ausgewertet werden.

Die gemessenen Werte für TNF- $\alpha$  sind in allen Versuchsgruppen auf gleichem Niveau. Die Konzentrationen von IL-6 und MIP-2 steigen nach den drei verschiedenen Provokationen an, teilweise ist dieser Anstieg signifikant. Nach isolierter Beatmung sind die Konzentrationen von IL-6 und MIP-2 bei den heterozygoten Tieren signifikant höher als bei den Wildtypen.

In der folgenden Abbildung sind die Mittelwerte von TNF- $\alpha$ , IL-6 und MIP-2 in den einzelnen Versuchsgruppen dargestellt.

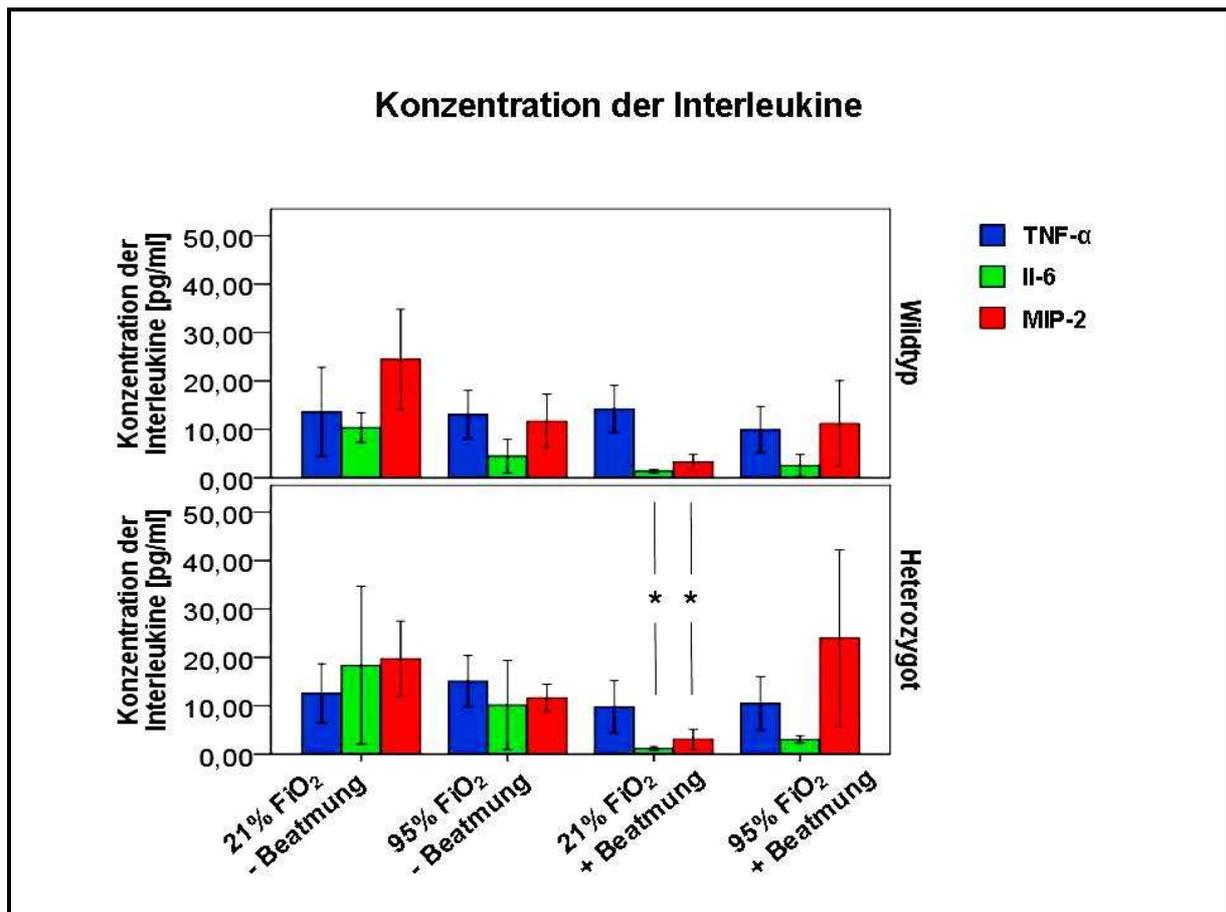


Abb. 34: Balkendiagramm der Mittelwerte (MW) der Interleukine TNF- $\alpha$ , IL-6 und MIP-2 in den verschiedenen Versuchsgruppen. Die Fehlerbalken repräsentieren den einfachen Standardfehler (MW  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$  ABCA3<sup>WT/WT</sup> vs. ABCA3<sup>WT/-</sup>).

In Tabelle 26 sind die Mittelwerte mit 95%-Confidence Intervall für die Interleukine TNF- $\alpha$ , IL-6 und MIP-2 bei den Wildtypen und den heterozygoten Tieren für die jeweilige Versuchsgruppe aufgelistet. Die p-Werte in Tabelle 26 ergeben sich aus dem Vergleich der beiden Genotypen innerhalb einer Therapiegruppe. In Tabelle 27 sind die p-Werte für den Vergleich der Mittelwerte der Interleukine TNF- $\alpha$ , IL-6 und MIP-2 für die Wildtypen in den unterschiedlichen Therapiegruppen dargestellt. Mit Tabelle 28 wird der Sachverhalt analog für die heterozygoten Tiere gezeigt.

**Vergleich der Interleukin-Konzentrationen in der BAL  
zwischen beiden Genotypen**

	Interleukin	<i>ABCA3</i> <sup>WT/WT</sup>	<i>ABCA3</i> <sup>WT/-</sup>	p-Wert
21% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	TNF-α	14,24 [9,72; 18,76]	9,81 [4,77; 14,85]	0,106
	IL-6	1,35 [0,98; 1,71]	1,20 [0,83; 1,57]	0,807
	MIP-2	3,26 [1,76; 4,76]	3,12 [1,23; 5,02]	0,552
95% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	TNF-α	13,09 [8,92; 17,27]	15,08 [9,51; 20,65]	0,864
	IL-6	4,47 [1,52; 7,41]	10,14 [0,47; 19,82]	0,358
	MIP-2	11,69 [7,02; 16,35]	11,64 [8,68; 14,61]	0,594
21% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	TNF-α	9,93 [7,61; 12,25]	10,49 [7,16; 13,82]	0,867
	IL-6	2,55 [1,43; 3,67]	3,04 [2,62; 3,46]	<b>0,003</b>
	MIP-2	11,19 [6,92; 15,45]	23,99 [12,98; 35,01]	<b>0,007</b>
95% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	TNF-α	13,63 [7,44; 19,83]	12,57 [9,03; 16,11]	0,907
	IL-6	10,37 [8,29; 12,45]	18,38 [8,97; 27,79]	0,526
	MIP-2	24,47 [17,51; 31,42]	19,72 [15,22; 24,22]	0,227

Tab. 26: Vergleich der Mittelwerte der Konzentrationen der Interleukine TNF-α, IL-6 und MIP-2 in der BAL zwischen beiden Genotypen in den Versuchsgruppen. Es werden die Mittelwerte mit 95%-Confidence Intervall und die p-Werte angegeben. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

**Vergleich der Interleukin-Konzentrationen in der BAL der Wildtyp-Mäuse  
zwischen den Versuchsgruppen**

		<i>ABCA3<sup>WT/WT</sup></i> p-Wert		
		TNF- $\alpha$	IL-6	MIP-2
21% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	0,158	0,313
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,750	1,000	0,200
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
95% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	0,158	0,313
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	0,541	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	<b>0,000</b>	<b>0,010</b>
21% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,750	1,000	0,200
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	0,541	1,000
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,743	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>
95% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	<b>0,000</b>	<b>0,010</b>
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,743	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>

Tab. 27: Post-Hoc-Mehrfachvergleich der Mittelwerte der Konzentrationen der Interleukine TNF- $\alpha$ , IL-6 und MIP-2 in der BAL der Wildtyp-Mäuse zwischen den Versuchsgruppen. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

**Vergleich der Interleukin-Konzentrationen in der BAL der heterozygoten Mäuse  
zwischen den Versuchsgruppen**

		<i>ABCA3</i> <sup>WT/-</sup>		
		p-Wert		
		TNF- $\alpha$	IL-6	MIP-2
21% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,632	0,783	1,000
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	1,000	<b>0,003</b>
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	<b>0,006</b>	<b>0,023</b>
95% FiO <sub>2</sub> - Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,632	0,783	1,000
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	0,667	1,000	0,226
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	0,677	0,972
21% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	1,000	<b>0,003</b>
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	0,667	1,000	0,226
	95% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	<b>0,003</b>	1,000
95% FiO <sub>2</sub> + Beatmung	21% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	<b>0,006</b>	<b>0,023</b>
	95% FiO <sub>2</sub> / - Beatmung	1,000	0,677	0,972
	21% FiO <sub>2</sub> / + Beatmung	1,000	<b>0,003</b>	1,000

Tab. 28: Post-Hoc-Mehrfachvergleich der Mittelwerte der Konzentrationen der Interleukine TNF- $\alpha$ , IL-6 und MIP-2 in der BAL der heterozygoten Mäuse zwischen den Versuchsgruppen. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die lungenmechanischen Eigenschaften von beatmeten *ABCA3*-Knockout-Mäusen im Vergleich zum *ABCA3*-Wildtyp evaluiert. Die lungenmechanische Charakterisierung wurde durch morphologische und inflammatorische Diagnostik ergänzt.

