

LUNGENMORPHOLOGIE UND APOPTOSE NACH PARTIELLER LIQUIDVENTILATION IM NEONATALEN TIERMODELL

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

**Eva Gesine Berkemeier
aus Aachen**

Berichter: Herr Universitätsprofessor Dr. med. Helmut Hörnchen
Herr Professor Dr. med. Bernd Klosterhalfen

Tag der mündlichen Prüfung: 05. November 2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

1	EINLEITUNG	1
1.1	ATEMNOTSYNDROM DES NEUGEBORENEN.....	1
1.1.1	KLINIK	1
1.1.2	PATHOGENESE UND PATHOPYSIOLOGIE	2
1.1.3	THERAPIEANSÄTZE	4
1.2	BEATMUNG MIT PERFLUOROCARBONEN	5
1.2.1	POTENTIELLE WIRKMECHANISMEN DER PERFLUOROCARBONE	7
1.3	APOPTOSE	9
1.3.1	NACHWEISVERFAHREN DER APOPTOSE	12
2	FRAGESTELLUNG	14
3	MATERIAL UND METHODIK	15
3.1	VERSUCHSTIERE	15
3.2	VERSUCHSAUFBAU	15
3.3	INDUKTION EINES SURFACTANT-MANGELS	17
3.4	VERSUCHSPROTOKOLL	18
3.4.1	PLV VERSUS CV	18
3.4.2	FC-77 VERSUS POB.....	18
3.4.3	BEATMUNGSPARAMETER	18
3.4.4	TECHNIK DER PARTIELLEN LIQUID VENTILATION.....	19
3.5	HISTOPATHOLOGIE	20
3.5.1	HISTOPATHOLOGISCHE GEWEBSAUFARBEITUNG.....	20
3.5.2	HISTOPATHOLOGISCHE KLASSIFIZIERUNG	20
3.5.3	APOPTOSE- FÄRBUNG (TUNEL)	21
3.5.4	TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	22
3.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG	23
4	ERGEBNISSE	24
4.1	HISTOPATHOLOGIE	24
4.1.1	CHARAKTERISTISCHE HISTOPATHOLOGISCHE BEFUNDE	24
4.1.2	PLV VERSUS CV	27
4.1.3	FC-77 VERSUS POB.....	30
4.2	APOPTOSE	33
4.3	TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	34
5	DISKUSSION	36
6	ZUSAMMENFASSUNG	45
7	LITERATURVERZEICHNIS	47

AI	Apoptose- Index
ced-Gene	Caenorhabditis elegans death genes
DNA	desoxyribonucleid acid
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
ECMO	extrakorporale Membranoxygenierung
F_iO₂	Fraktion der inspiratorische Sauerstoffkonzentration
HFO	Hochfrequenzoszillation
INO	Inhalation von Stickstoffmonoxyd
PAGE	perfluorocarbon-associated gas exchange
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
PFC	Perfluorocarbone
PIP	inspiratorischer Spitzendruck
PLV	partielle Liquid Ventilation
POB	Perfluorooctylbromid
TdT	terminale desoxynucleotidyl-Transferase
TLV	totale Liquid Ventilation
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	transferase-mediated dUTP biotin nick endlabeling

1 EINLEITUNG

1.1 Atemnotsyndrom des Neugeborenen

Die „Atemnot“ des Neugeborenen ist ein Kardinalsymptom, das seit Generationen Ärzte verschiedenster Fachrichtungen in Forschung und Praxis beschäftigt.

Trotz großer wissenschaftlicher Fortschritte und eines hohen Therapiestandards in der neonatologischen Intensivmedizin hat die respiratorische Insuffizienz des Neugeborenen immer noch einen hohen Anteil an der Gesamtmorbidität und -letalität hospitalisierter Neugeborener (Mariani und Carlo 1998).

Ein erfolgversprechendes, alternatives Verfahren zur Behandlung der respiratorischen Insuffizienz stellt die partielle Flüssigkeitsbeatmung mit Perfluorocarbonen dar, welche seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Forschung ist.

1.1.1 Klinik

Die „Schweizerische Neonatologiegruppe“ legte 1976 fünf Kriterien für die Diagnose eines Atemnotsyndroms fest:

- *Tachypnoe mit Atemfrequenzen > 60/min* zur Aufrechterhaltung eines normalen Atemzeitvolumens trotz hohem Atemwegswiderstands,
- *Zyanose bei Luftatmung* als Hinweis einer unzureichenden Oxygenierung,
- *Nasenflügeln* als Zeichen des Einsatzes der auxillären Atemmuskulatur,
- *thorakale Einziehungen* als Ausdruck der vermehrten Retraktionskraft der Lunge bei noch weichem Thoraxskelett und das
- *expiratorische Stöhnen*, bei dem durch Engstellen der Stimmlippen beim Ausatmen ein alveolärer Kollaps herausgezögert werden kann.

Ein Atemnotsyndrom liegt vor, wenn im Abstand von 15 bis 30 min post partum mindestens zwei der fünf Symptome nachweisbar sind (Fanconi et al. 1976). Es sind vielfältige Ursachen bekannt, die ein Atemnotsyndrom hervorrufen können. Der im Vordergrund stehende pathogenetische Faktor für ein Atemnotsyndrom des Früh- und Neugeborenen ist der Mangel an natürlichem Surfactant. Die neben Surfactantmangel-Syndrom gebräuchliche Bezeichnung „Hyalines-Membranen-Syndrom“ geht auf die charakteristischen histologischen Veränderungen mit Akkumulation von Plasmaproteinen, die membranartig die Alveolen auskleiden, zurück.

Die Diagnose des Surfactant-Mangel-Syndroms kann durch eine Thorax-Röntgenaufnahme gesichert werden. Die dabei sichtbaren radiologischen Veränderungen reichen von einer feinretikulären Lungenzeichnung über ein positives Bronchogramm und Unschärfe der Herz- und Zwerchfellstrukturen bis hin zur „weißen Lunge“. Diese Veränderungen werden zur Stadieneinteilung des Surfactant-Mangel-Syndroms herangezogen (Giedion et al. 1973).

1.1.2 Pathogenese und Pathophysiologie

Mit der Geburt wird aus der sekretorisch aktiven Lunge ein gasaustauschendes Organ. Im Rahmen dieses Prozesses muß die intraalveoläre Flüssigkeit durch Luft ersetzt werden. Dabei soll das Lungengerüst stabil bleiben und Atelektasen verhindern. Eine wesentliche protektive Rolle dabei spielt der Surfactant (= **surface active agent**), der die alveoläre Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze herabsetzt. Von Clements wurde bereits vor über vierzig Jahren das Phospholipid Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) als wichtigster Bestandteil des Surfactant identifiziert (Clements 1957; Clements et al. 1961). Etwa zur gleichen Zeit beschrieben Avery und Mead den kausalen Zusammenhang zwischen einem Surfactant-Mangel und dem Atemnotsyndrom des Neugeborenen (Avery und Mead 1959). Diese Untersuchungen wurden inzwischen durch eine Vielzahl von Befunden erweitert. Heute weiß man, daß die Lungenunreife eine wesentliche Ursache für den Mangel an Surfactant ist. Die Synthese des vor allem aus neutralen Lipiden, Phospholipiden und Apoproteinen bestehenden „Antiatelektasefaktors“,

findet in den Pneumozyten Typ II statt, die nur etwa 7 % der alveolären Oberfläche bedecken. Es konnte gezeigt werden, daß die unzureichende Entfaltung des Alveolarsystems nach der Geburt mit einer quantitativen Verminderung von DPPC und dem völligen Fehlen von Phosphatidylglycerin und spezifischen Apoproteinen einhergeht (Robertson 1984).

In den surfactantdefizienten Lungen kommt es durch eine hohe alveoläre Oberflächenspannung zum endexpiratorischen Kollaps der Alveolen und zur Ausbildung von Mikroatelektasen. Es entsteht dort ein Mißverhältnis zwischen Ventilation und Perfusion, das einen vermehrten intrapulmonalen Shunt zur Folge hat. Eine vermehrte Atemarbeit mit Abnahme der pulmonalen Compliance ist ebenfalls durch den Surfactant-Mangel begründet. Die pulmonale Widerstandserhöhung führt zusammen mit Hypoxie und Azidose zu einem „Circulus vitiosus“, der die Bedingungen einer Surfactantneusynthese verschlechtert.

Die namensgebenden hyalinen Membranen bilden sich an den Kapillar-Alveolar-Membranen durch Akkumulation von Plasmaproteinen als Ausdruck einer Schädigung von Alveolarepithel bzw. Kapillarendothel und erschweren die Diffusion der Atemgase.

Um dys- bzw. atelektatische Lungenbereiche zu rekrutieren und eine adäquate Oxygenierung zu erreichen, ist meist eine Beatmung mit hohen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen und hohen Beatmungsdrücken erforderlich.

Das Beatmungstrauma prädisponiert aufgrund der strukturellen und funktionellen Lungenunreife mit der durch Hyperoxie entstehenden Sauerstofftoxizität zur Ausbildung einer bronchopulmonalen Dysplasie. Diese Komplikation der Therapie des Atemnotsyndroms besteht aus einer chronischen Atemwegserkrankung mit typischen radiologischen Zeichen und einer langfristigen Abhängigkeit von zusätzlichem Sauerstoff in der Inspirationsluft. Pathophysiologisch stehen ein reparativ-proliferatives „Remodeling“ der Lunge mit der Konsequenz einer Beeinträchtigung der Lungenmechanik und des Gasaustauschs im Vordergrund.

1.1.3 Therapieansätze

Das heutige Therapieziel beim Atemnotsyndrom des Neugeborenen besteht darin, einen adäquaten Gasaustausch zu erzielen ohne eine iatrogene beatmungsbedingte Schädigung der Lunge und anderer Organe zu bewirken.

Zur kausalen Behandlung des Surfactant-Mangel-Syndroms wurde 1980 erstmalig ein tierisches Surfactant-Präparat beim Menschen eingesetzt (Fujiwara et al. 1980). Seitdem hat sich die Anwendung von bovinem oder porcinem Surfactant bei der Behandlung der beatmungspflichtigen respiratorischen Insuffizienz des Frühgeborenen als Standard etabliert. Dieser Meilenstein in der Behandlung des Atemnotsyndroms hat die Mortalität besonders unreifer Frühgeborener drastisch gesenkt (Avery und Merritt 1991; Jobe 1993). Dennoch konnte die Inzidenz der bronchopulmonalen Dysplasie durch die Surfactanttherapie nicht beeinflusst werden (Schwartz et al. 1994; Young et al. 1999). Auch gibt es eine Anzahl von Frühgeborenen, die auf die Surfactant-Therapie nicht adäquat ansprechen (Ebbecke und Jorch 1993).

Da verschiedene neue Beatmungsverfahren wie zum Beispiel die Hochfrequenzoszillation (HFO), die Inhalation von Stickstoffmonoxyd (INO) oder die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) bei reifen Neugeborenen die Erwartungen einer lungenprotektiven Beatmung bisher nicht erfüllen konnten, gibt es weiterhin den Bedarf an einer alternativen Beatmungsmethode.

Ein neuer therapeutischer Ansatz besteht darin, die Lunge mit einer sauerstofftragenden Flüssigkeit zu füllen. Für diese „Liquidventilation“ sind Flüssigkeiten aus der Substanzklasse der Perfluorocarbone aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften besonders geeignet.

1.2 Beatmung mit Perfluorocarbonen

Clark und Gollan verwendeten erstmals im Jahr 1966 eine oxygenierte Perfluorocarbonlösung als respiratorisches Medium (Clark und Gollan 1966). In einem Experiment an Mäusen konnten sie zeigen, daß eine adäquate Oxygenierung bei intrapulmonaler Anwendung einer mit Sauerstoff equilibrierten Perfluorocarbonlösung möglich war. Bestätigt wurde dieser Befund durch Modell an jungen Hunden (Modell et al. 1970). Diese waren nach Eintauchen in Perfluorocarbonlösungen ebenfalls ohne Langzeitschäden wieder zur Luftatmung fähig.

Perfluorocarbone (PFC) sind klar, farb- und geruchslos, nicht wasserlöslich, sowie chemisch und thermisch stabil, also inerte Flüssigkeiten, die nach heutigem Wissensstand nicht vom menschlichen Körper metabolisiert werden. Sie bestehen aus Kohlenstoff- Fluorverbindungen mit meist 6 bis 14 Kohlenstoffatomen. Zusätzlich kann noch ein Stickstoff-, Brom- oder Sauerstoffatom gebunden sein. Sowohl die Molekülgröße, als auch der Grad der Substitution von Fluor durch andere Halogene sowie mögliche Seitenketten und die sterische Konfiguration sind für die spezifischen Merkmale der PFC verantwortlich. Sie besitzen ein hohes Maß an Löslichkeit für Sauerstoff und Kohlendioxyd und weisen im Vergleich zu physiologischer Kochsalzlösung eine weit geringere Oberflächenspannung auf. Ihre kinematische Viskosität ist gering und der Spreitungskoeffizient ist positiv. Das heißt, sie besitzen die Fähigkeit, sich spontan auf Oberflächen auszubreiten. Der Dampfdruck in den Alveolen ist verantwortlich für die schnelle Verflüchtigung der PFC und ihre Elimination zu 99% durch Evaporation über die Lunge.

Einzelheiten über die physikochemischen Eigenschaften der Perfluorocarbone sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Physikochemische Eigenschaften der Perfluorocarbone FC-77 und Perfluorooctylbromid (POB) im Vergleich zu physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)

Eigenschaft	NaCl 0,9%	FC -77	POB
Dichte (g/ml bei 25°C)	1	1,78	1,93
Viskosität (mPa * s)	1	0,8	1,1
Dampfdruck (mmHg bei 37°C)	47	85	11
Oberflächenspannung (dyn/cm bei 25°C)	72	15	18
Spreitungskoeffizient auf NaCl (dyn/cm bei 25°C)	-	8,5	2,7
O₂-Löslichkeit (ml Gas in 100 ml Lösung bei 25°C)	3	50	53
CO₂-Löslichkeit (ml Gas in 100 ml Lösung bei 25°C)	57	198	210

Beim Einsatz von Perfluorocarbonen in der Lunge werden heute zwei unterschiedliche Verfahren angewandt.

Die totale Liquid Ventilation (TLV), bei der die Lunge allein durch Perfluorocarbone ventiliert wird, ist mit einem hohen technischen Aufwand verbunden. Ähnlich einer extrakorporalen Zirkulationseinheit muß die Perfluorocarbonflüssigkeit mehrmals in der Minute ausgetauscht und oxygeniert werden. Insgesamt blieb die Anwendung trotz Entwicklung entsprechender Liquidventilatoren (Moskowitz 1970) bis heute experimentell (Greenspan et al. 1990; Hirschl et al. 1995a; Shaffer et al. 1976; Tooley et al. 1996).

Im Jahr 1991 wurde durch Fuhrmann eine Alternative zur TLV eingeführt (Fuhrman et al. 1991). Bei dieser, als „perfluorocarbon-associated gas exchange (PAGE)“ oder „**partial liquid ventilation (PLV)**“ bezeichneten Therapieform wird die Lunge nicht mehr komplett, sondern mit einem maximalen Volumen, entsprechend der funktionellen Residualkapazität, mit der Perfluorocarbonflüssigkeit gefüllt. Das PFC wird als Bolus oder kontinuierlich über einen Seitenkanal des Endotrachealtubus in die Lunge appliziert, die Beatmung erfolgt mit einem konventionellen Gasbeatmungsgerät, der

Gasaustausch findet intrakorporal statt. Diese Anwendung erfordert keine neuen Geräte und der technische Aufwand ist entsprechend geringer.

Das Verfahren der partiellen Flüssigkeitsbeatmung als alternative Beatmungsform sowohl beim Früh- und Neugeborenen als auch beim Atemnotsyndrom des Erwachsenen wurde seitdem in zahlreichen tierexperimentellen sowie in ersten klinischen Studien untersucht (Gauger et al. 1996; Hirschl et al. 1995c; Leach et al. 1996). Dabei wurde die partielle Flüssigkeitsbeatmung nicht nur mit verschiedenen Beatmungstechniken kombiniert, auch die Art des Perfluorocarbon wurde variiert.

Es gibt eine Vielfalt von Perfluorocarbonen, die sich zur Flüssigkeitsbeatmung eignen. In tierexperimentellen Studien kamen bisher eine Reihe von Perfluorocarbonen wie FC-77, FC 3280, RM-101 und Perfluorooctylbromid zur Anwendung. In den klinischen Studien wurde nahezu ausschließlich das Perfluorooctylbromid verwandt ($C_8F_{17}Br$, Perflubron, LiquiVent[®], Alliance Pharm., USA).

