

**Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck**

Direktor: Prof. Dr. med. Egbert Herting

**Einfluß von Polymyxin B auf die biophysikalische Aktivität von exogenem
Surfactant und das Wachstum von Bakterien**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Philipp Jung
aus Kassel

Lübeck 2012

1. Berichterstatter

Prof. Dr. med. E. Herting

2. Berichterstatter

Prof. Dr. med. Jan Rupp

Tag der mündlichen Prüfung:

03.06.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

03.06.2013

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I	
Abkürzungsverzeichnis	III	
Inhalt		
1.	Einleitung	1
1.1	Surfactant	1
1.1.1	Historische Übersicht	1
1.1.2	Zusammensetzung	3
1.1.3	Metabolismus	7
1.1.4	Funktion	10
1.2	Mekonium	11
1.2.1	Zusammensetzung	11
1.3	Polymyxin B	12
1.4	Surfactantassoziierte Erkrankungen	15
1.4.1	Mekoniumaspirationssyndrom (MAS)	16
	Häufigkeit und Zahlen	16
	Pathophysiologie	17
	Therapie	19
1.4.2	Konnatale Pneumonie	20
	Pathophysiologie	22
	Erreger und Therapie	23
2.	Fragestellung	27
3.	Material und Methoden	28
3.1	Mekonium und seine Aufarbeitung	28
3.2	Surfactant und Polymyxin B	30
3.3	Bestimmung der Oberflächenspannung	31
3.4	Ermittlung des Bakterienwachstums	35
3.5	Statistische Analyse	39
4.	Ergebnisse	40
4.1	Mekoniumgewinnung	40
4.2	Messung der Oberflächenaktivität	40
4.3	Bakterienwachstum	43
5.	Diskussion	46
6.	Zusammenfassung	59

7.	Literaturverzeichnis	61
8.	Danksagung	73
9.	Lebenslauf	74

Abkürzungsverzeichnis

AMP	antimikrobielle Peptide
CPAP	Continuous Positiv Airway Pressure; kontinuierlicher positiv-endexpiratorischer Druck
DPPC	Dipalmytoylphosphatidylcholin; Synonym: Lecithin
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECMO	extracorporale Membranoxygenierung
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
GBS	Gruppe-B-Streptokokken, Synonym <i>Streptokokkus agalactiae</i>
HFOV	Hochfrequenz Oszillations Ventilation
iNO	inhalatives Stickstoffmonoxyd
KBE	koloniebildende Einheit
MAS	Mekoniumaspirationssyndrom
nCPAP	nasal applizierter kontinuierlicher positiv-endexpiratorischer Druck
PBS	Pulsating Bubble Surfactometer
PBS-Puffer	Phosphate buffered Saline
PPHN	persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
PxB	Polymyxin B
RDS	Respiratory Distress Syndrome
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptokokkus pyogenes</i>
SP	Surfactantprotein
SSW	Schwangerschaftswoche
<i>Staph. aureus</i>	<i>Staphylokokkus aureus</i>
Surfactant	Surface active agent
TTP	thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

1. Einleitung

Das respiratorische Versagen zählt bei Früh- und Neugeborenen immer noch zu einer der wichtigsten und schwerwiegendsten Komplikationen. Die Funktionseinschränkung des Surfactantsystems spielt in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle. Durch verschiedene Mechanismen kann sowohl das Mekoniumaspirationssyndrom (MAS), noch mehr aber eine pulmonale Infektion, wie zum Beispiel die konnatale Pneumonie, hierfür ursächlich sein.

1.1 Surfactant

Das Wort Surfactant, zusammengesetzt aus Bestandteilen der Wörter „**surface active agent**“, also „oberflächenaktive Substanz“, beschreibt ein Gemisch verschiedener Stoffe, das die terminalen Luftwege von innen auskleidet. Surfactant sorgt für eine Senkung der Oberflächenspannung und somit für eine Verbesserung der Dehnbarkeit der Lunge (Compliance) und verhindert zusätzlich den endexpiratorischen Kollaps der Alveolen.

1.1.1 Historische Übersicht

Den vermutlichen Anfang auf dem Weg zum exogenen Surfactantpräparat machte 1929 Kurt von Neergaard, der sich mit der Erforschung der Oberflächenspannung in der Lunge beschäftigte (von Neergard, 1929). Am Ende seiner Studien kam er zusammengefasst zu 3 Erkenntnissen:

- 1) Noch vor der Gewebeelastizität ist die Oberflächenspannung verantwortlich für die Lungenretraktion.
- 2) Eine niedrigere Oberflächenspannung ist für die Atemarbeit sehr hilfreich, denn wird die Oberflächenspannung zu groß, so erschwert dies eine adäquate Expansion der Lunge.
- 3) Die Oberflächenspannung ist die Kraft, die maßgeblich dem ersten Atemzug eines Neugeborenen entgegenwirkt.

Trotz dieser schon sehr weitreichenden Erkenntnisse war es erst 1947 Peter Grünwald, der von Neergaards Ideen aufgriff und proklamierte, dass die Oberflächenspannung die entscheidende Kraft in der Lunge sei, die dem Eindringen von Luft entgegenwirkt. Auch konnte er bereits zeigen, dass oberflächenaktive Substanzen imstande sind, den Druck, der benötigt wird, um die Lunge zu belüften, stark zu reduzieren (Grünwald, 1947).

1955 war es dann Richard Pattle, der bei seinen Forschungen mit verschiedenen Nervengasen entdeckte, dass Blasen, die seine Versuchstiere unter Gaseinfluss und dem dadurch entstehenden Lungenödem absonderten, lange Zeit sehr stabil blieben und auch von den gängigen schaumzerstörenden Substanzen nicht ohne weiteres zerstört werden konnten. Schließlich war er der erste, der eine Art Schutzfilm in der Lunge vermutete und spekulierte, dass das Fehlen dieses Schutzfilms maßgeblich zu den Schwierigkeiten der Atmung bei Frühgeborenen beitragen könnte (Pattle, 1955). Fast zeitgleich berichtete John Clements, der sich eigentlich mit der Wirkung von Kampfgasen auf die Lunge beschäftigte, über einen intrapulmonalen Film oberflächenaktiver Substanzen (Clements, 1956 und 1957).

Dieser Artikel wiederum imponierte Mary Ellen Avery, zu dieser Zeit Nachwuchswissenschaftlerin im Labor von Jere Mead in Boston, so sehr, dass sie Clements besuchte und sich von ihm in die Methodik der Untersuchung von Oberflächenspannungen einweisen ließ. Die so erworbenen Kenntnisse setzte sie daraufhin in Boston ein, um die Lungen von an der „Krankheit der hyalinen Membranen“, eine Maximalvariante des „neonatalen Atemnotsyndrom“, verstorbenen Frühgeborenen zu untersuchen. 1959 waren es dann Mary Ellen Avery und Jere Mead, die als erste den Zusammenhang des Atemnotsyndrom mit dem Fehlen von Surfactant in Verbindung brachten (Avery und Mead, 1959). Die weitere Erforschung und vor allem die Suche nach einer kausalen Therapie des Atemnotsyndroms schritt in den folgenden Jahren nur sehr langsam voran, bis 1963 Patrick Kennedy, Sohn des damaligen amerikanischen Präsidenten John. F. Kennedy als Frühgeborenes in der 35. Schwangerschaftswoche zur Welt kam, aber schon 2 Tage nach der Geburt am Atemnotsyndrom starb. Dieses Ereignis und die folgende Präsenz des Themas gaben der Forschung neuen Auftrieb. Die erhofften Erfolge aber blieben aus. Robillard (Robillard et al., 1964) und Chu (Chu et al., 1967) hatten mit dem Versuch Lecithin (Dipalmitoylphosphatidylcholin,

DPPC), den Hauptbestandteil des Surfactant, als Aerosol intrapulmonal zu verabreichen keinen Erfolg.

Als Alternative entdeckten Enhorning und Robertson 1972 natürlichen aus bronchialer Lavageflüssigkeit extrahierten Surfactant und konnten 1973 nachweisen, dass die intratracheale Gabe dieses Surfactant sowohl vom Applikationsweg als auch vom Präparat her im Tierversuch sehr effektiv waren (Enhorning und Robertson, 1972).

1980 wendete dann Fujiwara als erster erfolgreich an 10 Kindern diese Methode klinisch an (Fujiwara et al., 1980), wobei wohl auch die hierbei mit verwendete kontinuierliche positiv-end-expiratorische Atemunterstützung (CPAP) einen gewissen Anteil am Erfolg hatte. Mittlerweile ist die Wirkung gerade beim Atemnotsyndrom des Frühgeborenen etabliert und die Anwendung zur Standardtherapie geworden.

Auch für andere Erkrankungen wie die konnatale Pneumonie (Herting, 1997; Herting et al., 2001) und das Mekoniumaspirationssyndrom (Findlay et al., 1996) wurde im Verlauf die Effizienz von natürlichen exogenen Surfactantpräparaten gezeigt.

1.1.2 Zusammensetzung

In reifem menschlichen Surfactant stellen im Lipidanteil die oberflächenaktiven Phospholipide mit ca. 90% die größte Fraktion dar. Die restlichen 10% sind hauptsächlich neutrale Lipide, wie zum Beispiel das Cholesterol.

In der Gruppe der Phospholipide sind die Hauptvertreter Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC, Lecithin) mit ca. 40% und andere Phosphatidylcholone mit ebenfalls 40%. Phosphatidylglycerol ist zu ca. 10% enthalten (Johansson et al., 1994).

Phospholipide sind aufgrund ihrer Polarität und der daraus folgenden Ausrichtung an der Gas/Flüssigkeits-Grenzschicht die Bestandteile des Surfactant, die hauptsächlich zur Reduktion der Oberflächenspannung beitragen. Stevens und Schadow konnten 1997 zeigen, dass DPPC hierbei die Hauptrolle spielt (Stevens und Schadow, 1997). Genauso nehmen die anderen Lipide eine wichtige Funktion wahr, besonders bei der schnellen Ausrichtung und Adsorption oberflächenaktiver Substanzen an der Gas/Flüssigkeits-Grenzschicht der sich bewegenden Lunge.

Bisher wurden 4 Surfactantproteine (SP), SP-A, SP-B, SP-C und SP-D, identifiziert.

SP-B und SP-C sind hydrophobe Polypeptide und fördern vor allem die Adsorption von Lipiden in Richtung der Alveolaroberfläche.

SP-A und SP-D sind hydrophil und sehr bedeutsam bei der pulmonalen Immunabwehr. SP-A besitzt zusätzlich eine Stabilisierungsfunktion des tubulären Myelin, der Speicherform des Surfactant.

SP-A ist ein von den Clarazellen und Typ-II-Pneumozyten exprimiertes aus 248 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 26-38kDa (McCormack, 1997). Es stellt mit ca. 50% den Hauptanteil an der Gesamtmenge der Surfactantproteine dar.

Neben seiner Funktion als autokriner Regulator der Surfactanthomöostase (Wright et al., 1987; Rice et al., 1987; Dobbs et al., 1987) hat es eine wichtige Aufgabe in der Stabilisierung des tubulären Myelin, der extrazellulären Speicherform des Surfactant (Batenburg, 1995). Durch seine Form und Ladungsverteilung stabilisiert SP-A das tubuläre Myelin vor allem in seinen fast rechtwinkligen Ecken (Voorhout et al., 1991). Auch steigert SP-A die Resistenz von Surfactant gegen die Inaktivierung *in vivo* (Sun et al., 1997).

Des Weiteren spielt SP-A immunologisch eine wichtige Rolle. Wie auch SP-D gehört es zur Gruppe der Kollektine. Diese sind in der Lage, pathogene Strukturen zu binden und durch Opsonierung dem Immunsystem zu präsentieren. Zusammen mit dem Komplementsystem führt dies zur Neutralisierung des Pathogens (Kuroki und Sano, 1999; Holmskov et al., 2003). Überdies stimuliert bzw. aktiviert SP-A, zusammen mit SP-D, Alveolarmakrophagen (Johansson et al., 1994; Nkadi et al., 2009).

SP-B ist ein Dimer aus zwei cysteinreichen Monomeren mit einer Molekülmasse von je 8,7kDa. Bedingt durch seine dimere Struktur ist SP-B in der Lage Lipidmembranen durch ein „cross-linking“ zu verbinden und so zu stabilisieren.

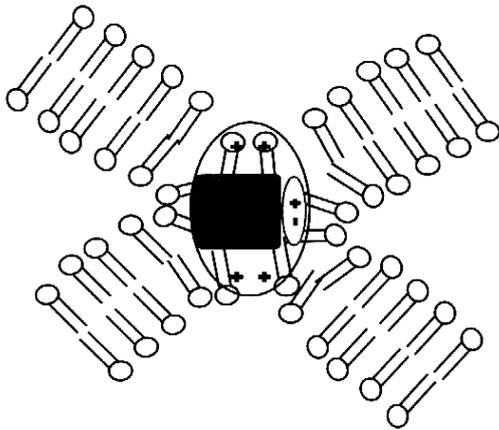


Abb. 1 „cross-linking“ zweier Lipidvesikel durch SP-B (Zaltash, 2000)

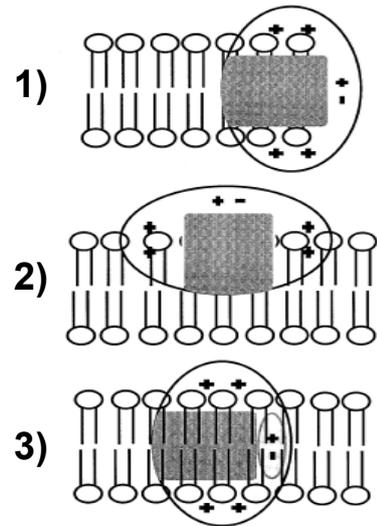


Abb. 2 verschiedene Positionen des SP-B im Lipidfilm (Zaltash, 2000)

Vor allem die Interaktionen seiner geladenen Anteile sorgen für eine Stabilisierung in der seitlichen Achse einer einschichtigen Phospholipidmembran des Surfactant (Cochrane und Revak, 1991). Diese einschichtige Membran, hauptsächlich bestehend aus DPPC-Molekülen, spielt die Hauptrolle bei der Reduktion der Oberflächenspannung auf nahe 0mN/m an der Luft-Wasser-Interphase.

Diskutiert werden hierbei zwei Mechanismen der Wirkung des SP-B: zum einen die selektive Adsorption von DPPC, vermutlich über die Kooperation von SP-B mit SP-A und zum anderen das selektive Entfernen von nicht-DPPC-Molekülen aus der Monolayer während der Expiration (Veldhuizen und Haagsman, 2000).

Tierexperimentelle Daten zeigen, dass SP-B für die Formation des tubulären Myelin (Demello et al., 1994) und der Lamellarkörperchen (Clark et al., 1995) unentbehrlich ist.

Auch ist SP-B das einzige unentbehrliche Surfactantprotein. Während eine Defizienz von SP-A (Korfhagen et al., 1994), SP-C (Weaver et al., 2001) und SP-D zwar Auswirkungen auf die Surfactanthomöostase hat, so ist doch das SP-B das einzige der vier Proteine, ohne das ein postnatales Überleben nicht möglich ist (Clark et al., 1995).

SP-C ist ein kleines, vorwiegend alpha-helikal vorliegendes Molekül, dessen Monomere ein Molekulargewicht von 4,2kDa aufweisen (Vandenbussche et al.,

1992). SP-C wird ausschließlich von Typ-II-Pneumozyten intraalveolär synthetisiert. Es ist entscheidend an der Stabilisierung des Surfactantfilms beteiligt, indem es zusammen mit SP-B den Ein- und Ausbau von Phospholipiden in die Interphase reguliert. Auch wurden in Protrusionen des Surfactantmonolayers hohe Konzentrationen von SP-C nachgewiesen, die als eine Art „Ausdehnungsreserve“ des Surfactantfilms angesehen werden (Amrein, 1998). Ikegami et al. konnten 2002 zeigen, dass SP-B ohne die Gegenwart von SP-C nicht in der Lage ist Mikroblasen zu stabilisieren. Daraus folgerten sie, dass SP-C vor allem bei maximaler Expiration, also minimalem Volumen, die Alveole stabilisiert (Ikegami, 2002).

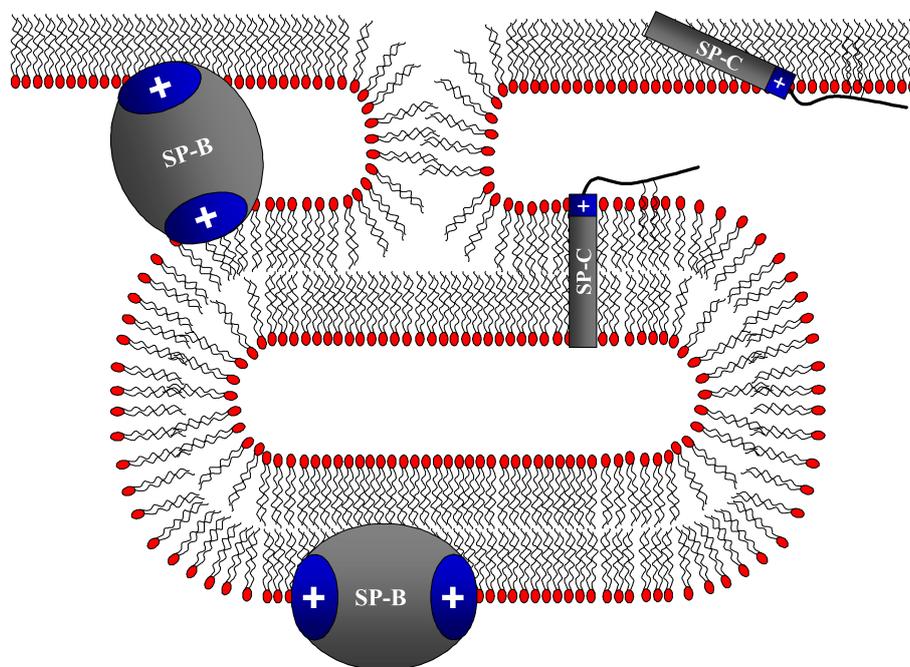


Abb. 3 Schematische Darstellung der Funktion von SP-B und SP-C im Surfactantfilm (modifiziert nach Zaltash, 2000)

SP-D ist ein hydrophiles Protein mit einer Molekülmasse von 43kDa. SP-D gehört, wie SP-A, in die Gruppe der Kollektine, der C-Typ-Lektine und spielt somit bei der immunologischen Präsentation von Pathogenen eine große Rolle (Dahl, 2006). Auch für die Wiederaufnahme des „verbrauchten“ Surfactant in die Typ-II-Pneumozyten ist SP-D entscheidend mitverantwortlich (Korfhagen et al., 1998; Ikegami, 2007).

Neuere Versuche mit rekombinantem SP-D zeigten einen deutlichen antiinflammatorischen Effekt auf die Lunge (Ikegami et al., 2007).

1.1.3 Metabolismus

Surfactant ist ein Gemisch, aus Lipiden (90%), Proteinen (8%) und Kohlenhydraten (2%).

Bereits ab der 12. Schwangerschaftswoche (SSW) werden Surfactantbestandteile gebildet und dann ab ca. der 20. SSW über den Golgi-Apparat in die Lamellarkörperchen, die intrazelluläre Speicherform des Surfactant, transportiert. Im Laufe der fetalen Lungenentwicklung sind ab dem sakkulären bzw. alveolären Stadium in der 22. SSW zu Typ-II-Pneumozyten differenzierte Zellen mit Lamellarkörperchen in ihrem Zytosol sichtbar. Ab der 35. SSW steigt, als entscheidende Voraussetzung für das extrauterine Leben, die Surfactantproduktion nochmals stark an.

Die mütterliche Wehentätigkeit zur Geburt und der damit ansteigende Katecholaminspiegel stoppt einerseits die Produktion intrauteriner Flüssigkeit und startet andererseits in der Lunge die Flüssigkeitsresorption. Zusätzlich wird nun der in den Lamellarkörperchen intrazellulär gespeicherte Surfactant sezerniert. Mit dem ersten Atemzug wird die sich noch in der Lunge befindende Flüssigkeit bereits teilweise verdrängt und durch Luft ersetzt. In den weiteren ersten Lebensstunden wird die Flüssigkeitsabsorption komplettiert (Wauer, 1997).

In der luftgefüllten Lunge bildet der sezernierte Surfactant dann als Mono- oder Multilayer (ein- oder mehrmolekulare Schicht) einen Phospholipidfilm, der schließlich die Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche in der Alveole minimiert.