Im Unterschied zu Hokuto et al. (Hokuto, Ikegami et al. 2004) wurden die basalen lungenmechanischen Parameter nicht nach zwei, sondern nach fünf Minuten bestimmt. Weiterhin wurde die Beatmungszeit auf 25 min ausgedehnt. Durch Messungen, die im Abstand von fünf Minuten wiederholt wurden, konnte auch der zeitliche Verlauf der einzelnen Parameter eingeschätzt werden. Erst nach einer Beatmungszeit von mind. 20 min wird in Bezug auf die lungenmechanischen Parameter ein ‚steady state‘ erreicht (s. 3.3.2 Zeitlicher Verlauf der lungenmechanischen Parameter). Daher erscheint ein Vergleich der Daten zum Zeitpunkt 25 min gerechtfertigt.

Insgesamt gestaltete sich die Durchführung der Versuche bei Mäusen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von  $< 20$  g sehr diffizil. Tracheotomie und Intubation konnten in der Regel erfolgreich durchgeführt werden.

Die lungenmechanischen Messungen waren ebenfalls gut durchführbar, sind allerdings auf Grund der geringen Körpergröße in Bezug auf ihre Genauigkeit limitiert. Die forcierte Oszillationstechnik führt zudem zu einem Atemstillstand über acht Sekunden, der bei den Tieren wiederholt Bradykardien auslöste.

Die gemessenen Daten zur Lungenmechanik der Wildtypen entsprechen weitgehend den Daten in der Literatur: Für die Resistance und die Compliance werden gleiche Werte angegeben (Huang, Rabold et al. 2007); für die TLC sind die Vergleichswerte minimal niedriger (Huang, Rabold et al. 2007).

Für die Werte der Impedanz-Messungen sind in der Literatur unterschiedliche Angaben zu finden. Huang et al. beatmeten männliche Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6 verschiedener Altersgruppen im Unterschied zu unserer Studie zunächst für 10 min und führten anschließend eine Impedanz-Messung durch (Huang, Rabold et al. 2007). Zudem hatten die männlichen Mäuse bei Huang et al. ein höheres Körpergewicht als die weiblichen Tiere in unserer Studie. Die Werte bzgl. Gewebe-

Dämpfung und Gewebe-Elastizität fallen in unserer Arbeit höher aus als in der Gruppe der acht Wochen alten Mäuse bei Huang et al. Die Tiere, die von Huang et al. im Alter von acht Wochen untersucht wurden, hatten höhere Werte für Gewebe-Dämpfung und Gewebe-Elastizität als die Tiere, die im Alter von 20 bzw. 26 Monaten untersucht wurden. Die Werte der älteren Mäuse sind mit den Werten unserer Studie vergleichbar.

In der Studie von Allen et al. wurden für ausgewachsene männliche Mäuse des Stammes C57BL/6 bei vergleichbaren Beatmungseinstellungen ähnliche Werte für die Newton-Resistance und die Gewebe-Elastizität gemessen wie in unserer Arbeit (Allen, Suratt et al. 2006). Die Werte für die Gewebe-Dämpfung sind bei Allen et al. etwas niedriger, steigen aber im Verlauf der rezidivierenden Messungen an.

In unserer Arbeit gelang die zur Durchführung einer Blutgasanalyse notwendige Entnahme von Blut aus der Schwanzarterie nur bei 68% der Tiere; wiederholte Blutentnahmen sind nicht möglich, da eine Maus lt. den Empfehlungen zur Planung und Durchführung von Tierversuchen mit einem Körpergewicht von 20 g ein geschätztes Blutvolumen von max. 1,6 ml hat (Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V. 2004). Eine zweimalige Abnahme einer BGA würde mit ca. 12,5% Verlust des intravasalen Volumens bei den Tieren zu einem relevanten Volumenmangel führen.

Die Fixierung des Lungengewebes mit Formalin gestaltete sich problematisch: In der Versuchsgruppe der isoliert beatmeten Tiere wurde der rechte Lungenlappen über die Trachea mit Formalin expandiert. Dies war technisch gut durchführbar. In der Versuchsgruppe der Tiere, die nach 72-stündiger Sauerstoffprovokation beatmet wurden, stand nur der Lobus inferior zur Verfügung, da die Lobi superior, medius et postcavalis für Untersuchungen der Surfactant-Proteine und inflammatorische Diagnostik homogenisiert wurden. Auf Grund der sehr geringen Größe des Bronchus des Lobus inferior war eine Kanülierung nicht möglich. Stattdessen wurde eine Unterdruck-Expansion in einer Spritze durchgeführt. Dies hatte eine sehr ungleichmäßige Fixierung des Lungenparenchyms zur Folge. Deshalb ist das Gewebe unterschiedlich stark geschrumpft. Eine mikroskopische Beurteilung der Präparate war nicht in ausreichender Qualität durchführbar. Bei der computerunterstützten Messung der MCL kann die unterschiedliche Schrumpfung des Gewebes ebenfalls nicht berücksichtigt werden.

Die gemessenen Daten der MCL sind aus diesem Grund nur bedingt aussagekräftig. Die Werte der MCL sind nur in der Versuchsgruppe der isoliert beatmeten Tiere mit Werten aus der Literatur vergleichbar (Huang, Rabold et al. 2007). In den anderen Versuchsgruppen wurden höhere Werte gemessen.

Die Durchführung der Lavage bereitete Schwierigkeiten, da der linke Lungenlappen nicht immer richtig abgeklemmt werden konnte. In diesen Fällen konnte der Quotient Feucht-/Trockengewicht nicht bestimmt werden.

Die Daten, die wir zum Quotienten Feucht-/Trockengewicht erhoben haben, entsprechen für die nicht-beatmeten Wildtyp-Tiere den Daten der Literatur (Wolthuis, Vlaar et al. 2009). Nach Beatmung über fünf Stunden konnten Wolthuis et al. einen signifikanten Anstieg der Ratio Feucht-/Trockengewicht nachweisen. In unserer Arbeit konnte nach 25 min kein Anstieg der Ratio beobachtet werden.

Unsere Daten der BAL sind im Wesentlichen mit den Daten aus der Literatur vergleichbar: Die von uns gemessene Leukozytenzahl und die Gesamt-Proteinmenge in der BAL entsprechen den veröffentlichten Werten (Dodd, Hristopoulos et al. 2009; Ali, Umstead et al. 2010). Auch die Konzentrationen der Interleukine Il-6 und MIP-2 stimmen bei vergleichbaren Bedingungen mit Daten aus der Literatur überein (Allen, Suratt et al. 2006).

Anhand der Daten zur Lungenmechanik wird in unserer Arbeit nachgewiesen, dass bei beiden Genotypen bereits eine Beatmung über 25 min zu einer Verschlechterung der dynamischen lungenmechanischen Parameter führt: Die Resistance nimmt in beiden Versuchsgruppen während der rezidivierenden Messungen zu. Als mögliche Erklärung wird die Bildung von Kondenswasser im Beatmungssystem, insbesondere im Tubus gesehen (Donn and Sinha 2006). Auch die dynamische Compliance verschlechtert sich bei beiden Genotypen: sie nimmt auf Grund der Beatmung in beiden Versuchsgruppen ab. Dies kann als Zeichen für eine Gewebeschädigung durch die Überdruck-Beatmung mit trockener, kalter Luft interpretiert werden (Dreyfuss, Soler et al. 1988).

Die FOT zeigt, dass die Inertance für beide Genotypen ohne Sauerstoffprovokation gleich ist. Nach 25 min Beatmung kommt es bei beiden Genotypen zu einem geringen Anstieg der Inertance. Dies ist durch die Austrocknung der Atemwege als Folge der trockenen Beatmung erklärbar (s. 6.2 Berechnungen zur Inertance).

Allerdings ist dieser Anstieg der Inertance für den Gesamtwiderstand der Atemwege auf Grund der sehr kleinen Werte nicht als relevant einzuschätzen.

Die lungenmechanischen Daten legen nahe, dass die Beatmung auch mit den physiologischen Tidalvolumina bereits zu Veränderungen der lungenmechanischen Parameter führt. Selbst nach kurzer physiologischer Beatmung sind Veränderungen des Lungenparenchyms im Sinne von morphologischen Veränderungen und einer inflammatorischen Reaktion beschrieben (Muller, Hellwig et al.; Plataki and Hubmayr; Hendra and Celli 2002; Curley, Kevin et al. 2009). Deshalb haben wir zusätzlich bei Tieren, die keinerlei Provokation erhalten hatten, morphologische und inflammatorische Diagnostik durchgeführt.

Die Analyse der Lungenfunktionsparameter zeigt zu Beginn der Beatmung für heterozygote Tiere und Wildtypen ohne Sauerstoffprovokation statistisch nicht zu unterscheidende Werte. Die einzige Ausnahme bildet die dynamische Compliance. Sie ist bei den heterozygoten Tieren signifikant niedriger als bei den Wildtypen ( $p=0,033$ ). Die heterozygoten Tiere haben damit als Ausgangspunkt eine steifere Lunge, die z.B. durch eine restriktive Lungenerkrankung i. S. von fibrotisch-emphysematösen Veränderungen (Lundblad, Thompson-Figueroa et al. 2005) oder durch das Vorliegen eines Lungenödems erklärt werden könnte.

Bei den weiteren lungenmechanischen Parametern ergeben sich hinsichtlich des Genotyps weder zu Beginn der Beatmung noch nach 25 min Veränderungen, die auf ein unterschiedlich ausgeprägtes Emphysem hinweisen könnten: Die TLC ist für beide Genotypen statistisch nicht zu unterscheiden. Die mit forcierter Oszillationstechnik gemessenen Daten zur Gewebe-Dämpfung und Gewebe-Elastizität sind zwischen Wildtypen und heterozygoten Mäusen nicht signifikant unterschiedlich.

In den histologischen Präparaten ergeben sich bei den heterozygoten Tieren ohne Provokation keine Hinweise für ein interstitielles oder alveoläres Lungenödem. Mikroskopisch erkennt man keine Fibrose, immunhistochemische Untersuchungen zur ausführlicheren Fibrose-Diagnostik wurden nicht durchgeführt.