1.2.1 Potentielle Wirkmechanismen der Perfluorocarbone

Die in die Lunge eingebrachten Perfluorocarbone erreichen aufgrund ihres hohen spezifischen Gewichts und ihrer guten Spreitungseigenschaften vor allem die schwerkraftabhängigen, dorsobasalen Bezirke der Lunge (Curtis et al. 1994). Diese sind bei der respiratorischen Insuffizienz besonders von alveolärem Kollaps, Perfusions-Ventilations-Mißverhältnis und intrapulmonalem Rechts-links-Shunt betroffen (Gattinoni et al. 1988; Gauger et al. 1998; Quintel et al. 1998b). Hier kann eine Rekrutierung kollabierter und atelektatischer Lungenabschnitte durch die Liquidventilation über eine Zunahme der funktionellen Residualkapazität zur Verbesserung des Gasaustauschs führen (Curtis et al. 1993; Curtis et al. 1994; Papo et al. 1996; Tütüncü et al. 1993). Gleichzeitig kommt es zu einer Umverteilung des pulmonalen Blutflusses zugunsten apikaler und ventraler Lungenabschnitte mit entsprechender Reduktion intrapulmonaler Shunts (Hirschl et al. 1994; Overbeck et al. 1996). Die eingeschränkte respiratorische Compliance geschädigter Lungen kann

ebenfalls durch Perfluorocarbonbeatmung verbessert werden (Hirschl et al. 1995b; Tütüncü et al. 1992; Tütüncü et al. 1993). Einerseits ist dies auf die geringe Oberflächenspannung, andererseits auf einen Effekt vergleichbar mit einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) zurückzuführen. Dieser sogenannte „Flüssigkeits-oder Liquid-PEEP“ stabilisiert die Alveolen und verhindert einen endexpiratorischen Kollaps. Diese unterschiedlichen Mechanismen erklären die eindrucksvolle Verbesserung des arteriellen Sauerstoff-Partialdrucks und der Ventilationsparameter während der Flüssigkeitsbeatmung mit Perfluorocarbonen, wie in einer Vielzahl tierexperimenteller Untersuchungen beschrieben wurde (Curtis et al. 1993; Hirschl et al. 1994; Hirschl et al. 1995b; Kaisers et al. 1997; Leach et al. 1993; Tütüncü und Lachmann 1995; Tütüncü et al. 1993). Darüberhinaus konnte in verschiedenen Studien eine Reduktion der beatmungsbedingten Lungenschädigung gezeigt werden. (Merz et al. 2000; Quintel et al. 1998a; van Eeden et al. 2000).

Andere Untersuchungen belegten auch eine Reduktion der Entzündungsreaktion unter PLV (Colton et al. 1994; Merz et al. 2002). Nach gegenwärtigem Kenntnisstand besitzen die Perfluorocarbone zudem eine direkte antiinflammatorische Wirkung, die sich in einer geringeren alveolären Infiltration durch neutrophile Granulozyten (Younger et al. 1997) und deren verminderten chemotaktischen Aktivität äußert (Rossman et al. 1996). Ferner fanden Smith et al. 1995 eine reduzierte Hydrogenperoxid-Produktion der Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Perfluorocarbon (Smith et al. 1995). Zusätzlich kann angenommen werden, daß Entzündungsmediatoren aus alveolären Strukturen ausgewaschen werden und sich aufgrund mangelnder Mischbarkeit und hoher Dichte der Perfluorocarbone auf deren Oberfläche absetzen (Gauger et al. 1996; Hirschl et al. 1996a).

Trotz dieser Vorteile müssen bei der Suche nach einer alternativen Beatmungsstrategie auch unerwünschte Nebenwirkungen sorgfältig bedacht werden. So kann es bei intrapulmonaler Anwendung zu einem Übertritt der PFC in den Intravasalraum kommen. Nach Phagozytose durch Makrophagen werden die Substanzen dann längere Zeit im retikuloendothelialen System gespeichert. Bisher wurden diesbezüglich jedoch keine Langzeitnebenwirkungen beobachtet

(Hirschl et al. 1995c). Um unerwünschte Wirkungen definitiv auszuschließen sind allerdings noch weitere Langzeitstudien erforderlich.

Ein weiteres potentielles Risiko ist die Entstehung von Pneumo- bzw. Liquothoraces (Hirschl et al. 1996b; Hirschl et al. 1995d; Overbeck et al. 1996). Einige Studien zeigen eine kurzfristige Beeinträchtigung des endogenen Surfactantpools (Tütüncü und Lachmann 1995), andere jedoch eine deutliche Zunahme der endogenen Surfactantsynthese (Steinhorn et al. 1996).

Bei der Frage nach einer möglichen Gewebsschädigung durch Perfluorocarbone spielt die Frage nach einer Apoptose-Induktion eine entscheidende Rolle.

1.3 Apoptose

Den Begriff der Apoptose prägten 1972 Kerr et al., indem sie anhand morphologischer Kriterien das Prinzip des „programmierten“ Zelltods durch Apoptose als ein geordnetes Ereignis von einem Zelltod durch Nekrose abgrenzten (Kerr et al. 1972). Der Name ist aus dem Griechischen entnommen und beschreibt mit $\alpha\pi\theta$ (herab) und $\pi\tau\epsilon\iota\nu$ (fallen) das Herabfallen der Blätter von den Bäumen im Herbst.

Der Zelltod durch Nekrose ist durch eine Volumenzunahme der Zelle und ihrer Organellen (Onkose) charakterisiert. Diese führt zu Lyse und Freisetzung des Zytosols und der Zellorganellen in den Extrazellulärraum. Folge ist eine inflammatorische Reaktion mit zusätzlicher Gewebsschädigung umgebenden Gewebes.

Die Veränderungen des apoptotischen Zelluntergangs beinhalten eine Volumenabnahme der Zelle und ihrer Organellen und die Kondensation des nukleären Chromatins. Die Stabilität der Zell- und Kernmembran gehen verloren und es kommt zur Ausstülpungen der Zelle (Zeiose). Einzelne membranumschlossene Zellteilchen werden abgeschnürt. Diese apoptotischen Körperchen werden von Nachbarzellen phagozytiert, ohne daß es zu einer Entzündungsreaktion kommt.

Die ersten biochemischen Beweise für das Vorhandensein von Apoptose wurden von Skalka et al. erbracht (Skalka et al. 1976). Er konnte erstmals in Lymphozyten- DNA deren Aufspaltung in regelmäßige Fragmente zeigen. Es konnten daraufhin spezielle DNAsen, sogenannte Endonukleasen, als Ursache für die charakteristische Spaltung von DNA in DNA-Fragmente definierter Größe identifiziert werden.

Apoptose ist demnach im Gegensatz zur Nekrose ein feingesteuerter Prozess, der zum kontrollierten Absterben einzelner Zellen führt. Dabei können unterschiedliche Stimuli spezielle Signalkaskaden aktivieren, die schließlich in eine gemeinsame Endstufe, die mit dem apoptotischen Zelltods endet, münden. Die kontrollierte Selbstzerstörung ist schnell, innerhalb von Stunden abgeschlossen, zeigt keine entzündliche Begleitreaktionen und ist deshalb nur kurzzeitig nachzuweisen.

Heute weiß man durch genauere morphologische, biochemische und molekulare Studien, daß der apoptotische Zelltod entscheidend zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase beiträgt und nicht nur große Bedeutung während der Embryogenese und Zelldifferenzierung besitzt, sondern auch bei folgenden Anpassungsprozessen maßgeblich regulatorisch mitwirkt (Vaux und Korsmeyer 1999). Bei der Immunregulation ist er der Hauptmechanismus zur Selektion und Elimination autoreaktiver Immunzellen sowie zur Verteidigung gegen Pathogene (Steller 1995). Der physiologische Zell-turnover, etwa von Haut- oder Intestinalzellen, ist ebenso durch apoptotische Vorgänge reguliert.

Eine behinderte Initiierung des Zelltodprogramms trägt zur Pathogenese einer Vielzahl von Krankheiten, wie maligne Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen bei. Zugleich findet sich eine vermehrte Apoptose unter anderem in ischämisch-hypoxischen Schädigungen und bei einer Reihe neurodegenerativer Erkrankungen.

Erste Erkenntnisse über die grundlegenden Mechanismen der Apoptose stammen aus entwicklungsbiologischen Studien am Fadenwurm *C(aenorhabditis) elegans*, der als genetischer Modellorganismus zum

Verständnis vieler Apoptosevorgänge dient (Yuan et al. 1993). Genetische Studien identifizierten drei zentrale Gene (ced-3, ced-4, ced-9), die für regelhafte Zerstörung exakt der gleichen 131 der 1090 Zellen des Nematoden während der Embryonalentwicklung verantwortlich sind (Fixsen et al. 1985). Die Effektorproteine dieser *C. elegans* **deaths genes** (ced-Gene) sind verantwortlich für die Initiierung beziehungsweise Regulation des zugrundeliegenden apoptotischen Prozesses. Dabei sind die Proteine CED-3 und CED-4 für die Ausführung der Apoptose essentiell, während CED-9 die Aktivität von CED-3 und 4 hemmt. In Säugetierzellen konnten analoge Proteine identifiziert werden. Als Homologe des CED-3 wurde ein proteinspaltendes Enzym, eine sogenannte Caspase (**c**ystein **a**spartate specific prote**a**se) gefunden, die als Exekutor der Apoptose gilt.

Homologien der CED-9 Proteine werden als anti- bzw. pro-apoptotische Mitglieder zur sogenannten Bcl-2-Familie gezählt, deren Namengeber ursprünglich das Onkogen bcl-2 war. Im Gegensatz zu Onkogenen haben die Mitglieder der Bcl-2-Familie eine apoptoseprotektive Wirkung.

Die Auslösung des programmierten Zelltods kann durch eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen erfolgen. Dabei ist weder die Art des Stimulus für jede Zelle gleich, noch wird der gleiche Signaltransduktionsweg zur Induktion der Apoptose benutzt.

Der membranständige Rezeptor CD95 aus der TNF-Rezeptorfamilie wurde erstmals 1989 als Zelloberflächenrezeptor beschrieben, der zusammen mit seinem Liganden das initiierende Signal zur Zellzerstörung in die Zelle übermitteln kann (Trauth et al. 1989). Die Bindung des sogenannten „Todesliganden CD95L“ initiiert durch die Aktivierung einer Caspasenkaskade den Apoptosevorgang. Durch unterschiedliche Mechanismen wie der proteolytischen Spaltung von Strukturproteinen und Inhibition von Endonukleasen (DNAsen) durch die verschiedenen aktiven Caspasen kommt es schließlich zum morphologischen und biochemischen Bild der Apoptose mit der typischen Fragmentation der DNA. Eine Induktion der phagozytischen Aktivität der Nachbarzellen führt zur schnellen, vollständigen Auflösung der Zelle.

1.3.1 Nachweisverfahren der Apoptose

Die definierenden morphologischen Kriterien und ultrastrukturellen Aspekte der Apoptose lassen sich am besten mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie von Gewebsschnitten nachweisen.

Erste morphologische Veränderungen betreffen den Zellkern und insbesondere das Chromatin, welches kondensiert. Die kondensierten Chromatinansammlungen erscheinen im Verlauf randständig, zunächst entlang der Kernmembran in Form von typischen Halbmondsicheln. Danach findet man sie als kappenähnliche Formationen an den Kernpolen. Diese Formationen erscheinen elektronenmikroskopisch gleichförmig dicht und sind abgrenzbar von anderen, diffusen Chromatinzonen. In einer folgenden Phase beginnt mit der Zeiose, dem Ausstülpfen der Zelle, eine tiefgreifende Umsortierung der Zellmembranstrukturen. Schließlich werden Mikronoduli als Abschnürungen des Zellkerns gebildet, die größtenteils von einer Doppelmembran umgeben sind und kompaktes, elektronenmikroskopisch homogen dichtes Chromatin enthalten. In diesen „Apoptosekörperchen“, die sich von normalen Zellen deutlich unterscheiden, können sowohl die intakte Zellmembran als auch die Zellorganellen für längere Zeit erhalten bleiben. Das späte Stadium der Apoptose, auch als sekundäre Apoptose bezeichnet, ist charakterisiert durch eine Überwässerung des Zytoplasmas, Membranruptur und das Vorhandensein von Zelltrümmern. Der letztendliche Untergang der apoptotischen Zelle erfolgt durch Phagozytose durch benachbarte oder zirkulierende Zellen (Cohen 1993; Dini et al. 1996; Falcieri et al. 1994).

Bei den biochemischen Nachweisverfahren macht man sich zunutze, daß während des Vorgangs der Apoptose spezifische Endonukleasen die genomische DNA der Zelle in definierte Stücke von circa 180 Basenpaaren (Nukleosomen) sowie ganzzahlige Vielfache (Oligonukleosomen) zerlegen. Wird aus entsprechend vorbereitetem Gewebe die extrahierte DNA auf ein Agarosegel aufgetragen, entsteht in der visualisierten Gelelektrophorese das charakteristische Bild einer DNA-Leiter, die durch die definierte Fragmentation des Chromatins zustande kommt. Aufgrund der notwendigen DNA-Extraktion ist diese Methode gewebserstörend, auch gelingt der Nachweis erst ab einer

Zellzahl von $1-2 \cdot 10^6$ Zellen und einer minimalen Anzahl von 8% apoptotischer Zellen (Gong et al. 1994).

Das Prinzip auch an Gewebsschnitten Apoptose sichtbar machen wurde erstmals von Gavrieli et al. (Gavrieli et al. 1992) beschrieben und ist mittlerweile eine Standardmethode in der Detektion von einzelnen apoptotischen Zellen *in situ*.

Bei der sogenannten TUNEL-Färbung (transferase-mediated dUTP biotin nick end-labeling) bindet das Enzym „terminale desoxynucleotidyl-Transferase“ (TdT) spezifisch an die 3'-OH-Enden der genomischen DNA-Fragmente biotinmarkierte Desoxyribonukleotide (Digoxigenin-11-dUTP und dATP). Diese Nukleotide binden den zugegebenen Antikörper Anti-Digoxigenin, der wiederum das Enzym Peroxidase trägt, welches die einzelne apoptotische Zelle nach Anfärbung sichtbar macht.

2 FRAGESTELLUNG

Es soll quantitativ untersucht werden, ob sich eine partielle Flüssigkeitsbeatmung mit Perfluorocarbonen von einer konventionellen Beatmung bei der Behandlung des Atemnotsyndroms in einem Neugeborenen Tiermodell in Bezug auf die Lungenmorphologie unterscheidet. Dazu wird das Ausmaß des Lungenschadens histopathologisch erhoben. Zugleich soll untersucht werden, ob sich die Apoptose-Rate im Lungengewebe unterscheidet. An einzelnen repräsentativen Tieren sollen im Transmissionselektronenmikroskop direkt ultrastrukturelle Unterschiede gezeigt werden.

Zuächst soll die konventionelle Gasbeatmung (CV) über 24 Stunden mit und ohne Surfactantsubstitution mit einer 24-stündigen partiellen Liquid Ventilation (PLV) mit dem Perfluorocarbon FC-77 an surfactantdepletierten neugeborenen Schweinen verglichen werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wird die Auswirkung zweier unterschiedlicher Perfluorocarbone, FC-77 und Perfluorooctylbromid, auf die histopathologisch nachweisbare Lungenschädigung und das Vorkommen von Apoptose hin untersucht werden. Bei der Entscheidung, welches Perfluorocarbon für den klinischen Einsatz geeignet ist, können Fragen nach Unterschieden in Histopathologie und Apoptose-Häufigkeit eine bedeutende Rolle spielen.

Die Ergebnisse werden mit Untersuchungen an lungengesunden Kontrolltieren verglichen.

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 Versuchstiere

Die Tierexperimente wurden gemäß des Tierschutzgesetzes durch die Bezirksregierung Köln genehmigt (Aktenzeichen 50.203.2-AC 40a, 3/97; Aktenzeichen 23.203.2-AC 40a, 1/99) und in den Räumen des Zentrallaboratoriums für Versuchstierkunde der RWTH Aachen durchgeführt.

Als Versuchstiere dienten 30 neugeborene männliche Schweine (Deutsche Landrasse), die zwischen 24 und 72 Stunden alt waren und ein Gewicht von 1,5 bis 2,5 kg besaßen. Sie waren nach veterinärmedizinischer Untersuchung für gesund befunden worden.