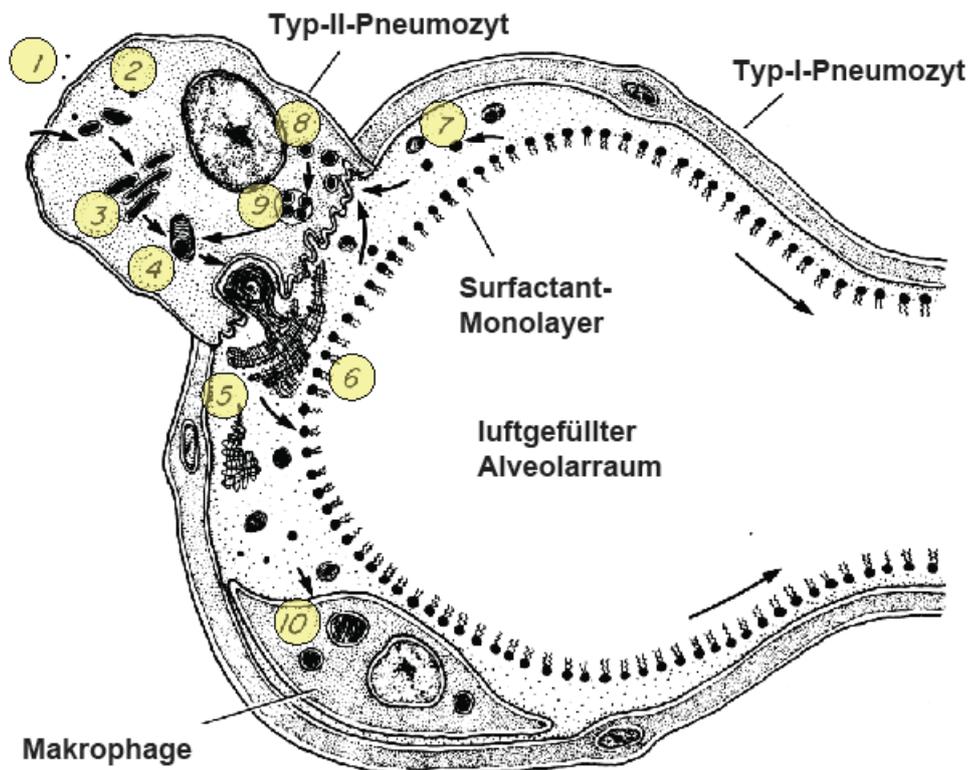


Abb. 4 Schematische Darstellung des Surfactantmetabolismus: gebildet aus Vorstufen (1) im Endoplasmatischen Retikulum (2), wird der Surfactant über den Golgi-Apparat der Typ-II-Pneumozyten (3) zu den Lamellarkörperchen transportiert (4) und hier intrazellulär gespeichert. Nach Sekretion in die Flüssigkeitsschicht der Alveole, wird das tubuläre Myelin gebildet (5), aus dem der Surfactant-Monolayer ausgebildet wird (6). Über mehrere Zwischenstationen wird der Surfactant wieder aufgenommen (7-9) und erneut in den Lamellarkörperchen gespeichert. Auch spielt die Aufnahme in Alveolarmakrophagen vermutlich eine Rolle beim Abbau des Surfactant (10). (modifiziert nach Hawgood und Clements, 1990)

Gebildet von den Typ-II-Pneumozyten - SP-A und SP-B zusätzlich in den Clara-Zellen der distalen Luftwege - werden die Surfactantbestandteile durch den Golgi-Apparat in multivesikuläre Körperchen transportiert und intrazellulär als sogenannte Lamellarkörperchen gespeichert. Wird Surfactant benötigt, so werden die Lamellarkörperchen in die Hypophase, den Flüssigkeitsraum auf der Alveolaroberfläche, sezerniert und in das sogenannte tubuläre Myelin umgewandelt (Rooney et al., 1994). Es hält unter der Mithilfe von SP-A, SP-B und Kalziumionen die Phospholipide für das Surfactant vor (Suzuki et al., 1989). Kommt es nun zu einem Reiz, so verschmelzen die Lamellarkörperchen mit der Plasmamembran des Typ-II-Pneumozyten und es bildet sich ein Porus. Die dann

beginnende Phase der Exkretion in die Alveole ist in ihren genauen Abläufen weiterhin unklar (Dietl et al., 2001).

Verschiedene Mechanismen wirken stimulierend auf die Surfactantexkretion. Betaadrenerge Rezeptoren an den Typ-II-Pneumozyten wirken beispielsweise stimulierend, wie auch Purine, zu denen auch das Adenosintriphosphat gehört. Diese beiden stressinduzierten Mechanismen könnten eine Erklärung für die entscheidende Rolle des Initialschreis Neugeborener darstellen (Nkadi et al., 2010).

Auch die Dehnung der Typ-II-Pneumozyten bei tiefer Inspiration stimuliert die Surfactantsekretion sehr potent. Daneben gibt es weitere, viele noch unverstandene Wege, die die Surfactantsekretion erhöhen (Dietl et al., 2001).

Der wohl bekannteste Weg die Surfactantsynthese bereits präpartal zu steigern wurde 1968 von Liggins beschrieben: antenatal verabreichte Glukocortikoide führten bei Schafen zu einer Reifung des pulmonalen Surfactantsystems (Liggins, 1968). Zusammen mit Howie zeigte Liggins vier Jahre später, dass dieses Verfahren auch beim Menschen funktioniert und so die Häufigkeit des Atemnotsyndrom (ANS) bei Frühgeborenen signifikant reduziert werden kann (Liggins und Howie, 1972). Seitdem ist diese „Lungenreifeinduktion“ bei drohender Frühgeburt ein etabliertes Vorgehen und seit 1995 in den Richtlinien der National Institutes of Health verankert (National Institutes of Health Consensus Development Conference, 1995).

Der genaue Ablauf der Surfactantwiederaufnahme und die Wiederverwendung oder Neusynthese der einzelnen Inhaltstoffe sind noch in vielen Punkten ungeklärt. Als mögliche Mechanismen werden der extrazelluläre Abbau in der Alveole und die Wiederaufnahme durch verschiedene pulmonale Zelltypen, hier vor allem Alveolarmakrophagen und Typ-II-Pneumozyten angenommen. Hier könnte das Surfactantprotein D (SP-D) eine entscheidende Rolle spielen (Ikegami, 2009).

Ebenso wird ein Übertreten bestimmter Bestandteile über die Epithel-Endothel-Barriere von der Alveole ins Blut diskutiert (Wright, 1990).

1.1.4 Funktion

Oberflächenspannungskräfte entstehen intraalveolär an der Grenzschicht zwischen Flüssigkeit und Luft. Hier lässt die Oberflächenspannung γ (gamma) infolge der Kohäsionskräfte zwischen den Molekülen eine in das Alveolarlumen gerichtete Kraft entstehen, die eine Oberflächenverkleinerung anstrebt. Der so erzeugte Druck (P, sogenannter Kollapsdruck der Alveolen) ist nach dem Gesetz von Laplace ($\Delta P = 2 \gamma / \text{Radius}$) proportional der Oberflächenspannung und umgekehrt proportional zum Radius.

So gesehen müsste eine Umverteilung der Gasvolumina zugunsten der größeren Alveole erfolgen, da der entstehende Druck in den kleineren Alveolen höher ist. Surfactant setzt diese hohen Retraktionskräfte mit ihrer immensen Gefahr der Überblähung und Schädigung der Lunge auf etwa 1/10 herab.

Natürliches Surfactant reduziert die Oberflächenspannung bei 37°C von ca. 70mN/m (im wässrigen Milieu) auf unter 6mN/m (Possmayer, 1997).

In kleineren Alveolen wird durch die hier vorliegende mehrschichtige Anordnung des Surfactantfilms die Oberflächenspannung stärker reduziert als in großen Alveolen mit nur einschichtiger Surfactantlage. Dieser Effekt, wahrscheinlich bedingt durch die intermolekularen Abstoßungskräfte der lipophilen Surfactantbestandteile (siehe auch Zusammensetzung des Surfactant), stabilisiert die Alveolen zusätzlich (Junqueira und Carniero, 1996; Scheid, 1996).

Weiterhin beeinflusst Surfactant den Flüssigkeitsaustausch von intraalveolär nach interstitiell. Die zunehmende Oberflächenspannung bei Surfactantmangel erzeugt am Alveolarepithel einen Sog in Richtung intraalveolär, wodurch ein Lungenödem bedingt sein kann (Beppu et al., 1983; Dreyer et al., 2008).

Surfactant hat aber auch noch eine Vielzahl anderer Funktion. So schützt es unter anderem die Alveolarzelle vor Dehydratation, unterstützt den Sekrettransport in den Atemwegen und somit die Clearance der Lunge und trägt mit zum Schutz des Alveolarepithels vor toxischen Sauerstoffradikalen bei (Possmayer, 1989; Robertson et al., 1984).

1.2 Mekonium

Der Begriff Mekonium, auf griechisch „Mekonion“ (μικων), bedeutet übersetzt „Mohnsaft“ oder „dem-Opium-ähnlich“. Sein Namensgeber ist vermutlich Aristoteles gewesen. Bezieht sich „Mohnsaft“ eher auf das Aussehen der Substanz, ist die Verbindung mit dem Opium interessanterweise zusätzlich dadurch entstanden, dass Aristoteles in der Antike angenommen hat, die Substanz halte die Kinder im Mutterleib am Schlafen (Emery, 1957).

Der Begriff Kindspech, die volkstümliche Bezeichnung des Mekonium, kommt ebenso nicht von ungefähr. Mekonium ist der dunkelgrüne bis tiefschwarze, zähe, fadenspinnende Darminhalt der Neugeborenen, dessen Konsistenz an Pech erinnert. Neugeborene setzen kurz nach der Geburt im Durchschnitt 60 bis 150g davon ab. Es ist geruchlos und sehr klebrig. Bereits 1844 untersuchte John Davy seine Inhaltsstoffe (Davy, 1844).

1.2.1 Zusammensetzung

Mekonium ist eine Mischung verschiedenster flüssiger und fester Bestandteile, die aus allen Organen stammen, die mit der Fruchthöhle in Verbindung stehen. Es enthält neben Fruchtwasser, gastrointestinalem Schleim, Pancreassaft, Gallensäuren und fetalen Urin auch Lanugohaare und Vernix caseosa, die sogenannte Käseschmiere. Der Gehalt an Wasser liegt bei 70 bis 92% (Emery, 1954) und 3 bis 12% des Trockengewichts bestehen aus Proteinen (Schutt, 1968), wobei Gründig et al. 1993 herausfanden, dass der Gesamtproteingehalt bei Frühgeborenen höher ist als bei reifen Neugeborenen (Gründig et al., 1993). Zweiter Hauptbestandteil sind Glykoproteine, die auch wesentlich die Viskosität bestimmen (Ryley et al., 1983).

1.3 Polymyxin B

Das als Antibiotikum eingesetzte Polymyxin B (PxB) gehört zur Gruppe der Polymyxine. Diese werden der übergeordneten Gruppe der antimikrobiellen Peptide zugerechnet und gehören zu den „alten“ Antibiotika. Bereits 1947 wurden sie erstmalig aus dem Bakterium *Bacillus polymyxa* isoliert (Storm et al., 1977). Es gibt fünf Vertreter der Polymyxine, das Polymyxin A, B, C, D und E. Von diesen fünf kommen aber nur PxB und Polymyxin E, letzteres unter dem Namen Colistin, zum klinischen Einsatz.

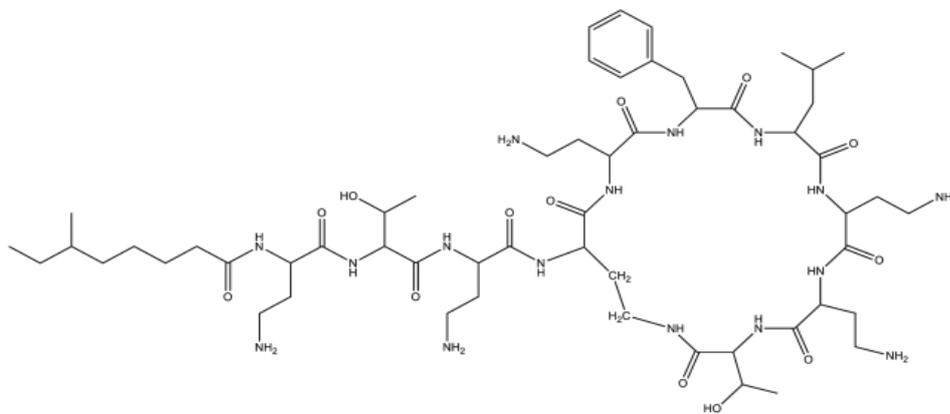


Abb. 5 Strukturformel des Polymyxin B

Chemisch sind sie verzweigte, zyklische Decapeptide (bestehen also aus 10 Aminosäuren), deren Ringstruktur durch die Aminosäurereste positiv geladen ist. Der am Ring anhängende Fettsäurerest ist hydrophob.

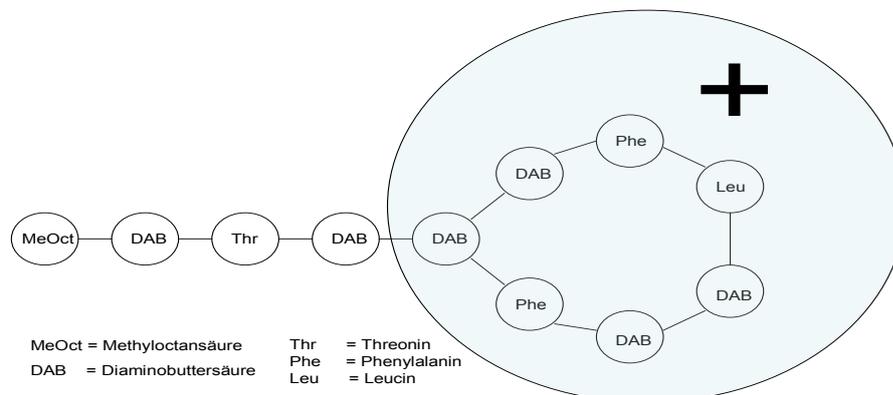


Abb. 6 Aminosäureanordnung und Ladungsverteilung des Polymyxin B

Aufgrund dieser besonderen Beschaffenheit kann es gut in Phospholipidmembranen, wie zum Beispiel der von gram-negativen Bakterien, eingebaut werden (siehe Abb. 6). Durch seinen Einbau stört PxB die Membranarchitektur, hebt die Ladung der Bakterienhülle auf und die Membran verliert ihre Wirkung als permeabilitätsregulierende Barriere. Es bilden sich Poren aus und das Bakterium stirbt ab. Auf diese Weise wirken Polymyxine bakterizid (Vaara, 1992 und Hancock, 1997).

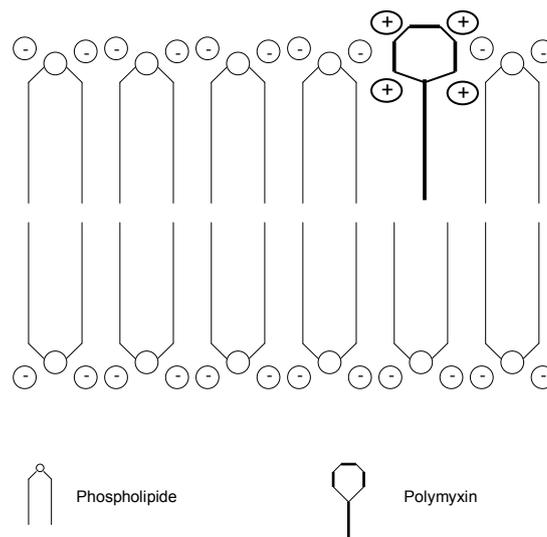


Abb. 7 Einlagerung von Polymyxin B in Phospholipidmembranen

Da gram-positive Bakterien eine dickere und in ihren Bestandteile grundlegend anders geartete Zellmembran besitzen, können die Polymyxine hier nicht wirken. Auch auf intrazelluläre Erreger wirken sie nicht, da sie die Erreger nicht erreichen können.

Ab den frühen 1960iger Jahren mehren sich Berichte über eine hohe Rate an Nebenwirkungen, wobei neben der Nephrotoxizität auch eine neurotoxische Wirkung mit Parästhesien, muskulärer Schwäche und vereinzelt sogar einer Einschränkung der Atemmuskulatur beschrieben wird. Desweiteren wird eine hepatotoxische Wirkung in einzelnen Berichten diskutiert (Falagas und Kasiakou, 2006).

Ein unerwartet positiver Nebeneffekt des PxB scheint zu sein, dass es in der Lage ist, zwei gegenüberliegende Phospholipiddoppelschichten, wie zum Beispiel im Surfactantsystem der Lunge, zu verbinden. Es schafft dies vermutlich analog dem SP-B über ein sogenanntes „cross-linking“. Dieses „quervernetzen“ erhöht

wahrscheinlich die Resistenz des Surfactantfilms gegenüber einer Inaktivierung durch andere Stoffe (Cajal et al., 1996; Zaltash et al., 2000). Calkovska et al. stützen diese These 2005 mit ihren Beobachtungen, dass sich die dynamische Oberflächenspannung von Surfactant nach Zugabe von PxB verbessert und die Surfactantresistenz gegenüber einer albumininduzierte Inaktivierung erhöht (Calkovska et al., 2005).

1.4 Surfactantassoziierte Erkrankungen

Unter den surfactantassoziierten Erkrankungen nimmt das Atemnotsyndrom des Früh- und Neugeborenen die Hauptrolle ein. Als führender Pathomechanismus gilt hierbei der auf der Lungenunreife basierende Surfactantmangel.

Frühgeborene, vor allem unter der 35. Schwangerschaftswoche, verfügen noch nicht über ausreichend Surfactant in ihrer Lunge, wodurch es postnatal zur Ausbildung einer Atemstörung bis hin zur respiratorischen Insuffizienz kommt. Auch ältere Neugeborene können am Atemnotsyndrom (RDS = respiratory distress syndrome) erkranken, vor allem wenn es zur kindlichen Reifungsverzögerung gekommen ist, wie zum Beispiel beim mütterlichen Diabetes mellitus oder einer intrauterinen Wachstumsverzögerung. Die Inzidenz des RDS hängt sehr vom Gestationsalter der Kinder ab. Bei Frühgeborenen im Alter von 28 Schwangerschaftswochen und darunter, liegt die Inzidenz in den USA bei über 90% (Stoll et al., 2010) und nimmt mit zunehmender Reife der Neugeborenen ab. Zeigen Frühgeborene in der 34. Schwangerschaftswoche noch in ca. 10% Zeichen eines RDS, so nimmt mit zunehmender Reife die Inzidenz auf 0,3% in der Gruppe der über 38 Schwangerschaftswochen alten Kinder ab (The Consortium on Safe Labor, 2010).

Die Ersatztherapie mit Surfactant hat sich beim RDS etabliert. Momentan ist die Verabreichung intratracheal, nach Intubation und maschineller Beatmung, das am weitesten verbreitete Verabreichungsverfahren. Andere Verfahren, vor allem mit der Idee die maschinelle Beatmung komplett zu vermeiden, werden derzeit in Studien untersucht (Goepel et al., 2011).

Neben dem quantitativen Surfactantmangel beim RDS oder speziellen Mangelsyndromen an spezifischen Sufactantkomponenten – auf die hier nicht näher eingegangen wird –, spielt bei verschiedenen Erkrankungen vor allem die Inaktivierung des eigentlich ausreichend vorhandenen Surfactant eine große Rolle. Der direkte Kontakt des Surfactant mit Stoffen wie Mekonium, Albumin oder Magensaft - zum Beispiel im Rahmen einer Aspiration -, aber auch die Vorgänge im Rahmen einer pulmonalen Inflammation, haben ein hohes Inaktivierungspotential auf das Surfactantsystem. Die meist im Rahmen solcher Ereignisse entstehende Hypoxie und Azidose reduziert ihrerseits weiterhin die Effektivität des Surfactantsystems.

Diese Pathomechanismen beobachtet man sowohl bei Kindern als auch beim Erwachsenen zum Beispiel im Rahmen von Aspiration, Lungenblutung, Schocklungen oder schweren Pneumonien.

1.4.1 Mekoniumaspirationssyndrom

Das Mekoniumaspirationssyndrom (MAS) ist eine seltene, aber durchaus gefürchtete Komplikation vornehmlich des reifen oder übertragenen Neugeborenen. Nach der 37. Schwangerschaftswoche verhindern normalerweise die reduzierte Peristaltik, der erhöhte Analsphinctertonus und ein den Enddarm verschließender Mekoniumpfropf den Abgang des Kindspechs ins Fruchtwasser. Ist es hypoxie-induziert zu einem MAS gekommen, so ist die Gefahr der bakteriellen Superinfektion für die Lunge sehr groß. Das Keimspektrum entspricht hierbei dem der konnatalen Pneumonien (s.u.).

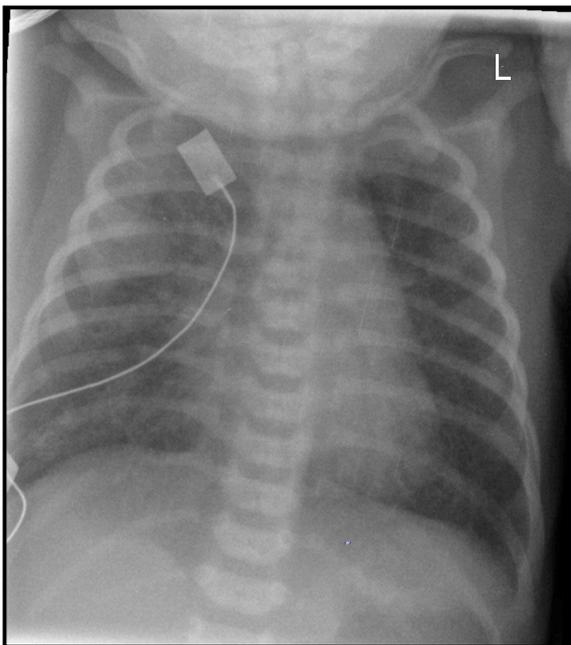


Abb. 8 Röntgenbild eines Thorax bei einem MAS: Gut sichtbar ist die fleckige, teils noduläre Zeichnungsvermehrung der Lunge. (Kinderradiologie des UKSH, Campus Lübeck)

Häufigkeit und Zahlen

Die Häufigkeit des MAS wird mit ca. 5 bis 12% der Neugeborenen, die aus mekoniumhaltigem Fruchtwasser geboren werden, (ca. 10-15% aller Geburten) angegeben, die Inzidenz ist aber leicht rückläufig. Daten, explizit für Deutschland,

existieren nicht. In den USA entspricht diese Inzidenz ca. 25.000 bis 30.000 Kindern pro Jahr (Wiswell, 2002).

Nicht alle Kinder mit einem MAS erkranken gleich schwer. Ungefähr ein Drittel der Erkrankten benötigt eine Intubation mit mechanischer Beatmung und ca. 10% erleiden im Verlauf der Erkrankung einen Pneumothorax (Wiswell, 2002; Dargaville, 2006; Bhat, 2008).

Die Mortalität liegt bei ca. 3-5% in der Gruppe der intubiert-beatmeten Kinder. Wesentlich höher liegt aber wahrscheinlich die Rate der Kinder, die durch eine Komplikation auf längere Sicht geschädigt werden, aber nicht direkt versterben. Seit langem gilt „grünes Fruchtwasser“ – also durch Mekonium gefärbtes Amnionwasser - als Alarmsignal für Geburtshelfer, Hebammen, Anästhesisten und Pädiater, da es eine potentielle Gefahr für das Neugeborene darstellt.

Pathophysiologie

In utero wird normalerweise die Flüssigkeit, die in den Lungen produziert wird, stets Richtung Fruchthöhle transportiert. Im Falle kindlichen Stresses aber kehrt sich diese Richtung um. Stressbedingt ins Fruchtwasser ausgepresstes Mekonium (Dawes et al., 1972) gelangt mit dem ersten Atemzug oder bereits pränatal in die Atemwege und Lunge des Feten.

Die Folge ist eine akute Verschlechterung der Sauerstoffversorgung bedingt durch mehrere Faktoren: die Obstruktion der Luftwege, die einsetzende Pneumonitis, die pulmonale Hypertonie, dem entstehenden Missverhältnis von Ventilation zu Perfusion, einer sich ausbildenden Azidose und konsekutiv der einsetzenden Hypoxämie (Cayabyab et al., 2007).