Zum Nachweis eines Emphysems ist die MCL als sensibler Parameter zur Bestimmung der mittleren freien Weglänge in den terminalen Luftwegen geeignet (Busch, Buschbom et al. 1984). Die Messungen der MCL ohne Provokation ergeben

keinen Unterschied zwischen Wildtypen und heterozygoten Tieren. Die heterozygoten Tiere zeigen lediglich höhere Werte der MCL als die Wildtyp-Tiere, so dass die Möglichkeit des Vorliegens eines Emphysems besteht.

Nach isolierter Beatmung ist die MCL bei den heterozygoten Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren tendenziell erhöht. Es scheint, dass nach isolierter Beatmung bei den heterozygoten Tieren ein Lungenemphysem vorliegt oder ein bereits bestehendes Emphysem stärker ausgeprägt ist.

Nach Abschluss der Beatmungsexperimente konnten in der vorab geplanten Zwischenauswertung der lungenmechanischen Parameter keine wegweisenden Unterschiede zwischen Wildtypen und heterozygoten Tieren nachgewiesen werden.

Unter der Hypothese, dass sich Unterschiede der Lungenfunktion zwischen den beiden Genotypen erst nach Provokation manifestieren, wurden in einem zweiten Versuchsabschnitt lungenmechanische Messungen an Tieren durchgeführt, die vorher über 72 Stunden einer Umgebungsluft mit 95% Sauerstoff ausgesetzt waren. Bzgl. der Sauerstoffprovokation war der Aufbau der Versuche angelehnt an die Veröffentlichungen von Tokieda et al. (Tokieda, Iwamoto et al. 1999).

Um den Effekt der Beatmung nach Sauerstoffprovokation vom Einfluss der Sauerstoffprovokation selbst abzugrenzen, wurde auch bei Kontroll-Tieren, die für 72 Stunden in 95%-Sauerstoff-Umgebung gehalten wurden, morphologische und inflammatorische Diagnostik durchgeführt.

Bei den lungenmechanischen Messungen nach Sauerstoffprovokation zeigen sowohl die Wildtypen ( $p=0,029$ ) als auch die heterozygoten Tiere ( $p<0,001$ ) eine signifikant höhere dynamische Compliance im Vergleich zu den Tieren ohne Sauerstoffprovokation. Zu Beginn der Beatmung liegen die Werte der dynamischen Compliance der heterozygoten Tiere zudem signifikant höher als die Werte der Wildtypen ( $p=0,021$ ). Diese Zunahme der Compliance nach Sauerstoffprovokation kann für beide Genotypen mit der Entstehung eines Lungenemphysems nach Sauerstoffprovokation erklärt werden. Die Zunahme der Compliance-Werte bei den heterozygoten Tieren über das Niveau der Werte der Wildtyp-Tiere hinaus zeigt, dass das Lungenemphysem nach Sauerstoffexposition bei den heterozygoten Tieren ausgeprägter ist als bei den Wildtypen.

Dieser Hinweis auf die Entstehung eines Lungenemphysems nach Sauerstoffprovokation steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Tokieda et al. (Tokieda, Iwamoto et al. 1999). In ihrer Arbeit zeigte sich bei SP-B-defizienten Mäusen nach Sauerstoffprovokation eine niedrigere Compliance. Histologisch wurden Zeichen für ein Lungenödem gefunden. Auch Boggaram charakterisiert die Lungenschädigung nach Sauerstoffexposition durch die Entstehung eines Lungenödems und die Initiierung einer inflammatorischen Reaktion (Boggaram 2004).

In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese der Entstehung eines Lungenemphysems nach Sauerstoffprovokation bei den heterozygoten Tieren auch durch die Daten zur Totalen Lungenkapazität (TLC) unterstützt: Während die TLC bei den Wildtyp-Tieren nach Sauerstoffprovokation gleich bleibt, nimmt sie bei den heterozygoten Tieren nach Sauerstoffprovokation signifikant zu ( $p=0,033$ ). Zudem ist sie zu jedem Zeitpunkt höher als die der Wildtyp-Tiere und steigt während der Beatmung weiter an. Aufgrund der technischen Messung der TLC kann hier von einer Überblähung der Lunge auf dem Boden eines Lungenemphysems ausgegangen werden.

Für beide Genotypen führt die Sauerstoffprovokation mit anschließender Beatmung nicht zu einer Änderung des Atemwegswiderstands (Resistance).

Hingegen nimmt die Newton-Resistance als Parameter des Widerstands in den kleinen Atemwegen nach Sauerstoffprovokation bei beiden Genotypen deutlich ab ( $ABCA3^{WT/WT}$   $p<0,001$ ;  $ABCA3^{WT/-}$   $p<0,001$ ). Dieser Effekt ist bei den heterozygoten Tieren noch ausgeprägter als bei den Wildtyp-Tieren. Die Abnahme der Newton-Resistance ist ebenfalls mit der Entstehung eines Emphysems erklärbar. Dieses Emphysem scheint bei den heterozygoten Tieren stärker ausgeprägt zu sein.

Die Impedanz-Messungen mit forcierter Oszillationstechnik zeigen, dass die Sauerstoffprovokation in Kombination mit der 25-minütigen Beatmung auf die Gewebe-Dämpfung keinen Einfluss hat.

Die Werte der Gewebe-Elastizität bleiben für die Wildtypen nach Sauerstoffprovokation und Beatmung unverändert. Bei den heterozygoten Tieren ist die Gewebe-Elastizität nach Sauerstoffprovokation im Vergleich zu isolierter Beatmung signifikant reduziert ( $p=0,003$ ). Diese erniedrigte Gewebe-Elastizität der heterozygoten Tiere wäre ebenfalls mit einem Lungenemphysem erklärbar, das nach Sauerstoffprovokation entsteht. Die Gewebe-Elastizität nach Sauerstoffprovokation

ist bei den heterozygoten Tieren ebenfalls tendenziell niedriger als bei den Wildtyp-Tieren (n. s.). Bei einer höheren Fallzahl wäre allerdings das Erreichen des Signifikanz-Niveaus zu erwarten. Auch die bei den heterozygoten Tieren nach Sauerstoffprovokation erniedrigten Werte für die Gewebe-Elastizität stehen im Gegensatz zu in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen: Habre et al. beschreiben bei gesunden Mäusen nach 60-stündiger Sauerstoffprovokation einen Anstieg der Gewebe-Elastizität (Habra, Petak et al. 2006).

Die Inertance nimmt nach Sauerstoffprovokation bei beiden Genotypen deutlich ab. Bei den heterozygoten Tieren ist die Abnahme sowohl initial ( $p=0,027$ ) als auch nach 25 min ( $p<0,001$ ) signifikant. Bei den Wildtypen wird das Signifikanz-Niveau beim 25 min-Wert gerade nicht mehr erreicht (initial:  $p=0,025$ ; 25min:  $p=0,050$ ).

Als Grund für die Abnahme der Inertance nach Sauerstoffprovokation kann zum einen die erhöhte Luftfeuchtigkeit angeführt werden. Die Sauerstoffprovokation verursacht sowohl bei heterozygoten als auch bei Wildtyp-Tieren eine Ödembildung im Lungengewebe (Tokieda, Iwamoto et al. 1999). Damit nimmt der Wassergehalt der Luft in den Bronchien zu. Eine Zunahme des Wassergehalts in der Atemluft bedeutet ein leichteres Molekulargewicht des Gases und damit eine niedrigere Trägheit der Gassäule, die der Inertance entspricht. Die genaue Berechnung kann dem Anhang (s. 6.2 Berechnungen zur Inertance) entnommen werden.

Zum anderen führt die Entstehung eines Emphysems zu einer Zunahme des Atemwegsquerschnitts in den terminalen Luftwegen. Beide Genotypen zeigen nach Sauerstoffexposition eine deutliche Reduktion der Inertance, da eine Zunahme des Atemwegsquerschnitts mit  $1/r^2$  in die Berechnung der Inertance eingeht (s. 6.2 Berechnungen zur Inertance). Auch in diesem Fall kann die Abnahme der Inertance für den Gesamtwiderstand der Atemwege nicht als relevant gewertet werden, da die absoluten Werte sehr klein sind.

Pathophysiologisch gesehen kommt es im Rahmen der Beatmung und der Sauerstoffprovokation zu einer Gewebeschädigung, die zu strukturellen Veränderungen mit konsekutiver Einschränkung der Lungenfunktion führt. Die Beatmung an sich entspricht einem Volutrauma und verursacht eine Schädigung des Lungenparenchyms (Dreyfuss, Soler et al. 1988; Crespo, Novoa et al. 2006): Das mit Überdruck zugeführte Luftvolumen deformiert die Alveolarzellen (Otto, Markstaller et al. 2008). Über den Mechanismus der Mechanotransduktion wird der mechanische

Stress von den Zellen in biochemische Signale übersetzt (Pugin 2003). Inflammatorisch vermittelt bildet sich ein Ödem (McCallion, Davis et al. 2005; Crespo, Novoa et al. 2006).

Das Volutrauma führt zur Ausbildung eines Emphysems. Emphysematöse Veränderungen des Lungengewebes beruhen auf einer Parenchymzerstörung distal der Bronchiolen. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer narbigen Schrumpfung des Lungengewebes. Bei Neugeborenen mit *ABCA3*-Mutationen wurden neben dem Emphysem eine Hyperplasie der Typ II Pneumozyten, variable Verdickungen des Interstitiums und der Alveolarsepten beobachtet (Shulenin, Noguee et al. 2004).