3.2 Versuchsaufbau

Die Tiere wurden zunächst mittels Maskennarkose mit 4% Halothan in 70% Lachgas anästhesiert. Über eine in eine Ohrvene eingebrachte Kunststoffverweilkanüle (26 G Vasculon[®]) erhielten die Tiere zur Analgosedierung jeweils einen Bolus 0,2 mg/kg Midazolam (Dormicum[®]) und 1mg/kg Ketamin (Ketanest[®]S) sowie zur Muskelrelaxation 0,2 mg/kg Vecuronium (Norcuron[®]).

Nach orotrachealer Intubation unter direkter Laryngoskopie mit einem Endotrachealtubus (Durchmesser 4,0 bis 4,5 mm) mit Surfactant-Seitenkanal (Vygon[®], Aachen, Deutschland) wurde die Narkose mittels Dauertropfinfusion von 1 mg kg⁻¹h⁻¹ Midazolam (Dormicum[®]), 1 mg kg⁻¹h⁻¹ Ketamin (Ketanest[®] S) und 0,6 mg kg⁻¹h⁻¹ Vecuronium (Norcuron[®]) während des gesamten Versuchszeitraums fortgesetzt.

Die Versuchstiere wurden in Rückenlage und bei 20° Kopfhochlagerung auf einem Heizkissen platziert, wobei die Körpertemperatur zwischen 37,0 und 39,0°C konstant gehalten wurde.

Es erfolgte eine druckkontrollierte Beatmung mit einem zeitgesteuerten Neugeborenenrespirator (Stephan HF 300, F. Stephan GmbH, Gackebach bzw. Babylog 8000 plus, Drägerwerke Lübeck).

Bei einem Flow von 6 l/min wurde initial ein maximaler Beatmungsdruck von 16 cmH₂O und ein positiv endexpiratorischer Druck (PEEP) von 3 cmH₂O angewandt. Die initiale Beatmungsfrequenz betrug 30 Atemzüge pro Minute, bei einem Inspirations/Expirationsverhältnis von 1:2, dabei lag die inspiratorische Sauerstoffkonzentration F_iO₂ zwischen 0,21 und 0,25.

Während der gesamten Versuchsdauer wurde die Herzfrequenz der Tiere kontinuierlich mittels eines dreipunktabgeleiteten EKGs überwacht. Die arterielle Sauerstoffsättigung wurde über ein Pulsoxymeter (OxyShuttle, Criticon, Anaheim) ständig registriert.

Unter sterilen Bedingungen erfolgte durch eine Venae sectio die Einlage eines doppelumigen 4FR-Venenkatheters (Arrow GmbH, Erding) in die externe Jugularvene. In die Arteria carotis interna wurde ein arterieller Katheter, Durchmesser 0,6 mm, (Vygon[®], Aachen) mittels Seldinger-Technik eingeführt.

Der zentralvenöse Zugang diente fortan zur intermittierenden Messung des zentralvenösen Drucks, der kontinuierlichen Flüssigkeitssubstitution in Form von Ringer-Lactat-Lösung (5 ml kg⁻¹h⁻¹) und der Injektion der Medikamente zur Aufrechterhaltung der Narkose.

Der eingebrachte arterielle Katheter ermöglichte eine kontinuierliche Blutdruckmessung sowie regelmäßige Blutentnahmen zur Bestimmung der arteriellen Blutgase.

Zusätzlich erhielten die Tiere 5 ml Doxycyclin (100 mg Vibravenös[®]) zur Infektionsprophylaxe sowie 100 IE Heparin-Natrium (Vetren[®]) zur Thromboseprophylaxe.

Zur kontinuierlichen Ableitung des Harns wurde die Harnblase durch die Bauchdecke mit einer Kunststoffverweilkanüle (Abbocath[®] 16 G, Abbott GmbH Wiesbaden) punktiert.

Von allen Tieren wurde eine Röntgen-Thorax-Aufnahme zur Erhebung eines Ausgangsstatus und zur Verifizierung der richtigen Lage des Endotrachealtubus sowie der zentralen Katheter angefertigt.

Anschließend erfolgte die Dokumentation der Ausgangswerte für die Kreislauf-, Lungenfunktions- und Blutgasparameter.

3.3 Induktion eines Surfactant-Mangels

Nach dem durch Lachmann et al. beschriebenen Verfahren, wurde ein Lungenschaden induziert. Hierbei wurde durch wiederholte bronchoalveoläre Lavagen mit isotonischer Natriumchloridlösung der natürliche Surfactant ausgewaschen und eine respiratorische Insuffizienz induziert (Lachmann et al. 1980).

Vor Beginn dieses Procederes wurden die Beatmungsparameter wie folgt eingestellt: PIP: 20 mmH₂O, PEEP: 4cm H₂O, F_IO₂: 1,0. Die Beatmungsfrequenz blieb konstant bei 30/min, ebenso der Flow mit 6l/min.

Den Tieren wurde wiederholt die auf 38°C erwärmte 0,9%ige Natriumchloridlösung in einer Dosierung von ca. 30 ml/kg über den Seitenkanal des Endotrachealtubus instilliert. Der Tubus wurde anschließend kurz diskonnektiert und die Flüssigkeit mit einem Absaugkatheter (10 Ch) bei einem maximalen Sog von 0,2 bar abgesaugt. Die Prozedur der Lavage wurde so oft wiederholt, bis der gemessene arterielle pO₂ nach Beendigung der Lavage in zwei aufeinanderfolgenden Messungen in 30-minütigem Abstand weniger als 100 mmHg unter den oben genannten Beatmungsparameter betrug.

Die anschließend durchgeführten Röntgen-Thorax-Aufnahmen zeigten bei allen Tieren eine „weiße Lunge“, als Zeichen eines schweren Surfactantmangels (Giedion et al. 1973).

3.4 Versuchsprotokoll

3.4.1 PLV versus CV

In dieser Versuchsreihe wurden 19 Tiere über 24 Stunden beatmet.

5 Tiere wurden nach Lavage konventionell gasbeatmet (**Gruppe CV**), bei weiteren 5 Tieren erfolgte nach Lungenlavage die Instillation von natürlichem Surfactant. (**Gruppe CV+S**). Bei den 5 flüssigkeitsbeatmeten Tiere wurde das Perfluorocarbon FC-77 verwendet (**Gruppe PLV**).

Als Kontrollgruppe dienten 4 Tiere, die ohne Induktion eines Surfactantmangel-Syndroms konventionell gasbeatmet wurden.

Ziel dieser Untersuchung war ein direkter Vergleich der PLV mit dem in der klinischen Routine etablierten Therapieverfahren des Surfactantmangel-Syndroms.

3.4.2 FC-77 versus POB

In der zweiten Versuchsreihe wurden 11 Tiere nach Lungenlavage zunächst 6 Stunden partiell flüssigkeitsbeatmet und anschließend für weitere 18 Stunden konventionell gasbeatmet.

Es wurden 6 Versuchstiere mit dem Perfluorocarbon FC-77 beatmet (**FC-77-Gruppe**), die übrigen 5 Tiere erhielten das Perfluorocarbon Perfluorooctylbromid (**POB-Gruppe**).

Das Ziel dieser Untersuchung war der direkte Vergleich zweier zur Verfügung stehender Perfluorocarbone im Hinblick auf eine klinische Anwendung.

3.4.3 Beatmungsparameter

Mit Beginn der unterschiedlichen Beatmungsformen wurden die Beatmungsparameter individuell so gesteuert, daß eine dem Früh- und Neugeborenen entsprechende optimale Situation bezüglich der Oxygenierung, der Ventilation und des Säure-Basen-Haushaltes vorliegen sollte. In der ersten Versuchsreihe kam als Beatmungsgerät ein Stephan-Respirator HF 300 (F. Stephan GmbH, Gackebach), in der zweiten Reihe ein Beatmungsgerät

Babylog 8000 plus (Drägerwerke Lübeck) zur Anwendung. Ungeachtet des eingesetzten Beatmungsgerätes wurden $p_a\text{CO}_2$ -Werte zwischen 35 und 50 mmHg, $p_a\text{O}_2$ -Werte von 50 bis 80 mmHg und ein arterieller pH-Wert von 7,30 bis 7,50 angestrebt. (ABL 500 Radiometer, Kopenhagen).

Beatmungs- und Kreislaufparameter sowie arterielle Blutgase wurden jeweils stündlich bestimmt.

3.4.4 Technik der partiellen Liquid Ventilation

Die Tiere der Gruppen PLV, FC-77 und POB wurden mit dem Verfahren der partiellen Liquid Ventilation beatmet. Das Perfluorocarbon wurde dazu auf 38°C erwärmt und oxygeniert. Über den Seitenkanal des Tubus wurde das entsprechende PFC mittels Perfusor innerhalb von 30 min instilliert. Die Dosis entsprach der funktionellen Residualkapazität von 30 ml kg^{-1} Körpergewicht. Zum Ausgleich der durch Exhalation eliminierten Menge wurde bei Verwendung von FC-77 kontinuierlich $30 \text{ ml kg}^{-1}\text{h}^{-1}$, bei Verwendung von POB $3 \text{ ml kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ infundiert. Die unterschiedlichen Erhaltungsdosen tragen dem spezifischen Dampfdruck der jeweiligen Substanzen Rechnung. Als Anhalt für eine optimale Füllmenge galt ein am Ende der Expiration stets sichtbarer Flüssigkeitsspiegel im Tubus.

Bei den Tieren der PLV-Gruppe wurde über 24h eine PLV durchgeführt.

Die Tiere der Gruppen FC-77 und POB erhielten das Perfluorocarbon für 6h, danach wurde die kontinuierliche Instillation beendet und die konventionelle Beatmung fortgeführt.

Diese beiden Gruppen unterschieden sich durch das verwendete Perfluorocarbon, Tiere der FC-77-Gruppe erhielten das Perfluorocarbon C8-F18/C8-F16-0 (FC-77, 3M, Neuss), die POB-Gruppe erhielt C8-F17-Br (Perfluorooctylbromid ABCR-GmbH, Karlsruhe, hochgereinigt durch Pharm Pur-GmbH, Augsburg).

Den Tieren, die der Gruppe CV+S zugeordnet waren, wurden nach der Lavage einmalig ein natürliches Surfactantpräparat (Alveofact[®], Boehringer Ingelheim) in einer Dosierung von 100 mg/kgKG über den Seitenkanal des Endotrachealtubus appliziert.

3.5 Histopathologie

3.5.1 Histopathologische Gewebsaufarbeitung

Von allen Tieren wurden nach Beendigung des Versuchs die Lungen entnommen, um diese histologisch und morphologisch auszuwerten.

Nach der Beatmung über 24 Stunden wurden die Tiere unter Fortführung der Narkose mit Ketamin und Midazolam durch zusätzliche Applikation einer Überdosis Phenobarbital (Luminal®) und Kaliumchlorid getötet.

Durch eine mediale Thorakotomie wurden Trachea und Lungen entfernt und sofort in gepuffertem 10%igem Formalin (pH 7,4) für 24 Stunden fixiert. Nach Fixation wurden die oberen und unteren Lungenabschnitte jeder Seite in jeweils 0,3 x 1 cm breite Gewebsteifen geteilt. Nach Dehydrierung und Einbettung in Paraffin wurden von jedem dieser Steifen 4 µm dicke Stufenschnitte angefertigt. Diese wurden mittels Hämatoxylin & Eosin (H&E) sowie Periodsäure- Schiff-Reagens (PAS) gefärbt.

3.5.2 Histopathologische Klassifizierung

Zur histologischen Auswertung wurde ein semiquantitativer Vier-Punkte-Score, ähnlich einem von Katzenstein und Blennerhassett beschriebenen Scoring-System benutzt, um den Lungenschaden der einzelnen Gruppen zu quantifizieren (Blennerhassett 1985; Katzenstein et al. 1976).

Folgende histologische Kriterien wurden untersucht:

- *Atelektase*,
- *Entzündung* (zusammengefaßt aus alveolärer neutrophiler Infiltration, interstitieller neutrophiler Infiltration, interstitieller lymphozytärer Infiltration und Granulozyten-„sticking“),
- *Ödem* (bestehend aus interstitiellem Ödem, septalem Ödem, Lymphangiektasie und intraalveolärem Exsudat) und schließlich
- *Verschiedene* (als Zusammenfassung aus alveolärer Hämorrhagie, kongestiver Hyperämie, Thrombozytenaggregation, Fibrinablagerung und hyalinen Membranen).

Dabei wurde die Ausprägung der vierzehn untersuchten Kriterien eingeteilt in negativ = 0, wenig = 1, mäßig = 2 und stark = 3. Es wurden jeweils vier repräsentative Präparate, nämlich rechter und linker Oberlappen sowie rechter und linker Lungenunterlappen, pro Versuchstier durchgemustert. Bei dieser Einteilung war die Zugehörigkeit zu der jeweiligen Gruppe dem Untersucher unbekannt. Die Ergebnisse der histologischen Kriterien wurden für die einzelnen Tiere jeder Gruppe addiert und durch die Anzahl der untersuchten Tiere dividiert. Dabei wurden die Ergebnisse der beiden Lungenseiten zusammengefaßt, die der einzelnen Lungenabschnitte (obere und untere) getrennt im Lungenschädigungs-Score der einzelnen Gruppen dargestellt.

3.5.3 Apoptose- Färbung (TUNEL)

Die Lungenschnitte aller Tiere wurden auf das Vorhandensein apoptotischer Zellen untersucht. Es wurden ebenfalls jeweils vier bis fünf repräsentative Präparate jeder Gruppe gefärbt und ausgewertet.

Zur Färbung Apoptose-positiver Zellen wurde die TUNEL (transferase-mediated dUTP biotin nick end-labeling)- Methode benutzt, welche die durch den apoptotischen Zelltod entstandenen 3'-OH-Enden der Nukleosomen mittels eines Farbstoffs sichtbar macht.

Die TUNEL Immunhistochemie wurde mit einem *in situ Apoptose Detektions- Kit-Peroxidase*, Catalog#: S7100-KIT (ApopTag[®], Oncor, Gaithersburg, MD) durchgeführt.

Die 4 µm dicken Stufenschnitte der Tiere wurden deparaffiniert und rehydriert. Bei Raumtemperatur erfolgte für 15 Minuten die Andauung der Präparateoberfläche der Schnitte mit Proteinase K 20 µg/ml in PBS- Puffer (phosphate buffered saline: 50mM Natriumphosphat, pH 7,4, 200 mM NaCl). Nach weiteren Spülungen der Schnitte in PBS erfolgte die Inkubation entsprechend der Herstelleranleitung in Equilibrationspuffer für 2-3 Minuten. Daraufhin wurden die Schnitte mit der Markierungslösung bei 37°C für eine Stunde inkubiert, letztere enthielt TdT-Enzym (terminale desoxynukleotidyl Transferase) mit Digoxigenin-11-dUTP und dATP, gelöst in Reaction-Puffer. In diesem Schritt erfolgte das Anhängen der Desoxyribonukleotide (Digoxigenin-dUTP) an die 3'-OH-Enden der Nukleosomen.

Die Zugabe eines „Stop-/Wasch“-Puffers beendete dann die Markierungsreaktion. Anschließend erfolgte die dreimalige Spülung in PBS-Puffer über 5 min. Durch die Inkubation mit dem Antikörper Anti-Digoxigenin-Peroxidase wurde an die jetzt markierten DNA-Fragmente Peroxidase gebunden. Für die lichtmikroskopische Auswertung wurden die apoptotischen Zellen durch die Zugabe von 0,05%igem DAB (Diaminobenzidin) und H_2O_2 visualisiert. Abschließend wurden die Präparate mit Hämalaun gegengefärbt, wiederum gewaschen und mit Permount-Medium eingedeckelt.

Durch die computergestützte Bildanalyse konnten apoptotische Zellkerne in den histologischen Gewebsschnitten der Tiere aller Gruppen ausgewertet wurden (Olympus BX 51, Olympus Digitalkamera C3030 Zoom, Olympus DP Soft 3.1, ImagePro Plus 4.5.0.19, Media Cybernetics).

Dabei wurden aus jeder Gruppe randomisiert insgesamt 20-30 Gesichtsfelder ausgezählt.

Die TUNEL-positiven Zellkerne in jedem Gesichtsfeld wurden identifiziert und die Anzahl der Gesamtzellkerne in je einem Gesichtsfeld ermittelt. Die Berechnung des Apoptoseindex (AI) beruhte auf der prozentualen Anzahl der TUNEL-positiven Zellkerne an der Gesamtzellzahl.