Die genaue Pathophysiologie ist sehr vielschichtig. Zum einen werden durch Mekonium als Fremdkörper die Atemwege mechanisch verengt, was mit Einsetzen der Eigenatmung zu einer lokalen Überblähung mit der Gefahr eines Pneumothorax führt. Auch Atelektasen können durch die Obstruktion entstehen, was wiederum zu einem Perfusions-Ventilations-Mißverhältnis und zu einem erhöhten pulmonalen Gefäßwiderstand führt. Dieser verursacht einen Rechts-Links-Shunts über das Foramen ovale, besonders aber auch über den Ductus arteriosus, der sich in der Konsequenz nicht verschließt, und persistiert. All dies mündet in die persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN), früher auch „Persistierende Fetale Circulation“ (PFC-Syndrom) genannt, einer

sehr ernsten Komplikation mit einer hohen Morbidität und einer Mortalität von über 10% (Walsh-Sukys et al., 2000; Baquero et al., 2006).

Zum anderen spielt, wie bereits oben erwähnt, die Inaktivierung des Surfactantfilms eine wichtige Rolle. Dass Mekonium zu dieser Inaktivierung in der Lage ist, zeigten bereits mehrere Untersuchungen *in vitro* und im Tierversuch (Moses et al., 1991; Sun et al., 1993; Clark et al., 1987).

Zwar sind noch nicht alle Mechanismen und Einflüsse von Mekonium auf Surfactant verstanden, eine Hauptrolle scheint aber ein Verlust der spezifischen Anordnung der Phospholipide im Surfactant zu spielen (Sun et al., 1993). Letztendlich führt dieser Strukturverlust zum Anstieg der Oberflächenspannung, zum konsekutiven endexpiratorischen Kollaps der Alveole und schließlich zur Atelektasenbildung.

Auch die oft nach Mekoniumaspiration auftretende Lungenblutung scheint als vermutlich seruminduzierter Inaktivierungsmechanismus des Surfactant eine Rolle zu spielen (Wiswell et al., 1990; Berger et al., 2000).

Eine dritte lungenschädigende Komponente beim MAS ist die sterile Inflammation. Hauptverantwortlich hierfür scheint neben proteolytischen Enzymen vor allem die Phospholipase-A₂ zu sein. Sie ist per se im Mekonium vorhanden und kann dosisabhängig den Surfactantfilm, vor allem durch die Hydrolyse von DPPC, schädigen (Schrama et al., 2001). Zusätzlich begünstigt sie die intrapulmonale Einwanderung von neutrophilen Granulozyten (Kääpä und Soukka, 2008).

Mekonium scheint ebenso eine direkt toxische Wirkung auf pulmonale Gefäßstrukturen zu haben (Wiswell et al., 1994).

Ein relativ neuer Ansatz zum Verstehen der Pathophysiologie des MAS ist die Rolle proteolytischer Verdauungsenzyme aus dem Pancreas, die ebenfalls per se im Mekonium enthalten sind. Ivanov et al. vermuten in einer durch diese Enzyme ausgelösten Ablösung pulmonaler Epithelzellen von ihrer Basalmembran einen zentralen Schädigungsmechanismus, der allerdings noch genauer untersucht werden muß (Ivanov et al., 2010).

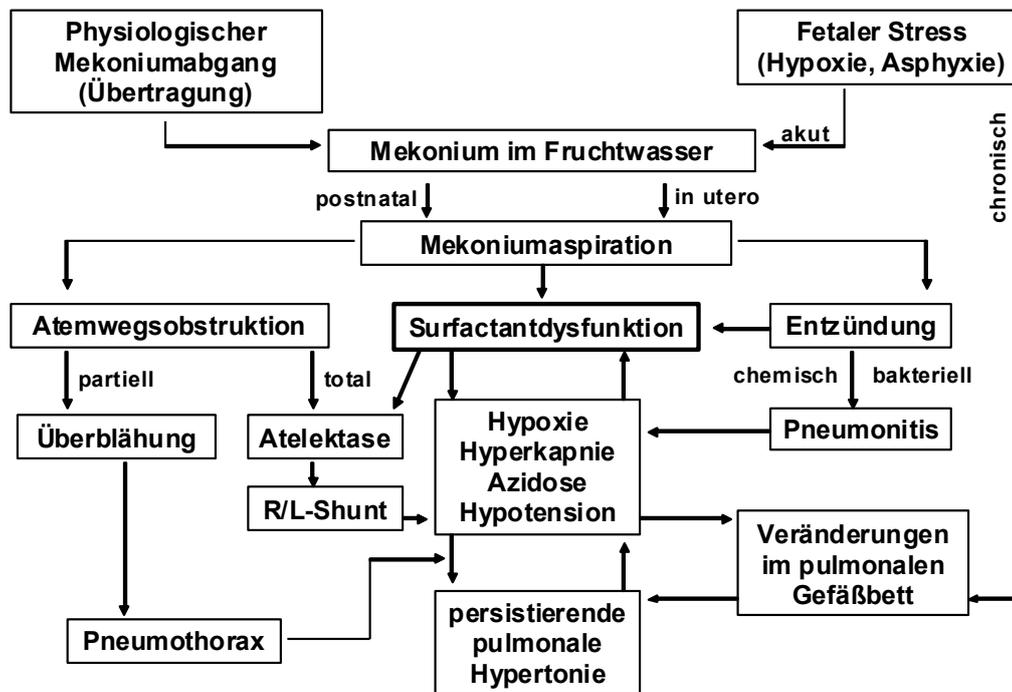


Abb. 9 Pathophysiologische Übersicht des MAS (modifiziert nach Herting in „Surfactanttherapie“, herausgegeben von Wauer)

Therapie

Eine intensivmedizinische Überwachung gefährdeter Kinder ist dringend notwendig, da sich die Symptome mit einer zeitlichen Latenz bis zu mehreren Stunden ausbilden können. Je nach Schweregrad gibt es verschiedene therapeutische Möglichkeiten. In früheren Jahren wurde empfohlen jedes Neugeborene, das aus grünem Fruchtwasser geboren wurde, schnellstmöglich, das heißt vor dem ersten Schrei, abzusaugen und den subglottischen Bereich auf Mekonium zu inspizieren. Heutzutage ist man etwas zurückhaltender und empfiehlt dieses invasive Vorgehen nur noch bei klinisch schwer deprimierten Neugeborenen (Leitlinien des European Resuscitation Council, 2010).

Sowohl prognostisch, als auch bei der symptomatischen Therapie des MAS spielt, wie oben bereits erwähnt, die Ausprägung der PPHN eine entscheidende Rolle. Die therapeutischen Zielsetzungen bestehen dementsprechend einerseits in der Behandlung oder Vermeidung der PPHN und somit der Sicherstellung der bestmöglichen Oxygenierung bei geringstmöglicher Beatmungsintensität und andererseits in der frühzeitigen Gabe von Surfactant.

Je nach Schweregrad der Erkrankung kommen auch nasaler CPAP (nCPAP, kontinuierlicher positiver Atemwegsdruck) als Atemunterstützung, die maschinelle Beatmung, gegebenenfalls auch die Hochfrequenzoszillationsbeatmung (HFOV),

die Gabe von inhalativem Stickstoffmonoxyd (iNO) zur Senkung des pulmonalvaskulären Widerstands bei PPHN und, beim Versagen dieser Therapien, die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) zum Einsatz. Dies ist als hochinvasive Therapie spezialisierten Zentren vorbehalten ist.

Neben den je nach Allgemeinzustand begleitenden intensivmedizinischen Therapien wie zum Beispiel einer Sedierung, sollten Neugeborene mit MAS zur Vermeidung einer bakteriellen Superinfektion der ohnehin schon schwer geschädigten Lunge, eine antibiotische Therapie erhalten.

Zusammenfassend wirkt Surfactant also positiv beim MAS, wenn auch die Art und Weise der Applikation und die genaue Dosierung weiterhin ein Thema für Diskussionen und randomisiert kontrollierte Studien bleiben sollten.

1.4.2 Konnatale Pneumonie

Bei pulmonalen Infektionen, wie zum Beispiel einer konnatalen Pneumonie, ist die Inaktivierung des Surfactantsystems ein bedeutsamer Pathomechanismus. Die Pathophysiologie wird im folgenden genauer erläutert.

Infektionen werden je nach ihrem Zeitpunkt der Manifestation in „early-onset“ (bis zur 72. Lebensstunde) oder „late-onset“ (älter als 72 Lebensstunden) unterteilt, da sich in diesen Zeiträumen auch das Erregerspektrum und der Infektionsweg unterscheiden. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den Haupterregern im „early-onset“-Bereich, die meist der mütterlichen Vaginalflora entstammen und intrapartal, in manchen Fällen und bei stattgehabtem Blasensprung eventuell auch schon intrauterin auf das Neugeborene übertragen werden.

Die häufigsten bakteriellen Erreger sind hierbei beta-hämolyisierende *Streptokokken* der Gruppe B (GBS, *Streptococcus agalactiae*), *Escherichia coli* (*E.coli*) und *Staphylococcus aureus* (Rauprich et al., 2000).

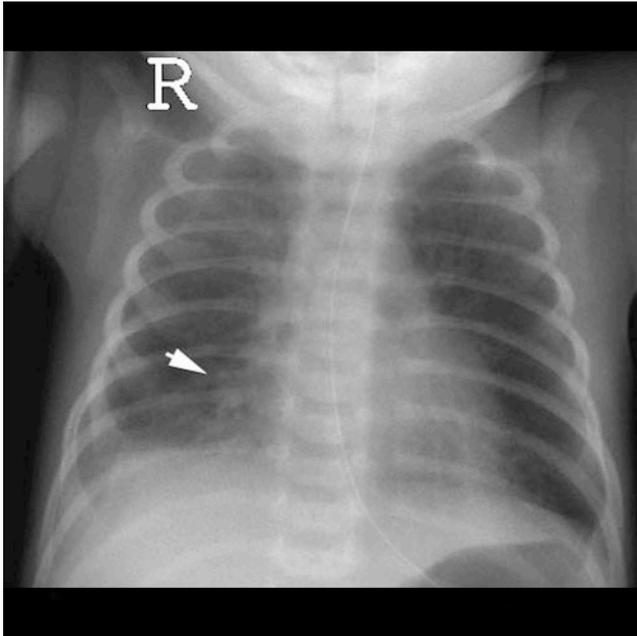


Abb. 10 Röntgenbild eines Thorax bei einer konnatalen Pneumonie: der Pfeil markiert den Bereich des pneumonischen Infiltrats. (Kinderradiologie des UKSH, Campus Lübeck)

Pneumonien spielen innerhalb der „early-onset“-Erkrankungen, also den innerhalb der ersten 72 Lebensstunden auftretenden Erkrankungen, eine wesentliche Rolle. Die Symptome sind vor allem Tachypnoe, Dyspnoe (Nasenflügeln, interkostale und/oder juguläre Einziehungen) und erhöhter Sauerstoffbedarf. Dies kann gerade bei Neugeborenen schnell zur respiratorischen Insuffizienz mit der Notwendigkeit der Atemunterstützung oder maschinellen Beatmung führen. Die Diagnose kann sich schwierig gestalten, denn gerade bei Frühgeborenen fehlen oft die radiologisch wegweisenden intrapulmonalen Infiltrate und das radiologische Bild imponiert wie ein Atemnotsyndrom; bei annähernd gleicher Symptomatik ist dies auch die wichtigste Differentialdiagnose.

Weltweit liegt die Inzidenz der intrauterinen oder konnatalen Pneumonie in den ersten 48 Lebensstunden bei 10 bis 38% aller Totgeburten und bei 20 bis 63% aller lebendgeborenen, aber später verstorbenen Neugeborenen (Barnett und Klein, 2001). In einer anderen, wenn auch schon länger zurückliegenden Untersuchung von 1971, finden Naeye et al. in der Autopsie von über 1000 Neugeborenen, die innerhalb der ersten zwei Lebenstage verstorben sind, Anzeichen einer Pneumonie (Naeye et al., 1971; Duke, 2005).

Erreger und Therapie

Gruppe B-Streptokokken

Streptokokken sind fakultativ anaerobe, kettenförmig hintereinander gelagerte gram-positive Bakterien. Sie sind teilweise zur Hämolyse fähig und werden hierdurch auch weiter in alpha-, beta- oder nicht-hämolisierende *Streptokokken* unterteilt.

Alpha-hämolisierenden Arten machen eine inkomplette Hämolyse - es bleiben hierbei im Blutagarpräparat Resterythrozyten im Hämolysehof intakt - wobei beta-hämolisierende *Streptokokken* eine komplette Hämolyse auslösen. Das Hämoglobin der Erythrozyten wird hierbei zu Bilirubin abgebaut.

Beta-hämolisierende *Streptokokken* werden nach einem Zellwandpolysaccharid, der sogenannten C-Substanz, weiter in die Lancefield-Gruppen A bis T unterteilt, benannt nach ihrer Entdeckerin Rebecca Lancefield.

Besonders bedeutsam sind die Erreger der Gruppen A und B.

Gruppe A-Streptokokken (*S. pyogenes*) lösen zum Beispiel Scharlach aus und sind, je nach Virulenzfaktoren, auch für die eitrige Fasziiitis oder das Toxic-shock-Syndrom verantwortlich. Darüber hinaus ist *S. pyogenes* in der Lage immun-pathologische Folgeerkrankungen auszulösen.

Gruppe B-Streptokokken (*GBS*, *S. agalactiae*) kommen beim Menschen hauptsächlich im Darm und bei Frauen vaginal vor. Die Zahlen der vaginal *GBS*-besiedelten Frauen zum Zeitpunkt der Geburt schwanken zwischen 5 und 25% (Rocchetti et al., 2010; Dechen et al., 2010). Die Übertragungsrate von Keimen einer vaginal *GBS*-positiven Mutter auf die Haut oder Schleimhaut ihres Neugeborenen liegt bei einer vaginalen Geburt bei ungefähr 50 bis 60%, wobei die Inzidenz einer symptomatischen Erkrankung nur 0,2 bis 0,5% beträgt. Diese Inzidenz steigt bei Unreife des Kindes jedoch sprunghaft an und liegt bei einem Frühgeborenen bei 15 bis 20% und bei Frühgeborenen unterhalb der 28. Schwangerschaftswoche sogar bei 100% (Berner et al., DGPI-Handbuch 2010). Im „early-onset“-Bereich (ca. 85%) spielt bei reifen Neugeborenen vor allem die Pneumonie als mögliche Erkrankungsmanifestation eine Rolle. Umso jünger und unreifer das Kind, desto eher manifestiert sich eine Sepsis. Die Meningitisrate liegt hier bei positiver Blutkultur bei 10 bis 20%.

Im „late-Onset“-Bereich – der Infektionsweg ist hier vor allem horizontal (nosokomial) durch *GBS*-besiedelte, aber nicht getestete Mütter, Pflegepersonal

oder andere Neugeborene - dominiert die Meningitis mit über 60% (Berner et al., DGPI-Handbuch 2010).

Frühgeborene unter 1500g haben verglichen mit reifen Neugeborenen ein 20-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko.

GBS sind etwa seit den 1970igern die führenden Auslöser einer neonatalen Sepsis und Meningitis (Schuchat, 1998; Phares et al., 2008). Die Inzidenz liegt bei etwa 0,4 pro 1000 Neugeborenen in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) und bei 0,28 pro 1000 in Deutschland (Fluegge et al., 2006).

Gefürchtet sind *GBS* vor allem wegen ihres möglicherweise sehr rasanten und fulminanten Verlaufs und der hohen Morbidität und Mortalität. Die Mortalität bei einer *GBS*-Sepsis liegt bei bis zu 50%, bei einer Pneumonie bei ca. 9% und bei der *GBS*-Meningitis bei ca. 4%. Nicht genau erfasst wird in den Erhebungen die hohe Morbidität, vor allem Entwicklungsstörungen wie mentale Retardierung und ein Hör- oder Sehverlust (Schrag et al., 2000).

Die Therapie des Kindes bei bereits ausgebrochener Erkrankung oder bei Krankheitsverdacht besteht in der Gabe eines geeigneten Antibiotikums. Hier ist vor allem das klassische Penicillin G oder auch Ampicillin wegen seiner geringen Nebenwirkungen, der grossen therapeutischen Breite und dem Fehlen von *GBS*-Resistenzen sehr gut geeignet (Fluegge et al., 2004). Aber auch Cephalosporine eignen sich gut.

Zusätzlich ist allerdings die prophylaktische Behandlung der *GBS*-positiv getesteten Mütter sehr sinnvoll. Die Testung der Schwangeren erfolgt per Abstrich in der 35. bis 37. Schwangerschaftswoche. Dies gehört in Deutschland allerdings nicht zu den Regelleistungen der Krankenkassen. Ist der Abstrichbefund positiv, so wird mit Einsetzen der Wehen, bzw. bei Blasensprung eine antibiotische Prophylaxe mit Penicillin G durchgeführt. In den USA konnte durch diese Maßnahme die Inzidenz invasiver *GBS*-Erkrankungen um 65% gesenkt werden (Fluegge et al., 2006). Genaue Daten für Deutschland werden gerade erstellt.

Escherichia coli

Escherichia coli (*E.coli*) gehört zur Familie der Enterobakterien und ist ein gerades, gram-negatives, fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium. Es kommt in der Darmflora vieler Tiere und des Menschen vor, spielt dort eine wichtige Rolle

beim Schutz vor Fehlbesiedelungen anderer Bakterien und löst per se keine Erkrankung aus.

Allerdings gibt es auch obligat pathogene *E.coli*-Stämme, zum Beispiel die enterohämorrhagischen *E.coli* (EHEC), die für das hämolytisch-urämisches Syndrom und die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP), beides sehr schwerwiegenden Erkrankungen, verantwortlich sind.

E.coli verursacht zwar unter anderem eine Pneumonie, sehr gefürchtet ist aber vor allem der Übergang in eine neonatale Sepsis oder Meningitis die nicht selten einen fulminanten Verlauf nimmt. Die Mortalität ist dementsprechend hoch, zwischen 5 und 30%, die Rate der entwicklungsneurologischen Schädigungen nach einer Infektion liegt bei ungefähr einem Drittel (Jones et al., 2004; Daley et al., 2004; Mittal et al., 2010).

In Untersuchungen zu den häufigsten Erregern einer early-onset Sepsis, *GBS* und *E.coli*, sind die Zahlen der schweren *GBS*-Verläufe zwar Dank der flächendeckend eingeführten intrapartalen antibiotischen Prophylaxe, rückläufig, *E.coli*-positive early-onset-Septitiden bleiben aber in ihrer Häufigkeit gleich oder nehmen in manchen Untersuchungen sogar zu (Bizzarro et al., 2008). Als zunehmendes Problem zeichnet sich hierbei vor allem die steigende Zahl der antibiotikaresistenten Bakterienstämme, vor allem gegen das oft in Kombination mit Ampicillin eingesetzte Gentamicin, ab.

Staphylokokkus aureus

Staphylokokkus aureus (*Staph. aureus*) gehört zu den gram-positiven Kokken, ist fakultativ anaerob und steht der Häufigkeit nach an dritter Stelle der Auslöser einer early-onset-Infektion des Neonaten.

Staph. aureus verfügt über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren. Die Koagulase zum Beispiel aktiviert den letzten Schritt der Gerinnungskaskade und das Protein A schafft es durch Interaktion mit den Fc-Komponenten der Immunglobuline IgA, IgM und IgG, deren Phagozytosefähigkeit zu behindern. Zum Schutz vor toxischen Sauerstoffprodukten bildet *Staph. aureus* die Katalase, und die Exfoliatine verursachen die Lösung der Desmosomen beim „staphylococcal scaled skin syndrome“ (SSSS).

Auch produziert *Staph. aureus* Superantigene wie zum Beispiel das „toxic-shock-syndrom-toxin 1“ (TSST-1), die in der Lage sind, durch eine polyklonale T-

Zellaktivierung und eine unkoordinierte, sich selbst verstärkende Zytokinsekretion mit massiver TNF- α - und Histaminausschüttung eine Entzündungsreaktion zu maximieren.

Staph. aureus kann sowohl eine Sepsis, als auch oberflächliche und tiefe Eiterungen, wie zum Beispiel eine Osteomyelitis, Abszesse, Peri- und Endokarditiden, Empyeme, aber auch Pneumonien und Meningitiden verursachen. Zunehmend schwierige Resistenzlagen und die Ausbreitung methicillin-resistenter *Staph. aureus*-Stämme (MRSA) werden diesen Keim in Zukunft wahrscheinlich immer schwieriger beherrschbar machen.

2. Fragestellung

Die Inaktivierung des endogenen Surfactantsystems ist ein bedeutender Faktor bei verschiedenen Erkrankungen. Die Gabe von exogenen Surfactantpräparaten hat sich in vielen dieser Fälle als therapeutische Maßnahme etabliert.

Bakterielle Infektionen haben, entweder als primärer Auslöser oder sekundär als Superinfektion, einen bedeutenden Einfluss auf die Wirkung des endogenen Surfactantsystems und auf die Wirksamkeit therapeutisch gegebener exogener Surfactantpräparate.

Surfactant unterliegt generell einer möglichen Inaktivierung durch Mekonium, Plasmaproteine oder anderer Blutplasmabestandteile.

In der Vergangenheit hat man durch die Mischung exogener Surfactantpräparate mit bestimmten Stoffen, vor allem Proteinen, eine Zunahme der Resistenz gegenüber Inaktivierung von außen zeigen können.

Die vorliegende Arbeit sollte daher folgende Fragen beantworten:

- Welchen Einfluss hat Surfactant mit und ohne PxB-Zusatz auf das Proliferationsverhalten verschiedener Keime?
- Hat Mekonium einen proliferationsbeeinflussenden Effekt? Falls ja, ab welcher Konzentration?
- Behält ein exogenes Surfactantpräparat trotz der Zugabe von PxB seine oberflächenspannungsreduzierende Wirkung?
- Kann diese oberflächenspannungsreduzierende Wirkung durch die Zugabe von Calcium verbessert werden?
- Kann PxB die Oberflächenaktivität von Surfactant verbessern?
- Behält PxB seine antimikrobielle Wirkung im gram-negativen Bereich nach Vermischen mit Surfactant?
- Wie wirkt ein Surfactant-PxB-Gemisch auf gram-positive *Gruppe-B-Streptokokken* bzw. gram-positive *Staphylokokkus aureus*?