In den histologischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Vorgänge nur zu einem sehr kleinen Teil bestätigt werden. Der Nachweis der Entstehung eines Lungenemphysems nach Sauerstoffprovokation konnte weder für die Wildtypen noch für die heterozygoten Tiere erbracht werden. Auch nach Sauerstoffexposition und Beatmung der Mäuse konnte histologisch eine Zunahme des Emphysems bei den heterozygoten Tieren nicht gezeigt werden. Allerdings ist die Qualität der histologischen Präparate aus o. g. Gründen sehr gering, so dass die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen nicht aussagekräftig sind.

Die MCL, ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der mittleren freien Weglänge der terminalen Luftwege, ist statistisch nicht signifikant. Möglicherweise reicht eine Beatmung mit physiologischen Tidalvolumina über 30 min noch nicht aus, um das histologische Vollbild eines Lungenemphysems erkennen zu lassen. Um diese Hypothese zu stützen, müssten Beatmungsexperimente über einen wesentlich längeren Zeitraum durchgeführt werden. Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war aber die Erhebung von validen lungenmechanischen Parametern im ‚steady state‘, der nach 25 min erreicht zu sein scheint.

Die Bestimmung des Verhältnisses Feucht-/Trockengewicht bestätigt jedoch die oben beschriebenen pathophysiologischen Gewebeveränderungen. Höhere Werte für die Ratio Feucht-/Trockengewicht dokumentieren einen höheren Lungenwassergehalt des Gewebes und sind damit ein Hinweis auf ein Ödem. Nach einer Provokation durch isolierte Beatmung, durch isolierte Sauerstoffgabe oder durch die Kombination beider Provokationsformen entstehen ausgeprägte Gewebeschädigungen: Heterozygote Tiere haben sowohl nach reiner Sauerstoffprovokation ( $p=0,023$ ) als auch nach reiner Beatmung ( $p=0,001$ ) ein

signifikant größeres Verhältnis Feucht-/Trockengewicht im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (s. 3.4.1 Quotient Feucht-/Trockengewicht). Bei den Wildtyp-Tieren ist für die Ratio Feucht-/Trockengewicht kein Unterschied zwischen den verschiedenen Provokationsformen nachweisbar. Die Ratio der heterozygoten Tiere nach isolierter Sauerstoffprovokation ist im Vergleich zu allen anderen Provokationsformen signifikant erhöht (s. 3.4.1 Quotient Feucht-/Trockengewicht, Tab. 11). Dies bedeutet, dass die Ödembildung durch die isolierte Sauerstoffprovokation am stärksten ausgeprägt ist. Eine mögliche Erklärung für die abgeschwächte Ödembildung nach reiner Beatmung bzw. bei Sauerstoffprovokation mit Beatmung ist die Austrocknung der Atemwege durch die trockene Beatmungsluft, die zu einer Abnahme des Ödems führt. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass hier die Ausbildung des Emphysems im Vordergrund steht.

Die Gewebeschädigung durch Sauerstoff, Beatmung oder der Kombination von beiden Therapien führt nicht nur zu strukturellen Veränderungen sondern auch zu einer Entzündungsreaktion des geschädigten Gewebes. Als Hinweis für eine ablaufende Entzündungsreaktion konnten vermehrt Makrophagen und proteinhaltiges Material in den Alveolarräumen nachgewiesen werden (Shulenin, Noguee et al. 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb neben lungenmechanischen Parametern auch Daten zur Entzündungsreaktion des Gewebes erhoben. Zur Quantifizierung der Entzündungsreaktion wurde die Leukozytenzahl in der BAL bestimmt und eine Zelldifferenzierung durchgeführt. Neben der zytologischen Diagnostik wurde die Proteinkonzentration der BAL gemessen und die Interleukine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und MIP-2 wurden quantitativ bestimmt.

In allen Versuchsgruppen können bzgl. der Zelldifferenzierung keine statistischen Unterschiede festgestellt werden. In der BAL finden sich stets zu 95% Makrophagen, kaum Lymphozyten und kaum stabkernige neutrophile Granulozyten.

Für TNF- $\alpha$  wurden weder für die beiden Genotypen noch für die verschiedenen Provokationsmethoden unterschiedliche Werte gemessen. TNF- $\alpha$  steigt als erstes Protein der Kaskade der Akut-Phase-Reaktion bei Infektionen oder septischen Komplikationen bereits wenige Minuten nach Beginn des Infektionsgeschehens an

(Hehlgans and Pfeffer 2005). Wahrscheinlich wird TNF- $\alpha$  bei beiden Genotypen nach Beginn der Beatmung gleich schnell in ähnlicher Konzentration ausgeschüttet.

Die Auswertung von Il-1 $\beta$  war in unserer Arbeit nicht möglich, da die Konzentration der Standard-Lösung bei der Durchführung des Multiplex-ELISA nicht niedrig genug gewählt worden war und die geringen Konzentrationen von Il-1 $\beta$  nicht ausreichend genau erfasst werden konnten.

Die Ergebnisse der inflammatorischen Diagnostik zeigen, dass bei den heterozygoten Tieren auf Grund der Genmutation bereits ohne Provokation Zeichen einer erhöhten pulmonalen Entzündungsreaktion auf zellulärer Ebene vorliegen: Die Leukozytenzahl in der BAL ist bei den heterozygoten Tieren bereits signifikant erhöht ( $p=0,021$ ). Die Proteinkonzentration und die Interleukin-Konzentrationen von Il-6 und MIP-2 unterschieden sich nicht.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl die isolierte Beatmung als auch die ausschließliche Sauerstoffprovokation eine Entzündungsreaktion stimulieren.

Die isolierte Provokation mit Sauerstoff hat bei den Wildtypen einen signifikanten Anstieg der Leukozytenzahl zur Folge ( $p=0,034$ ). Die heterozygoten Tiere bleiben auf dem bereits erhöhten Ausgangsniveau. Die segmentkernigen neutrophilen Granulozyten steigen bei beiden Genotypen an (n. s.). Das gleiche gilt für die Proteinkonzentration. Sie erreicht aber kein signifikantes Niveau.

Die isolierte Beatmung verursacht ebenfalls bei beiden Genotypen einen Anstieg der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (n. s.) und der Proteinkonzentration (n. s.). Bei den heterozygoten Tieren steigen die Interleukine Il-6 (n. s.) und MIP-2 ( $p=0,003$ ) an. Sie erreichen eine signifikant höhere Konzentration als bei den Wildtypen gemessen wurde (Il-6:  $p=0,003$ ; MIP-2:  $p=0,007$ ).

Die stärkste Entzündungsreaktion wird durch die kombinierte Provokation mit Sauerstoff und Beatmung hervorgerufen. Bei beiden Phänotypen nimmt die Leukozytenzahl zu, bei den Wildtypen signifikant ( $p<0,001$ ), bei den heterozygoten Tieren auf Grund des bereits erhöhten Ausgangsniveaus nicht signifikant. Auch die Anzahl der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten steigt bei beiden Phänotypen an. Signifikantes Niveau wird nur bei den Wildtypen erreicht ( $p=0,050$ ), da bei den heterozygoten Tieren eine breitere Streuung vorliegt. Die

Proteinkonzentration ist bei beiden Genotypen ebenfalls signifikant erhöht ( $ABCA3^{WT/WT}$   $p=0,001$ ;  $ABCA3^{WT/-}$   $p=0,021$ ). Zudem zeigen die Wildtypen eine signifikant höhere Proteinkonzentration ( $p=0,033$ ). Die Interleukine Il-6 und MIP-2 sind im Vergleich zum Ausgangswert bei beiden Genotypen signifikant erhöht ( $ABCA3^{WT/WT}$ : Il-6 u. MIP-2:  $p<0,001$ ;  $ABCA3^{WT/-}$ : Il-6:  $p=0,006$ ; MIP-2:  $p=0,023$ ). Die heterozygoten Tiere zeigen eine höhere Konzentration als die Wildtyp-Tiere (n. s.).

Eine Sauerstoffumgebung schädigt das Lungenparenchym anders als die mechanische Beanspruchung einer Beatmung (Pugin 2003; Wright and Dennery 2009). Diese Hypothese wird durch die Daten unserer Arbeit gestützt: Nach ausschließlicher Sauerstoffprovokation kommt es zu einem deutlicheren Anstieg der Leukozyten und der neutrophilen Granulozyten als nach isolierter Beatmung. Nach isolierter Beatmung sind die Konzentrationen der Interleukine Il-6 und MIP-2 erhöht. Otto et al. beschreiben nach mechanischer Schädigung des Lungenepithels eine Steigerung der Interleukin-Ausschüttung (Otto, Markstaller et al. 2008). In unseren Untersuchungen ist nach Kombination der beiden Provokationsformen die stärkste inflammatorische Reaktion zu erkennen.

In unserer Arbeit sind im Gewebe der heterozygoten Tiere bei gleicher Belastung höhere Entzündungszeichen nachzuweisen als bei den Wildtypen. Das Lungenparenchym scheint vulnerabler zu sein. Außerdem liegt bei den heterozygoten Tieren bereits ein höheres inflammatorisches Ausgangsniveau vor. Dies resultiert evt. aus einer gestörten Surfactant-Homöostase. Allerdings war die Untersuchung des Surfactant-Metabolismus nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

Frühere Veröffentlichungen zeigen, dass der „signal transducer and activator of transcription 3“, STAT3, die Expression des *ABCA3*-Transporters reguliert (Hokuto, Ikegami et al. 2004; Ikegami, Falcone et al. 2008; Matsuzaki, Besnard et al. 2008). STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor, der die zelluläre Antwort nach Stimulation durch verschiedene Zytokine reguliert. An dieser Kaskade ist unter anderem Il-6 beteiligt, das bei einer Schädigung des Lungenepithels durch mechanische Beatmung (Pugin 2003) und durch Hyperoxie (Wright and Dennery 2009) vermehrt synthetisiert wird. Der Signalübertragungsweg beginnt mit Il-6 und führt über GP130 und JAK-1 zur

Aktivierung von STAT3. STAT3 stimuliert über verschiedene weitere Signalzwischenstufen die Expression des *ABCA3*-Transporters, der eine wichtige Rolle in der Surfactant-Homöostase spielt (Matsuzaki, Besnard et al. 2008).