3.5.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurde Lungengewebe in 2,5 %igem, gepufferten Glutaraldehyd fixiert und im Anschluß in 1,5 x 10 mm große Steifen geschnitten. Es erfolgte nach mehrfachem Waschen in Phosphatpuffer die Nachfixierung mit OsO_4 , die Dehydrierung und die Einbettung in das Epoxidharz Epon. Die Präparate wurden dann semidünn (1,0 μm) geschnitten und mit Methylén-Blau-Azure II gefärbt. Nach Durchmusterung der Semidünnschnitte konnten relevante Gewebsareale in Ultradünnschnitten weiter aufgearbeitet, mit Uranylacetat gegengefärbt und am Elektronenmikroskop untersucht werden (Philips, TEM 400 T).

3.6 Statistische Auswertung

Den statistischen Berechnungen lagen die Gruppeneinteilung in die Gruppen CV, CV+S, PLV, FC-77, POB und die Kontrollgruppe zugrunde. Für die Berechnung der statistischen Differenzen im Vergleich innerhalb der Gruppen wurde der verbundene Wilcoxon-Rangsummen-Test verwendet. Die Analyse der Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgten durch den Mann-Whitney U-Test für unverbundene Stichproben. Eine statistische Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ angenommen.

Die statistischen Berechnungen erfolgten mittels der Software „Statistical Package for Social Sciences“ (SPSS 8.0).

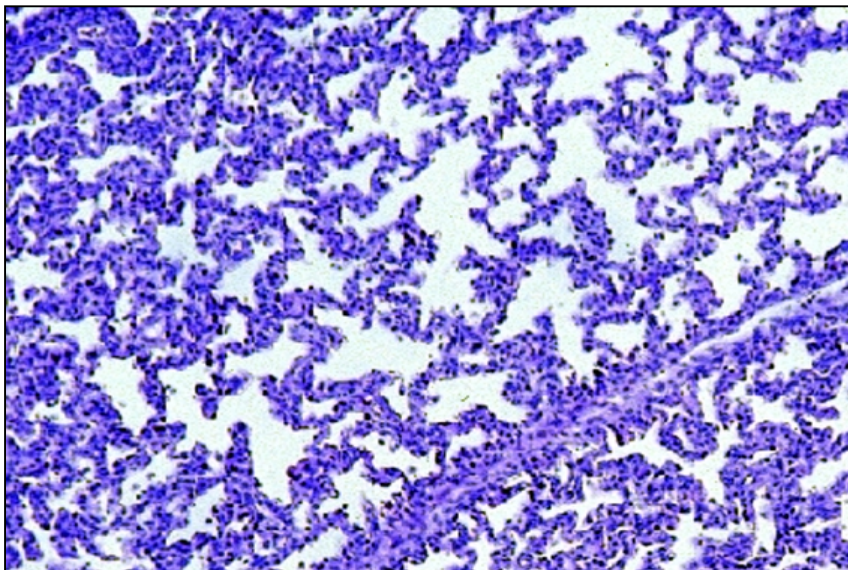
4 ERGEBNISSE

Die zu untersuchenden neugeborenen Versuchstiere waren in fünf Gruppen und eine Kontrollgruppe eingeteilt. Zwischen den Gruppen bestanden keine Unterschiede hinsichtlich Durchschnittsalter und –gewicht. Außer den Kontrolltieren erfüllten alle Tiere nach Lungenlavage die geforderten Kriterien eines schweren Atemnotsyndroms. 27 Tiere überlebten die gesamte Studiendauer von 24h, drei Tiere der CV-Gruppe verstarben aufgrund einer nicht beherrschbaren respiratorischen Insuffizienz bereits vor der Beendigung des Versuchs.

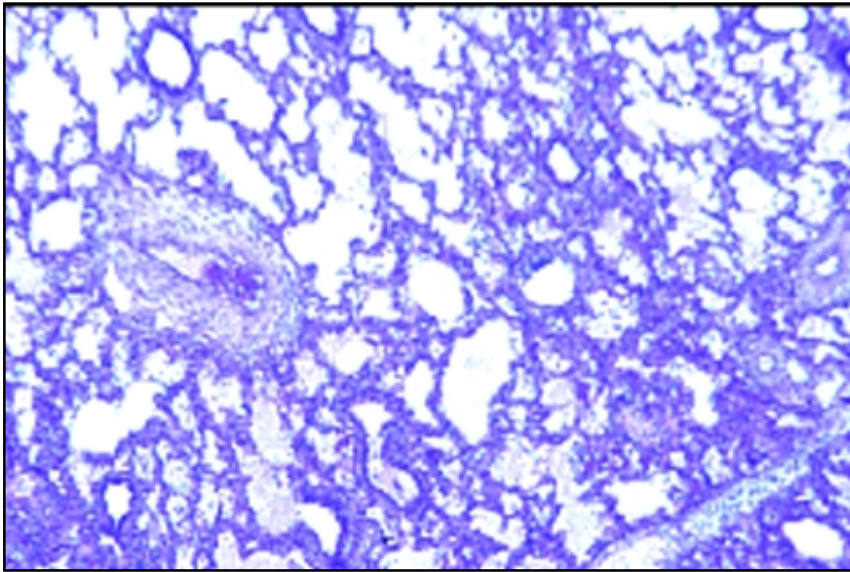
4.1 Histopathologie

4.1.1 Charakteristische histopathologische Befunde

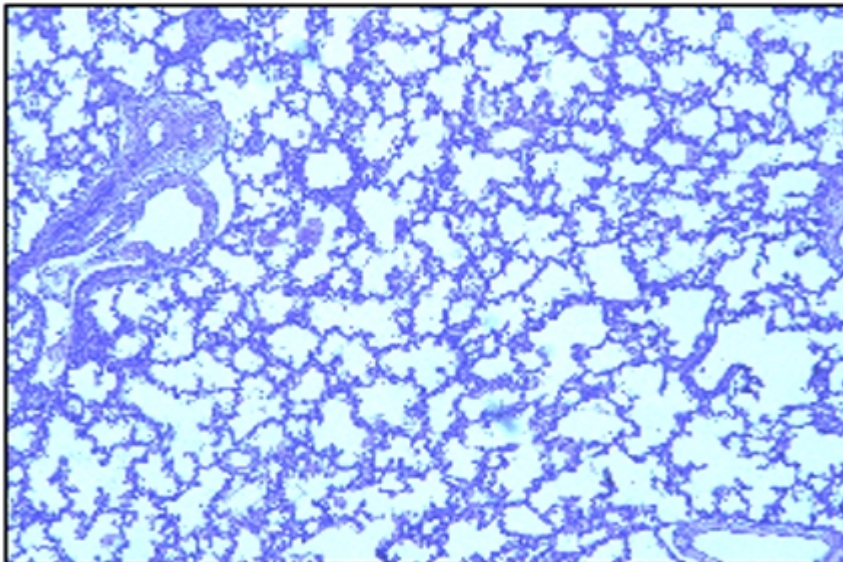
Abbildung 1 bis Abbildung 3 zeigen charakteristische histopathologische Befunde nach konventioneller Gasbeatmung bzw. nach partieller Flüssigkeitsbeatmung (Abbildung 4).



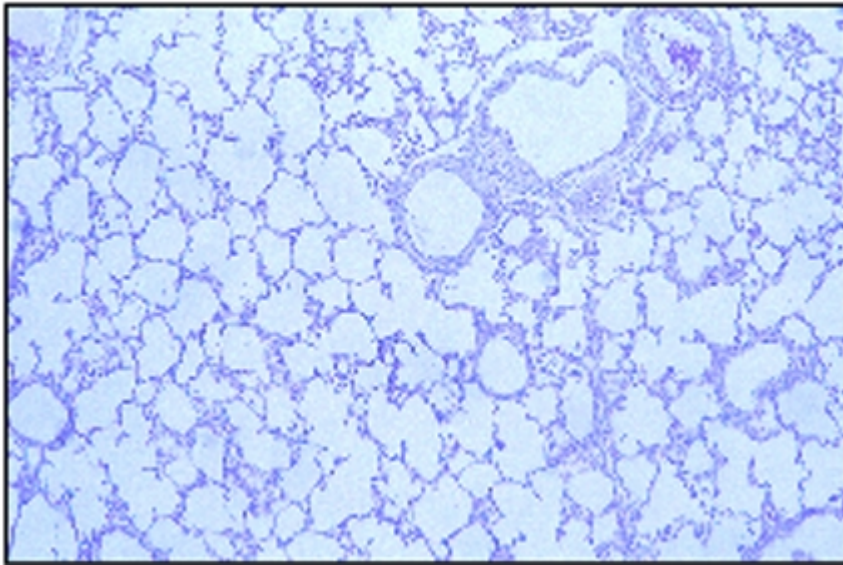
**Abbildung 1: Lungengewebe, Lichtmikroskopie, Vergrößerung 1: 40
interstitielles Ödem, Verbreiterung der Alveolarsepten**



**Abbildung 2: Lungengewebe, Lichtmikroskopie, Vergrößerung 1: 40
intraalveoläres Ödem, Atelektasenbildung**



**Abbildung 3: Lungengewebe, Lichtmikroskopie, Vergrößerung 1: 40
Interstitielles Ödem, fokale Überblähung der Alveolen**



**Abbildung 4: Lungengewebe, Lichtmikroskopie, Vergrößerung 1: 40
nahezu normale Lungenmorphologie**

Deutlich zu erkennen sind in Abbildung 1 bis Abbildung 3 das interstitielle Ödem mit der konsekutiven Verbreiterung der Alveolarsepten sowie die Rarifizierung der Alveolarräume. Eine kleinherdige Atelektasenbildung zeigt darüberhinaus die Abbildung 2. In der Abbildung 3 sind fokale überblähte Alveolen mit destrukturierter Alveolarseptenstruktur dargestellt. Eine nahezu vollständig erhaltene Lungenstruktur ohne morphologische Schädigungszeichen nach partieller Liquidventilation sind in Abbildung 4 zu erkennen.

4.1.2 PLV versus CV

Aus der Tabelle 2 sind die Lungenschädigungs-Scores der Gruppen CV, CV+S und PLV für die oberen und unteren Lungenabschnitte ersichtlich. Die Summe der vierzehn Einzelkriterien, die in die vier Hauptkriterien *Atelektase*, *Entzündung*, *Ödem* und *Verschiedene* zusammengefaßt werden können, ergibt die Gesamtpunktzahl des Lungenschädigungs-Score.

**Tabelle 2: Lungenschädigungs-Score PLV vs. CV
apikale und basale Lungenabschnitte**

	CV <i>apikal</i>	CV <i>basal</i>	CV+S <i>apikal</i>	CV+S <i>basal</i>	PLV <i>apikal</i>	PLV <i>basal</i>
Atelektase	2,6	2,3	1,5	2,8	0,7	0,1
Alveoläre neutrophile Inf.	1,6	1,5	0,8	1,5	0,1	0,1
Interstitielle neutrophile Inf.	2,0	2,0	1,3	1,7	0,6	0,4
Interstitielle lymphozytäre Inf.	1,7	1,8	1,3	2	0,6	0,3
Granulozyten "sticking"	2,2	2,0	1,3	1,9	0,6	0,4
Interstitielles Ödem	2,7	2,6	2,0	2,6	0,7	0,4
Septales Ödem	2,5	2,5	1,9	2,1	0,8	0,4
Lymphangiektasie	2,3	2,4	2,1	2,0	0,7	0,3
Intraalveoläres Exsudat	1,8	1,8	0,8	1,3	0,2	0,0
Alveoläre Hämorrhagie	1,7	1,8	0,7	1,1	0,2	0,2
Kongestive Hyperämie	1,7	1,8	0,9	1,4	0,1	0,0
Thrombozytenaggregation	2,3	2,2	1,3	1,6	0,2	0,1
Fibrinablagerung	2,2	2,2	1,3	1,4	1,2	0,8
Hyaline Membranen	2,3	2,0	1,1	1,3	0,2	0,0
Summe	29,6	28,9	18,3	24,7	6,9	3,5

apikale Lungenabschnitte

CV vs. CV+S p < 0,01 CV vs. PLV p < 0,01
CV+S vs. PLV p < 0,01

basale Lungenabschnitte

CV vs. CV+S ohne statistische Signifikanz
CV+S vs. PLV p < 0,01 CV vs. PLV p < 0,01

apikal vs. basal

CV vs. CV ohne statistische Signifikanz
CV+S vs. CV+S p < 0,01
PLV vs. PLV p < 0,01

Die geringsten Zeichen einer Lungenschädigung fanden sich in der PLV-beatmeten Gruppe.

Die PLV-Gruppe wies dabei in allen vierzehn Einzelkriterien eine geringere Ausprägung des Lungenschadens im Vergleich zur konventionellen Beatmung mit (CV+S) oder ohne (CV) Surfactantbehandlung auf. Vergleichend sind die vier Hauptkriterien für die oberen und die unteren Lungenabschnitte in Abbildung 5 bzw. in Abbildung 6 graphisch dargestellt.

Das Ausmaß der Lungenschädigungszeichen war sowohl in den apikalen als auch in den basalen Lungenabschnitten in der Liquidgruppe am geringsten (CV vs. PLV $p < 0,01$; CV+S vs. PLV $p < 0,01$). Dabei ergab sich für die PLV-Gruppe eine signifikant geringere Lungenschädigung in den basalen Lungenabschnitten im Vergleich zu den apikalen Bezirken.

Auch die konventionellen Beatmungsformen unterschieden sich im Hinblick auf die Lungenpathologie. Der höchste Lungenschädigungs-Score wurde bei den Tieren gefunden, die ohne Surfactant-Substitution konventionell beatmet wurden (CV-Gruppe). Hier ergab sich kein signifikanter Unterschied beim Vergleich apikaler und basaler Lungenabschnitte. Durch eine Surfactant-Gabe konnte im Lungenschädigungs-Score, insbesondere für die oberen Lungenabschnitte ein besseres Ergebnis erzielt werden.

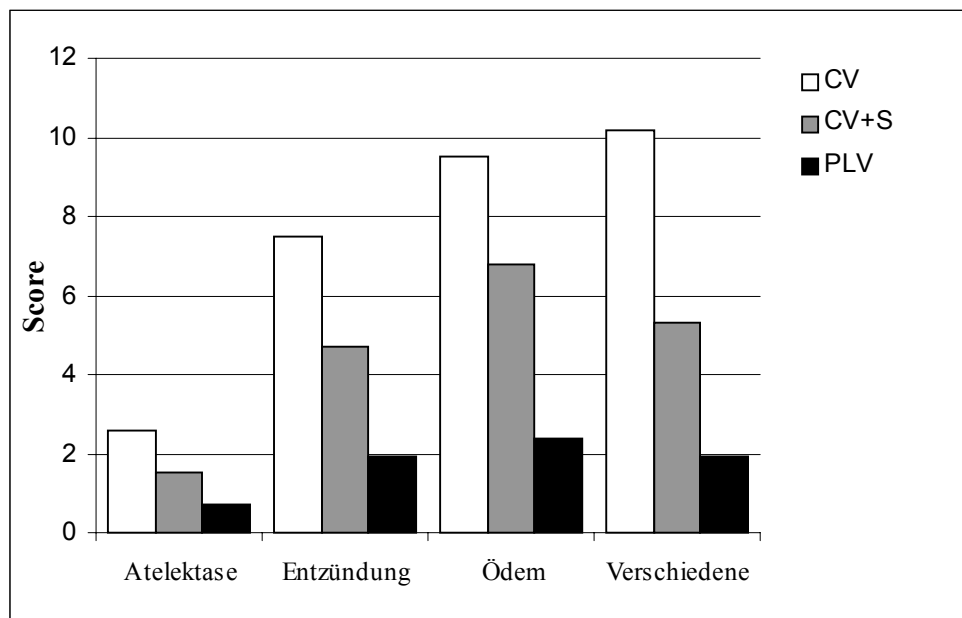


Abbildung 5: Lungenschädigungs-Score/ apikale Lungenabschnitte

CV vs. CV+S
CV+S vs. PLV

$p < 0,01$
 $p < 0,01$

CV vs. PLV

$p < 0,01$

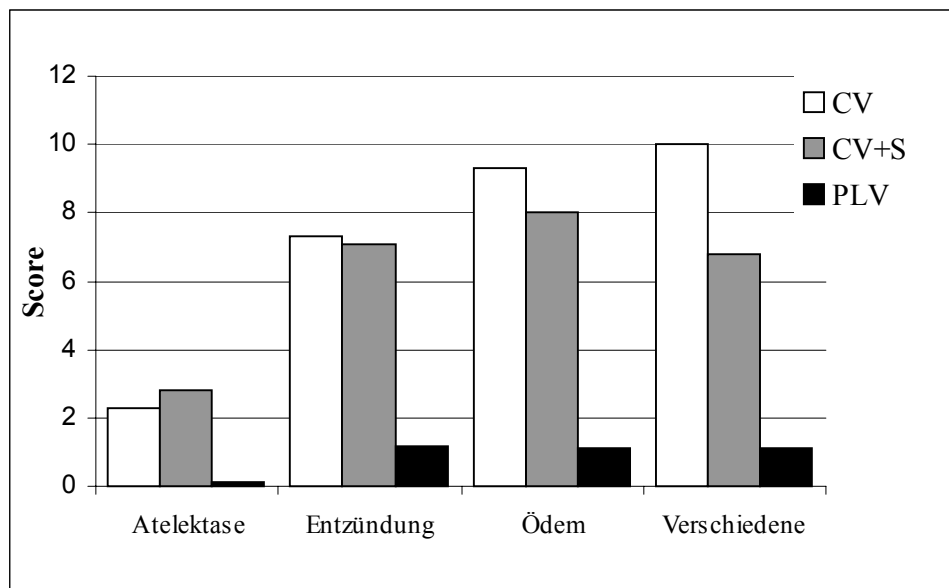


Abbildung 6: Lungenschädigungs-Score/ basale Lungenabschnitte

CV vs. CV+S
CV+S vs. PLV

ohne statistische Signifikanz
p < 0,01 **CV vs. PLV** **p < 0,01**

4.1.3 FC-77 versus POB

Tabelle 3 zeigt die Lungenschädigungs-Scores der Tiere der zweiten Versuchsreihe, in der zwei unterschiedliche Perfluorocarbone verglichen wurden.