3. Material und Methoden

3.1 Mekonium und seine Aufarbeitung

Probengewinnung

Das verwendete Mekonium, die erste Stuhlentleerung der Neugeborenen, wurde auf der Wochenstation der Universitätsfrauenklinik Göttingen durch die Hebammen – mit Einverständnis der Eltern - aus den Windeln der Neugeborenen entnommen und in vorher gewogene (Waage: Sartorius 2001 MP2, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) Stuhlröhrchen abgefüllt. Ein positives Ethikkommissionsvotum diesbezüglich wurde im Vorfeld eingeholt (Ethikkommission der Universität Göttingen, Antragsnummer 7/3/03).

Im Zeitraum von 4 Wochen wurden 40 Mekoniumproben gesammelt. Diese wurden innerhalb von 24 Stunden weiter verarbeitet. Zwischenzeitlich wurden sie bei 4° C gelagert, um ein eventuelles Bakterienwachstum zu reduzieren.

Es wurde nur Mekonium von reifen und gesunden Neugeborenen verwendet. Eine infektiologische Erkrankung der Mutter oder des Kindes durfte nicht vorliegen. Mikrobiologisch sollte das Mekonium relativ keimarm sein, wobei die Grenze der Verwendbarkeit auf unter 10^4 KBE (kolonienbildende Einheiten)/mg Mekonium festgelegt wurde.

Dieses Vorgehen, wie auch der Prozeß der weiteren Probenaufbereitung, wurde in Vorarbeiten in unserem Labor entwickelt (Stichtenoth, 2002).

Mikrobiologische Untersuchung

Für die mikrobiologische Untersuchung wurde von jeder nativen Mekoniumprobe eine kleine Menge steril entommen. Die so entnommene Menge schwankte je nach Konsistenz der Probe zwischen 60 und 120mg. Die Stuhlröhrchen mit den Proben wurden erneut gewogen und bei -80°C eingefroren.

Das mit der Impföse entnommene Mekonium wurde dann in 100µl einer Phosphat-Pufferlösung (PBS; Phosphate buffered saline (Dublecco) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} ; Seromed®; Biochrom AG, Berlin, Deutschland) abgestreift und unter Zuhilfenahme eines Vortexers suspendiert (Vortex Genie, Bender & Hohein AG, Zürich, Schweiz). Aus dieser Lösung wurden Verdünnungen von $1:10^2$, $1:10^4$ und $1:10^6$ (logarithmische Verdünnung), ebenfalls in PBS-Puffer, hergestellt.

100µl der verdünnten Mekoniumsuspensionen wurden auf vorbereitete Schafsblutagar-Nährböden (5% Schafsblut, defibriniert, Unipath GmbH, Wesel, Deutschland und Columbia Agar Base, Oxoid CM 0331, Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, Großbritannien) pipettiert und mit einer über der Bunsenbrennerflamme zu 90° abgewinkelten gläsernen Pasteurpipette kreisförmig verteilt. Zur Sterilisation wurden die Glaspipetten in 99,9% vergälltem Alkohol gelagert und direkt vor jeder Verwendung über dem Bunsenbrenner abgeflammt. Die Ausstriche jeder Verdünnung wurden zweifach angelegt (Doppelbestimmung).

Die quantitative Auswertung des mikrobiologischen Wachstums der Proben erfolgte nach 24 und 48 Stunden Inkubation bei 37°C. In die Ergebnisse einbezogen wurden alle Platten jeder Mekoniumverdünnung, auf denen zwischen 10 und maximal 250 KBE/Nährboden wuchsen.

Jede ausgestrichene Mekoniumprobe wurde protokolliert. Ab einer Abweichung der Mittelwerte der Doppelbestimmungen über 10% wurden die Proben verworfen.

Gefriertrocknung

Analog der oben bereits zitierten Arbeit (Stichtenoth, 2002), entschlossen wir uns bei der Frage der Konservierung des Mekoniums für die Gefriertrocknung der Proben. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass man gefrorenes Material direkt, unter Umgehung des flüssigen Aggregatzustandes, trocknen kann. Eis wird so direkt in Gas umgewandelt, einen Vorgang, den man Sublimation oder Lyophilisation nennt. Die Lyophilisation ist eine sehr schonende Konservierungsmöglichkeit für biologische Materialien. Die Wasserlöslichkeit von Proteinen und die allermeisten chemischen Verbindungen bleiben so bestehen.

Die Proben wurden in der Gefriertrocknungsanlage (Beta 2000, Christ, Osterode am Harz, Deutschland) 24 Stunden bei -20°C getrocknet und danach erneut gewogen.

Das Lyophilisat der einzelnen Proben wurde dann in einem sterilen Mörser zerrieben und gleichzeitig gemischt, so dass aus den Einzelproben ein grosser Mekoniumpool entstand. Dieser wurde bei -80°C gelagert.

Herstellung von Verdünnungsreihen

Um Verdünnungsfehler zu vermeiden, erwiesen sich einmalig angelegte großvolumigere Verdünnungsreihen, die später, aufgeteilt in Aliquots, bei -80°C gelagert wurden, als sinnvoll. Damit wurde die Gefahr der Kontamination und eines eventuellen Keimwachstums in an- oder aufgetauten Proben gering gehalten.

Sowohl für das Mekonium als auch für das Surfactant wurde als Verdünnungsmittel NaCl 0,9% mit oder ohne Zusatz von 1,5mM CaCl₂ (CaCl₂ x 2 H₂O, Calciumdichloriddihydrat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) gewählt. Hiermit sollte zusätzlich untersucht werden, ob die Surfactantfunktion *in vitro* durch den Zusatz von Calcium optimiert werden kann. Sowohl Kobayashi und Robertson als auch Schürch und Bachofen hatten dies in Untersuchungen gesehen (Kobayashi und Robertson, 1983; Schürch und Bachofen, 1995).

Aus dem Mekoniumlyophilisat wurden Stammlösungen mit einem Mekoniumgehalt von 20 und 40mg/ml hergestellt. Hieraus wurden dann in Verdünnungsreihen (Mekoniumlösung:NaCl/CaCl₂-Lösung im Verhältnis 1:2) Konzentrationen von 20, 10, 5, 2,5, ...bis 0,02mg/ml hergestellt. Die Verdünnungen wurden zwischen den Einzelschritten gevortext, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.2 Surfactant und Polymyxin B

Wir verwendeten in dieser Arbeit das exogene Surfactantpräparat Curosurf[®] (Serono Pharma GmbH, Unterschleißheim, Deutschland), ein modifiziertes natürliches Surfactant. Über mehrere Herstellungsschritte, die eine organische Extraktion einbeziehen, wird das Endprodukt aus Tierlungen gewonnen (**Curstedt-Robertson-Surfactant**; Robertson et al. 1990).

Curosurf[®] enthält etwa 99% polare Lipide, wovon ungefähr 77% Phosphatidylcholin, 1,5% Phosphatidylglycerol und 20,5% sonstige Phospholipide sind. Weiterhin enthält es 1% der hydrophoben Proteine SP-B und SP-C im Verhältnis 1:2 (Schürch und Bachofen, 1995). Die von uns genutzten Chargen der Konzentration 240mg Phospholipide in 3ml Suspension (entspricht 80mg/ml) waren die 194/09, die 148/01 und die 200/05.

Curosurf® mit 1 und 2% Polymyxin B (PxB) wurde selbst hergestellt. Hierzu wurden Curosurf® und PxB auf eine Konzentration von 40mg/ml gebracht und mit 1, bzw. 2% PxB (Polymyxin B sulfate, 8100 units per mg, Lot No. 092K2515, EC No. 215-774-7, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gemischt. Vor den Messungen wurden die Lösungen 30 Minuten bei 37°C geschüttelt und inkubiert.

3.3 Bestimmung der Oberflächenspannung

Pulsating-Bubble-Surfactometer

Das Pulsating-Bubble-Surfactometer (PBS; Electronetics Corporation, Buffalo, New York, USA) ist eine Apparatur, mit der man die Oberflächenspannung (γ) einer Gasblase, die in einer Flüssigkeit pulsiert, bestimmen kann. Das PBS kann als ein *in-vitro*-Modell der Alveole angesehen werden, in dem an kleinen Probenvolumina die Oberflächenspannung im dynamischen Verlauf gemessen wird.



Abb. 12 Pulsating-Bubble-Surfactometer (PBS)

Hierzu nutzt das Gerät das LaPlace'sche Gesetz (Enhorning, 1977), wonach sich die Oberflächenspannung wie folgt errechnen lässt:

$$\Delta p = 2\gamma/r \quad \leftrightarrow \quad \gamma = (\Delta p \times r)/2$$

Das Gerät funktioniert wie folgt: Während in einer mit der Probenflüssigkeit gefüllten 50 μ l großen Messküvette mit Hilfe einer Präzisionskolbenpumpe eine Gasblase generiert und in ihrer Größe immer wieder verändert wird, wird Δp (der transmurale Druck zwischen der Atmosphäre und der Flüssigkeit) kontinuierlich gemessen.

Die Blase wird zu Beginn jeder Messung unter mikroskopischer Einstellung auf eine definierte Anfangsgröße gebracht. Die Kolbenpumpe bewegt dann Flüssigkeit aus der Küvette rein und raus und lässt die Blase so mit einer frei wählbaren Frequenz pulsieren. Die Oberfläche der Blase wird hierbei zyklisch um 50% reduziert. Der minimale Radius ist 0,40mm, der maximale 0,55mm. Der Druck in der Küvette wird alle 0,06 Sekunden gemessen und an einen Computer übertragen.

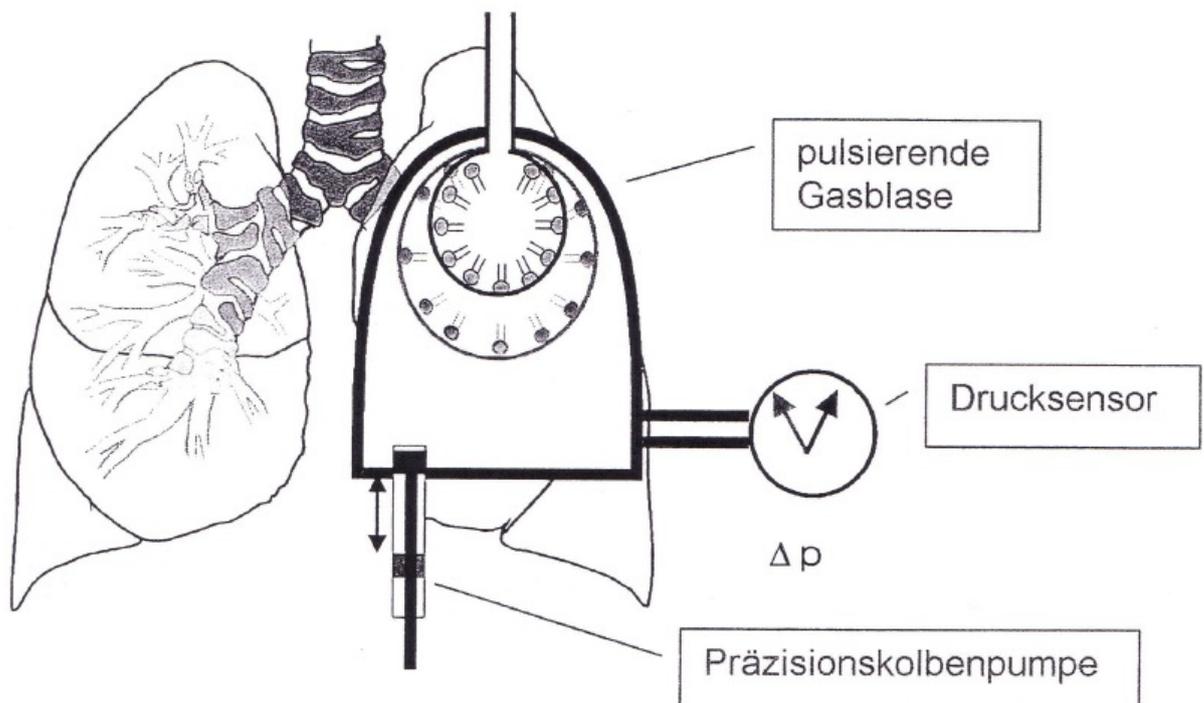


Abb. 13 Schemazeichnung zum Messprinzip der Oberflächenspannung im PBS: Durch eine Kolbenpumpe wird die Gasblasengröße verändert, wobei der Druck Δp im dynamischen Verlauf gemessen wird. Diese Situation spiegelt modelhaft die Verhältnisse in der Alveole wider. (modifiziert nach Enhorning, 1977)

Die Messküvette verfügt über einen sehr dünnen Schlot, der die generierte Blase mit der Atmosphäre verbindet. Regelmässige Eichung des Drucksensors gegen die Atmosphäre ermöglicht es dann, während der Messung den Druck in der Küvette gegen den der Atmosphäre abzugleichen und die während der zyklischen Blasenvolumenänderung entstehende Differenz als Δp zu ermitteln. Da der Blasenradius r durch die regelmässig pumpende Kolbenpumpe bekannt ist und Δp gemessen wird, ist man in der Lage alle 0,06 Sekunden nach der obenstehenden Formel die Oberflächenspannung γ zu errechnen.

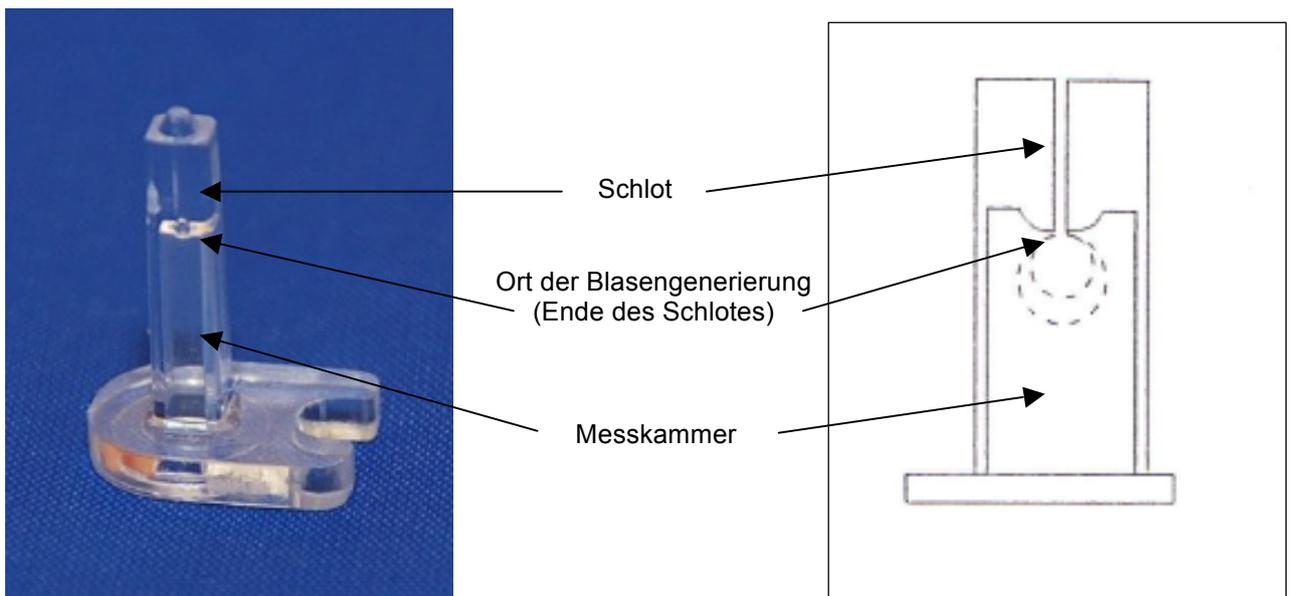


Abb. 14 und 15 Photo und Schemazeichnung der Messküvette.

Um möglichst realistische *in vivo*-Verhältnisse zu schaffen, steht die Messküvette nach unten dicht verschlossen in einem 37°C warmen Wasserbad.



Abb. 16 Messküvette (weisser Kreis) in meßbereitem Wasserbad. Justiermikroskop (gelber Kreis)



Abb. 17 Messküvette (weisser Kreis) in abgesenktem Wasserbad

Vor jeder Messung muß das Gerät vorbereitet werden, da bereits kleinste Mengen oberflächenaktiver Probenflüssigkeiten die Messungen verfälschen können.

Das Wasserbad wird hierfür täglich vor Beginn der Messungen mit deionisiertem, entgastem Wasser gespült. Die Küvetten werden nach jeder Messung ebenfalls mit deionisiertem Wasser gespült und dann in einer speziellen Reinigungslösung (2% Extran MA 03 phosphatfrei, Merck KG, Darmstadt, Deutschland) eingelegt. Abschließend werden sie nochmals mit deionisiertem Wasser ab- und durchgespült.

Das PBS wird vor jedem Messtag mit entgastem, also abgekochten Aqua Bidest gespült und kalibriert. Das Entgasen durch Abkochen soll hierbei verhindern, dass kleinste Luftblasen im System entstehen und durch Adsorption oberflächenaktiver Substanzen die Messungen verfälscht werden.

Um die Funktionstüchtigkeit des PBS zu überprüfen, können Eichmessungen mit Wasser oder 40%igem Ethanol durchgeführt und mit Daten aus der Literatur (Hall et al. 1993) abgeglichen werden.

Messvorgang

Die Küvette wird mittels einer Kapillarspitze und einer Pipette luftblasenfrei mit ca. 50µl der Probenflüssigkeit befüllt und mit einem Spezialhalter auf den Messplatz des PBS aufgesetzt. Der Messplatz kann hierzu mechanisch aus der Wanne des Wasserbades gehoben werden. Sollte Flüssigkeit aus dem Schlot ausgetreten sein, so wird diese vorsichtig abgetupft ohne durch die Sogwirkung eines Tuches Probenmaterial über den Schlot aus der Küvette zu ziehen. Der Messplatz wird dann wieder in das Wasserbad gesenkt. Unter mikroskopischer Kontrolle wird nun Probenflüssigkeit aus der Küvette gesaugt, wodurch über den Schlot, der Verbindung zur Atmosphäre hat, Luft angesaugt und so eine Blase generiert wird. Im Mikroskop ist die minimale und maximale Blasengröße durch zwei Linien definiert. Mit der Erzeugung der Minimalblase beginnt die 2-minütige Adsorptionsphase von oberflächenaktiven Substanzen aus der Probenflüssigkeit an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht. Dann beginnt mit der Expansion auf den maximalen Radius die Pulsation und damit die dynamische Phase. Die Pulsationsdauer in unseren Versuchen betrug standardisiert 5 Minuten, die Pulsationsfrequenz 20 Zyklen/Minute und die Temperatur des Wasserbades 37°C.

Selten kam es zur Ausdehnung der Blase, weshalb unter der Messung die Blasengröße diskret nachreguliert werden musste.

Curosurf[®] , Curosurf[®]/CaCl₂ und Curosurf[®]/CaCl₂ plus 1%PxB wurden mit Mekonium in aufsteigender Dosierung gemischt und vorinkubiert. Jedes Gemisch wurde fünf Mal im PBS gemessen.

Die genannte Surfactantkonzentration von 2,5mg/ml wurde gewählt, da wir in Vorarbeiten gesehen hatten, dass diese Konzentration relativ sensibel gegenüber einer Inaktivierung ist.

	Curosurf[®] (mg/ml)	Mekonium (mg/ml)	PxB (% bezogen auf die Surfactantkonzentration)	CaCl₂ (mM)
statische Oberflächenaktivität	2,5 und 5	1 und 2	0 und 1	0 und 1,5
dynamische Oberflächenaktivität	2,5	5, ...0,08 (serielle Verdünnungsreihe)	0 und 1	1,5

Tab.1 Ansätze zur Bestimmung der Oberflächenspannung im PBS

3.4 Ermittlung des Bakterienwachstums

Versuchsvorbereitungen

Bei unseren Bakterienwachstumsversuchen orientierten wir uns bei der Methodik an der Vorarbeit von Möller aus dem Jahre 1998 (Möller, 1998). Die verwendeten Bakterienarten wurden ausgesucht, da sie die Hauptkeime der direkt postpartalen Infektionserkrankungen darstellen.

Von den eingesetzten Bakterien wurden zunächst Aliquots erstellt, um eine gleiche Startmenge von koloniebildenden Einheiten (KBE) des jeweiligen Bakteriums zu gewährleisten.

Für unsere Versuche verwendeten wir analog zu den häufigsten Erregern einer konnatalen Pneumonie drei verschiedene Bakterien (siehe Einleitung):

- 1) *E.coli* (Stamm ATTC 25922)
- 2) GBS (Stamm 090 la Colindale; eine Variante hoher Dichte ohne Polysaccharidkapsel; freundlicherweise bereitgestellt von Stellan Håkanson, Universität Umeå, Schweden)
- 3) *Staph. aureus* (Stamm ATTC 25923)

Von den verschiedenen Bakterien wurden mit Hilfe der Messung der optischen Dichte Aliquots zu je 1ml erstellt. Um ein weiteres Wachstum zu vermeiden, wurden diese anschließend bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Reagenzgläser der Verdünnungsreihen wurden zu Versuchsbeginn mit 900µl, bzw. 4,5ml 0,9%igem NaCl gefüllt, verschraubt und bei 121°C für 20 Minuten im Autoklav sterilisiert.

Für den Schafsblutagar wurde ein Standard-Agar (39g/l Columbia Agar Base, Oxoid CM 0331, Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, Großbritannien) mit 1 Liter Aqua dest. angerührt, autoklaviert und mit zimmertemperaturwarmen Schafsblut (50ml pro 1000ml Agar; Schafsblut, defibriniert, Unipath GmbH, Wesel, Deutschland) vermischt.

Für die *Staph. aureus*-Bakterien wurden Petrischalen vorbereitet und bei 4°C gelagert. Hierzu wurde der wie oben beschrieben angerührte Schafsblutagar in die Petrischalen gegossen, mit dem Bunsenbrenner abgeflammt und nach Auskühlung bei Raumtemperatur bei 4°C gelagert. Maximal waren die Platten so bis zu 3 Wochen haltbar, abhängig von einer eventuellen Verkeimung. Nach Lagerung sichtbar verkeimte Platten wurden verworfen.