Die Morphogenese der Lunge und die Lungenfunktion nach Geburt werden durch einen STAT3-Mangel nicht beeinflusst (Matsuzaki, Besnard et al. 2008). Dagegen ist STAT3 relevant für die Aufrechterhaltung der Surfactant-Homöostase während einer Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung (Hokuto, Ikegami et al. 2004). Da STAT3 die Expression des *ABCA3*-Transporters reguliert, liegt es nahe, dass bei einem *ABCA3*-Defekt auch eine Lungenschädigung durch Hyperoxie ausgelöst werden kann.

In unseren Untersuchungen zeigen heterozygot *ABCA3*-defiziente Mäuse bereits nach Sauerstoffprovokation dezente Veränderungen der Lungenmechanik. Möglicherweise führt die *ABCA3*-Mutation im Heterozygoten-Status teilweise zu einem Funktionsverlust des *ABCA3*-Transporters. Lt. Hammel et al. verursacht der Defekt des *ABCA3*-Transporters bei den heterozygoten Tieren direkt postnatal und während des Heranwachsens der Tiere keine klinisch erkennbaren Veränderungen. Die Tiere sind in Bezug auf Mobilität, Gewicht und Fertilität nicht von den gesunden Tieren des gleichen Stammes zu unterscheiden (Hammel, Michel et al. 2007). Bei unseren Experimenten waren die heterozygoten Tier klinisch ebenfalls nicht von den gesunden Wildtypen zu differenzieren. Es fiel lediglich auf, dass beide Genotypen nach Sauerstoffprovokation weniger agil waren und entsprechend leichter gefangen werden konnten. Möglicherweise wird der genetische Defekt bei den heterozygoten Tieren erst bei einer mechanischen, inflammatorischen oder toxischen Schädigung des Lungengewebes problematisch.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen stützen diese Hypothese: So ist die Lungenfunktion der heterozygot *ABCA3*-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nicht wesentlich verändert. Nach 72-stündiger Haltung der Tiere in 95%-Sauerstoff-Umgebung zeigen die heterozygoten Tiere jedoch erste Schädigungen des Lungengewebes und eine Entzündungsreaktion. Diese Entzündungsreaktion als Folge der Gewebsschädigung ist bei den heterozygoten Tieren tendenziell ausgeprägter als bei den Wildtypen, die der gleichen Prozedur unterzogen wurden. Nach Sauerstoffexposition zeigen die heterozygoten Tiere bei Messung der lungenmechanischen Parameter nach 25-minütiger Beatmung eine Einschränkung der Lungenfunktion, die auf strukturelle

Veränderungen im Sinne eines Lungenemphysems zurückzuführen ist. Dies kann als Hinweis gewertet werden, dass das Lungenparenchym der heterozygoten Tiere vulnerabler ist und zur Emphysembildung neigt. Diese Hypothese wird von Beobachtungen von Besnard et al. gestützt, der nachweisen konnte, dass überlebende homozygot *ABCA3*-defekte Mäuse spontan ein Emphysem entwickeln (Besnard, Matsuzaki et al. 2009).

Die *ABCA3*-Knockout-Maus ist ein Modell für das RDS des Neugeborenen. Die homozygot-defizienten Tiere versterben innerhalb weniger Stunden nach Geburt (Hammel, Michel et al. 2007). In einer neueren Studie von Besnard et al. haben 30% der homozygot geschädigten Tiere überlebt und im Verlauf ein Lungenemphysem entwickelt (Besnard, Matsuzaki et al. 2009). Die heterozygoten Mäuse zeigen nur dezente Veränderungen der Lungenfunktion. Allerdings kommt es nach Sauerstoffexposition zu einer Schädigung der Lunge und zur Ausbildung eines Lungenemphysems. Die Morbidität und Mortalität der *ABCA3*-Knockout-Mäuse sind gut vergleichbar mit der Klinik von *ABCA3*-homozygot-defizienten Neugeborenen, die trotz Intensivtherapie häufig versterben. Die Klinik der Neugeborenen und Kinder mit heterozygoten Mutationen im *ABCA3*-Gen ist auf Grund der vielen verschiedenen Mutationen sehr variabel. Es wurden viele Varianten von asymptomatischen Verläufen bis hin zu schweren klinischen Einschränkungen bei emphysematös-fibrotischen Veränderungen des Lungenparenchyms beobachtet (Shulenin, Noguee et al. 2004; Bullard, Wert et al. 2005).

Für eine bessere Übertragbarkeit auf die klinische Situation von Neugeborenen mit RDS müssten die lungenmechanischen Untersuchungen an neugeborenen Mäusen durchgeführt werden und nicht wie in dieser Arbeit an erwachsenen Mäusen. Möglicherweise ist die Vulnerabilität des Lungenparenchyms direkt postpartal auf eine 95%-Sauerstoffexposition deutlich höher. Evt. muss aber auch eine andere Provokationsform gewählt werden. Folgestudien mit Provokation durch intratracheale Instillation von NaCl 0,9% und LPS (Lipopolysaccharid) werden bereits durchgeführt. Studien an neugeborenen Mäusen, die direkt postpartal eine 95%-Sauerstoffexposition erhalten, sind in Planung. Aktuell wird auch versucht, eine *ABCA3*-Knockout-Maus zu generieren, bei der homozygot *ABCA3*-defiziente Mäuse nicht versterben, um ein für die Klinik besser vergleichbares Modell zu erhalten.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die lungenmechanische Charakterisierung der heterozygoten *ABCA3*-Knockout-Mäuse des Stammes C57BL/6 im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Dazu wurden 60 weibliche Mäuse tracheotomiert und im Finalversuch für 30 min mit dem Scireq FlexiVent Kleintier-Respirator beatmet. Zusätzlich zur Bestimmung der lungenmechanischen Parameter TLC, Compliance, Resistance, Newton-Resistance, Gewebe-Dämpfung, Gewebe-Elastizität und Inertance wurde inflammatorische und morphologische Diagnostik durchgeführt.

Hinsichtlich der Lungenmechanik zeigten die Wildtypen und die heterozygot *ABCA3*-defizienten Tiere keinen wesentlichen Unterschied. Deshalb wurden nach Beendigung der ersten Versuchsreihe weitere Messungen an Mäusen durchgeführt, die unmittelbar vor den Experimenten für 72 Stunden einer Umgebung mit 95% Sauerstoff ausgesetzt waren. Weiterhin wurden vergleichende histologische Untersuchungen der beiden Gruppen untereinander und mit nicht beatmeten Tieren beider Genotypen durchgeführt. Die nicht beatmeten Tiere erhielten entweder keine Provokation oder wurden wie die beatmeten Tiere für 72 Stunden einer Umgebung mit 95% Sauerstoff ausgesetzt. Dadurch konnte die Hypothese bestätigt werden, dass sowohl die Beatmung an sich als auch die 95%-Sauerstoff-Umgebung für 72 Stunden als Provokationsform gewertet werden müssen.

Die Beatmung an sich führt zu einer Zunahme der Resistance und zu einer Abnahme der Compliance. Wildtypen und heterozygote Tiere unterscheiden sich diesbezüglich nicht. Einzige Ausnahme ist die dynamische Compliance, die zu Beginn der Beatmung bei den heterozygoten Tieren niedriger ist. Dies wird als Hinweis auf einen bereits nativ bestehenden emphysematös-fibrotischen Umbau des Lungenparenchyms bei den heterozygoten Tieren gewertet. Alternativ wird diskutiert, dass ein Lungenödem vorliegt.

Durch die verschiedenen Provokationsformen von isolierter Beatmung, ausschließlicher Sauerstoffprovokation oder der Kombination beider Provokationsformen konnten deutliche Unterschiede der lungenmechanischen Parameter herausgearbeitet werden. Pathophysiologisch lassen sich die Veränderungen der Lungenmechanik z. B. durch das Vorliegen eines

Lungenemphysems erklären. Die emphysematösen Veränderungen entstehen bei beiden Genotypen, sind aber bei den heterozygoten Tieren ausgeprägter. Leider konnte auf Grund der durchgeführten Fixationsmethode die histologische Aufarbeitung der Präparate nur eingeschränkt erfolgen. Der Beweis für die schwerwiegenderen emphysematösen Veränderungen konnte deshalb bei den heterozygoten Tieren nach gleicher Provokationsform nicht erbracht werden. Die Entstehung eines Lungenemphysems konnte inzwischen bei überlebenden homozygot *ABCA3*-defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Besnard, Matsuzaki et al. 2009).

Die inflammatorische Diagnostik zeigte, dass die heterozygoten Tiere insgesamt bezüglich der inflammatorischen Reaktion bereits ein höheres Ausgangs-Niveau haben. Isolierte Beatmung oder ausschließliche Provokation durch Sauerstoff führten bei beiden Genotypen zu einer Steigerung der Entzündungsreaktion. Die Zunahme der entzündlichen Aktivität war bei den heterozygoten Tieren ausgeprägter.

In Zusammenschau aller Ergebnisse liegt bei den heterozygoten Tieren also eine erhöhte Vulnerabilität des Lungenparenchyms vor. Dies zeigt sich sowohl in den ausgeprägteren Veränderungen der lungenmechanischen Parameter im Sinne der Entstehung eines Lungenemphysems als auch durch die gesteigerte inflammatorische Reaktion des Gewebes.