**Tabelle 3: Lungenschädigungs-Score FC-77 vs. POB
apikale und basale Lungenabschnitte**

	FC-77 <i>apikal</i>	FC-77 <i>basal</i>	POB <i>apikal</i>	POB <i>basal</i>
Atelektase	0,1	0,2	0,4	0,2
Alveoläre neutrophile Inf.	0,0	0,4	0,7	0,8
Interstitielle neutrophile Inf.	0,2	0,7	0,8	1,2
Interstitielle lymphozytäre Inf.	0,0	0,2	0,6	0,8
Granulozyten "sticking"	0,0	0,5	1,0	1,1
Interstitielles Ödem	0,3	0,6	0,8	0,6
Septales Ödem	0,3	0,5	0,9	1,5
Lymphangiektasie	0,3	0,8	1,1	1,5
Intraalveoläres Exsudat	0,0	0,3	0,7	0,4
Alveoläre Hämorrhagie	0,0	0,4	0,3	0,5
Kongestive Hyperämie	0,0	0,2	0,3	0,3
Thrombozytenaggregation	0,0	0,1	0,6	0,6
Fibrinablagerung	0,0	0,5	0,8	0,7
Hyaline Membranen	0,0	0,1	0,4	0,5
Summe	1,2	5,5	9,4	10,6

apikale Lungenabschnitte

FC-77 vs. POB p < 0,01

basale Lungenabschnitte

FC-77 vs. POB p < 0,01

apikal vs. basal

FC-77 vs. FC-77 p < 0,01

POB vs. POB statistisch nicht signifikant

Die Analyse der beiden Gruppen, die zunächst über sechs Stunden mit jeweils einem der beiden zur Verfügung stehenden Perfluorocarbon flüssigkeitsbeatmet wurden und anschließend einer konventionellen Gasbeatmung unterzogen waren, zeigte bei der Verwendung von FC-77 eine histologisch signifikant geringere Lungenschädigung als bei Verwendung von POB. Es waren alle der vierzehn histologischen Kriterien des Lungenschadens gleichsinnig betroffen und in der FC-77-Gruppe geringer ausgeprägt (vergleiche Tabelle 3). Die Darstellung der vier Hauptkriterien sind aus Abbildung 7 und Abbildung 8 ersichtlich.

Die Lungenschädigung nach Flüssigkeitsbeatmung mit POB betraf die apikalen und basalen Lungenabschnitte in etwa gleichem Ausmaß, nach Beatmung mit FC-77 wurde eine signifikant geringere Schädigung in den apikalen Lungenabschnitten gefunden.

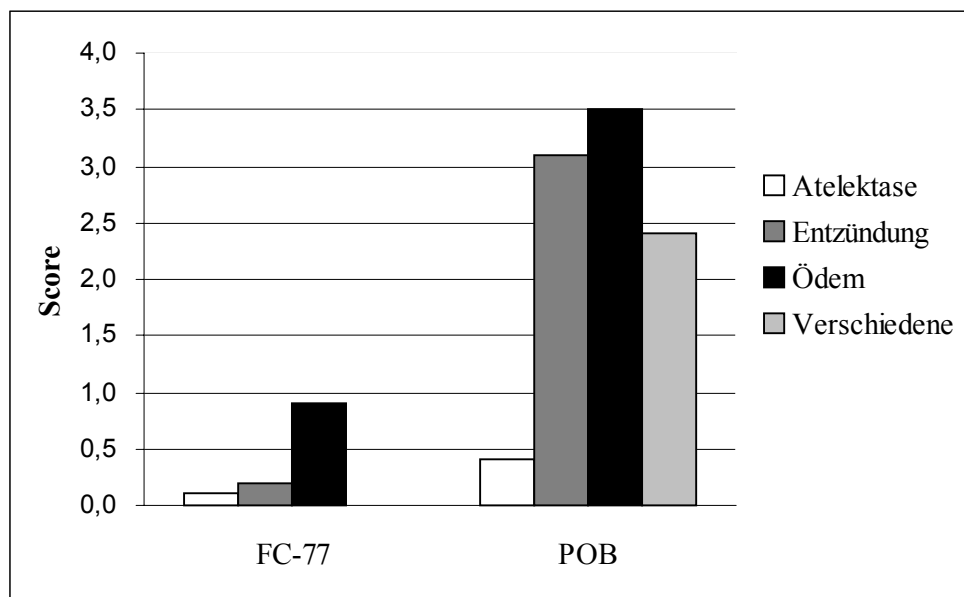


Abbildung 7: Lungenschädigungs-Score/ apikale Lungenabschnitte
FC-77 vs. POB **p < 0,01**

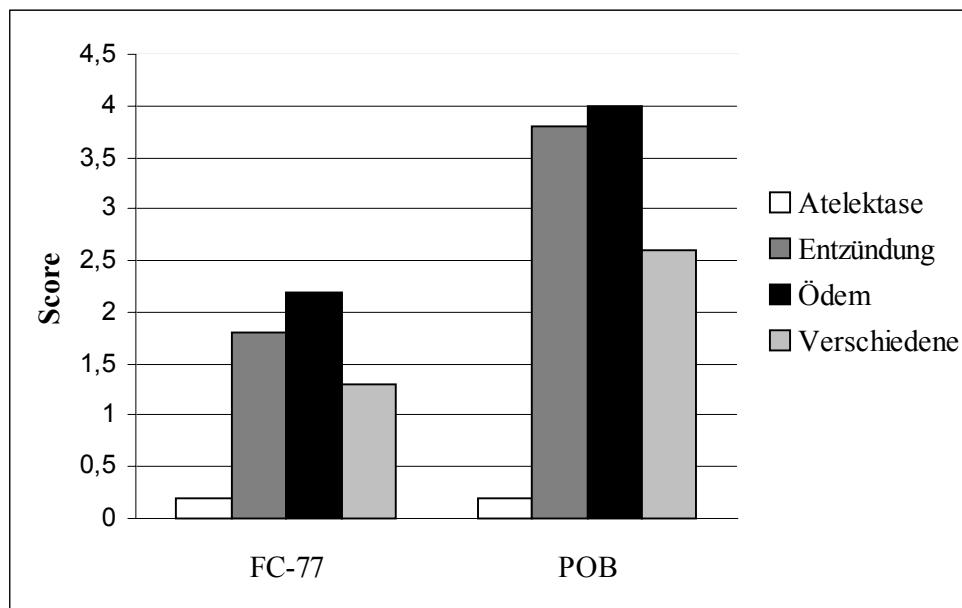


Abbildung 8: Lungenschädigungs-Score/ basale Lungenabschnitte
FC-77 vs. POB **p < 0,01**

4.2 Apoptose

In der Abbildung 9 sind die Apoptose-Indices der fünf Gruppen und der Kontrollgruppe dargestellt. Es konnte in allen Gruppen das Vorhandensein von Zelltod durch Apoptose nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Tiere der Kontrollgruppe einen Apoptose-Index von 2,82 %. Im Vergleich dazu konnte bei den Tieren, die nach Lungenschädigung mit konventioneller Beatmung behandelt wurden (Gruppen CV und CV+S) eine statistisch signifikant geringere Apoptosehäufigkeit festgestellt werden.

Tiere, die einer partiellen Liquidventilation unterlagen, zeigten einen höheren (Gruppe PLV und POB) bzw. geringfügig niedrigeren Apoptoseindex (Gruppe FC-77) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Diese Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe waren allesamt statistisch nicht signifikant.

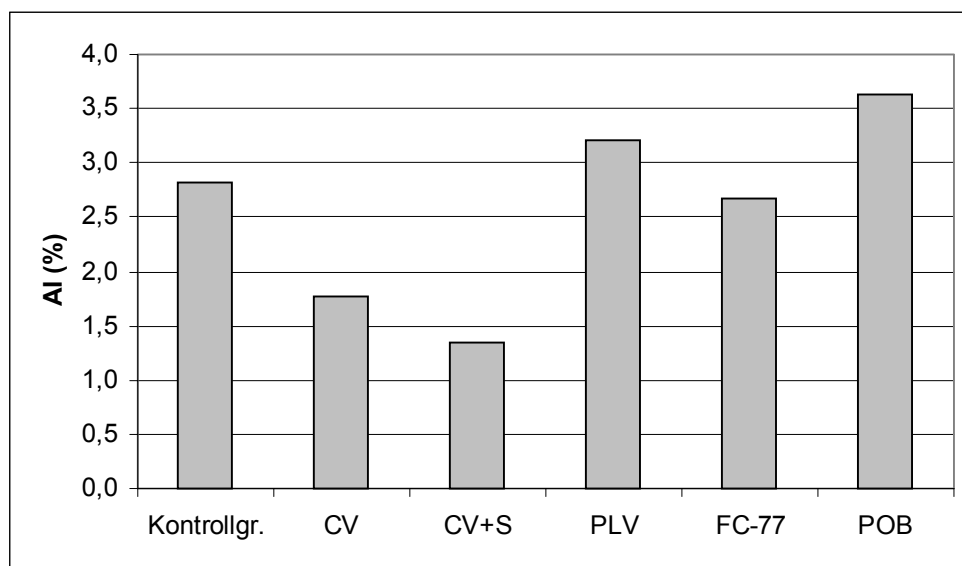


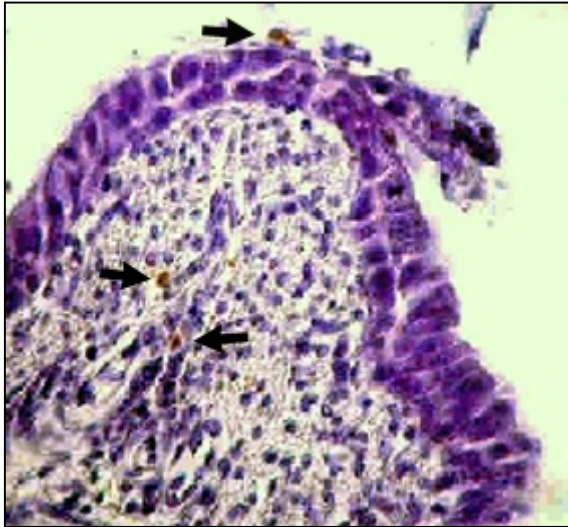
Abbildung 9: Apoptose-Index (AI)

CV vs. Kontrollgr. $p < 0,01$

CV+S vs. Kontrollgr. $p < 0,01$

PLV, FC-77, POB vs. Kontrollgr. jeweils ohne statistische Signifikanz

Einen repräsentativen Ausschnitt eines mit der TUNEL-Methode bearbeiteten Gewebsschnitts zeigt die Abbildung 10. Einzelne apoptotische Zellkerne sind an ihrer dunklen Färbung zu erkennen.



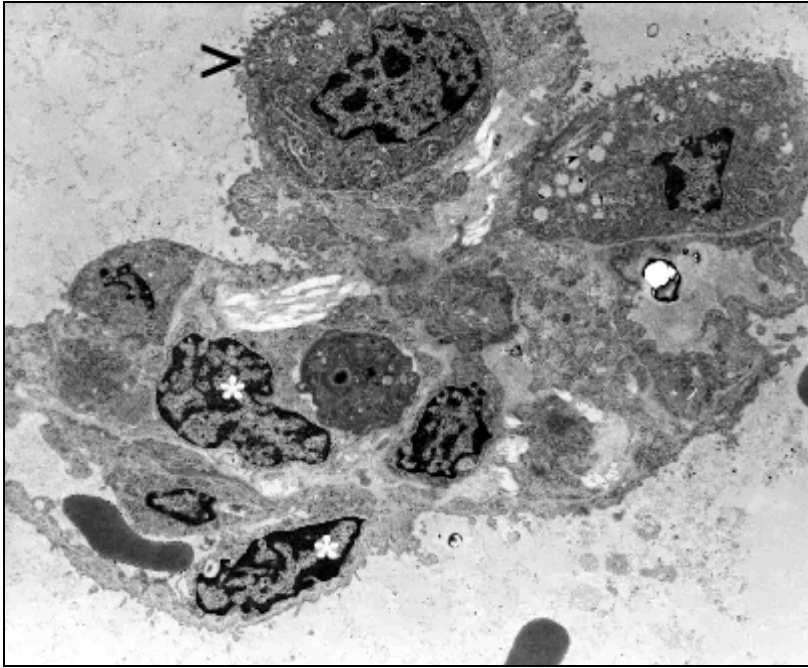
**Abbildung 10: Lichtmikroskopie, TUNEL-Methode, Vergrößerung 1: 400
apoptotische Zellkerne sind dunkel gefärbt (Pfeile)**

4.3 Transmissionselektronenmikroskopie

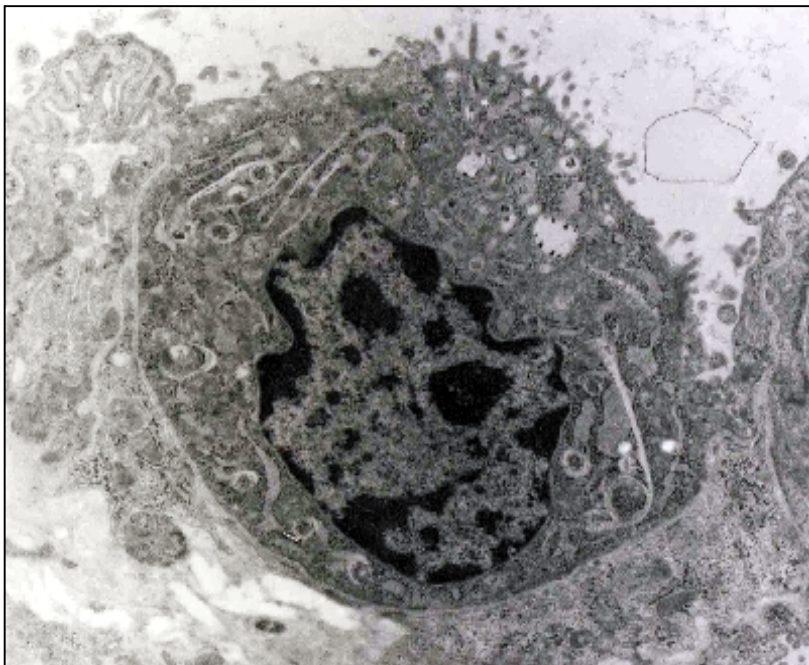
Die elektronenmikroskopische Auswertung einzelner Lungenschnitte wurde angefertigt, um anhand morphologischer Kriterien apoptotische Zellen an repräsentativen Gewebsschnitten zu detektieren.

Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Analysen zeigten in den untersuchten Gewebsabschnitten keine apoptotischen Zellen.

Abbildung 11 und Abbildung 12 stellen repräsentative Ausschnitte eines mit FC-77 beatmeten Tieres (PLV) mit regelrecht erhaltenen Gewebsstrukturen, ohne Nachweis apoptotischer Zellen dar. Ohne morphologische Schäden zeigten sich die Pneumozyten des Typs I und die surfactantproduzierenden Pneumozyten des Typs II.