Versuchsablauf

Erreichen einer logarithmischen Wachstumsphase

Zu Beginn jedes Versuches wurde ein Aliquot mit Bakterien aufgetaut und zur Anreicherung in 11,5ml einer sterilen Standard-I-Nährbouillon (Standard-I-Nährbouillon für die Mikrobiologie, 25g/l, E. Merck, Darmstadt, Deutschland) für 16 Stunden über Nacht inkubiert. Um die logarithmische Wachstumsphase der Bakterien zu erfassen, also eine bestmögliche Proliferation zu gewährleisten, wurden sie danach im Verhältnis 1:7 in 50ml vorgewärmte Standard-I-Nährlösung umgesetzt und erneut für eine (*E.coli*), bzw. für 2,5 Stunden (*GBS* und *Staph.*

aureus) bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Bakteriensuspensionen in 2 sterile 50ml Röhren überführt und bei 1800 x g für 10 Minuten abzentrifugiert, resuspendiert und zweimal mit NaCl 0,9% gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 1800 x g wurde ihre optische Dichte bei 595 nm bestimmt. Um möglichst gleiche Bakterienkonzentrationen zu erreichen, wurde die Zieldichte von ~1,2 durch die entsprechende Zugabe von 0,9%igem NaCl eingestellt. In Vorarbeiten wurde eine Eichkurve erstellt, wodurch wir wussten, dass diese optische Dichte einer Ausgangskonzentration von 8×10^8 KBE/ml entsprach.

Pipettieren der verschiedenen Ansätze

Die verschiedenen Inhaltsstoffe des jeweiligen Versuchsansatzes wurden daraufhin auf eine Gesamtmenge von 1ml aufpipettiert.

Zu den Zeitpunkten 0 Stunden, 1 Stunde, 3 Stunden und 5 Stunden Inkubationszeit bei 37°C im Schüttelinkubator (180 Umdrehungen pro Minute) wurden 100µl aus diesen Ansätzen entnommen und in die Röhren mit den 900µl NaCl überführt. Von dieser 1:10 Verdünnung wurden dann je 500µl entnommen und weiter in Serie in die mit 4,5ml 0,9%igem NaCl gefüllten nächsten Röhren verdünnt. So entstand eine logarithmische Verdünnungsserie im Verhältnis 1:10.

Ausplattieren

Von den einzelnen Verdünnungen wurden je 100µl entnommen und in eine Petrischale pipettiert, wobei bei den ersten Versuchen fast alle Verdünnungen ausgestrichen wurden. Damit sollte die noch unbekannt entstehende Keimzahl pro Verdünnung ermittelt werden, um im folgenden nur noch zählbare Verdünnungen ausplattieren zu müssen und so Material zu sparen.

Die hämolysierenden *GBS* und *E.coli* wurden in die leeren Petrischalen pipettiert, mit noch warmen Schafsblutagar bedeckt und durch leichtes Schwenken gemischt. Bevor die Schalen zur Inkubation bei 37°C in den Brutschrank gestellt wurden, liessen wir den Agar noch kurz bei Raumtemperatur aushärten. Diese Art der Anlage in noch flüssigem Agar wählten wir für die *GBS* und die *E.coli*, da durch ihre Hämolysehöfe die einzelnen koloniebildenden Einheiten der Bakterien besser sichtbar wurden und so auch genauer auszuzählen waren (Möller, 1998).

Da *Staph. aureus* keine Hämolysehöfe ausbildet wurden hierfür, wie oben beschrieben, Schafsblutagarplatten vorbereitet, 100µl der jeweiligen Verdünnung auf die Agarplatte pipettiert und dann mit einer vorne verschlossenen 90° abgewinkelten Glaspipette, die vorher abgeflammt und ausgekühlt wurde, ausgestrichen.

Ablezen des Bakterienwachstums

Pro Verdünnung wurde eine Doppelbestimmung angelegt, 24 Stunden bei 37°C inkubiert und die KBE von Hand ausgezählt. Die Auszählergebnisse wurden einzeln dokumentiert und daraus der Mittelwert errechnet.

Pro Ansatz wurden 5 Versuchsreihen erstellt und ausgezählt.

	Curosurf® (mg/ml)	Mekonium (mg/ml)	PxB (% bezogen auf die Surfactantkonzentration)
<i>GBS</i>	0 und 10	0 und 20	0 und 1
<i>E.coli</i>	0 und 10	0 und 20	0 und 1
<i>Staph. aureus</i>	0 und 10	0 und 20	0 und 1

Tab. 2 Ansätze zur Bestimmung des Bakterienwachstums

Weiteres verwendetes Material:

- Schüttelinkubator: G 24, Environmental Inkubator Shaker, New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen, Deutschland
- Autoklav: Systec V 95, Systec GmbH, Wetzlar, Deutschland
- Petrischalen: Petrischalen 92 x 16mm mit Nocken, Sarstedt AG &Co., Nümbrecht, Deutschland
- Photometer: Spektralphotometer Ultraspec III, Pharmacia Biosystems GmbH, Freiburg, Deutschland
- Reagenzgläser: Gewindereagenzgläser mit Kunststoffkappen, Schuett Labortechnik GmbH, Göttingen, Deutschland
Verwendet für die Verdünnungsreihen und die Inkubation der Ansätze

3.5 Statistische Analyse

Die Resultate der Bestimmung der Oberflächenaktivität wie auch die Ergebnisse der Bakterienwachstumskurven sind im folgenden als Mittelwert +/- Standardabweichung ausgedrückt. Für die statistische Analyse nutzen wir die einfaktorielle (univariante) Varianzanalyse (one-way ANOVA) für wiederholte Messungen.

Die statische Oberflächenaktivität bei minimalen (γ_{\min}) und maximalen (γ_{\max}) Blasenradius der mekoniumhaltigen Ansätze wird mit nicht-mekoniumhaltigen Kontrollansätzen über den Dunnett's post-hoc-Test analysiert.

Bonferroni's post-hoc Test wird für den Vergleich der statischen Oberflächenaktivität der surfactanthaltigen Ansätze allein und nach Zugabe von CaCl_2 , PxB und CaCl_2 mit PxB, in An-, bzw. Abwesenheit von Mekonium genutzt. Beim Bakterienwachstum vergleichen wir mit dem Dunnett's post-hoc-Test die Werte nach 1, 3 und 5 Stunden Inkubation und Wachstum mit den Werten nach 0 Stunden als Kontrolle.

Als signifikant wird, sofern nicht anders angegeben, ein p-Wert $< 0,05$ bewertet.

Für die statistischen Berechnungen und die Ausgabe in Grafiken nutzen wir die Software GraphPadPrism 4.02 (San Diego, CA, USA).

Die Beratung hinsichtlich der Statistik erfolgte beim Mathematischen Institut der Universität Göttingen.

4. Ergebnisse

4.1 Mekoniumgewinnung

Nach der mikrobiologischen Auswertung müssen wir 12 Proben aufgrund zu hoher bakterieller Kontamination aussortieren.

Das Feuchtgewicht aller verwendeten Proben beträgt 67,26g. Nach der Gefriertrocknung wiegt unser Mekonium-Pool noch 17,08g, was einem Mekoniumanteil Trockengewicht/Feuchtgewicht von 254mg/g entspricht. Hieraus errechnet sich ein durchschnittlicher Feuchtigkeitsanteil von 74,6%.

4.2 Messung der Oberflächenaktivität

Die Messung der statischen Oberflächenspannung im PBS, gemessen nach 5 Minuten der Messung, ergibt für Proben mit einer Surfactantkonzentration von 2,5mg/ml und niedrigem Mekoniumanteil (1mg/ml) eine deutlich verzögerte Adsorption, was sich in hohen Werten für die statische Oberflächenspannung, gemessen zehn Sekunden nach Generierung der Blase, ausdrückt (siehe Tab. 1).

		statische Oberflächenspannung (mN/m)/Zeit			
		2 Sekunden		10 Sekunden	
Surfactant	mg/ml	Kontrolle	+ Mekonium	Kontrolle	+ Mekonium
Curosurf [®]	2,5	32	50	30	47*
+ PxB	2,5	26	56	27	51**
+ CaCl ₂	2,5	28	56	25	51**
+ CaCl ₂ /PxB	2,5	27	52	25	44**

Tab. 3 Statische Oberflächenspannung im PBS, gemessen nach 2 und 10 Sekunden in Abwesenheit (Kontrolle) oder Anwesenheit von Mekonium (1mg/ml); gemessen wurden die Gemische: Curosurf[®] allein, Curosurf[®] + CaCl₂, Curosurf[®] + PxB 1% und Curosurf[®] + CaCl₂/PxB 1%. Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 Messungen.
* p < 0,01 vs. Kontrolle, ** p < 0,001 vs. Kontrolle

In den Proben mit Surfactant (2,5mg/ml) haben wir zusätzlich noch fünf Minuten nach dem Start der Blasenpulsation reduzierte Werte für γ_{\min} gemessen. Ebenso steigert Mekonium signifikant γ_{\max} (siehe Tab. 2).

dynamische Oberflächenspannung nach 5 Minuten [mN/m]

Surfactant	mg/ml	γ_{\min}		γ_{\max}	
		Kontrolle	+ Mekonium	Kontrolle	+ Mekonium
Curosurf [®]	2,5	<3	23*	27	49*
+ PxB	2,5	<3	17*	32	48*
+ CaCl ₂	2,5	<3	17*	29	48*
+ CaCl ₂ /PxB	2,5	<3	6†‡§	31	37‡§

Tab. 4 Dynamische Oberflächenspannung im PBS, gemessen nach 5 Minuten ohne (Kontrolle) oder mit Mekonium; gemessen wurden die Gemische: Curosurf[®] allein, Curosurf[®] + CaCl₂, Curosurf[®] + PxB 1% und Curosurf[®] + CaCl₂/PxB 1%. Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 Messungen.
 ** p < 0,001 vs. Kontrolle; † p < 0,01 vs. +CaCl₂; ‡ p < 0,01 vs. +PxB; § p < 0,01 vs. + Curosurf[®]

Die Zugabe von CaCl₂ und/oder CaCl₂ plus Polymyxin B (PxB) vermag die Inaktivierung durch Mekonium mindestens auszugleichen, wenn nicht sogar zu reduzieren (siehe Tab. 1 und 2).

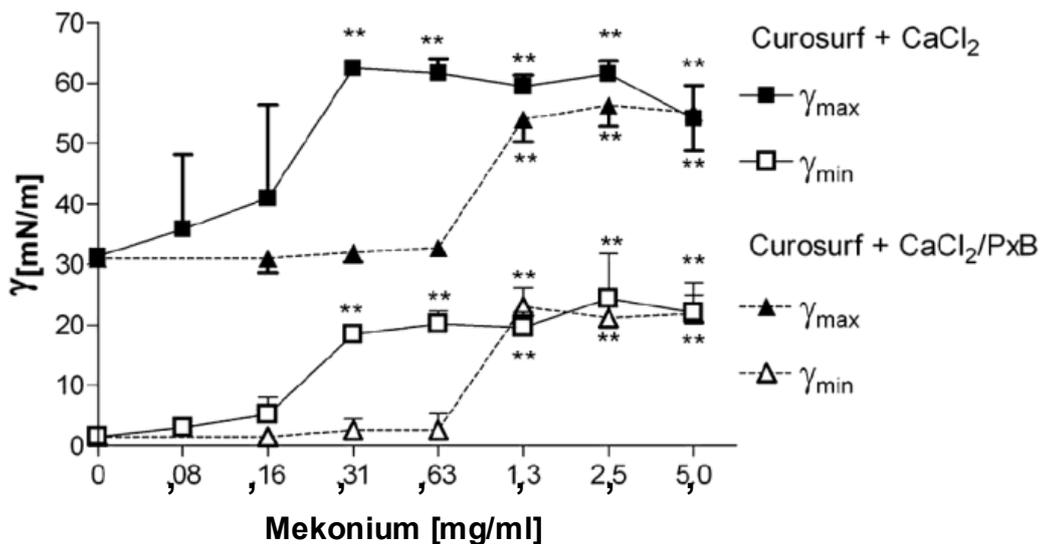


Abb. 18 Minimale (γ_{\min}) und maximale (γ_{\max}) Oberflächenspannung von Curosurf[®] (2,5mg/ml) + CaCl₂ nach Zusatz von verschiedenen Mekoniumkonzentrationen, bzw. mit und ohne 1%PxB
 Messwerte nach 5 Messminuten, dargestellt als mean \pm Standardabweichung.
 **p < 0,01 vs 0mg/ml Mekonium; n = 5 Messungen

Die Zugabe von 1%igem PxB zu Curosurf[®]/CaCl₂ verschiebt die Wirkungskurve nach rechts. Dementsprechend wurden höhere Mekoniumkonzentrationen zur Inaktivierung des Surfactant benötigt.

Die Zugabe von CaCl₂ allein verbessert bereits die oberflächenspannungsreduzierende Wirkung von Curosurf[®].

Verglichen mit Kontrollen die nur Surfactant/ CaCl₂ ohne PxB enthielten, benötigten wir in Curosurf[®]/CaCl₂/PxB-Mischungen eine 4fach höhere Mekoniumkonzentration (1,3mg/ml statt 0,31mg/ml) um γ_{\min} und γ_{\max} zu erhöhen.

Die Zugabe von PxB erhöht also die Resistenz von Curosurf[®]/CaCl₂-Gemischen gegen die Inaktivierung durch Mekonium.

4.3 Bakterienwachstum

Escherichia coli (*E.coli*)

Ausgehend von einer Konzentration von 10^7 KBE *E.coli* zu Versuchsbeginn, sehen wir nach 5 Stunden Inkubation in reiner 0,9%iger Kochsalzlösung keine signifikante Zunahme der KBE/ml.

Signifikant nimmt aber die Konzentration von *E.coli* nach 3 und 5 Stunden Inkubationszeit in Mekonium und in Mekonium/Curosurf[®]-Gemischen etwa um den Faktor 100 zu.

Im Gegensatz dazu können PxB oder Curosurf[®]/PxB-Gemische bereits nach einer Stunde die Proliferation von *E.coli* reduzieren. Nach 5 Stunden Inkubation wurde das *E.coli*-Wachstum um den Faktor 10^4 reduziert.

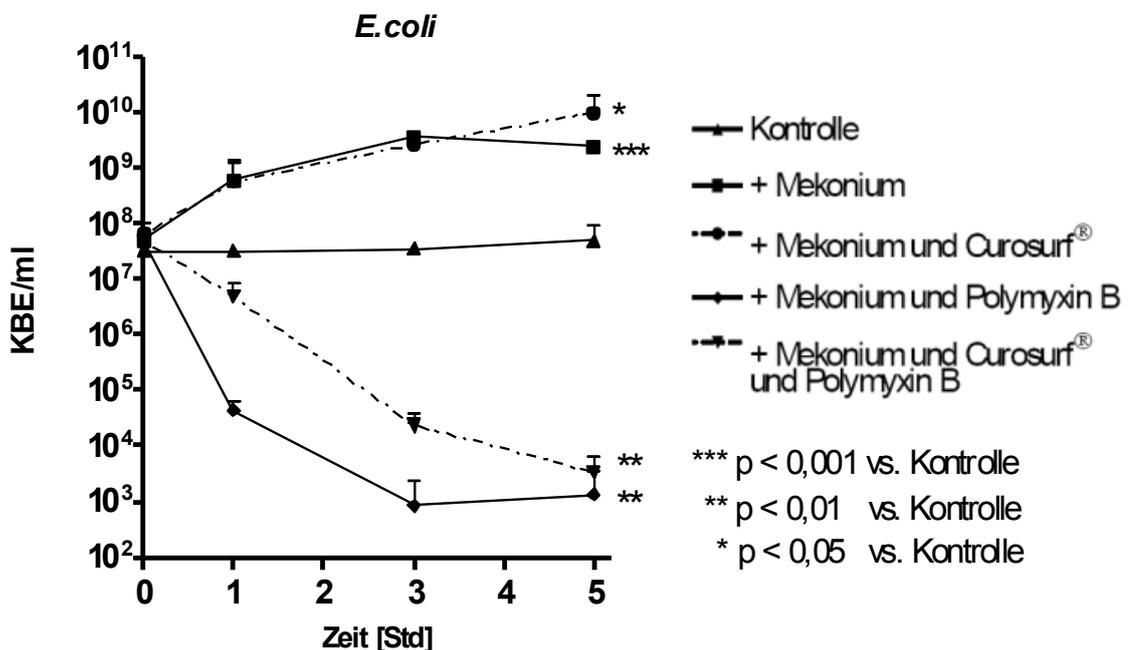


Abb. 19 Einfluß von Mekonium/Curosurf[®] und/oder PxB auf die Proliferation von *E.coli*. Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 Messungen +/- der SD magnus.

Gruppe-B-Streptokokken (GBS)

Auch GBS zeigen inkubiert in reiner 0,9%iger Kochsalzlösung kein Wachstum.

In mekoniumhaltigen Ansätzen nimmt die Konzentration der gram-positiven GBS im Laufe der Inkubationszeit zu.

Gegenüber den Kontrollen zur Stunde 0 der Inkubation sehen wir nach 5 Stunden Inkubationsdauer eine geringgradige Proliferation von GBS in den Ansätzen mit Mekonium und in denen mit Mekonium/Curosurf[®]/PxB.

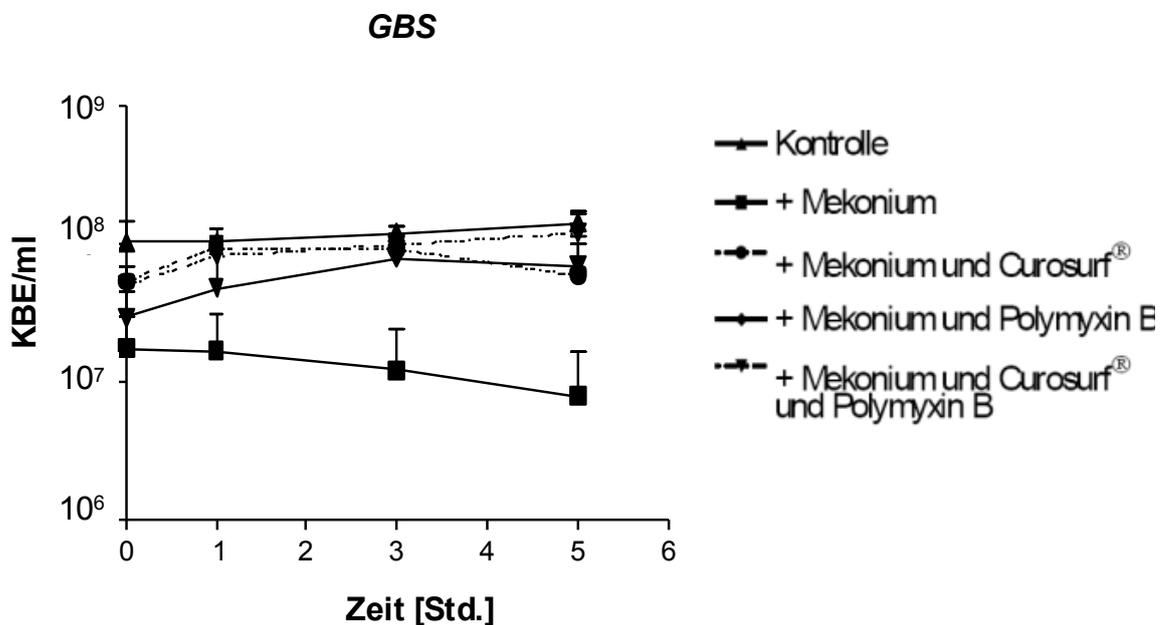


Abb. 20 Einfluß von Mekonium/Curosurf[®] und/oder PxB auf die Proliferation von GBS. Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 Messungen +/- der SD magnus.

Staph.aureus

Auch die getesteten *Staphylokokken* zeigen kein signifikantes Wachstum nach 5 Stunden Inkubation in reiner 0,9%iger Kochsalz-lösung.

Die Proliferation von *Staph. aureus* wird auch durch Mekonium, Curosurf® und/oder PxB ebenfalls nicht beeinflusst.

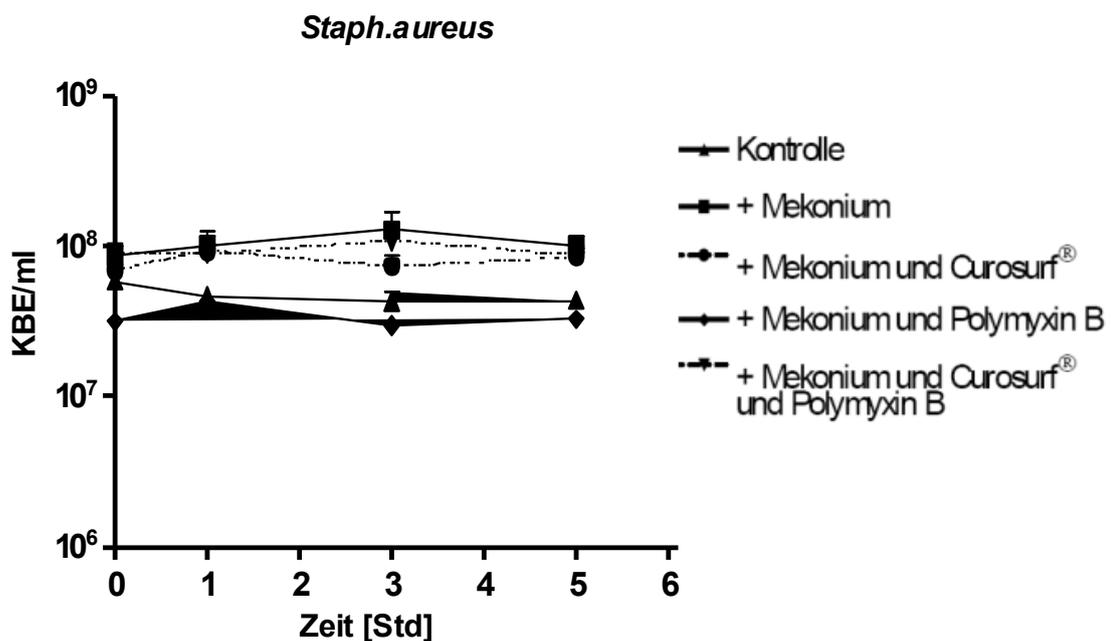


Abb. 21 Einfluß von Mekonium/Curosurf® und/oder PxB auf die Proliferation von *Staph. aureus*. Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 Messungen.