Da die Unterschiede zwischen den heterozygoten Tieren und den Wildtypen insgesamt diskret sind, werden Folgeversuche mit intratrachealer Applikation von NaCl 0,9% und Lipopolysaccharid (LPS) durchgeführt. Zur besseren Übertragbarkeit des Maus-Modells auf die klinische Situation sollen auch Versuche an neugeborenen *ABCA3*-Knockout-Mäusen erfolgen, die direkt postpartal eine Sauerstoffprovokation erhalten. Weiterhin ist die Generierung einer neuen *ABCA3*-Knockout-Maus geplant. Heterozygote Mäuse zeigen bereits dezente Veränderungen der Lungenfunktion. Ziel ist die Züchtung einer Knockout-Maus, bei der die Surfactant-Homöostase der heterozygoten Tiere schwerer gestört ist. Alternativ könnte eine Knockout-Maus generiert werden, deren homozygote Merkmalsträger zu einem hohen Prozentsatz die Neonatalzeit überleben. An entsprechenden Tieren könnten im Folgenden Therapien erforscht werden, die die Überlebenschancen von schwer erkrankten Neugeborenen erhöhen könnten.

## 6 Anhang

### 6.1 Versuchsprotokoll

<b>Versuchsprotokoll ABCA3 (C57BL/6)</b>		<b>O2-Provokation</b> <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein														
<b>Versuchstag</b>																
<b>Versuchscode</b>																
<b>Genotyp</b>		unbekannt														
<b>Geschlecht</b>		weibl.														
<b>Gewicht</b>		g														
<b>Versuchsbeginn</b>																
<b>Narkose</b>																
<b>Beginn OP</b>																
<b>Beginn Beatmung</b>																
<b>eingestellte Parameter</b>																
<b>Vt</b>		<b>f</b>		<b>PEEP</b>		<b>Modus</b>										
8,0		180		4,0		Vol-contr.										
Zeit	BGA	Bem.	Vt	f	PEEP	PIP	R	C	TLC	Cstat	Area	Rn	E	SPO2	Hf	T
<b>0</b>	pH															
	pCO2															
	pO2															
	HCO3															
	BE															
<b>5</b>	pH															
	pCO2															
	pO2															
	HCO3															
	BE															
<b>10</b>	pH															
	pCO2															
	pO2															
	HCO3															
	BE															
<b>15</b>	pH															
	pCO2															
	pO2															
	HCO3															
	BE															
<b>20</b>	pH															
	pCO2															
	pO2															
	HCO3															
	BE															
<b>25</b>	pH															
	pCO2															
	pO2															
	HCO3															
	BE															
<b>Feuchtgew.</b>																
<b>Trockengew.</b>																
<b>Histologie</b>																
<b>Zytologie</b>																
<b>Lavage</b>																
<b>Leukozyten</b>																
<b>Proteine</b>																
<b>Interleukine</b>																

## 6.2 Berechnungen zur Inertance

### Berechnung des relativen Molekulargewichts für Wasser, Luft und Sauerstoff:

a) Wasser:

1mol Wasser setzt sich aus den Elementen H + H + O zusammen (H<sub>2</sub>O).

Wasser (H<sub>2</sub>O) wiegt:

$$(1,008 \text{ g/mol} + 1,008 \text{ g/mol}) + 16,000 \text{ g/mol} = 18,02 \text{ g/mol}$$

b) Sauerstoff:

1mol Sauerstoff setzt sich aus zwei Elementen O zusammen (O<sub>2</sub>).

Sauerstoff wiegt:

$$16,000 \text{ g/mol} + 16,000 \text{ g/mol} = 32,00 \text{ g/mol}$$

c) Luft:

1mol Luft setzt sich (vereinfacht) aus 79% Stickstoff (N<sub>2</sub>) und 21% Sauerstoff (O<sub>2</sub>) zusammen.

1mol Luft wiegt:

$$[79\% * (14,01 \text{ g/mol} + 14,01 \text{ g/mol})] + (21\% * 32,00 \text{ g/mol}) = 28,86 \text{ g/mol}$$

Das relative Molekulargewicht ist direkt proportional zur spezifischen Dichte des Gases und direkt proportional zur Trägheit der Gassäule (Inertance). Daraus lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- 1) Mit Sauerstoff angereicherte Luft ist schwerer und damit träger als Luft.
- 2) Mit Sauerstoff angereicherte Luft ist schwerer und damit träger als mit Sauerstoff angereicherte und befeuchtete Luft.

### Berechnung der Inertance:

$$I = \frac{\rho * l}{A} = \frac{\rho * l}{r^2 * \pi}$$

$I$  : Inertance,  $\rho$ : Dichte des Gases,  $l$ : Länge des Rohres,

$A$  : Fläche,  $r$  : Radius,  $\pi$  : Kreiszahl

### 6.3 Lungenmechanische Begriffe

Compliance, dynamisch	Maß für die Lungendehnbarkeit, Änderung des Volumens pro Druckänderung
Compliance, statisch	Maß für den elastischen Rückstoß-Druck der Lunge bei einem vorgegebenen Lungen-Volumen im statischen Modell
Elastance	Maß für die Tendenz eines ganzen Organs in die Ausgangsposition zurückzukehren, wenn die sie ausdehnende oder komprimierende Kraft abnimmt; Kehrwert der Compliance
Gewebe-Dämpfung	Umwandlung von Schwingungsenergie in eine andere Energieform durch das Gewebe
Gewebe-Elastance	Elastischer Widerstand des Lungengewebes
Hysterese	Verzögerung bzw. Zurückbleiben einer Wirkung hinter dem jeweiligen Stand der sie bedingenden Kraft
Impedanz	Scheinwiderstand, setzt sich zusammen aus Resistance und Reactance
Inertance	Trägheit von Lunge und Thorax
Newton-Resistance	Widerstand der zentralen Atemwege, $R_n = R_{aw}$
Reactance	Maß für den Blindwiderstand; Energieverlust durch Speicherung im Gewebe; imaginärer Teil der Impedanz
Resistance, dynamisch	Maß für den Wirkwiderstand; Energieverlust durch Umwandlung in Wärme oder polarisierende Kräfte; reeller Teil der Impedanz
Lungenkapazität, totale	Maximales Lungenvolumen; maximales inspiratorisches Volumen und Residualvolumen
Residualkapazität, funktionelle	Volumen, das sich aus dem expiratorischen Reservevolumen und dem Residualvolumen zusammensetzt
Residualvolumen	Volumen, das nach maximaler Expiration in der Lunge verbleibt

## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

ABC	engl., adenosin binding cassette
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BGA	Blutgasanalyse
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
C	Compliance
CBBG	Coomassie-Briliant-Blau G-250, Bradford-Reagenz
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
COD-Wert	engl., coefficient of determination
DIP	desquamative interstitielle Pneumonie;
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
E	Elastance
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	engl.: Enzyme linked Immunosorbent Assay, Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest
FOT	Forcierte Oszillations-Technik
G	Gewebe-Dämpfung
Gp130	Glykoprotein Gp130, Protein des STAT3-Signalwegs
H	Gewebe-Elastance
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
I	Inertance, Atemwegsträgheit
Il-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
Il-6	Interleukin 6
IVC	engl.: individually ventilated cages
JAK-1	Janus-Kinase I, Enzym des STAT3-Signalwegs
LPS	Lipopolysaccharid
MCL	engl.: Mean Chord Length, Sehnenlänge
MIP-2	engl.: macrophage inflammatory protein 2 der Maus, entspricht dem humanen Interleukin 8
MW	Mittelwert
n. s.	Abkürzungsverzeichnis
SEM	engl.: standard error of the mean, Standardfehler

PAP	Pulmonale Alveolarproteinose
PBS	Pufferlösung, bestehend aus 40g/l NaCl und 5,75g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> mit 1g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 1g/l KCl bei einem pH von 7,4
PEEP	engl.: positive end-expiratory pressure, positiver end-expiratorischer Druck
PFO	persistierendes Foramen ovale
PIP	engl.: positive inspiratory pressure, positiver inspiratorischer Druck
P <sub>max</sub>	maximaler Druck, Spitzendruck
PV-Loop	engl.: Pressure-Volume Loop, Druck-Volumen-Schleife
R	Resistance
RDS	Respiratory distress syndrome, Atemnotsyndrom
RT-PCR	engl.: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SPF	spezifisch pathogenfrei
STAT3	engl.: signal transducer and activator of transcription 3
TLC	totale Lungkapazität
TNF- $\alpha$	Tumornekrose-Faktor $\alpha$
TVP	engl.: total vertical projections; Verfahren zur Bestimmung des mittleren Abstandes von benachbarten Alveolarsepten
X	Reactance
Z	Impedance
ZVT	Zentrale Versuchstierhaltung