**Abbildung 11: Elektronenmikroskopie, PLV, Vergrößerung 1: 5000
normale Pneumozyten Typ I (weiße Sterne)
und normaler Pneumozyt Typ II (schwarzer Pfeil)**



**Abbildung 12: Elektronenmikroskopie, PLV, Vergrößerung 1: 11000
normaler Pneumozyt Typ II**

5 DISKUSSION

Die strukturelle und funktionelle Unreife der Lunge zum Zeitpunkt des Übergangs des intrauterin flüssigkeitsgefüllten Organs zum extrauterin gasventilierten Organ führt zu großen Problemen bei der Beatmung Früh- und Neugeborener. Bei der Suche nach alternativen Beatmungsformen zur Gasventilation konnte in vielen tierexperimentellen und einigen klinischen Studien der Vorteil einer Flüssigkeitsbeatmung mit Perfluorocarbonen gezeigt werden (Curtis et al. 1994; Fuhrman et al. 1991; Hirschl et al. 1994; Kaisers et al. 1997; Leach et al. 1996; Shaffer et al. 1984; Weiswasser et al. 1998; Wolfson et al. 1992).

Dabei wurden als Maß für die Effizienz der Liquidventilation verschiedene Gasaustauschvariablen und Lungenfunktionsparameter herangezogen. Ein weiterer entscheidender Parameter zur Beurteilung der Qualität einer Beatmung stellt die histologische Bewertung der Gewebsschädigung dar. Aufgrund typischer histologischer Veränderungen läßt sich eine Aussage zum Schweregrad der akuten Lungenschädigung als Folge des Baro-/ Volutraumas und der Sauerstofftoxizität nach Beatmung einer Surfactant- Mangelung machen. Auch im Hinblick auf die Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie, die mit weitreichenden morphologischen Veränderungen einhergeht und schließlich in einen chronisch-fibrotischen Umbau münden kann, ist die histopathologische Einordnung essentiell.

In früheren Studien konnte an verschiedenen Tiermodellen eine geringere Lungenschädigung nach PFC-Ventilation im Vergleich zur Gasbeatmung nachgewiesen werden (Hirschl et al. 1994; Quintel et al. 1998a; Rotta et al. 1999; Smith et al. 1997; van Eeden et al. 2000; Wolfson et al. 1992).

Eine „in vitro“-Studie, die geringere Schädigungszeichen in der alveolären Mikrostruktur nach Perfluorocarbonbehandlung aufzeigt, liegt ebenfalls vor (Bachofen et al. 1994).

In Erweiterung der bisherigen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit in beiden Versuchsreihen eine Beatmungsdauer von vierundzwanzig Stunden gewählt. Erstmals wurden hier zwei Perfluorocarbone direkt miteinander verglichen. Die histopathologische Quantifizierung erfolgte bei allen Tieren mittels etabliertem Scoringsystem.

In der vorliegenden Arbeit konnte der protektive Effekt einer Flüssigkeitsbeatmung mit Perfluorocarbonen gegenüber einer konventionellen Beatmung mit und ohne Surfactant auf die Lungenhistologie quantifiziert werden. Die Studie steht somit in Einklang zu früheren Untersuchungen (Hirschl et al. 1994; Quintel et al. 1998a; Rotta et al. 1999; Smith et al. 1997; van Eeden et al. 2000; Wolfson et al. 1992). Es zeigten sich in den Liquidgruppen im Vergleich zu den konventionellen Gasbeatmungsgruppen signifikant geringere Lungenschäden im Hinblick auf Ausbildung von Atelektasen und hyaline Membranen, Ödem- und Entzündungszeichen. Dabei ist die homogene Lungenexpansion der flüssigkeitsbeatmeten Tiere durch Vermeidung eines endexpiratorischen Kollaps und durch Rekrutierung bereits atelektatischer Alveolen in erster Linie auf die geringe Oberflächenspannung und das hohe spezifische Gewicht der Perfluorocarbone zurückzuführen. Der protektive Effekt einer Behandlung mit Perfluorocarbonen auf die alveoläre Mikrostruktur im Vergleich zur Flüssigkeiten mit höherer Oberflächenspannung oder Luft konnte in vitro bereits durch Bachofen et al. gezeigt werden (Bachofen et al. 1994).

In der PLV-Gruppe zeigte sich in den unteren Lungenabschnitten im Vergleich zu den oberen ein signifikant geringerer Lungenschaden. Es liegt nahe, auch dieses Phänomen auf die physikochemischen Eigenschaften der Perfluorocarbone zurückzuführen. Das hohe spezifische Gewicht der Substanzen, das im Vergleich zu Wasser etwa doppelt so hoch ist, führt zu einer preferentiellen Verteilung in den abhängigen Lungenabschnitten (Curtis et al. 1994). Im vorliegenden Versuchsprotokoll in Rücken- und Kopfhochlagerung erfolgt die Verteilung des PFC zugunsten der basalen Lungenabschnitte, sodass diese besser vor Barotrauma, Volutrauma und Sauerstofftoxizität geschützt werden konnten. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen kamen Smith et al. in einem ähnlichen Versuchsprotokoll bei einer 20-stündigen Flüssigkeitsbeatmung an neugeborenen Schweinen nach Surfactantdepletion

durch Kochsalzlavage zu entsprechenden Ergebnissen (Smith et al. 1997). Degraeuwe et al. fanden in ihrer Studie keine Verringerung der akuten Lungenschädigung im Vergleich zu einer konventionellen Beatmung. In dieser Arbeit betrug die Beatmungsdauer allerdings nur vier Stunden und die induzierte Lungenschädigung durch Lavage war gering (Degraeuwe et al. 1995).

Die Reduktion der pulmonalen Ödem- und Entzündungsreaktion kann durch den hohen Spreitungskoeffizienten der Perfluorocarbone erklärt werden, der zur Auskleidung der Alveolen mit einem Liquidfilm führt. Die Infiltration von Proteinen und Entzündungsmediatoren kann durch einen Tamponadeneffekt reduziert werden (Younger et al. 1997). Auch direkte antiinflammatorische Wirkungen der Substanzklasse konnten nachgewiesen werden (Rossman et al. 1996; Smith et al. 1995; Younger et al. 1997).

In keiner der histopathologischen Arbeiten (Hirschl et al. 1994; Quintel et al. 1998a; Rotta et al. 1999; Smith et al. 1997; van Eeden et al. 2000; Wolfson et al. 1992) wurde der Lungenschaden nach Liquidventilation mit der Lungenschädigung nach Surfactantsubstitution unter konventioneller Beatmung quantitativ verglichen. Da jedoch die Effizienz einer alternativen Beatmungsform an der Wirksamkeit der etablierten Therapien gemessen wird, wurde in der vorliegenden Arbeit anhand entsprechender Gruppen der direkte Vergleich erbracht. In der Analyse dieser Gruppen (CV+S und PLV) zeigte sich eine signifikant geringere Ausprägung der Lungenschädigung nach Flüssigkeitsbeatmung. Der geringeren Schädigung der unteren Abschnitte in der PLV-Gruppe liegt die bevorzugte Verteilung des PFC in den abhängigen Bezirken zugrunde. In der Gruppe CV+S kann eine ungleichmäßige Verteilung über den Sideport des Endotrachealtubus zugunsten der oberen Abschnitte die dort besseren Ergebnisse erklären.

In der zweiten Versuchsreihe konnte im Vergleich der 6h-Liquidventilation mit unterschiedlichen Perfluorocarbonen eine signifikant geringere Lungenschädigung in der FC-77- Gruppe nachgewiesen werden, die sich in allen histopathologischen Kriterien widerspiegelte. Sind in der POB-Gruppe

apikale und basale Lungenbezirke gleichmäßig von der Schädigung betroffen, zeigte sich in der FC-77-Gruppe eine signifikant geringere Lungenschädigung in den apikalen im Vergleich zu den basalen Lungenabschnitten. Da die hier zunächst liquidventilierten Tiere nach sechs Stunden weiter konventionell gasbeatmet wurden, kann man annehmen, daß sich verschiedene Phänomene mischen, und trotz der vorzugsweisen Verteilung der PFC in den abhängigen Regionen hier eine geringere Schädigung in den nicht-abhängigen Lungenregionen gefunden wurde. Ist bereits in vorausgegangenen Studien eine ungünstige Auswirkung beim Wechsel von Flüssigkeitsbeatmung zu Gasbeatmung beschrieben (Merz et al. 2001), zeigen diese Ergebnisse eine längeranhaltende Protektion durch das Perfluorocarbon FC-77.

Bei der Frage nach einem optimalen Perfluorocarbon in der klinischen Anwendung sind diese histopathologische Ergebnisse entscheidend. Die Lungen der POB-Gruppe wiesen insbesondere eine vermehrte Entzündungs- und Ödemreaktion auf, dem gegenüber war die Ausprägung von Dys- oder Atelektasen vergleichbar wie nach FC-77- Instillation.

Analysiert man die Perfluorocarbone FC-77 (als eine Mischung aus C8-F18 und C8-F16-0) und POB (C8- F13- Br) anhand ihrer physikalischen Eigenschaften, kann man feststellen, daß FC-77 bei ähnlichem Löslichkeitsverhalten für Sauerstoff und Kohlendioxyd eine geringere Viskosität, geringere Oberflächenspannung und einen höheren Spreitungskoeffizienten aufweist (vergleiche Tabelle 1). Diese Differenzen scheinen nicht zu Unterschieden in der Effizienz der homogenen Lungenexpansion und des Recruitments atelektatischer Regionen zu führen.

Das Perfluorocarbon FC-77 weist zusätzlich eine etwas geringere Dichte und einen erheblich höheren Dampfdruck im Vergleich zu POB auf. Ob diese Unterschiede in der Eigenschaft verantwortlich sind für das signifikant bessere histopathologische Outcome nach FC-77- Behandlung kann anhand der vorliegenden Untersuchungen nicht beantwortet werden. Für die Elimination der Perfluorocarbone durch Evaporation sind Dichte und Dampfdruck die entscheidenden Parameter. Die Instillation einer Menge von 30 ml kg^{-1} Körpergewicht und zusätzliche kontinuierliche Infusion von $3 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ist unter dem Aspekt des niedrigen Dampfdrucks und der geringen Dichte des Perfluorooctylbromid möglicherweise nicht optimal.

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse im Lungenschädigungs-Score kann man bezüglich der Ausprägung der Entzündungsreaktion eine größere antiinflammatorische Potenz des Perfluorocarbon FC-77 im Vergleich zu POB postulieren. Im Hinblick auf eine klinische Anwendung ist dies von entscheidender Relevanz, da nach heutigem Verständnis der pulmonale Inflamationsprozess als ein wichtiger Faktor sowohl in der Entstehung des Atemnotsyndroms als auch in der Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie gilt (Brus et al. 1996; Groneck und Speer 1997; Heikinheimo et al. 1992; Jobe and Ikegami 1998).

Die signifikant stärkere Lungenschädigung nach POB ist außer den bisher genannten Faktoren Folge einer intensiveren Beatmung. Der Oxygenierungsindex als Produkt aus inspiratorischer Sauerstoffkonzentration und Beatmungsmitteldruck war in der POB-Gruppe signifikant höher (Ergebnisse nicht demonstriert).

Das Phänomen des programmierten Zelltods durch Apoptose rückt aktuell zunehmend in das Zentrum des wissenschaftlichen Interesses, da dieser Mechanismus der kontrollierten Zellzerstörung nicht nur für eine Vielzahl physiologischer Prozesse, sondern auch für die Pathogenese einer großen Anzahl von Krankheitsentitäten eine zentrale Rolle zu spielen scheint.

Von Bardales et al. wurde beschrieben, daß Apoptose ein Hauptmechanismus der Zelldestruktion der Typ-II-Pneumozyten während des akuten Lungenversagens des Erwachsenen, und so am Organversagen grundlegend beteiligt ist. (Bardales et al. 1996). In einer anderen Studie (Polunovsky et al. 1993; Uhal 2002) wurde dem programmierten Zelltod eine entscheidende Rolle im Mechanismus des Remodeling nach akuter Lungenschädigung zugeschrieben. Auch an Lungen unreifer Frühgeborener mit schwerem Atemnotsyndrom konnten im Vergleich zu Früh- und Neugeborenen ohne Atemnotsymptomatik eine erhöhte Anzahl der durch apoptotische Prozesse zerstörten Lungenepithelzellen gefunden werden (Lukkarinen et al. 2003).

Gasbeatmung mit hohen Sauerstoffkonzentrationen, wie sie bei der Beatmung des Früh- und Neugeborenen zur Aufrechterhaltung einer adäquaten arteriellen Oxygenierung notwendig ist, führt zur Produktion exzessiver Mengen von Sauerstoffradikalen (Vento et al. 2000). Ebenfalls tragen bei Neugeborenen und

besonders bei Frühgeborenen niedrige Plasmakonzentrationen anti-oxidativer Enzyme zur ungenügender Protektion gegenüber freien Sauerstoffradikalen bei. Die erhöhten Konzentrationen freier Radikale führen zur vermehrten Oxydation pulmonaler Proteine, Lipide und Nukleinsäuren. In verschiedenen Studien ist untersucht worden, daß oxidativer Stress in den betroffenen Zellen in erster Linie Apoptose, und in sehr viel geringerem Maße Nekrose induziert (Payne et al. 1995; Slater et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit ist gleichzeitig zu den histopathologischen Untersuchungen das Ausmaß der Apoptose mittels TUNEL- Technik detektiert und im Apoptose-Index quantifiziert worden.

In allen untersuchten Gruppen einschließlich der Kontrollgruppe konnte das Vorhandensein apoptotischer Zellen nachgewiesen werden. Bei den flüssigkeitsbeatmeten Tiere zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede im Apoptose-Index. Dies bedeutet, daß keine Apoptose-Induktion durch Perfluorocarbone festgestellt werden konnte.

Das Vorkommen apoptotischer Zellen in allen untersuchten Lungen entspricht dem Verständnis der Apoptose als Regulationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase in Organen. Zusätzlich zu dieser im Lungengewebe vorkommenden "physiologischen" Apoptose konnte eine gesteigerte Apoptosehäufigkeit während der pränatalen und der frühen postnatalen Lungenentwicklung an fetalen Ratten und fetalen humanen Lungengewebskulturen gezeigt werden (Kresch et al. 1998; Scavo et al. 1998). Besitzt dieses Phänomen auch für neonatale Schweine eine Relevanz, so sind die Tiere aller Gruppen durch ihr Alter von 24 – 72 Lebensstunden gleichsam betroffen. Ein relevanter Einfluß der bronchoalveolären Lavage auf die Apoptosehäufigkeit konnte durch die Untersuchung der nicht lavagierten Tiere der Kontrollgruppe ausgeschlossen werden.

Bei Untersuchungen zur Apoptose während des Atemnotsyndroms fanden Mantell et al. und Otterbein et al. eine eindeutige Korrelation zwischen der Schwere eines Atemnotsyndroms und der Apoptosehäufigkeit. Diese Studien wurden an einem Modell des Atemnotsyndroms des Erwachsenen an Mäusen

bzw. an Ratten erhoben (Mantell et al. 1999; Mantell et al. 1997; Otterbein et al. 1998).

Eine Korrelation zwischen der histopathologischen Schädigung der Lungen und der prozentualen Häufigkeit von apoptotischen Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden. Vergleicht man die Werte der Lungenschädigungs- Scores mit den Apoptose-Indices, findet man beim Vorliegen einer geringen Lungenschädigung im histopathologischen Score bei den flüssigkeitsbeatmeten Tieren (PLV, FC-77, POB) vergleichbar hohe Apoptosehäufigkeiten im Apoptose-Index (AI).

Da Apoptose im vorliegenden Modell nicht direkter Ausdruck der Lungenschädigung ist, müssen andere Faktoren beteiligt sein, die zu Unterschieden im AI führen.

In früheren Studien an Erwachsenen- und Neugeborenen-Tiermodellen (Mantell et al. 1999) wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Hyperoxie und der Induktion eines programmierten Zelltods postuliert (Mantell et al. 1997; Otterbein et al. 1998). Konnte in diesen Untersuchungen eine Zunahme der Apoptosehäufigkeit nach Beatmung mit 100% Sauerstoff gefunden werden, so zeigten Untersuchungen an Zellkulturen pulmonaler Typ-II-Alveolarzellen nach direkter O₂-Exposition eine Zellschädigung ohne Apoptose (Franek et al. 2001; Kazzaz et al. 1999; Kazzaz et al. 1996; McGrath-Morrow and Stahl 2001).