Zusammenfassend stellen wir fest, dass die oberflächenspannungs-reduzierenden Eigenschaften des Curosurf® durch die Zugabe von PxB und/oder CaCl₂ nicht verschlechtert werden. Gleichzeitig behält PxB seine gute antimikrobielle Wirksamkeit gegen gram-negative Erreger, wie zum Beispiel *E.coli*, auch in Gemischen mit Curosurf®.

Bereits die Anwesenheit von Mekonium allein führt bei *E. coli* und bei GBS zur Vermehrung der Bakterien.

Staph. aureus wird in seinem Proliferationsverhalten weder durch Mekonium allein noch durch Curosurf® und/oder PxB beeinflusst.

5. Diskussion

Exogene Surfactantpräparate haben sich beim Atemnotsyndrom des Früh- und Neugeborenen, aber auch bei anderen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem Mekoniumaspirationssyndrom (MAS) oder der konnatalen Pneumonie, als wirksame Therapieoptionen etabliert.

Beim MAS dringt mekoniumhaltiges Fruchtwasser in den intraalveolären Raum ein, und das Mekonium kann mit dem Surfactant interagieren, bzw. es inaktivieren. Immer wieder Gegenstand der Diskussionen ist die bestmögliche Therapie beim MAS.

Dass Bolusgaben von Surfactant (50 bis 200mg/kg Körpergewicht), wenn nötig auch wiederholt gegeben, beim MAS die Oxygenierung verbessern, können Pilotstudien in den Neunzehnhundertneunzigern mehrfach demonstrieren (Auten et al., 1991; Sun et al., 1993; Blanke und Jorch, 1993; Herting et al., 1995; Halliday, 1996). Findlay et al. beobachteten zudem 1996 in der ersten randomisiert kontrollierten Studie diesbezüglich die positive Wirkung des künstlichen Surfactant beim MAS (Findlay et al., 1996). In einer Metaanalyse aus 4 randomisiert-kontrollierten Studien schlussfolgern El Shahed et al. 2007, dass sich mit der Bolusgabe von Surfactant zwar der Schweregrad der respiratorischen Problematik und die ECMO-Bedürftigkeit reduzieren lässt, dass aber andererseits keine Verbesserung der Mortalität, der Krankenhausverweildauer, der Beatmungstage, des Sauerstoffbedarfs und der langfristigen Entwicklung einer chronischen Lungenschädigung erreicht wird (El Shahed et al., 2007).

Vom Gedanken der besseren Mekoniumauswaschung ausgehend wurde auch die Bronchiallavage mit verdünntem Surfactant untersucht (Paranka et al., 1992; Wiswell et al., 2002). In einer kleinen aktuellen Studie zeigt diese Methode zwar eine Verbesserung der Oxygenierung, aber es besteht kein Vorteil hinsichtlich Beatmungsdauer, der Komplikationen und Dauer des Klinikaufenthaltes (Gadzinowski et al. 2008). Eine aktuelle Untersuchung von Dargaville et al. zeigt ebenfalls keine Verbesserung hinsichtlich der Beatmungsdauer, allerdings wird eine Reduzierung der Mortalität insbesondere in Zentren ohne ECMO-Möglichkeit diskutiert (Dargaville et al., 2011).

Um den Grad der Schädigung und den Inaktivierungsvorgang an sich besser zu verstehen, wäre es hilfreich genauere, Zahlen der intraalveolär vorliegenden Surfactant- und Mekoniummengen zu wissen.

Bei reifen Neugeborenen bewegt sich die Gesamtmenge des alveolär vorliegenden Surfactant zwischen 50 und 100mg/kg Körpergewicht (Rebello et al., 1996), bzw. bei einem Alveolarvolumen definiert als die funktionelle Residualkapazität (FRC) der Lunge zwischen 25 und 30ml/kg Körpergewicht (Schmalisch et al., 1993). Geht man von einer gleichmässigen Verteilung des Surfactant in den vor Geburt noch mit Fruchtwasser gefüllten Alveolen aus, so errechnet sich hieraus eine Surfactantkonzentration von ungefähr 2,5 bis 3mg/ml Alveolarvolumen, was den in unserer Arbeit verwendeten Konzentration entspricht. Bei der Literaturrecherche für diese Arbeit konnten leider keine Daten oder absolute Werte über Mekoniummengen in den Lungen von Kindern mit einem MAS gefunden werden. Genaueres Wissen hierüber wäre andererseits sehr hilfreich, da man dann hieran eventuell die Gefährdung, bzw. die Prognose der Kinder mit einem MAS genauer abschätzen könnte.

In dieser Arbeit verwendeten wir lyophilisiertes Mekonium in Konzentrationen bis 5mg/ml. Dies entspricht ungefähr einer Konzentration von 20mg/ml nativem Mekonium (6 bis 40g in 0,3 bis 2 Litern Fruchtwasser zum errechneten Geburtstermin) (Brace et al., 1989). Welche Menge oder Verdünnung an Mekonium für eine Surfactantinaktivierung erforderlich sein würde, haben wir in Anlehnung an eine Arbeit von Moses et al. überlegt, der 1991 noch bei einer Verdünnung von Mekonium um das 6500fache eine inhibitorische Wirkung auf Surfactant nachweisen kann (Moses et al. 1991).

Beim MAS genau wie auch bei inflammatorischen Prozessen in der Lunge – hervorgerufen entweder in Form einer „sterilen“ Inflammation oder auch direkt erregerinduziert - spielt der Kontinuitätsverlust des Surfactantfilms, bzw. die Störung der Surfactantsynthese und die somit stattfindende Inaktivierung des Surfactantsystems eine entscheidende Rolle. In den letzten Jahren und Jahrzehnten wurden immer neue Strategien entwickelt und beschrieben, wie die Resistenz von Surfactant gegen die Inaktivierung durch verschiedene Noxen zu verbessern sein könnte. Verschiedene Ansätze werden im Folgenden beschrieben.

Zu aller erst scheint schlicht eine größere Menge an Surfactant die Inaktivierungsanfälligkeit zu reduzieren. In unserer Arbeit sehen wir bereits allein durch die Erhöhung der Surfactantkonzentration und ohne die Zugabe von PxB eine γ_{\min} unter 3mN/m, dies entspricht einer sehr niedrigen Oberflächenspannung. Interessanterweise sagen Kobayashi et al. noch 1990, dass sie es als sehr kritisch ansehen, mit exogenen Surfactantpräparaten, ähnlich dem bei unserer Arbeit verwendeten Curosurf[®], jemals γ_{\min} -Werte unter 3mN/m erreichen zu können (Kobayashi et al., 1990).

Auch Moses et al. steigern in ihrer Arbeit aus dem Jahr 1991 nur die Surfactantkonzentration und finden heraus, dass aus ihrer Erhöhung eine dosis- aber nicht stoichiometrische Erhöhung der Surfactantresistenz resultiert (Moses et al., 1991). Sun et al. untersuchen 1993 den Effekt steigender Konzentrationen humanen Mekoniums, eine der potentesten surfactantinaktivierenden Substanzen, auf exogenen Surfactant (Curosurf[®]) in einer Phospholipidkonzentration von 10mg/ml (Sun et al., 1993). Dies entspricht einer 4fach höheren Phospholipidkonzentration als in unserer Arbeit. Sie beobachten eine Inaktivierung des von ihnen verwendeten exogenen Surfactantpräparats (Curosurf[®]) ab einer Mekoniumkonzentration von 2,5mg/ml. Dies legt die Annahme nahe, dass modifizierte Surfactantpräparate mit Phospholipidkonzentrationen unter 5mg/ml sensibler gegenüber der mekoniuminduzierten Inaktivierung sind, als solche mit höherem Phospholipidanteil.

Ende des letzten, vor allem aber zu Beginn dieses Jahrtausends kommt die Idee auf, Surfactant durch die Zugabe von ionischen oder nicht-ionischen Polymeren gegen eine Inaktivierung zu schützen. Gemeinsam haben diese Substanzen eine Art Brückenfunktion an, je nach ihrer Ladung, verschiedenen Stellen des Surfactantfilms. Somit sind geladene Polymere in der Lage, *in vitro* die Inaktivierung von Surfactant durch Mekonium rückgängig zu machen und bei Versuchstieren mit mekoniuminduzierten Lungenerkrankungen die Lungenfunktion signifikant zu verbessern (Taeusch et al., 1999; Tashiro et al., 2003).

2005 zeigen Lu et al., dass das anionische Polymer Hyaluronsäure in einer Konzentration von 1,0 bis 1,25mg/ml einer serum-induzierten Inaktivierung verschiedener Surfactantpräparate *in vitro* vorbeugen kann (Lu et al., 2005).

Ochs et al. stellen 2006 Dextran als mögliche Substanz vor, die die Ultrastruktur des Surfactant vor den Einflüssen von Mekonium schützt. 2008 beschreiben

Calkovska et al. ebenso die positive Wirkung des Dextran. Sie untersuchen im Tiermodell bei Kaninchen mit experimentellem MAS, wie gut aspiriertes Mekonium aus der Lunge ausgewaschen werden kann. Hierfür vergleichen sie die Mekoniumclearance durch die Lungenlavage mit Surfactant allein und einem Surfactant-Dextran-Gemisch. Bei der Lavage mit dem Surfactant-Dextran-Gemisch verbessert sich sowohl die Mekoniumclearance als auch die Lungenfunktion allgemein (Calkovska et al., 2008).

In einer aktuellen Untersuchung aus dem Jahr 2011 haben Lu et al. verschiedene Lipid-Mischungen (DPPC und Palmitoyloleoylphosphatidylcholin, bzw. DPPC, Palmitoyloleoylphosphatidylcholin, Palmitoyloleoylphosphoglycerol und Cholesterol) mit unterschiedlichen Anteilen an SP-B und SP-C vermischt. Als nichtionische Polymere setzen sie Polyethylenglykol und Dextran, als anionisches Polymer Hyaluronsäure zu. Untersucht haben sie in einem modifizierten Bubble-Surfactometer, ob diese künstlichen Mischungen verschiedener Bestandteile des Surfactants eine ähnlich hohe oberflächen-spannungsreduzierende Wirkung haben wie natürlicher Surfactant selbst. Zusätzlich wird die Anfälligkeit gegen eine serum-induzierte Inaktivierung getestet. Hierbei zeigt sich, dass die Lipid-Mischungen mit SP-B, SP-C (jeweils gewonnen und isoliert aus Lungenlavageflüssigkeit von Schweinen) und Hyaluronsäure mit oder ohne Polyethylenglycol die niedrigste Inaktivierungsanfälligkeit besitzen und in ihrer Wirksamkeit durchaus mit natürlichem Surfactant vergleichbar sind. Sie schlussfolgern, dass diese Mischungen bei der Behandlung mancher Arten der Lungenschädigung hilfreich sein könnten (Lu et al., 2011).

1997 beschreiben Johansson und Curstedt PxB als potenten „Nachahmer“ der SP-B-Funktion in einer stabilen Surfactantschicht (Johansson und Curstedt, 1997). Dem voraus geht die Beschreibung von Cajal et al., die 1996 aufzeigen kann, wie und wo genau die Einlagerung von PxB in Phospholipidmembranen geschieht (Cajal et al. 1996). Genau dieser Mechanismus macht die antimikrobielle Wirksamkeit des PxB dieser Substanz aus: nach Einlagerung in die Bakterienmembran wird die Ladungsverteilung und somit die Membranstruktur verändert, Poren entstehen und die Hülle der Bakterien wird funktionsunfähig. Dies führt zum Absterben des Erregers.

Bei der Inaktivierung des Surfactantfilms beim MAS oder einer Inflammation ist ein „Reissen“ der Lipidmembranen ein zentraler Mechanismus. 1995 proklamieren

Schürch et al., dass eine der Hauptwirkungen des SP-B in der Vernetzung von Lipidvesikeln besteht. So vergrößert es das oberflächenassoziierte Surfactantreservoir, aus welchem die Phospholipide in einer pulsierenden Blase für die Oberflächenadsorption verfügbar gemacht werden. Der Surfactantfilm wird so stabilisiert (Schürch et al., 1995).

Auch Zaltash et al. beschreiben 2000, dass die Einlagerung des membranstabilisierenden Moleküls PxB die Funktion des SP-B imitieren und übernehmen kann (Zaltash et al., 2000).

Zudem unterstützt PxB zwar den bidirektionalen Transfer von monoionischen Phospholipiden (z.B. Phosphatidylglycerol), für zwitterionische Moleküle wie zum Beispiel dem Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), der Hauptkomponente des Surfactant, wird dagegen nur in eine unidirektionale Transferrichtung zugelassen (Cajal et al., 1996). DPPC wird so an der Luft-Flüssigkeits-Grenze gehalten. Die DPPC-Anreicherung an der Luft-Flüssigkeits-Grenze in der Alveole wird als ein Hauptbestandteil der oberflächenreduzierenden Wirkung der Surfactantproteine angenommen. Wir spekulieren, dass PxB hierbei durch eine Art „Sortierung“ der Phospholipide eine wichtige positive Rolle spielen könnte.

2010 finden Acosta et al. heraus, dass kationische Additive, unter anderem PxB, auch die seruminduzierte Surfactantinaktivierung hemmen. Sie testeten neben PxB auch die rein kationischen Additive Chitosan und das besser lösliche Chitosanhydrochlorid, die aber beide nicht über die Lipophilie des PxB verfügen. PxB zeigt in ihrer Arbeit das beste Schutzverhalten gegen die seruminduzierte Surfactantinaktivierung, wofür vor allem seine zusätzlich zum kationischen Aufbau vorhandene lipophile Komponente verantwortlich gemacht wird (Acosta et al., 2010).

Ein weiterer Ansatz zur Steigerung der Inaktivierungsresistenz ist die Veränderung der verschiedenen Surfactantproteinanteile, insbesondere des SP-A.

Wird Curosurf[®], eigentlich SP-A-frei, angereichert mit 5% SP-A, zeigt sich *in vitro* eine deutlich gesteigerte Resistenz gegen die Inaktivierung durch Mekonium, Fibrinogen, Albumin und Serum. Im Tierversuch an frühgeborenen Kaninchen führt diese spezielle Surfactantmischung, verglichen mit reinem Curosurf[®], zu einer deutlich verbesserten Lungencompliance nach Surfactantinaktivierung durch die intratracheale Gabe von Fibrinogen (Sun et al., 1997). Dass SP-A einen

protektiven Einfluss auf Surfactant hat, wird durch die Beobachtung unterstützt, dass natürlicher Kaninchensurfactant (enthält von Natur aus ungefähr 5% SP-A) *in vitro* deutlich resistenter gegen die mekoniuminduzierte Inaktivierung ist als die getesteten modifizierten Surfactantpräparate Curosurf[®], Alveofact[®] und Survanta[®] (Herting et al., 2001).

Um Unterschiede bezüglich der Resistenz von Surfactant gegen die mekoniuminduzierte Inaktivierung zu untersuchen, verwenden wir in dieser Arbeit eine Surfactantphospholipidkonzentration von 2,5mg/ml. Stichtenoth stellt in begleitenden Untersuchungen zu unserer Arbeit fest, dass nur bei einer Surfactantkonzentration von 2,5mg/ml in der Wilhelmy balance die PxB-Zugabe in der Lage ist, die statische Oberflächenspannung signifikant zu reduzieren; bei einer Surfactantkonzentration von 5mg/ml oder bei den Untersuchungen der dynamischen Oberflächenspannung aller o.g. Gemische zeigen sich keine positiven Auswirkungen durch die Zugabe von PxB. Diese Beobachtung sollte in weiteren Untersuchungen verifiziert werden.

Bezüglich der notwendigen inaktivierungsreduzierenden Menge an PxB finden sich verschiedene Ansätze.

Calkovska et al. finden 2005 eine verbesserte dynamische Oberflächenspannung nach Zugabe von 2%igem PxB zu einem 2mg/ml-Surfactantgemisch (Calkovska et al., 2005).

Für die Inaktivierung von Curosurf[®]/CaCl₂-Gemischen werden in unseren Untersuchungen Mekoniumkonzentrationen von 0,3mg/ml benötigt. Bereits nach Zugabe von „nur“ 1%igem PxB hingegen sind Konzentrationen von 1,3mg/ml Mekonium notwendig. Bereits im Vorfeld dieser Arbeit haben wir in einer unveröffentlichten Pilotstudie eine ähnlich gute Verbesserung der Inaktivierungsresistenz gesehen.

Unserem Labor steht für die Bestimmung der Oberflächenspannung das Pulsating-Bubble-Surfactometer zur Verfügung, ein Gerät, das 1977 erstmals von Enhorning in seiner Funktionsweise beschrieben wurde (Enhorning, 1977). Mittlerweile gibt es andere Hilfsmittel, um die Oberflächenspannung zu messen, wie zum Beispiel das Captive-Bubble-Surfactometer oder die Wilhelmy-Waage. Erwähnenswert ist dies, da die Messungen im PBS gewissen Einschränkungen

unterliegen: Liegt die Oberflächenspannung der Probenflüssigkeit unter 10mN/m, was bei gut wirksamen Surfactantpräparaten oder –gemischen der Fall sein sollte, kommt es unter Kompression zum Kollaps der Blase oder es tritt das Phänomen der „tanzenden Blase“ auf; deshalb muss die Blasengröße anhand der definierten maximalen Größe immer wieder mikroskopisch kontrolliert und gegebenenfalls nachjustiert werden. Zusätzlich läuft eine „tanzende Blase“ Gefahr, sich in einer Ecke der Messküvette festzusetzen und abzureißen. Hat sich eine Blase in einer Küvettenecke festgesetzt, ist sie nicht mehr sphärisch und das LaPlace'sche Gesetz darf auf sie nicht mehr angewendet werden (Robertson und Schürch, 1998). Letztlich sind die im PBS gemessenen Werte aufgrund der Viskosität der Probenflüssigkeit lediglich bei minimalem und maximalem Radius annähernd genau, da an diesen Messpunkten die Volumenänderung der Blase verglichen zur Zeit am geringsten ist und hier viskositätsbedingte Effekte vernachlässigt werden können (Hall et al., 1993). Die für diese Arbeit gemessenen Werte hat Stichtenoth in weitergehenden Versuchen mit einer Wilhelmy-Waage nachgemessen, wobei er zu annähernd denselben Werten wie in unserer Arbeit kommt (Stichtenoth, 2006).

Vorgeschädigte Lungen sind besonders anfällig für bakterielle Superinfektionen. Betrachtet man das Proliferationsverhalten der in unseren Versuchen verwendeten Bakterien in verschiedenen Nährmedien, so lassen sich folgende Beobachtungen beschreiben: Bakterien vom Typ *E.coli* wachsen in mekoniumhaltigem Fruchtwasser vermehrt. Auch Eidelmann et al. kommen 2002 zu ähnlichen Ergebnissen (Eidelmann et al., 2002). *E.coli* und GBS, nicht aber *Staph. aureus*, zeigen in der vorliegenden Arbeit ein gesteigertes Wachstum nach Zugabe von reinem Mekonium oder mekoniumhaltigen Surfactantgemischen. Keine der hier verwendeten Bakterien zeigt Wachstumstendenzen in per se nährstofffreier Kochsalzlösung.

Curosurf[®] allein kann auf Bakterien wachstumshemmend wirken. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen von Rauprich et al. die 2000 beschrieben, dass in Abwesenheit von Mekonium Curosurf[®] in Konzentrationen von 1 bis 20mg/ml eine bakterizide Wirkung auf GBS zeigt, nicht aber auf *E. coli* oder *Staph. aureus* (Rauprich et al., 2000).

Bryans sieht bereits 1967 eine erhöhte Mortalität bei Ratten, denen zusätzlich zu *E.coli* auch noch Mekonium intratracheal verabreicht wurde (Bryans, 1967).

Eine andere Arbeit zeigt, dass Mekoniummengen über 3mg/ml im Fruchtwasser das Wachstum von *E.coli* und *Listeria monocytogenes* steigern, das von *Staph. aureus* aber reduzieren (Florman und Teubner, 1969).

Daten einer aktuellen Untersuchung legen den Verdacht nahe, dass Mekonium den eigentlich bakteriostatischen Effekt des Fruchtwassers aufhebt und das Wachstum von *E.coli* und GBS steigert. Beide Bakterien zeigen ein gesteigertes Wachstum sowohl bei höheren Konzentrationen von Mekonium als auch bei längerer Inkubationsdauer (Eidemann et al., 2002).

Eine andere Arbeit zeigt, dass mekoniumhaltige Kochsalzlösung, nicht aber Kochsalzlösung allein, das Wachstum von *E.coli*, GBS und *Staph. aureus* sowie auch anderer gram-positiver und -negativer Bakterien steigert (Lembet et al., 2003).

PxB und SP-C binden in stoichiometrischer Art an den Lipid A-Komplex des Lipopolysaccharids (LPS), einem Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Erreger (Morrison und Jacobs, 1976; Augusto et al., 2001). Wie im Ergebnisteil beschrieben, ist reines PxB im Vergleich zu PxB/Curosurf[®]-Gemischen sehr viel besser in der Lage innerhalb der ersten Stunde das Bakterienwachstum zu reduzieren. Eventuell spielt hierbei die primäre und bakterizid nicht so potente Bindung von SP-C statt PxB an LPS eine Rolle. Unserer Meinung nach ist diese eigentliche Reduktion der antimikrobiellen Wirkung aber vermutlich zu vernachlässigen.

Unsere Daten zeigen, dass PxB mit oder ohne Curosurf[®] das Wachstum von *E.coli* in mekoniumhaltigen Lösungen hemmt.

Die Aussagen, dass PxB einerseits sehr potent gegen gram-negative Bakterien (Evans et al., 1999) nicht aber gegen gram-positive Erreger und Pilze wirkt (Horton und Pankey, 1982), können wir durch unsere Beobachtungen unterstützen.

Die tatsächliche Menge PxB die für eine bakterizide Wirkung aufgenommen werden muss, entspricht laut Hersteller ca. 1 bis 2mg/kg Körpergewicht.

Calkovska et al. zeigen 2005 eine Erhöhung der Surfactantresistenz gegen die albumininduzierte Inaktivierung bei Zugabe von 2% PxB, dies entspricht umgerechnet auf das Körpergewicht einer Dosis von 2-4mg/kg (Calkovska et al.,

2005). Die maximale Dosis von freiem PxB als Aerosol liegt bei 2,5mg/kg Körpergewicht verteilt auf 4 Tagesdosen bei nierengesunden Erwachsenen (Horton und Pankey, 1982).