## 7 Literaturverzeichnis

- Abe-Dohmae, S., K. Ueda, et al. (2006). "ABCA7, a molecule with unknown function." *FEBS Lett* 580(4): 1178-82.
- Albrecht, C. and E. Viturro (2007). "The ABCA subfamily--gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases." *Pflugers Arch* 453(5): 581-9.
- Ali, M., T. M. Umstead, et al. (2010). "Differences in the BAL proteome after *Klebsiella pneumoniae* infection in wild type and SP-A-/- mice." *Proteome Sci* 8: 34.
- Allen, G. B., B. T. Suratt, et al. (2006). "Choosing the frequency of deep inflation in mice: balancing recruitment against ventilator-induced lung injury." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291(4): L710-7.
- Avery, M. E. and J. Mead (1959). "Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease." *AMA J Dis Child* 97(5, Part 1): 517-23.
- Ban, N., Y. Matsumura, et al. (2007). "ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis." *J Biol Chem* 282(13): 9628-34.
- Besnard, V., Y. Matsuzaki, et al. (2009). "Conditional Deletion of *Abca3* in Alveolar Type II Cells Alters Surfactant Homeostasis in Newborn and Adult Mice." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.
- Bevilacqua, G., S. Parmigiani, et al. (1996). "Prophylaxis of respiratory distress syndrome by treatment with modified porcine surfactant at birth: a multicentre prospective randomized trial." *J Perinat Med* 24(6): 609-20.
- Boggaram, V. (2004). "Regulation of surfactant protein gene expression by hyperoxia in the lung." *Antioxid Redox Signal* 6(1): 185-90.
- Brasch, F., S. Schimanski, et al. (2006). "Alteration of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency." *Am J Respir Crit Care Med* 174(5): 571-80.
- Bullard, J. E., S. E. Wert, et al. (2006). "ABCA3 deficiency: neonatal respiratory failure and interstitial lung disease." *Semin Perinatol* 30(6): 327-34.
- Bullard, J. E., S. E. Wert, et al. (2005). "ABCA3 mutations associated with pediatric interstitial lung disease." *Am J Respir Crit Care Med* 172(8): 1026-31.
- Burri, P. H. (2006). "Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth." *Biol Neonate* 89(4): 313-22.
- Busch, R. H., R. L. Buschbom, et al. (1984). "Comparison of methods for evaluation of experimentally induced emphysema." *Environ Res* 33(2): 473-96.
- Bustos, R., M. V. Kulovich, et al. (1979). "Significance of phosphatidylglycerol in amniotic fluid in complicated pregnancies." *Am J Obstet Gynecol* 133(8): 899-903.
- Cheong, N., M. Madesh, et al. (2006). "Functional and trafficking defects in ATP binding cassette A3 mutants associated with respiratory distress syndrome." *J Biol Chem* 281(14): 9791-800.
- Cheong, N., H. Zhang, et al. (2007). "ABCA3 is critical for lamellar body biogenesis in vivo." *J Biol Chem* 282(33): 23811-7.
- Clark, J. C., S. E. Wert, 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.
- Connors, T. D., T. J. Van Raay, et al. (1997). "The cloning of a human ABC gene (ABC3) mapping to chromosome 16p13.3." *Genomics* 39(2): 231-4.

- Courtney, S. E., W. Long, et al. (1995). "Double-blind 1-year follow-up of 1540 infants with respiratory distress syndrome randomized to rescue treatment with two doses of synthetic surfactant or air in four clinical trials. American and Canadian Exosurf Neonatal Study Groups." *J Pediatr* 126(5 Pt 2): S43-52.
- Crespo, A., E. Novoa, et al. (2006). "[Effect of changes in airway pressure and the inspiratory volume on the fluid filtration rate and pulmonary artery pressure in isolated rabbit lungs perfused with blood and acellular solution]." *Invest Clin* 47(4): 323-35.
- Creuwels, L. A., L. M. van Golde, et al. (1997). "The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects." *Lung* 175(1): 1-39.
- Curley, G. F., L. G. Kevin, et al. (2009). "Mechanical ventilation: taking its toll on the lung." *Anesthesiology* 111(4): 701-3.
- Davies, G. and L. Reid (1970). "Growth of the alveoli and pulmonary arteries in childhood." *Thorax* 25(6): 669-81.
- Dean, M., Y. Hamon, et al. (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." *J Lipid Res* 42(7): 1007-17.
- Dean, M., A. Rzhetsky, et al. (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." *Genome Res* 11(7): 1156-66.
- Dodd, O. J., M. Hristopoulos, et al. (2009). "Interactive effects of mechanical ventilation and kidney health on lung function in an in vivo mouse model." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296(1): L3-L11.
- Donn, S. M. and S. K. Sinha (2006). "Manual of Neonatal Respiratory Care." Mosby Elsevier 2nd ed.
- Dreyfuss, D., P. Soler, et al. (1988). "High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure." *Am Rev Respir Dis* 137(5): 1159-64.
- Dubois, A. B., A. W. Brody, et al. (1956). "Oscillation mechanics of lungs and chest in man." *J Appl Physiol* 8(6): 587-94.
- Edwards, V., E. Cutz, et al. (2005). "Ultrastructure of lamellar bodies in congenital surfactant deficiency." *Ultrastruct Pathol* 29(6): 503-9.
- Enhoring, G. and B. Robertson (1972). "Lung expansion in the premature rabbit fetus after tracheal deposition of surfactant." *Pediatrics* 50(1): 58-66.
- Epstein, J., Q. Eichbaum, et al. (1996). "The collectins in innate immunity." *Curr Opin Immunol* 8(1): 29-35.
- Fargier, P., B. Salle, et al. (1974). "[Prevention of the respiratory distress syndrome of the newborn. Value of antepartum treatment with glucocorticoids]." *Nouv Presse Med* 3(25): 1595-1597.
- Farrell, P. M. and M. E. Avery (1975). "Hyaline membrane disease." *Am Rev Respir Dis* 111(5): 657-88.
- Fedrick, J. and N. R. Butler (1972). "Hyaline-membrane disease." *Lancet* 2(7780): 768-9.
- Fitzgerald, M. L., R. Xavier, et al. (2007). "ABCA3 inactivation in mice causes respiratory failure, loss of pulmonary surfactant, and depletion of lung phosphatidylglycerol." *J Lipid Res* 48(3): 621-32.
- Flemmer, A. W., J. C. Jani, et al. (2007). "Lung tissue mechanics predict lung hypoplasia in a rabbit model for congenital diaphragmatic hernia." *Pediatr Pulmonol* 42(6): 505-12.
- Foster, C. D., P. X. Zhang, et al. (2003). "In vitro surfactant protein B deficiency inhibits lamellar body formation." *Am J Respir Cell Mol Biol* 29(2): 259-66.
- Frey, U. (2005). "Forced oscillation technique in infants and young children." *Paediatr Respir Rev* 6(4): 246-54.

- Fujiwara, T., H. Maeta, et al. (1980). "Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease." *Lancet* 1(8159): 55-9.
- Garmany, T. H., M. A. Moxley, et al. (2006). "Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations." *Pediatr Res* 59(6): 801-5.
- Garmany, T. H., J. A. Wambach, et al. (2008). "Population and disease-based prevalence of the common mutations associated with surfactant deficiency." *Pediatr Res* 63(6): 645-9.
- Glasser, S. W., E. A. Detmer, et al. (2003). "Pneumonitis and emphysema in sp-C gene targeted mice." *J Biol Chem* 278(16): 14291-8.
- Gomes, C. M., H. van Paassen, et al. (2006). "Multidrug resistance mediated by ABC transporters in osteosarcoma cell lines: mRNA analysis and functional radiotracer studies." *Nucl Med Biol* 33(7): 831-40.
- Griese, M. (1999). "Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art." *Eur Respir J* 13(6): 1455-76.
- Habre, W., F. Petak, et al. (2006). "The role of endothelin-1 in hyperoxia-induced lung injury in mice." *Respir Res* 7: 45.
- Hammel, M., G. Michel, et al. (2007). "Targeted inactivation of the murine Abca3 gene leads to respiratory failure in newborns with defective lamellar bodies." *Biochem Biophys Res Commun* 359(4): 947-51.
- Hammer, J. and C. J. Newth (1995). "Infant lung function testing in the intensive care unit." *Intensive Care Med* 21(9): 744-52.
- Hamvas, A., F. S. Cole, et al. (2007). "Genetic disorders of surfactant proteins." *Neonatology* 91(4): 311-7.
- Hantos, Z., B. Daroczy, et al. (1992). "Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs." *J Appl Physiol* 72(1): 168-78.
- Hartl, D. and M. Griese (2005). "Interstitial lung disease in children -- genetic background and associated phenotypes." *Respir Res* 6: 32.
- Hehlgans, T. and K. Pfeffer (2005). "The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games." *Immunology* 115(1): 1-20.
- Hendra, K. and B. Celli (2002). "Physiologic responses to long-term ventilation." *Respir Care Clin N Am* 8(3): 447-62.
- Hokuto, I., M. Ikegami, et al. (2004). "Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia." *J Clin Invest* 113(1): 28-37.
- Huang, K., R. Rabold, et al. (2007). "Age-dependent changes of airway and lung parenchyma in C57BL/6J mice." *J Appl Physiol* 102(1): 200-6.
- Huang, Y. and W. Sadee (2006). "Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells." *Cancer Lett* 239(2): 168-82.
- Ikegami, M., A. Falcone, et al. (2008). "STAT-3 regulates surfactant phospholipid homeostasis in normal lung and during endotoxin-mediated lung injury." *J Appl Physiol* 104(6): 1753-60.
- Irvin, C. G. and J. H. Bates (2003). "Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size." *Respir Res* 4: 4.
- Karjalainen, M. K., R. Haataja, et al. (2008). "Haplotype analysis of ABCA3: association with respiratory distress in very premature infants." *Ann Med* 40(1): 56-65.
- Kattwinkel, J., B. T. Bloom, et al. (1993). "Prophylactic administration of calf lung surfactant extract is more effective than early treatment of respiratory distress syndrome in neonates of 29 through 32 weeks' gestation." *Pediatrics* 92(1): 90-8.