Auch aus den hier erhobenen Ergebnissen ist ein direkter Zusammenhang zwischen Apoptose und Hyperoxie nicht offensichtlich. Obwohl die Tiere der CV-Gruppe und der CV+S-Gruppe zunächst während der Lungenlavage, später auch zur Aufrechterhaltung einer adäquaten Oxygenierung über längere Zeiträume als die übrigen Gruppen mit hohem F_iO₂ beatmet wurden, finden sich keine höheren, sondern niedrigere Apoptoseraten.

Für die klinische Verwendung von Perfluorocarbonen von entscheidender Relevanz ist die Frage, ob diese Substanzklasse über direkte oder indirekte Mechanismen selbst eine apoptoseauslösende Wirkung besitzt und damit nach bisherigem Kenntnisstand als unerwünschte Wirkung interpretiert werden müßte.

Da bei den liquidventilierten Tiere sowohl der PLV-Gruppe über 24 Stunden, als auch bei den für 6 Stunden PFC-beatmeten Tieren der FC-77- Gruppe und der POB-Gruppe keine signifikant höheren Apoptose-Indices als für die Kontrollgruppe gefunden wurde, konnte eine Apoptose-Induktion durch Perfluorocarbone selbst ausgeschlossen werden.

Die Tatsache, daß bei den Tieren nach konventioneller Gasventilation signifikant geringere Apoptose-Indices im Vergleich mit der Kontrollgruppe gefunden wurden, erscheint auf den ersten Blick überraschend. Da jedoch in der vorliegenden Arbeit die Höhe des AI nicht positiv mit der Schwere des Atemnotsyndroms bzw. der iatrogenen Lungenschädigung durch die Beatmung korreliert, ist der Apoptose-Index weder Ausdruck der Lungenschädigung noch der Qualität der Beatmung.

Die hier erhobenen Ergebnisse zeigen, daß die niedrigeren Apoptose-Indices nach Gasventilation mit hohen F_iO_2 einen Zelluntergang, der nicht programmiert, sondern in erster Linie unprogrammiert als Nekrose verläuft, induziert, wie zuvor beschrieben (Payne et al. 1995; Slater et al. 1995). Selbst wenn im Initialstadium des Atemnotsyndroms und durch direkte Sauerstofftoxizität auch vermehrt apoptotische Prozesse angenommen werden können, konnten diese Phänomene weder mittels TUNEL noch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen aufgedeckt werden. Dies ist dadurch begründet, daß Apoptose als ein rasch ablaufender Prozess gekennzeichnet ist, der keine Spuren im Gewebe hinterläßt.

In einer ähnlichen Studie an 56 frühgeborenen Lämmern kommen Mantell et al. bezüglich des signifikant höheren AI in ihren flüssigkeitsbeatmeten im Vergleich zu den gasventilierten Tieren zu entsprechenden Ergebnissen (Mantell et al. 2002). In dieser Untersuchung konnten zusätzlich unterschiedliche Verteilungsmuster der apoptotischen Zellen nach den verschiedenen Beatmungsformen aufgezeigt werden. Während sich nach Gasventilation eine klusterartige Apoptoseverteilung an Oberfläche und Lumen der proximalen Atemwege zeigte, konnte nach Liquidventilation eine homogene, diffuse Verteilung, die alle Atemwege in ähnlicher Ausprägung betraf, gefunden werden.

Es gibt eine große Anzahl bekannter und unbekannter „Induktoren“ des programmierten Zelltods. Wichtige Einflußgrößen in experimentellen Studien sind offensichtlich das Modell des Atemnotsyndroms, die Dauer der Beatmung als auch das Tiermodell. So ist es schwierig, kausale Zusammenhänge im Vergleich mit anderen Studien zu belegen.

Auch wenn in anderen Studienprotokollen direkte Zusammenhänge zwischen einerseits der Schwere des Atemnotsyndroms und Apoptose (Mantell et al. 1999; Mantell et al. 1997; Otterbein et al. 1998) und andererseits zwischen Hyperoxie und Apoptose-Induktion postuliert wurden (Mantell et al. 1997; Otterbein et al. 1998), ist aus der vorliegenden Arbeit, der ein am klinischen Einsatz orientiertes Versuchsprotokoll zugrunde liegt, ersichtlich, daß diese Zusammenhänge nicht direkt korrelieren.

Sowohl durch die Auswahl des Schweins als Modelltier, bei dem eine hohe Übereinstimmung bezüglich Lungenphysiologie und -pathologie mit dem Menschen besteht, als auch durch die Durchführung der Beatmung über 24 Stunden, erscheinen die Ergebnisse der vorliegenden Studie besser auf Früh- und Neugeborener übertragbar.

Um den genauen Einfluß der Apoptose auf die Pathophysiologie des Atemnotsyndroms und ihre Bedeutung während der Beatmung zu untersuchen, sind weitere experimentelle und klinische Studien notwendig, die einzeln bereits vorliegen (Hargitai et al. 2001; Lukkarinen et al. 2003).

Insbesondere die Aufdeckung molekularer Mechanismen im Apoptose-Pathway kann zukünftig möglicherweise zum besseren Verständnis der Rolle der Apoptose während des Atemnotsyndroms des Neugeborenen beitragen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Atemnotsyndrom des Früh- und Neugeborenen hat trotz einer ständigen Erweiterung der therapeutischen Strategien in der neonatologischen Intensivmedizin weiterhin einen hohen Anteil an der Gesamtmorbidität und -letalität hospitalisierter Neugeborener.

Bei der Suche nach alternativen Beatmungsformen stehen heute vor allem protektive Methoden im Vordergrund, die die physiologische Lungenstruktur und -funktion erhalten, und iatrogene Schädigungen vermeiden. Mit der partiellen Liquidventilation steht durch die intratracheale Anwendung gastragender Flüssigkeiten aus der Substanzklasse der Perfluorocarbone ein alternatives Beatmungsverfahren zur Verfügung.

Für eine klinische Anwendung sind neben der Verbesserung des Gasaustauschs und der Lungenmechanik auch Histomorphologie und ultrastrukturelle Veränderungen, wie Apoptose-Induktion von entscheidender Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit war es, an einem neonatalen Tiermodell einer schweren respiratorischen Insuffizienz durch Surfactantmangel den protektiven Effekt der partiellen Liquidventilation auf die Lungenmorphologie beim Einsatz zweier unterschiedlicher Perfluorocarbone im Langzeitexperiment zu quantifizieren. Es wurden 30 neugeborene Schweine nach Induktion eines Lungenschadens durch Kochsalzlavage in 3 Gruppen CV (konventionelle Gasbeatmung), CV+S (konventionelle Gasbeatmung mit Surfactant-Substitution), PLV (partielle Flüssigkeitsbeatmung), und in einer zweiten Versuchsanordnung in den Gruppen FC-77 und POB (partielle Flüssigkeitsbeatmung mit FC-77 bzw. POB, anschließend konventionelle Beatmung) untersucht. Vier Tiere erhielten als Kontrolltiere keine Lungenlavage. Nach 24 Stunden erfolgte die histopathologische Beurteilung und Anfärbung apoptotischer Zellkerne mittels der TUNEL-Methode.

In der vorliegenden Untersuchung konnte eine signifikant geringere histologische Lungenschädigung nach einer partiellen Flüssigkeitsbeatmung im Vergleich zu einer Gasbeatmung mit oder ohne Surfactant erbracht werden. Alle Bewertungskriterien waren hierbei gleichsinnig betroffen. Die

Lungenschädigung war in den flüssigkeitsbeatmeten Tieren in den basalen Lungenabschnitten in signifikant geringerer Ausprägung nachzuweisen.

Bei der Untersuchung zweier für die Anwendung zur Verfügung stehender Perfluorocarbone, FC-77 und POB, konnte ein signifikant geringerer Lungenschaden in den mit FC-77 beatmeten Tieren nachgewiesen werden.

Da Apoptose möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Lungenschädigung im Rahmen des neonatalen Atemnotsyndrom spielt, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Apoptosehäufigkeiten an Lungen gasbeatmeter und flüssigkeitsbeatmeter Tiere zu untersuchen.

Anhand des Apoptoseindex, konnte sowohl in der nicht beatmeten Kontrollgruppe als auch in allen weiteren fünf Untersuchungsgruppen das Vorhandensein einzelner apoptotischer Zellen nachgewiesen werden. Es zeigten sich bei den liquidventilierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede.

Die erhobenen Ergebnisse sind im Hinblick auf eine klinische Anwendung der Flüssigkeitsbeatmung mit Perfluorocarbonen von Bedeutung, untermauern sie doch die Überlegenheit der PLV im Vergleich mit einer konventionellen Gasbeatmung in diesem Tiermodell einer schweren respiratorischen Insuffizienz durch quantitative histopathologische Untersuchungen. Desweiteren konnten bei den mit PFC behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Atemnotsyndrom keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Apoptosehäufigkeit gefunden werden.

Diese Arbeit unterstützt die Erwartungen, daß die Flüssigkeitsbeatmung mit Perfluorocarbonen eine geeignete alternative Therapieform zur Behandlung der respiratorischen Insuffizienz des Früh- und Neugeborenen darstellen kann. Einem Einsatz der partiellen Liquidventilation insbesondere in der Neonatologie müssen allerdings randomisierte klinische Studien vorausgehen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Avery, M., and Mead, J. (1959). "Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease." *Am J Dis Child*, 97, 517-523.
- Avery, M. E., and Merritt, T. A. (1991). "Surfactant-replacement therapy." *N Engl J Med*, 324(13), 910-2.
- Bachofen, H., Schurch, S., and Possmayer, F. (1994). "Disturbance of alveolar lining layer: effects on alveolar microstructure." *J Appl Physiol*, 76(5), 1983-92.
- Bardales, R. H., Xie, S. S., Schaefer, R. F., and Hsu, S. M. (1996). "Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury." *Am J Pathol*, 149(3), 845-52.
- Blennerhassett, J. B. (1985). "Shock lung and diffuse alveolar damage pathological and pathogenetic considerations." *Pathology*, 17(2), 239-47.
- Brus, F., van Oeveren, W., Okken, A., and Bambang, S. O. (1996). "Activation of circulating polymorphonuclear leukocytes in preterm infants with severe idiopathic respiratory distress syndrome." *Pediatr Res*, 39(3), 456-63.
- Clark, L., and Gollan, F. (1966). "Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure." *Science*, 152, 1755-1756.
- Clements, J. (1957). "Surface tension of lung extracts." *Proc Soc Exp Biol Med*, 95, 170-172.
- Clements, J., Hustead, R., Johnson, R., and Gribetz, I. (1961). "Pulmonary surface tension and alveolar stability." *J App Physiol*, 16, 444-450.
- Cohen, J. J. (1993). "Apoptosis." *Immunol Today*, 14(3), 126-30.
- Colton, D., Hirschl, R., KJ, J., GO, T., SB, D., and RH, B. (1994). "Neutrophil infiltration is reduced during partial perfluorocarbon liquid ventilation in the setting of lung injury." *Surg Forum*, 1055, 668-670.
- Curtis, S. E., Peek, J. T., and Kelly, D. R. (1993). "Partial liquid breathing with perflubron improves arterial oxygenation in acute canine lung injury." *J Appl Physiol*, 75(6), 2696-702.
- Curtis, S. E., Tilden, S. J., Bradley, W. E., and Cain, S. M. (1994). "Effect of continuous rotation on the efficacy of partial liquid (perflubron) breathing in canine acute lung injury." *Adv Exp Med Biol*, 361, 449-56.
- Degraeuwe, P. L., Vos, G. D., and Blanco, C. E. (1995). "Perfluorochemical liquid ventilation: from the animal laboratory to the intensive care unit." *Int J Artif Organs*, 18(10), 674-83.
- Dini, L., Coppola, S., Ruzittu, M. T., and Ghibelli, L. (1996). "Multiple pathways for apoptotic nuclear fragmentation." *Exp Cell Res*, 223(2), 340-7.
- Ebbecke, K., and Jorch, G. (1993). "Surfactant therapy in severe neonatal respiratory failure--multicenter study--I. Surfactant therapy in 264 premature infants of < 34 weeks with IRDS with special reference to 'non-responders' " *Klin Pdiatr*, 205(2), 71-5.

- Falcieri, E., Gobbi, P., Zamaï, L., and Vitale, M. (1994). "Ultrastructural features of apoptosis." *Scanning Microsc*, 8(3), 653-65; discussion 665-6.
- Fanconi, A., Stoll, W., Bossi, E., and Prod'hom, S. (1976). "Das Atemnotsyndrom des Neugeborenen in der Schweiz." *Schweiz. med. Wschr.*, 106, 1426-1429.
- Fixsen, W., Sternberg, P., Ellis, H., and Horvitz, R. (1985). "Genes that affect cell fates during the development of *Caenorhabditis elegans*." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 50, 99-104.
- Franek, W. R., Horowitz, S., Stansberry, L., Kazzaz, J. A., Koo, H. C., Li, Y., Arita, Y., Davis, J. M., Mantell, A. S., Scott, W., and Mantell, L. L. (2001). "Hyperoxia inhibits oxidant-induced apoptosis in lung epithelial cells." *J Biol Chem*, 276(1), 569-75.
- Fuhrman, B. P., Paczan, P. R., and DeFrancis, M. (1991). "Perfluorocarbon-associated gas exchange." *Crit Care Med*, 19(5), 712-22.
- Fujiwara, T., Maeta, H., Chida, S., Morita, T., Watabe, Y., and Abe, T. (1980). "Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease." *Lancet*, 1(8159), 55-9.
- Gattinoni, L., Pesenti, A., Bombino, M., Baglioni, S., Rivolta, M., Rossi, F., Rossi, G., Fumagalli, R., Marcolin, R., Mascheroni, D., and et al. (1988). "Relationships between lung computed tomographic density, gas exchange, and PEEP in acute respiratory failure." *Anesthesiology*, 69(6), 824-32.
- Gauger, P. G., Overbeck, M. C., Chambers, S. D., Cailipan, C. I., and Hirschl, R. B. (1998). "Partial liquid ventilation improves gas exchange and increases EELV in acute lung injury." *J Appl Physiol*, 84(5), 1566-72.
- Gauger, P. G., Pranikoff, T., Schreiner, R. J., Moler, F. W., and Hirschl, R. B. (1996). "Initial experience with partial liquid ventilation in pediatric patients with the acute respiratory distress syndrome." *Crit Care Med*, 24(1), 16-22.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A. (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." *J Cell Biol*, 119(3), 493-501.
- Giedion, A., Haeffliger, H., and Dangel, P. (1973). "Acute pulmonary X-ray changes in hyaline membrane disease treated with artificial ventilation and positive end-expiratory pressure (PEP)." *Pediatr Radiol*, 1(3), 145-52.
- Gong, J., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z. (1994). "A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry." *Anal Biochem*, 218(2), 314-9.
- Greenspan, J. S., Wolfson, M. R., Rubenstein, S. D., and Shaffer, T. H. (1990). "Liquid ventilation of human preterm neonates." *J Pediatr*, 117, 106-11.
- Groneck, P., and Speer, C. P. (1997). "Pulmonary inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia." *Pediatr Pulmonol Suppl*, 16, 29-30.
- Hargitai, B., Szabo, V., Hajdu, J., Harmath, A., Pataki, M., Farid, P., Papp, Z., and Szende, B. (2001). "Apoptosis in various organs of preterm infants: histopathologic study of lung, kidney, liver, and brain of ventilated infants." *Pediatr Res*, 50(1), 110-4.
- Heikinheimo, M., Halila, R., Marttinen, E., and Raivio, K. (1992). "N-terminal propeptide of type III collagen in tracheal fluid and serum in preterm infants at risk for bronchopulmonary dysplasia." *Pediatr Res*, 31, 340-3.
- Hirschl, R. B., Merz, S. I., Montoya, J. P., Parent, A., Wolfson, M. R., Shaffer, T. H., and Bartlett, R. H. (1995a). "Development and application of a simplified liquid ventilator." *Crit Care Med*, 23(1), 157-63.