In unseren Untersuchungen wurde die Dosis des 1%igen PxB deshalb so gewählt, dass sie der klinisch üblichen Dosis von 1-2mg/kg Körpergewicht entspricht, wenn man eine Behandlung mit 100mg/kg Körpergewicht durchführt.

Trotz der guten Wirksamkeit gegen gram-negative Erreger sind die Polymyxine immer noch ungern eingesetzte Substanzen. Ihre Nebenwirkungen, ihre Toxizität und die mit ihnen in Verbindung gebrachten Todesfälle, haben sie aus der Routineanwendung herausgedrängt (Falagas und Kasiakou, 2006).

Während die Inzidenz von allergischen Reaktionen bei 2%, die von milden Reaktionen ohne konsekutiven Therapieabbruch bei knapp über 20% liegt und damit im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika nicht stark erhöht ist, beschreiben Falagas und Kasiakou in einer systematischen Durchsicht alter Berichte und Studien eine hohe Rate (20 bis 36%) an nephrotoxischen Nebenwirkungen verschiedener Schweregrade. Die Wirkstoffdosis liegt allerdings in älteren Studien viel höher als in neueren Untersuchungen (Falagas und Kasiakou, 2006).

Diese neueren Untersuchungen mit einer niedrigeren Wirkstoffdosis zeigen sowohl für PxB als auch für Colistin (Polymyxin E) dass die Häufigkeit nephrologischer Nebenwirkungen bei 10 bis 18% liegt. Die Autoren weisen aber explizit darauf hin, dass es zum Untersuchungszeitpunkt keine einheitliche Definition des akuten Nierenversagens gibt und es sich in allen Fällen um schwerstkranke Intensivpatienten handelt, die auch andere, für sich allein oder in der Kombination, nephrotoxische Medikamente erhalten haben (Falagas und Kasiakou, 2006).

Als ausschlaggebender Pathomechanismus für diese nephrotoxische Wirkung aber auch für die meisten anderen Nebenwirkungen, wird die Einlagerung des Polymyxins an, bzw. in alle, also nicht nur den bakteriellen, Zellmembranen vermutet. Die hierdurch entstehende Permeabilitätsstörung führt zu einem Einstrom von Anionen, Kationen und Wasser, was in letzter Konsequenz zu einer Zellschwellung und -lyse führt.

Die Inzidenz der Neurotoxizität wird im gleichen Artikel von Falagas und Kasiakou in älteren Berichten mit 7 bis 27% angegeben und zwischen 1964 und 1973 werden acht Fälle von Apnoen bei intramuskulär mit Polymyxin behandelten Patienten beschrieben (Falagas und Kasiakou, 2006).

Pathophysiologisch werden hierfür eine direkte präsynaptische Wirkung des Polymyxins und eine Blockade der Acetylcholinausschüttung in den synaptischen Spalt verantwortlich gemacht (McQuillen et al., 1967; Duncan, 1973).

Interessanterweise werden aber in neueren Untersuchungen der letzten 15 Jahre keine neuromuskulären Blockaden oder Apnoen als Nebenwirkungen berichtet.

Ab den frühen 1960iger Jahren mehren sich Berichte über eine hohe Rate an Nebenwirkungen, wobei neben der Nephrotoxizität auch eine neurotoxische Wirkung mit Parästhesien, muskulärer Schwäche und vereinzelt sogar einer Einschränkung der Atemmuskulatur beschrieben wird. Desweiteren wird eine hepatotoxische Wirkung in einzelnen Berichten diskutiert (Falagas und Kasiakou, 2006).

Die oben genannten Berichte beschreiben allesamt Nebenwirkungen, die aus einer intramuskulären oder intravenösen Gabe resultieren. Schon früh erkannte man jedoch auch den Nutzen vernebelter Polymyxine bei pulmonalen Infekten, insbesondere bei Patienten mit einer cystischen Fibrose. Deren Keimspektrum umfasst vermehrt gram-negative Keime wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* oder Vertreter aus dem *Burkholderia-cepacia*-Komplex. Polymyxine sind aufgrund der oft multiplen Antibiotikaresistenzen dieser Keime nicht selten die letzten wirksamen Substanzen. So kann Kumarasamy 2010 zeigen, dass selbst die hochgradig und sogar gegen Carbapeneme resistenten Stämme von *Klebsiella pneumoniae* und *E.coli* bei Patienten mit cystischer Fibrose, die ihre Resistenz der Bildung der NDM-1 (Neu-Delhi-Metallo-Beta-Laktamase 1) verdanken, einem Enzym, das Carbapeneme hydrolysiert und inaktiviert, mit Polymyxin E behandelbar sind (Kumarasamy et al., 2010).

Allerdings treten auch bei dieser Anwendungsart Nebenwirkungen auf. Sie reichen von Halsschmerzen bis hin zur Bronchokonstriktion und pectanginösen Beschwerden. Ihnen liegt als Pathomechanismus vermutlich die ausgeprägte Histaminliberation im Sinne einer allergischen Reaktion auf Polymyxine zu Grunde. Dem kann aber – wie oben bereits erwähnt – durch eine genaue

Dosisanpassung und der prophylaktischen Medikamentengabe, zum Beispiel von Bronchodilatoren, begegnet werden (Alothman et al., 2005).

Um die lokalen antimikrobiellen Effekte der Polymyxine zu verbessern, wird um die Jahrtausendwende erstmalig versucht, Wirkstoffe in Liposomen einzupacken. Dieses Vorgehen hat sich bereits bei anderen Präparaten, wie zum Beispiel dem AmBisome[®], bewährt. In diesem Fall ist der antimykotische Wirkstoff Amphotericin B in vor allem aus Phospholipiden bestehende lipophile Liposomen „verpackt“ und kann dadurch besser in die einzelnen Körperkompartimente aufgenommen werden.

Omri hat 2002 zeigen können, dass PxB, eingebettet in Liposomen aus DPPC und Cholesterol, durch diese spezielle inhalative Galenik *in vitro* bei *Pseudomonas aeruginosa*-positiven Ratten eine gute Wirksamkeit hat. Allerdings hängt die Wirksamkeit des PxB entscheidend von der Zusammensetzung der Liposomen ab (Omri et al., 2002; McAllister et al., 1999).

Betrachtet man noch einmal das Thema der Antibiotikaresistenzen, so stellt man fest, dass in der heutigen Zeit die Zahl der hochgradig resistenten Keime zunimmt. Dadurch erleben die Polymyxine und andere antimikrobiell wirksame Peptide im Moment eine Renaissance. Es gibt bereits mehrere aktuelle Studien, die die Nebenwirkungsraten des PxB als deutlich geringer einschätzen als zuerst angenommen, die richtige und individuell angepasste Dosierung vorausgesetzt (Falagas und Rafailidis, 2009; Iosifidis et al. 2009).

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind sehr alte Substanzen, die nicht nur beim Menschen sondern auch oder vor allem in der Tier- und Pflanzenwelt den Hauptpfeiler der Abwehr mikrobieller Attacken darstellen. Vor allem Spezies, die nicht über ein angeborenes leukozytengestütztes Immunsystem verfügen, produzieren eine Vielzahl verschiedener AMP. 2002 waren mehr als 500 verschiedene AMP bekannt, wobei ihre Zahl zwar stetig zunimmt, aber die genaue Bedeutung der einzelnen Proteine noch in vielen Fällen im Dunkeln liegt. In Zeiten der immer stärker ausgeprägten Resistenzlage auch gegenüber neu entwickelten Antibiotika erlangen die AMP mehr und mehr Bedeutung (Zasloff, 2002).

Erstmals als eigene Klasse antimikrobiell wirksamer Substanzen werden sie 1987 von Zasloff beschrieben, der sie auf der Haut des afrikanischen Krallenfroschs

(*Xenopus laevis*) als natürliche Infektionsbarriere nachweisen kann (Zasloff, 1987).

AMP stellen die erste Linie des angeborenen Immunsystems dar und bilden bei Pflanzen und Nicht-Wirbeltieren, die nicht über ein lern- bzw. anpassungsfähiges Immunsystem verfügen, den essentiellen Abwehrmechanismus (Bulet et al., 2004; Kasahara et al., 2004). Je nach Protein wirken sie antibakteriell, -viral und -fungal (Brandenburg et al., 2012).

In den letzten 50 Jahren wurde bei jedem neu entwickelten Antibiotikum innerhalb weniger Jahre eine Resistenzentwicklung beschrieben (Palumbi, 2001 und Perron et al., 2006). Obwohl AMP seit vielen Jahrtausenden allgegenwärtig sind, sind Resistenzen gegen sie zwar möglich aber doch selten. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich hauptsächlich in ihrem primär physikalischen Wirkmechanismus: im Gegensatz zu den meisten anderen antimikrobiell wirksamen Substanzen binden AMP nicht an spezifische Rezeptoren, sondern als meist kationische Proteine interagieren sie direkt mit negativ geladenen Bestandteilen der Bakterienmembran, werden dann in diese eingeschleust und bilden Poren aus, die letzten Endes die Zellhomöostase des Bakteriums stören und so zu ihrem Untergang führen (Yang et al., 2000). Ein anderer, ebenfalls primär physikalischer Wirkmechanismus der zur Zerstörung der bakteriellen Zellwand führt, ist die fatale Depolarisation der normalerweise geladenen Hülle ebenfalls durch die Einlagerung von AMP (Westerhoff et al., 1989).

Bakterien müssten also, wollten sie eine Resistenz gegen AMP aufbauen, über eine grundlegend anders geartete Membranstruktur verfügen, dahingehend dass in ihrer Zellwand keine Andockstellen für die AMP vorhanden sind (wie zum Beispiel bei *Morganella*- oder *Serratia*-Spezies); als zweite Möglichkeit könnten sie, wie im Fall des *Porphyromonas gingivalis*, spezifische Proteasen bilden, die die AMP spalten und so unwirksam machen. Evolutionär stellen sich aber beide Wege, sind sie nicht von Grund auf vorhanden, als sehr kompliziert, zeit- und energieaufwendig dar (Zasloff, 2002).

2006 gelang es Perron et al. erstmals und entgegen allen Erwartungen im Labor eine Resistenz gegen AMP dadurch zu erzeugen, dass er Bakterien längere Zeit und über mehrere Generationen subletalen Mengen an AMP aussetzte (Perron et al., 2006). Dies zeigt, dass Resistenzen zwar selten, aber dennoch möglich sind

und bei allen weiteren Einsätzen der AMP, zum Beispiel als Konservierungsmittel in der Nahrungsmittelindustrie, beachtet werden sollten. Es werden außerdem mehr und mehr Mechanismen aufgedeckt, wie gram-negative Erreger den Angriffen von AMP widerstehen können. Der Fokus sollte dementsprechend zuerst auf der weiteren Erforschung dieser Resistenzwege und der Langzeitverträglichkeit der AMP liegen, da wie oben bereits erwähnt, die Nebenwirkungen der im gesamten Körper wirkenden AMP schlecht im Voraus abgeschätzt werden können (Gruenheid und Le Moual, 2012).

Zusammenfassend können wir zeigen, dass PxB-haltige Surfactantgemische *in vitro* in der Lage sind, der mekoniuminduzierten Surfactantinaktivierung vorzubeugen. Die antimikrobielle Wirksamkeit des PxB gegen gram-negative Erreger, in unserer Arbeit *E.coli*, ist in diesen Gemischen nicht schlechter als in PxB allein.

Mit dem PxB scheint eine inaktivierungsprotektive Substanz gefunden, die noch dazu ihre antibiotische Wirksamkeit, vor allem gegen gram-negative Erreger, zu behalten scheint. Dies wiederum könnte helfen, die inflammatorischen Prozesse in der Lunge zu bremsen, eine Ausbreitung der Infektion einzudämmen und durch die Stabilisierung des Surfactantsystems die respiratorische Insuffizienz in positiver Weise zu beeinflussen.

PxB kombiniert mit exogenem Surfactant stellt also möglicherweise eine sinnvolle Ergänzung der Therapie bei einer neonatalen Pneumonie oder einem Mekonium-aspirationssyndrom dar. Weitere tierexperimentelle Untersuchungen sollten folgen.

6. Zusammenfassung

Die Inaktivierung des pulmonalen Surfactant spielt unter anderem bei der Mekoniumaspiration und im Rahmen von konnatalen Pneumonien eine entscheidende pathophysiologische Rolle. Die Hauptwirkung der funktionierenden Surfactantschicht in der Lunge besteht in der Reduktion der Oberflächenspannung der Alveole und so in der Reduktion der zu leistenden Atemarbeit. Außerdem verhindert das Surfactant den endexpiratorischen Kollaps der Alveolen.

Verschiedene Verfahren, die das pulmonale Surfactant resistenter gegenüber der Inaktivierung durch Mekonium machen sollten, wurden bereits untersucht. Eine davon ist die Addition kationischer Peptide, die durch ein „cross-linking“ der Surfactantmembranen diese stabilisieren und die Inaktivierungsresistenz des Surfactant erhöhen. In unserer Arbeit wählen wir mit dem Polymyxin B (PxB) eines dieser Peptide aus, welches zusätzlich noch eine antibiotische Wirkung auf gram-negative Keime, wie zum Beispiel *Escherichia coli* (*E.coli*), hat.

Die zentrale Frage dieser Arbeit ist, ob nach Vermischen von Surfactant und PxB beide Substanzen ihre Wirksamkeit hinsichtlich der Oberflächenspannungsreduktion und der Proliferationshemmung behalten.

Hierfür wird mit dem Pulsating Bubble Surfactometer in unterschiedlich konzentrierten PxB/Surfactant-Gemischen die Oberflächenspannung nach Zugabe verschiedener Mengen an Mekonium gemessen.

Für die Beurteilung der antibiotischen Wirksamkeit wird das Proliferationsverhalten von *Gruppe-B-Streptokokken* (GBS), *E.coli* und *Staph. aureus* in Gegenwart der PxB/Surfactant-Gemische mit und ohne Mekonium bestimmt.

Wir können beobachten, dass im Vergleich zu Surfactant alleine, PxB/Surfactant-Gemische eine 4-fach höhere Menge an Mekonium benötigten, um ihre oberflächenspannungsreduzierende Wirkung abzuschwächen. Auch verbessert bereits die Zugabe von CaCl_2 allein die oberflächenspannungsreduzierende Wirkung von Surfactant.

Außerdem reduzieren PxB/Surfactant-Gemische signifikant das Wachstum von *E. coli*, nicht aber das von GBS oder *Staph. aureus*.

Die Inkubation allein mit Mekonium steigert die Proliferationsrate von *E. coli* und GBS.

Zusammenfassend können wir zeigen, dass PxB-haltige Surfactantgemische *in vitro* in der Lage sind, die mekoniuminduzierte Surfactantinaktivierung zu

erschweren. Die antimikrobielle Wirksamkeit des PxB gegen gram-negative Erreger, in unserem Fall *E.coli*, ist in diesen Gemischen nicht schlechter als die von PxB allein.

Die zu den antimikrobiellen Peptiden zählende Gruppe der Polymyxine ist bis ins vergangene Jahrtausend hinein wegen vermeintlich hoher Raten an schweren Nebenwirkungen stark in Verruf geraten. Betrachtet man aktuelle Einschätzungen und Zahlen, ist dies aber vermutlich nur eingeschränkt haltbar.

PxB kombiniert mit exogenem Surfactant stellt also möglicherweise eine sinnvolle Ergänzung der Therapie bei einer neonatalen Pneumonie oder einem Mekonium-Aspirations-Syndrom dar. Weitere tierexperimentelle Untersuchungen sollten folgen.

7. Literaturverzeichnis

Acosta E, Policova Z, Lee S, Dang A, Hair ML, Neumann AW: Restoring the activity of serum-inhibited bovine lung extract surfactant (BLES) using cationic additives. *Biochim Biophys Acta* 1798, 489-497 (2010)

Allothman G, Ho B, Alsaadi MM, Ho SL, O'Drowsky L, Louca E, Coates AL: Bronchial Constriction and Inhaled Colistin in Cystic Fibrosis. *Chest* 127, 522-529 (2005)

Amrein M: The structure-function relationship of pulmonary surfactant as revealed by scanning force microscopy. In: *Surfactant and Alveolar Biology, 5th Marburg Surfactant Symposium, Abstracts, 14.-16.09.1998*; Philipps-Universität Marburg, Marburg 1998, Poster 12

Augusto L, Le Blay K, Auger G, Blanot D, Chaby R: Interaction of bacterial lipopolysaccharide with mouse surfactant protein C inserted into lipid vesicles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281,776-785 (2001)

Auten RL, Notter RH, Kendig JW, Davis JM, Shapiro DL: Surfactant treatment of full-term Newborns with respiratory failure. *Pediatrics* 87, 101-107 (1991)

Avery ME, Mead J: Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am J Dis Child* 97, 517-523 (1959)

Aziz S, Leroy P, Servaes R, Eggermont E, Fevery J: Bilirubin-IXbeta is a marker of meconium, like zinc coproporphyrin. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 32, 287-292 (2001)

Batenburg JJ: Biosynthesis, secretion, and recycling of surfactant components. In: *Surfactant Therapy for lung disease*. Hrsg. von Robertson B und Taeusch HW; Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong 1995; Seite 47-73

Baquero H, Soliz A, Neira F, Venegas ME, Sola A: Oral Sildenafil in Infants With Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn: A Pilot Randomized Blinded Study. *Pediatrics* 117, 1077-1083 (2006)

Beppu OS, Clements JA, Goerke J: Phosphatidylglycerol-deficient lung surfactant has normal properties. *J Appl Physiol* 55, 496-502 (1983)

Berger TM, Allred EN, van Marter LJ: Antecedents of clinically significant pulmonary hemorrhage among newborn infants. *J Perinatol* 20, 295-300 (2000)

Berner R, Herting E, Henneke P, Martius J, Roos R: Infektionen durch – hämolysierende Streptokokken der Gruppe B (GBS). In: *DGPI-Handbuch, Infektionen bei Kindern und Jugendlichen*. 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2009, Seite 488-491

Bhat RY, Rao A: Meconium-stained amniotic fluid and meconium aspiration syndrome: a prospective study. *Ann Trop Paediatr* 28, 199-203 (2008)

Bizzarro MJ, Dembry LM, Baltimore RS, Gallagher PG: Changing Patterns in Neonatal Escherichia coli Sepsis and Ampicillin Resistance in the Era of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis. *Pediatrics* 121, 689-696 (2008)

Blanke JG, Jorch G: Surfactanttherapie bei 10 Neugeborenen mit Mekoniumaspirationssyndrom. *Klin Pädiatr* 205, 75-78 (1993)

Brace RA, Wolf EJ: Normal amniotic fluid volume changes throughout pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 161, 382-388 (1989)

Brandenburg LO, Merres J, Albrecht LJ, Varoga D, Pufe T: Antimicrobial Peptides: multifunctional Drugs for different Applications. *Polymers* 4, 539-560 (2012)

Bryans SC: Enhancement of bacterial infection by meconium. *Johns Hopkins Med J* 121, 9-13 (1967)

Bulet P, Stocklin R, Menin L: Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 169-184 (2004)

Cajal Y, Ghanta J, Easwaran K, Surolia A, Jain MK: Specificity for the Exchange of Phospholipids through Polymyxin B Mediated Intermembrane Molecular Contacts. *Biochemistry* 35, 5684-5695 (1996)

Calkovska A, Some M, Linderholm B, Johansson J, Curstedt T, Robertson B: Biophysical and physiological properties of porcine surfactant enriched with polymyxin B. *Biol Neonate* 88, 101-108 (2005)

Calkovska A, Mokra D, Drgova A, Zila I, Javorcka K: Bronchoalveolar lavage with pulmonary surfactant/dextran mixture improves meconium clearance and lung functions in experimental meconium aspiration syndrome. *Eur J Pediatr* 167, 851-857 (2008)

Cayabyab RG, Kwong K, Jones C, Minoo P, Durand M: Lung inflammation and pulmonary function in infants with meconium aspiration syndrome. *Pediatr Pulmonol* 42, 898-905 (2007)

Chu J, Clements JA, Cotton EK, Klaus MH, Sweet AY, Tooley WH: Neonatal pulmonary ischemia: clinical and physiologic studies. *Pediatrics* 40, 709-782 (1967)

Clark DA, Nieman GF, Thompson JE, Paskanik AM, Rokhar JE, Bredenberg CE: Surfactant displacement by meconium free fatty acids: an alternative explanation for atelectasis in meconium aspiration syndrome. *J Pediatr* 110, 765-770 (1987)

Clark JC, Wert SE, Bachurski CJ, Stahlmann MT, Stripp BR, Weaver TE, Whitsett JA: Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7794-7798 (1995)

Clements JA: Dependence of pressure-volume characteristics of lungs on intrinsic surface active material. *Am J Physiol* 187, 592 (1956)

- Clements JA: Surface tension of lung extracts. *Proc Soc Exp Biol Med* 95, 170-172 (1957)
- Cochrane CG, Revak SD: Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships. *Science* 254 (5031), 566-568 (1991)
- Dahl M, Holmskov U, Husby S, Juvonen PO: Surfactant protein D Levels in umbilical cord blood and capillary blood of premature infants. The influence of perinatal factors. *Pediatr Res* 59, 806-810 (2006)
- Daley AJ, Isaacs D, Australasian Study Group for Neonatal Infections: Ten-year study on the effect of intrapartum antibiotic prophylaxis on early onset group B *streptococcal* and *Escherichia coli* neonatal sepsis in Australasia. *Pediatr Infect Dis* 23, 630-634 (2004)
- Dargaville P, Copnell B, for the Australian and New Zealand Neonatal Network: The Epidemiology of Meconium Aspiration Syndrome: Incidence, Risk Factors, Therapies and Outcome. *Pediatrics* 117, 1712-1721 (2006)
- Dargaville P, Copnell B, Mills JF, Haron I, Lee JK, Tingay DG, Rohana J, Mildenhall LF, Jeng MJ, Narayanan A, Battin MR, Kuschel CA, Sadowsky JL, Patel H, Kilburn CJ, Carlin JB, Morley CJ, lessMAS Trial Study Group: Randomized controlled trial of lung lavage with dilute surfactant for meconium aspiration syndrome. *J Pediatr* 158, 383-389 (2011)
- Davy J: On the composition of the meconium, and of the vernix caseosa, or lubricating matter of the new-born infant. *Med Chir Trans* 27, 189-197 (1844)
- Dawes GS, Fox HE, Leduc BM, Liggins GC, Richards RT: Respiratory movements and rapid eye movement sleep in the foetal lamb. *J Physiol* 220, 119-143 (1972)
- Dechen TC, Sumit K, Ranabir P: Correlates of vaginal colonization with group B streptococci among pregnant women. *J Glob Infect Dis* 2, 236-241 (2010)
- deMello DE, Heyman S, Phelps DS, Hamvas A, Noguee L, Cole S, Colten HR: Ultrastructure of lung surfactant protein B deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11, 230-239 (1994)
- Dietl P, Haller T, Mair N, Frick M: Mechanisms of Surfactant Exocytosis in Alveolar Type II Cells *In Vitro* and *In Vivo*. *News Physiol Sci* 16, 239-243 (2001)
- Dobbs LG, Wright JR, Hawgood S, Gonzalez R, Ventstrom K, Nellenbogen J: Pulmonary surfactant and its components inhibit secretion of phosphatidylcholine from cultured rat alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 1010-1014 (1987)
- Dreyer N, Mühlfeld C, Fehrenbach A, Pech T, von Berg S, Nagib R, Richter J, Wittwer T, Wahlers T, Ochs M: Exogenous surfactant application in a rat lung ischemia reperfusion injury model: effects on edema formation and alveolar type II cells. *Respiratory Research* 9, 5 (2008)