- Kaushal, S., S. Ghosh, et al. (2001). "Role of phospholipid transfer protein in rabbit lung development." *Cell Mol Life Sci* 58(14): 2098-107.
- Kendig, J. W., R. H. Notter, et al. (1991). "A comparison of surfactant as immediate prophylaxis and as rescue therapy in newborns of less than 30 weeks' gestation." *N Engl J Med* 324(13): 865-71.
- Klugbauer, N. and F. Hofmann (1996). "Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein." *FEBS Lett* 391(1-2): 61-5.
- Lai, Y. L. and H. Chou (2000). "Respiratory mechanics and maximal expiratory flow in the anesthetized mouse." *J Appl Physiol* 88(3): 939-43.
- Langston, C., K. Kida, et al. (1984). "Human lung growth in late gestation and in the neonate." *Am Rev Respir Dis* 129(4): 607-13.
- Liggins, G. C. and R. N. Howie (1972). "A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants." *Pediatrics* 50(4): 515-25.
- Lovgren, A. K., L. A. Jania, et al. (2006). "COX-2-derived prostacyclin protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291(2): L144-56.
- Lumb, R. H. (1989). "Phospholipid transfer proteins in mammalian lung." *Am J Physiol* 257(4 Pt 1): L190-4.
- Lundblad, L. K., J. Thompson-Figueroa, et al. (2005). "Tumor necrosis factor-alpha overexpression in lung disease: a single cause behind a complex phenotype." *Am J Respir Crit Care Med* 171(12): 1363-70.
- Matsumura, Y., N. Ban, et al. (2006). "Characterization and classification of ATP-binding cassette transporter ABCA3 mutants in fatal surfactant deficiency." *J Biol Chem* 281(45): 34503-14.
- Matsumura, Y., H. Sakai, et al. (2007). "ABCA3-mediated choline-phospholipids uptake into intracellular vesicles in A549 cells." *FEBS Lett* 581(17): 3139-44.
- Matsuzaki, Y., V. Besnard, et al. (2008). "STAT3 regulates ABCA3 expression and influences lamellar body formation in alveolar type II cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* 38(5): 551-8.
- McCallion, N., P. G. Davis, et al. (2005). "Volume-targeted versus pressure-limited ventilation in the neonate." *Cochrane Database Syst Rev*(3): CD003666.
- McMillan, D., V. Chernick, et al. (1995). "Effects of two rescue doses of synthetic surfactant in 344 infants with respiratory distress syndrome weighing 750 to 1249 grams: a double-blind, placebo-controlled multicenter Canadian trial. Canadian Exosurf Neonatal Study Group." *J Pediatr* 126(5 Pt 2): S90-8.
- Morley, C. J. and R. Morley (1990). "Follow up of premature babies treated with artificial surfactant (ALEC)." *Arch Dis Child* 65(7 Spec No): 667-9.
- Muller, H. C., K. Hellwig, et al. "Simvastatin attenuates ventilator-induced lung injury in mice." *Crit Care* 14(4): R143.
- Mulugeta, S., J. M. Gray, et al. (2002). "Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3." *J Biol Chem* 277(25): 22147-55.
- Nagata, K., A. Yamamoto, et al. (2004). "Human ABCA3, a product of a responsible gene for abca3 for fatal surfactant deficiency in newborns, exhibits unique ATP hydrolysis activity and generates intracellular multilamellar vesicles." *Biochem Biophys Res Commun* 324(1): 262-8.
- Nandi, N. and D. Vollhardt (2002). "Molecular Origin of the Chiral Interaction in Biomimetic Systems: Dipalmitoylphosphatidylcholine Langmuir Monolayers." *J. Phys. Chem. B* 106: 10144-10149.

- Nogee, L. M. (2006). "Genetics of pediatric interstitial lung disease." *Curr Opin Pediatr* 18(3): 287-92.
- Notter, R. (1984). "Pulmonary surfactant: an interdisciplinary approach." *J Appl Physiol* 57: 1613-1624.
- Otto, C. M., K. Markstaller, et al. (2008). "Spatial and temporal heterogeneity of ventilator-associated lung injury after surfactant depletion." *J Appl Physiol* 104(5): 1485-94.
- Plataki, M. and R. D. Hubmayr "The physical basis of ventilator-induced lung injury." *Expert Rev Respir Med* 4(3): 373-85.
- Pugin, J. (2003). "Molecular mechanisms of lung cell activation induced by cyclic stretch." *Crit Care Med* 31(4 Suppl): S200-6.
- Quinton, P. M. (1999). "Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective." *Physiol Rev* 79(1 Suppl): S3-S22.
- Robertson, J. S., N (2005). "The Harriet Lane Handbook, 17th edition, Elsevier Mosby."
- Roth-Kleiner, M. and M. Post (2003). "Genetic control of lung development." *Biol Neonate* 84(1): 83-8.
- Salazar, E. and J. H. Knowles (1964). "An Analysis of Pressure-Volume Characteristics of the Lungs." *J Appl Physiol* 19: 97-104.
- Sauve, R., W. Long, et al. (1995). "Outcome at 1-year adjusted age of 957 infants weighing more than 1250 grams with respiratory distress syndrome randomized to receive synthetic surfactant or air placebo. American and Canadian Exosurf Neonatal Study Groups." *J Pediatr* 126(5 Pt 2): S75-80.
- Schuetzer-Muehlbauer, M., B. Willinger, et al. (2003). "The Candida albicans Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin." *Mol Microbiol* 48(1): 225-35.
- Shulenin, S., L. M. Nogee, et al. (2004). "ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency." *N Engl J Med* 350(13): 1296-303.
- Somaschini, M., L. M. Nogee, et al. (2007). "Unexplained neonatal respiratory distress due to congenital surfactant deficiency." *J Pediatr* 150(6): 649-53, 653 e1.
- Speer, C. P. (2002). "Surfactantsubstitutionstherapie." *Monatsschr Kinderheilkd* 150: 659-668.
- Strittmatter, H. J., A. Wischnik, et al. (1992). "[Fetal outcome of premature infants less than 1,500 g birth weight with special reference to surfactant requirements]." *Geburtshilfe Frauenheilkd* 52(9): 544-8.
- Taeusch, H. W., Ballrad, Roberta A., Gleason, Christine A. (2005). "Avery's Diseases of the Newborn." Elsevier Inc., 8th edition.
- Tankersley, C. G., R. Rabold, et al. (1999). "Differential lung mechanics are genetically determined in inbred murine strains." *J Appl Physiol* 86(6): 1764-9.
- Tekamp-Olson, P., C. Gallegos, et al. (1990). "Cloning and characterization of cDNAs for murine macrophage inflammatory protein 2 and its human homologues." *J Exp Med* 172(3): 911-9.
- Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V. (2004). "Empfehlungen zur Planung und Durchführung von Tierversuchen, Merkblatt Nr. 76." <http://www.tierschutz-tvt.de/merkblaetter.html>.
- Tokieda, K., H. S. Iwamoto, et al. (1999). "Surfactant protein-B-deficient mice are susceptible to hyperoxic lung injury." *Am J Respir Cell Mol Biol* 21(4): 463-72.
- Tomioka, S., J. H. Bates, et al. (2002). "Airway and tissue mechanics in a murine model of asthma: alveolar capsule vs. forced oscillations." *J Appl Physiol* 93(1): 263-70.

- Usher, R. H., A. C. Allen, et al. (1971). "Risk of respiratory distress syndrome related to gestational age, route of delivery, and maternal diabetes." *Am J Obstet Gynecol* 111(6): 826-32.
- Walti, H., J. Paris-Llado, et al. (1995). "Porcine surfactant replacement therapy in newborns of 25-31 weeks' gestation: a randomized, multicentre trial of prophylaxis versus rescue with multiple low doses. The French Collaborative Multicentre Study Group." *Acta Paediatr* 84(8): 913-21.
- Weaver, T. E. and J. J. Conkright (2001). "Function of surfactant proteins B and C." *Annu Rev Physiol* 63: 555-78.
- Wigglesworth, J. S. (1988). "Lung development in the second trimester." *Br Med Bull* 44(4): 894-908.
- Wolthuis, E. K., A. P. Vlaar, et al. (2009). "Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice." *Crit Care* 13(1): R1.
- Wong, Y. C., C. S. Beardsmore, et al. (1982). "Antenatal dexamethasone and subsequent lung growth." *Arch Dis Child* 57(7): 536-8.
- Wright, C. J. and P. A. Dennery (2009). "Manipulation of gene expression by oxygen: a primer from bedside to bench." *Pediatr Res* 66(1): 3-10.
- Wright, J. R. (2005). "Immunoregulatory functions of surfactant proteins." *Nat Rev Immunol* 5(1): 58-68.
- Yamano, G., H. Funahashi, et al. (2001). "ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells." *FEBS Lett* 508(2): 221-5.
- Yoshida, I., N. Ban, et al. (2004). "Expression of ABCA3, a causative gene for fatal surfactant deficiency, is up-regulated by glucocorticoids in lung alveolar type II cells." *Biochem Biophys Res Commun* 323(2): 547-55.
- Yuan, J. S., P. J. Tranel, et al. (2007). "Non-target-site herbicide resistance: a family business." *Trends Plant Sci* 12(1): 6-13.

## **8 Danksagung**

Bei Herrn PD Dr. med. Andreas W. Flemmer bedanke ich mich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für die wissenschaftliche, konstruktive und freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Frau Dr. med. Susanne Herber-Jonat danke ich sehr herzlich für die hervorragende Betreuung und ihre Diskussionsbereitschaft während der Durchführung der Experimente und der Auswertung und Interpretation der Daten.

Beiden danke ich sehr für die exzellenten Lehrstunden zur Beatmung von Neu- und Frühgeborenen auf der neonatologischen Intensivstation.

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Schulze danke ich sehr für die lehrreiche Zeit auf der neonatologischen Intensivstation und für die Vermittlung dieser Dissertation.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Rashmi Mittal für die Unterstützung bei den Beatmungsexperimenten und den biochemischen Untersuchungen. Außerdem möchte ich mich bei Frau Silvia Münzing, Walter-Brendel-Zentrum, für die geduldige Unterweisung im Umgang mit den technischen Geräten und für die Auswertung der Zelldifferenzierung bedanken.

Dank schulde ich Frau Annegret Schäfer, Pathologisches Institut am Klinikum Großhadern, für die Anfertigung der histologischen Präparate. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Ali Önder Yildirim, Institute of Lung Biology and Disease, Helmholtz Zentrum München, für die kritische Analyse der histologischen Präparate danken.

Großer Dank gilt meinen Eltern, die mir finanziell mein Medizinstudium überhaupt erst ermöglicht haben und mich nicht nur bei dieser Dissertationsschrift unermüdlich unterstützt haben.