- Hirschl, R. B., Overbeck, M. C., Parent, A., Hernandez, R., Schwartz, S., Dosanjh, A., Johnson, K., and Bartlett, R. H. (1994). "Liquid ventilation provides uniform distribution of perfluorocarbon in the setting of respiratory failure." *Surgery*, 116(2), 159-67; discussion 167-8.
- Hirschl, R. B., Parent, A., Tooley, R., McCracken, M., Johnson, K., Shaffer, T. H., Wolfson, M. R., and Bartlett, R. H. (1995b). "Liquid ventilation improves pulmonary function, gas exchange, and lung injury in a model of respiratory failure." *Ann Surg*, 221(1), 79-88.
- Hirschl, R. B., Pranikoff, T., Gauger, P., Schreiner, R. J., Dechert, R., and Bartlett, R. H. (1995c). "Liquid ventilation in adults, children, and full-term neonates." *Lancet*, 346(8984), 1201-2.
- Hirschl, R. B., Pranikoff, T., Wise, C., Overbeck, M. C., Gauger, P., Schreiner, R. J., Dechert, R., and Bartlett, R. H. (1996a). "Initial experience with partial liquid ventilation in adult patients with the acute respiratory distress syndrome." *Jama*, 275(5), 383-9.
- Hirschl, R. B., Tooley, R., Parent, A., Johnson, K., and Bartlett, R. H. (1996b). "Evaluation of gas exchange, pulmonary compliance, and lung injury during total and partial liquid ventilation in the acute respiratory distress syndrome." *Crit Care Med*, 24(6), 1001-8.
- Hirschl, R. B., Tooley, R., Parent, A. C., Johnson, K., and Bartlett, R. H. (1995d). "Improvement of gas exchange, pulmonary function, and lung injury with partial liquid ventilation. A study model in a setting of severe respiratory failure." *Chest*, 108(2), 500-8.
- Jobe, A. H. (1993). "Pulmonary surfactant therapy." *N Engl J Med*, 328(12), 861-8.
- Jobe, A. H., and Ikegami, M. (1998). "Mechanisms initiating lung injury in the preterm." *Early Hum Dev*, 53(1), 81-94.
- Kaisers, U., Max, M., Walter, J., Kuhlen, R., Pappert, D., Falke, K., and Rossaint, R. (1997). "Partial liquid ventilation with small volumes of FC 3280 increases survival time in experimental ARDS." *Eur Respir J*, 10(9), 1955-61.
- Katzenstein, A. L., Bloor, C. M., and Leibow, A. A. (1976). "Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review." *Am J Pathol*, 85(1), 209-28.
- Kazzaz, J. A., Horowitz, S., Li, Y., and Mantell, L. L. (1999). "Hyperoxia in cell culture. A non-apoptotic programmed cell death." *Ann N Y Acad Sci*, 887, 164-70.
- Kazzaz, J. A., Xu, J., Palaia, T. A., Mantell, L., Fein, A. M., and Horowitz, S. (1996). "Cellular oxygen toxicity. Oxidant injury without apoptosis." *J Biol Chem*, 271(25), 15182-6.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer*, 26(4), 239-57.
- Kresch, M. J., Christian, C., Wu, F., and Hussain, N. (1998). "Ontogeny of apoptosis during lung development." *Pediatr Res*, 43(3), 426-31.
- Lachmann, B., Robertson, B., and Vogel, J. (1980). "In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome." *Acta Anaesthesiol Scand*, 24(3), 231-6.
- Leach, C. L., Fuhrman, B. P., Morin, F. C., 3rd, and Rath, M. G. (1993). "Perfluorocarbon-associated gas exchange (partial liquid ventilation) in respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, controlled study." *Crit Care Med*, 21(9), 1270-8.
- Leach, C. L., Greenspan, J. S., Rubenstein, S. D., Shaffer, T. H., Wolfson, M. R., Jackson, J. C., DeLemos, R., and Fuhrman, B. P. (1996). "Partial liquid ventilation with perflubron in premature infants with severe respiratory distress syndrome. The LiquiVent Study Group." *N Engl J Med*, 335(11), 761-7.

- Lukkarinen, H. P., Laine, J., and Kaapa, P. O. (2003). "Lung epithelial cells undergo apoptosis in neonatal respiratory distress syndrome." *Pediatr Res*, 53(2), 254-9.
- Mantell, L. L., Horowitz, S., Davis, J. M., and Kazzaz, J. A. (1999). "Hyperoxia-induced cell death in the lung--the correlation of apoptosis, necrosis, and inflammation." *Ann N Y Acad Sci*, 887, 171-80.
- Mantell, L. L., Kazzaz, J. A., and Xu, J. P., T.A. (1997). "Unscheduled apoptosis during acute inflammatory lung injury." *Cell death and differentiation*, 4, 600-607.
- Mantell, L. L., Shaffer, T. H., Horowitz, S., Foust, R., 3rd, Wolfson, M. R., Cox, C., Khullar, P., Zakeri, Z., Lin, L., Kazzaz, J. A., Palaia, T., Scott, W., and Davis, J. M. (2002). "Distinct patterns of apoptosis in the lung during liquid ventilation compared with gas ventilation." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283(1), L31-41.
- Mariani, G. L., and Carlo, W. A. (1998). "Ventilatory management in neonates. Science or art?" *Clin Perinatol*, 25(1), 33-48.
- McGrath-Morrow, S. A., and Stahl, J. (2001). "Apoptosis in neonatal murine lung exposed to hyperoxia." *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25(2), 150-5.
- Merz, U., Kellinghaus, M., Hausler, M., Rose, E., Honchen, H., and Klosterhalfen, B. (2000). "Effects of prolonged partial liquid ventilation, high frequency ventilation and conventional ventilation on gas exchange and lung pathology in newborn surfactant-depleted piglets." *Shock*, 13(6), 472-7.
- Merz, U., Klosterhalfen, B., Kellinghaus, M., Peschgens, T., Pluschke, S., and Hornchen, H. (2001). "Effects of single and multiple doses of perfluorocarbon in comparison with continuous partial liquid ventilation on gas exchange and lung pathology in newborn surfactant-depleted pigs." *Crit Care Med*, 29(3), 645-651.
- Merz, U., Klosterhalfen, B., Hausler, M., Kellinghaus, M., Peschgens, T., and Hornchen, H. (2002). "Partial liquid ventilation reduces release of leukotriene B4 and interleukin-6 in bronchoalveolar lavage in surfactant-depleted newborn pigs." *Pediatric Research*, 51(2), 183-9.
- Modell, J., Newby, E., and Ruiz, B. (1970). "Long-term survival of dogs after breathing oxygenated fluorocarbon liquid." *Federation Proceedings*, 29, 1731-1736.
- Moskowitz, G. D. (1970). "A mechanical respirator for control of liquid breathing." *Fed Proc*, 29(5), 1751-2.
- Otterbein, L. E., Chin, B. Y., Mantell, L. L., Stansberry, L., Horowitz, S., and Choi, A. M. (1998). "Pulmonary apoptosis in aged and oxygen-tolerant rats exposed to hyperoxia." *Am J Physiol*, 275, L14-20.
- Overbeck, M. C., Pranikoff, T., and Hirschl, R. B. (1996). "Partial liquid ventilation provides effective gas exchange in a large animal model." *J Crit Care*, 11(1), 37-42.
- Papo, M. C., Paczan, P. R., Fuhrman, B. P., Steinhorn, D. M., Hernan, L. J., Leach, C. L., Holm, B. A., Fisher, J. E., and Kahn, B. A. (1996). "Perfluorocarbon-associated gas exchange improves oxygenation, lung mechanics, and survival in a model of adult respiratory distress syndrome." *Crit Care Med*, 24(3), 466-74.
- Payne, C. M., Bernstein, C., and Bernstein, H. (1995). "Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, DNA damage and signal-transduction pathways." *Leuk Lymphoma*, 19(1-2), 43-93.
- Polunovsky, V. A., Chen, B., Henke, C., Snover, D., Wendt, C., Ingbar, D. H., and Bitterman, P. B. (1993). "Role of mesenchymal cell death in lung remodeling after injury." *J Clin Invest*, 92(1), 388-97.

- Quintel, M., Heine, M., Hirschl, R. B., Tillmanns, R., and Wessendorf, V. (1998a). "Effects of partial liquid ventilation on lung injury in a model of acute respiratory failure: a histologic and morphometric analysis." *Crit Care Med*, 26(5), 833-43.
- Quintel, M., Hirschl, R. B., Roth, H., Loose, R., and van Ackern, K. (1998b). "Computer tomographic assessment of perfluorocarbon and gas distribution during partial liquid ventilation for acute respiratory failure." *Am J Respir Crit Care Med*, 158(1), 249-55.
- Robertson, B. (1984). "Surfactant replacement in neonatal and adult respiratory distress syndrome." *Eur J Anaesthesiol*, 1(4), 335-43.
- Rossman, J. E., Caty, M. G., Rich, G. A., Karamanoukian, H. L., and Azizkhan, R. G. (1996). "Neutrophil activation and chemotaxis after in vitro treatment with perfluorocarbon." *J Pediatr Surg*, 31(8), 1147-50; discussion 1150-1.
- Rotta, A. T., Gunnarsson, B., Hernan, L. J., Fuhrman, B. P., and Steinhorn, D. M. (1999). "Partial liquid ventilation influences pulmonary histopathology in an animal model of acute lung injury." *J Crit Care*, 14(2), 84-92.
- Scavo, L. M., Ertsey, R., Chapin, C. J., Allen, L., and Kitterman, J. A. (1998). "Apoptosis in the development of rat and human fetal lungs." *Am J Respir Cell Mol Biol*, 18(1), 21-31.
- Schwartz, R. M., Luby, A. M., Scanlon, J. W., and Kellogg, R. J. (1994). "Effect of surfactant on morbidity, mortality, and resource use in newborn infants weighing 500 to 1500 g." *N Engl J Med*, 330(21), 1476-80.
- Shaffer, T. H., Lowe, C. A., Bhutani, V. K., and Douglas, P. R. (1984). "Liquid ventilation: effects on pulmonary function in distressed meconium-stained lambs." *Pediatr Res*, 18(1), 47-52.
- Shaffer, T. H., Rubenstein, D., Moskowitz, D., and Delivoria-Papadopoulos, M. (1976). "Gaseous exchange and acid-base balance in premature lambs during liquid ventilation since birth." *Pediatr Res*, 10(4), 227-31.
- Skalka, M., Cejkova, M., and Matyasova, J. (1976). "The sensitivity of chromatin from thymuses and spleens of irradiated mice to alkaline solutions." *Folia Biol*, 22(5), 335-42.
- Slater, A. F., Stefan, C., Nobel, I., van den Dobbelsteen, D. J., and Orrenius, S. (1995). "Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis." *Toxicol Lett*, 82-83, 149-53.
- Smith, K. M., Mrozek, J. D., Simonton, S. C., Bing, D. R., Meyers, P. A., Connett, J. E., and Mammel, M. C. (1997). "Prolonged partial liquid ventilation using conventional and high-frequency ventilatory techniques: gas exchange and lung pathology in an animal model of respiratory distress syndrome." *Crit Care Med*, 25(11), 1888-97.
- Smith, T. M., Steinhorn, D. M., Thusu, K., Fuhrman, B. P., and Dandona, P. (1995). "A liquid perfluorochemical decreases the in vitro production of reactive oxygen species by alveolar macrophages." *Crit Care Med*, 23(9), 1533-9.
- Steinhorn, D. M., Leach, C. L., Fuhrman, B. P., and Holm, B. A. (1996). "Partial liquid ventilation enhances surfactant phospholipid production." *Crit Care Med*, 24(7), 1252-6.
- Steller, H. (1995). "Mechanisms and genes of cellular suicide." *Science*, 267(5203), 1445-9.
- Tooley, R., Hirschl, R. B., Parent, A., and Bartlett, R. H. (1996). "Total liquid ventilation with perfluorocarbons increases pulmonary end- expiratory volume and compliance in the setting of lung atelectasis." *Crit Care Med*, 24(2), 268-73.
- Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (1989). "Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis." *Science*, 245(4915), 301-5.

- Tütüncü, A., and Lachmann, B. (1995). "Effects of partial liquid ventilation on gas exchange and lung mechanics in healthy animals." *App. Cardiopul Pathophysiol*, 5, 195-199.
- Tütüncü, A. S., Akpir, K., Mulder, P., Faithfull, N. S., Erdmann, W., and Lachmann, B. (1992). "Gas exchange and lung mechanics during long-term mechanical ventilation with intratracheal perfluorocarbon administration in respiratory distress syndrome." *Adv Exp Med Biol*, 317, 401-7.
- Tütüncü, A. S., Faithfull, N. S., and Lachmann, B. (1993). "Intratracheal perfluorocarbon administration combined with mechanical ventilation in experimental respiratory distress syndrome: dose-dependent improvement of gas exchange." *Crit Care Med*, 21(7), 962-9.
- Uhal, B. D. (2002). "Apoptosis in lung fibrosis and repair." *Chest*, 122(6 Suppl), 293S-298S.
- van Eeden, S. F., Klut, M. E., Leal, M. A., Alexander, J., Zonis, Z., and Skippen, P. (2000). "Partial liquid ventilation with perfluorocarbon in acute lung injury: light and transmission electron microscopy studies." *Am J Respir Cell Mol Biol*, 22(4), 441-50.
- Vaux, D. L., and Korsmeyer, S. J. (1999). "Cell death in development." *Cell*, 96(2), 245-54.
- Vento, G., Mele, M. C., Mordente, A., Romagnoli, C., Matassa, P. G., Zecca, E., Zappacosta, B., and Persichilli, S. (2000). "High total antioxidant activity and uric acid in tracheobronchial aspirate fluid of preterm infants during oxidative stress: an adaptive response to hyperoxia?" *Acta Paediatr*, 89(3), 336-42.
- Weiswasser, J., Lueders, M., and Stolar, C. J. (1998). "Pressure- versus volume-cycled ventilation in liquid-ventilated neonatal piglet lungs." *J Pediatr Surg*, 33(7), 1158-62.
- Wolfson, M. R., Greenspan, J. S., Deoras, K. S., Rubenstein, S. D., and Shaffer, T. H. (1992). "Comparison of gas and liquid ventilation: clinical, physiological, and histological correlates." *J Appl Physiol*, 72(3), 1024-31.
- Young, T. E., Kruyer, L. S., Marshall, D. D., and Bose, C. L. (1999). "Population-based study of chronic lung disease in very low birth weight infants in North Carolina in 1994 with comparisons with 1984. The North Carolina Neonatologists Association." *Pediatrics*, 104(2), e17.
- Younger, J. G., Taqi, A. S., Till, G. O., and Hirschl, R. B. (1997). "Partial liquid ventilation protects lung during resuscitation from shock." *J Appl Physiol*, 83(5), 1666-70.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1993). "The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme." *Cell*, 75(4), 641-52.

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Universitätsprofessor Dr. med. H. Hörnchen, Leiter des Lehr- und Forschungsgebietes Neonatologische Intensivmedizin der RWTH Aachen, für die Möglichkeit zu dieser Dissertation.

Besonders danke ich meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. U. Merz dafür, dass er mich so herzlich in sein Doktorandenteam, bestehend aus Stefanie Pluschke, Elmar Rose, Neda Pakrawan, Elli Staikou, Ralf Müllenbach und Alexandra Kurth aufgenommen hat und meine Arbeit praktisch und theoretisch professionell betreut hat. Bei Frau Dr. med. Melanie Ahaus möchte ich mich bedanken, da sie meinen beruflichen Werdegang nicht nur während der Experimente, sondern auch später als Kollegin in der Kinderklinik begleitet und positiv geprägt hat.

Herrn Professor Dr. med. B. Klosterhalfen danke ich für die menschliche und technische Hilfe bei der Auswertung der histologischen Befunde.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich nicht nur während meiner Ausbildung, sondern auch bei der Fertigstellung dieser Arbeit vielseitig unterstützen und mir so die Möglichkeit gaben, mit viel Freude meinen Beruf zu erlernen.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Eva Gesine Berkemeier
geboren am	13. Mai 1975
in	Aachen
Konfession	römisch - katholisch
Familienstand	ledig

Schul Ausbildung

1981-1985	Gemeinschaftsgrundschule Klinkheide, Herzogenrath
1985-1994	Privates St. Ursula- Gymnasium, Aachen Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/94 – 08/96	Vorklinisches Studium der Medizin an der RWTH Aachen
08/96	Ärztliche Vorprüfung
10/96 – 04/2000	Klinisches Studium der Medizin an der RWTH Aachen
08/97	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2000 – 03/2001	Praktisches Jahr
18/05/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

06/2001	Vorläufige Approbation als Ärztin
07/2001-01/2003	Tätigkeit als Ärztin im Praktikum in der Kinderklinik der RWTH Aachen
seit 01/2003	Approbation als Ärztin Tätigkeit als Assistenzärztin in der Kinderklinik der RWTH Aachen