Duke T: Neonatal pneumonia in developing countries. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 90, 211-219 (2005)

Duncan DA: Colistin toxicity. Neuromuscular and renal manifestations. Two Cases treated by hemodialysis. Minn Med 56, 31-35 (1973)

Eidemann AI, Nevet A, Rudensky B, Rabinowitz R, Hammermann C, Raveh D, Schimmel MS: The Effect of meconium staining of amniotic fluid on the growth of *Escherichia coli* and *Group B Streptococcus*. J Perinatol 22, 467-471 (2002)

El Shahed AI, Dargaville P, Ohlsson A, Soll RF: Surfactant for meconium aspiration syndrome in full term/near term infants. Cochrane Database of Systematic Reviews, Nr. 3, Artikel ID CD002054 (2007)

Emery J: Laboratory Observations on the Viscidity of Meconium. Arch Dis Child 29, 34-37 (1954)

Emery J: Abnormalities in Meconium of the Foetus and Newborn. Arch Dis Child 32, 17-21 (1957)

Enhoring G, Robertson B: Lung expansion in the premature rabbit fetus after tracheal deposition of surfactant. Pediatrics 50, 58-66 (1972)

Enhoring G: Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. J Appl Physiol 43, 198-203 (1977)

Evans ME, Feola DJ, Rapp RP: Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant Gram-negative bacteria. Ann Pharmacother 33, 960-967 (1999)

Falagas M, Kasiakou S: Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. Critical Care 10, R27 (2006)

Falagas M, Rafailidis P: Nephrotoxicity of Colistin: New Insight into an old Antibiotic. Clinical Infectious Diseases 48, 1729-1731 (2009)

Findlay RD, Taeusch HW, Walther FJ: Surfactant replacement therapy for meconium aspiration syndrome. Pediatrics 97, 48-52 (1996)

Fluegge K, Supper S, Siedler A, Berner R: Antibiotic Susceptibility in Neonatal Invasive Isolates of *Streptococcus agalactiae* in a 2-Year Nationwide Surveillance Study in Germany. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48, 4444-4446 (2004)

Fluegge K, Siedler A, Heinrich B, Schulte-Moenting J, Moenning MJ, Bartels DB, Dammann O, von Kries R, Berner R, for the German Pediatric Surveillance Unit Study Group: Incidence and Clinical Presentation of Invasive Neonatal Group B *Streptococcal* Infections in Germany. Pediatrics 117, 1139-1145 (2006)

Florman AL, Teubner D: Enhancement of bacterial Growth in amniotic fluid by meconium. J Pediatr 74, 111-114 (1969)

Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T: Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet* 1(8159), 55-59 (1980)

Gadzinowski J, Kowalska K, Vidyasagar D: Treatment of MAS with PPHN using combined therapy: SSL, bolus surfactant and iNO. *J Perinatol* 28, suppl 3, 56-66 (2008)

Göpel W, Kribs A, Ziegler A, Laux R, Hoehn T, Wieg C, Siegel J, Avenarius S, von der Wense A, Vochem M, Groneck P, Weller U, Möller J, Härtel C, Haller S, Roth B, Herting E, German Neonatal Network: Avoidance of mechanical ventilation by surfactant treatment of spontaneously breathing preterm infants (AMV): an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet* 378(9803), 1627-1634 (2011)

Gründig CA, John M, Rumler W: Proteolytische Enzyme des Mekoniums – Untersuchungen bei gesunden Neugeborenen und bei Frühgeborenen. *Zentralbl Gynäkol* 115, 323-327 (1993)

Gruenheid S, Le Moual H: Resistance to antimicrobial peptides in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 330, 81-89 (2012)

Grünwald P: Surface tension as a factor in the resistance of neonatal lungs to aeration. *Am J Obstet Gynecol* 53, 996-1007 (1947)

Hall SB, Bermel MS, Ko YT, Palmer HJ, Enhorning G, Notter RH: Approximations in the measurement of surface tension on the oscillating bubble surfactometer. *J Appl Physiol* 75, 468-477 (1993)

Halliday HL, Speer CP, Robertson B: Treatment of severe meconium aspiration syndrome with porcine surfactant. *Eur J Pediatr* 155, 1047-1051 (1996)

Halliday HL: Surfactants: past, present and future. *J Perinatol* 28, 47-56 (2008)

Hancock RE: Peptide antibiotics. *Lancet* 349, 418-422 (1997)

Hawgood S, Clements JA: Pulmonary Surfactant and its Apoproteins. *J Clin Invest* 86, 1-6 (1990)

Herting E, Sun B, Harms K: Surfactant Behandlung bei Mekoniumaspirations-syndrom: Widerspruch tierexperimenteller und klinischer Ergebnisse? *Z Geburtshilfe Neonatol* 199, 210 (1995)

Herting E: Surfactanttherapie bei neonataler Pneumonie und beim Mekoniumaspirationssyndrom. In: *Surfactanttherapie, Grundlagen, Diagnostik, Therapie*. Hrsg. von Wauer RW u.a.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1997, Seite 124-132

Herting E, Gefeller O, Land M, van Sonderen L, Harms K, Robertson B: Surfactant treatment of neonates with respiratory failure and group B streptococcal infection. Members of the collaborative European multicenter study group. *Pediatrics* 106, 957-964 (2000)

Herting E, Rauprich P, Stichtenoth G, Walter G, Johansson J, Robertson B: Resistance of different surfactant preparations to inactivation by meconium. *Pediatr Res* 50, 44-49 (2001)

Holm BA: Surfactant Inactivation in the adult respiratory distress syndrome. In: *Pulmonary Surfactant: from molecular biology to clinical practice*. Hrsg. v. Robertson B, van Golde LMG, Batenburg JJ; Elsevier, Amsterdam 1992, Seite 665-684

Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC: Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol* 21, 547-578 (2003)

Horton J, Pankey GA: Polymyxin B, colistin, and sodium colistinmethate. *Med Clin North Am* 66, 135-142 (1982)

Ikegami M, Weaver TE, Conkright JJ, Sly PD, Ross GF, Whitsett JA, Glasser SW: Deficiency of SP-B reveals protective role of SP-C during oxygen lung injury. *J Appl Physiol* 92, 519-526 (2002)

Ikegami M, Scoville EA, Grant S, Korfhagen T, Brondyk W, Scheule RK, Whitsett JA: Surfactant Protein-D and Surfactant Inhibit Endotoxin-Induced Pulmonary Inflammation. *Chest* 132, 1447-1454 (2007)

Ikegami M, Grant S, Korfhagen T, Scheule RK, Whitsett JA: Surfactant protein-D regulates the postnatal maturation of pulmonary surfactant lipid pool sizes. *J Appl Physiol* 106, 1545-1552 (2009)

Iosifidis E, Antachopoulos C, Ioannidou M, Mitroudi M, Sdougka M, Drossou-Agakidou V, Tsivitanidou M: Colistin administration to pediatric and neonatal patients. *Eur J Pediatr* 169, 867-874 (2009)

Ivanov VA, Gewolb IH, Uhal BD: A New Look at the Pathogenesis of the Meconium Aspiration Syndrome: A Role for Fetal Pancreatic Proteolytic Enzymes in Epithelial Cell Detachment. *Pediatric Research* 68, 221-224 (2010)

Johansson J, Curstedt T, Robertson B: The proteins of the Surfactant System. *Eur Respir J* 7, 372-391 (1994)

Johansson J, Curstedt T: Molecular Structures and Interactions of pulmonary surfactant components. *Eur J Biochem* 244, 675-693 (1997)

Jones B, Peake K, Morris AJ, McCowan LM, Battin MR: *Escherichia coli*: a growing problem in early onset neonatal sepsis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 44, 558-561 (2004)

Junqueira LC, Carneiro J: *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 4. Auflage, Springer-Verlag Berlin 1996, Seite 459-460

Kasahara M, Suzuki T, Pasquier LD: On the origins of the adaptive immune system: Novel insights from invertebrates and cool-blooded vertebrates. *Trends Immunol.* 25, 105-111 (2004)

- Kääpä P, Soukka H: Phospholipase A2 in meconium-induced lung injury. J Perinatol 28 suppl3, 120-122 (2008)
- Kobayashi T, Robertson B: Surface adsorption of pulmonary surfactant in relation to bulk-phase concentration and presence of CaCl₂. Respiration 44, 63-70 (1983)
- Kobayashi T, Shido A, Nitta K, Inui S, Ganzuka M, Robertson B: The critical concentration of surfactant in fetal lung liquid at birth. Respir Physiol 80, 181-192 (1990)
- Korfhagen TR, Sheftelyevich V, Burhans MS: Surfactant Protein-D regulates surfactant phospholipid homeostasis in vivo. J Biol Chem 273, 28438-28443 (1998)
- Kuroki Y, Sano H: Functional roles and structural analysis of lung collectins SP-A and SP-D. Biol Neonate 76 suppl 1, 19-21 (1999)
- Lembet A, Gaddipati S, Holzman IR, Berkowitz RL, Bottone EJ: Meconium enhances the Growth of perinatal bacterial pathogens. Mt Sinai J Med 70, 126-129 (2003)
- Liggins GC: Premature parturition after infusion of corticotrophin or cortisol into fetal lambs. J Endocrin 42, 323-329 (1968)
- Liggins GC, Howie RN: a controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. Pediatrics 50, 515-525 (1972)
- Lu KW, Goerke J, Clements JA, Taeusch HW: Hyaluron decreases surfactant inactivation *in vitro*. Pediatr Res 57, 237-241 (2005)
- Lu KW, Pérez-Gil J, Echaide M, Taeusch HW: Pulmonary surfactant proteins and polymer combinations reduce surfactant inhibition by serum. Biochim Biophys Acta 1808, 2366-2376 (2011)
- McAllister SM, Alpar HO, Brown MR: Antimicrobial properties of liposomal polymyxin B. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 43, 203-210 (1999)
- McCormack F: The Structure and Function of Surfactant Protein-A. Chest 111, 114s-119s (1997)
- McQuillen MP, Cantor HA, O'Rourke JR: Myasthenic syndrome associated with antibiotics. Trans Am Neurol Assoc 92, 163-167 (1967)
- Mittal R, Krishnan S, Gonzalez-Gomez I, Prasadarao NV: Deciphering The Roles Of Outer Membrane Protein A Extracellular Loops In The Pathogenesis Of *Escherichia Coli* K1 Meningitis. J Biol Chem 286, 2183-2193 (2011)
- Möller OG: *In-vitro*-Untersuchungen zur Beeinflussung des Proliferationsverhaltens von B-Streptokokken durch Surfactant. Inaugural-Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen, Göttingen 1998

- Morrison DC, Jacobs DM: Binding of Polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry* 13, 813-818 (1976)
- Moses D, Holm BA, Spitale P, Liu M, Enhorning G: Inhibition of pulmonary surfactant by meconium. *Am J Obstet Gynecol* 164, 477-481 (1991)
- Naeye RL, Burt LS, Wright DL, Blanc WA, Tatter D: Neonatal mortality, the male disadvantage. *Pediatrics* 48, 902-906 (1971)
- National Institutes of Health Consensus Development Conference: Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 173, 246-252 (1995)
- Nkadi PO, Merritt TA, Pillers DM: An Overview of Pulmonary Surfactant in the Neonate: Genetics, Metabolism, and the Role of Surfactant in Health and Disease. *Mol Genet Metab* 97, 95-101 (2009)
- Ochs M, Schüttler M, Stichtenoth G, Herting H: Morphological alterations of exogenous surfactant inhibited by meconium can be prevented by dextran. *Respiratory Research* 7, 86 (2006)
- Omri A, Suntres ZE, Shek PN: Enhanced activity of liposomal polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model of lung infection. *Biochem Pharmacol* 64, 1407-1413 (2002)
- Palumbi SR: Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science* 293, 1786-1790 (2001)
- Pattle RE: Properties function and origin of the alveolar lining layer. *Nature* 175, 1125 (1955)
- Pattle RE: The relation between surface tension and area in the alveolar lining film. *J Physiol* 269, 591-604 (1977)
- Paranka MS, Walsh WF, Stancombe BB: Surfactant lavage in a piglet model of meconium aspiration syndrome. *Pediatr Res* 31, 625-628 (1992)
- Perron GG, Zasloff M, Bell G: Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc Biol Sci* 273, 251-256 (2006)
- Phares CR, Lynfield R, Farley MM: Epidemiology of Invasive *Group B Streptococcal* Disease in the United States, 1999-2005. *JAMA* 299, 2056-2065 (2008)
- Possmayer F: Biophysical Properties of pulmonary surfactant. In: *Surfactant and the respiratory tract*. Hrsg. v. Ekelund L, Jonson B, Malm M u.a.; Elsevier-Verlag, Amsterdam 1989, Seite 39-55
- Possmayer F: Fetal and Neonatal Physiology. In: *Physiological aspects of pulmonary Surfactant* WB Saunders. Philadelphia 1997, Seite 1259-1275

Rauprich P, Möller O, Walter G, Herting E, Robertson B: Influence of Modified Natural or Synthetic Surfactant Preparations on Growth of Bacteria Causing Infections in the Neonatal Period. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7, 817-822 (2000)

Rebello CM, Jobe AH, Eisele JW, Ikegami M: Alveolar and tissue surfactant pool sizes in humans. *Am J Resp Crit Care Med* 154, 625-628 (1996)

Rice WR, Ross GF, Singleton FM: Surfactant-associated protein inhibits phospholipid secretion from type II cells. *J Appl Physiol* 63, 692-698 (1987)

Richmond S, Wyllie J: European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 7. Resuscitation of babies at birth. *Resuscitation* 81, 1389-1399 (2010)

Robertson B, Curstedt T, Johansson J, Jornvall H, Kobayashi T: structural and functional characterization of porcine surfactant isolated by liquid-gel chromatography. *Prog Resp Res* 25, 237-246 (1990)

Robertson B, Schürch S: Assessment of surfactant function. In: *Methods in pulmonary research*. Hrsg. v. Uhlig S und Taylor AE; Birkhäuser Verlag, Basel 1998, Seite 349-380

Robillard E, Alarie Y, Dagenais-Perusse P, Baril E, Guibeault A: Microaerosol administration of synthetic dipalmitoyl lecithin in the respiratory distress syndrome: a preliminary report. *Can Med Assoc J* 90, 55-57 (1964)

Rocchetti TT, Marconi C, Rall VL, Borges VT, Corrente JE, da Silva MG: Group B streptococci colonization in pregnant women: risk factors and evaluation of the vaginal flora. *Arch Gynecol Obstet* 283, 717-721 (2011)

Rooney SA, Young SL, Mendelson CR: Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J* 8, 957-967 (1994)

Ryley HC, Rennie D, Bradley DM: The composition of a mucus glycoprotein from meconium of cystic fibrosis, healthy pre-term and full-term neonates. *Clin Chim Acta* 135, 49-56 (1983)

Scheid P: Atmung. In: *Lehrbuch der Physiologie*. Hrsg. Klinker R und Silbernagel S; Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1996, Seite 225

Schrama AJ, de Beaufort AJ, Sukul YR, Jansen SM, Poorthuis BJ, Berger HM: Phospholipase A2 is present in meconium and inhibits the activity of pulmonary surfactant: an *in vitro* study. *Acta Paediatr* 90, 412-416 (2001)

Schmalisch G, Wauer RR: Percentile curves of functional residual capacity of newborn infants. *Monatszeitschr Kinderheilk* 141, 714-720 (1993)

Schuchat A: Epidemiology of *group B streptococcal* disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* 11, 497-513 (1998)

Schürch S, Bachofen H: Biophysical Aspects in the design of a therapeutic surfactant. In: Surfactant Therapy for lung Disease. Hrsg. v. Robertson B und Taeusch HW; Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong 1995, Seite 3-32

Schutt WH, Isles TE: Protein in meconium from meconiumileus. Arch Dis Child 43, 178-181 (1968)

Stevens PA, Schadow B: Molekulare Diagnostik der Surfactantstörungen. In: Surfactanttherapie; Grundlagen, Diagnostik, Therapie. Hrsg. v. Wauer RR u.a.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1997, Seite 21-33

Stichtenoth G: Einfluss von Mekonium auf die Funktion von pulmonalen Surfactant. Inaugural-Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen, Göttingen 2002

Stichtenoth G, Jung P, Walter G, Johansson J, Robertson B, Curstedt T, Herting E: PolymyxinB/Pulmonary Surfactant mixtures have increased resistance to Inactivation by meconium and reduce Growth of gram-negative bacteria *in vitro*. Pediatr Res 59, 407-411 (2006)

Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, et al.: Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. Pediatrics 126, 443-456 (2010)

Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE: Polymyxin and related peptide antibiotics. Annu Rev Biochem 46, 723-763 (1977)

Sun B, Curstedt T, Robertson B: Surfactant Inhibition in experimental meconium aspiration. Acta Paediatr 82, 182-189 (1993)

Sun B, Curstedt T, Lindgren G, Franz'en B, Alaiya AA, Calkovska A, Robertson B: Biophysical and physiological properties of a modified porcine surfactant enriched with surfactant protein A. Eur Resp J 10, 1967-1974 (1997)

Suzuki Y, Fujita Y, Kogishi K: Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. Am Rev Respir Dis 140, 75-81 (1989)

Taeusch HW, Lu KW, Goerke J, Clements JA: Nonionic polymers reverse inactivation of surfactant by meconium and other substances. Am J Respir Crit Care Med 159, 1391-1395 (1999)

Tashiro K, Ciu XG, Kobayashi T, Curstedt T, Robertson B: Modified Protocols for surfactant therapy in experimental meconium aspiration syndrome. Biol Neonate 83, 49-56 (2003)

The Consortium on Safe Labor: Respiratory morbidity in late preterm Births. JAMA 304, 419-425 (2010)

Vaara M: Agents that increase the Permeability of the outer membrane. Microbiol Rev 56, 395-411 (1992)

Vandenbussche G, Clercx A, Curstedt T, Johansson J, Jörnvall H, Ruyschaert JM: Structure and orientation of the surfactant-associated protein C in a lipid bilayer. *Eur J Biochem* 203, 201-209 (1992)

Veldhuizen EJA, Haagsman HP: Role of pulmonary Surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1467, 255-270 (2000)

von Neergard K: Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Z Gesamt Exp Med* 66, 373-394 (1929)

Voorhout WF, Veenendaal T, Haagsman HP, Verkleij AJ, van Golde LM, Geuze HJ: Surfactant Protein A is localized at the corners of the tubular myelin lattice. *J Histochem Cytochem* 39, 1331-1336 (1991)

Walsh-Sukys MC, Tyson JE, Wright LL, Bauer CR, Korones SB, Stevenson DK, Verter J, Stoll BJ, Lemons JA, Papile L, Shankaran S, Donovan EF, Oh W, Ehrenkranz RA, Fanaroff AA: Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn in the Era Before Nitric Oxide: Practice Variation and Outcomes. *Pediatrics* 105, 14-20 (2000)

Walther FJ, David-Cu R, Lopez SL: Antioxidant-surfactant liposomes mitigate hyperoxic lung injury in premature rabbits. *Am J Physiol* 269, 613-617 (1995)

Wauer RR: Das Atemnotsyndrom (ANS). In: *Surfactanttherapie; Grundlagen, Diagnostik, Therapie*. Hrsg. v. Wauer RR u.a.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1997, Seite 2-20

Weaver TE, Conkright JJ: Functions of Surfactant proteins B and C. *Annu Rev Physiol* 63, 555-578 (2001)

Westerhoff HV, Juretic D, Hendler RW, Zasloff M: Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 6597-6601 (1989)

Wiswell TE, Tuggle JM, Turner BS: Meconium Aspiration Syndrome: Have We Made a Difference? *Pediatrics* 85, 715-721 (1990)

Wiswell TE, Peabody SS, Davis JM, Slayter MV, Bent RC, Merritt TA: Surfactant therapy and high-frequency jet ventilation in the management of a piglet model of meconium aspiration syndrome. *Pediatr Res* 36, 494-500 (1994)

Wiswell TE, Knight GR, Finer NN, Donn SM, Desai H, Walsh WF, Sekar KC, Bernstein G, Keszler M, Visser VE, Merritt TA, Mannino FL, Mastroianni L, Marcy B, Revak SD, Tsai H, Cochrane CG: A Multicenter, Randomized, Controlled Trial Comparing Surfaxin (Lucinactant) Lavage With Standard Care for Treatment of Meconium Aspiration Syndrome. *Pediatrics* 109, 1081-1087 (2002)

Wright JR: Clearance and Recycling of pulmonary Surfactant. *Am J Physiol* 259, L1-L12 (1990)

Wright JR, Clements JA: Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 136, 426-444 (1987)

Yang L, Weiss TM, Lehrer RI, Huang HW: Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys J* 79, 2002-2009 (2000)

Zaltash S, Palmblad M, Curstedt T, Johansson J, Persson B: Pulmonary surfactant protein B: a structural model and a functional analogue. *Biochim Biophys Acta* 1466, 179-186 (2000)

Zasloff M: Magainins, a class of antimicrobial peptides from xenopus skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5449-5453 (1987)

Zasloff M: Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 405, 389-395 (2002)

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. med. PhD Guido Stichtenoth und Herrn Prof. Dr. med. Egbert Herting bedanken. Sie haben mich an das Thema herangeführt und mein Interesse geweckt. Außerdem standen sie jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Durch verschiedenste Gegebenheiten immer wieder ausgebremst, haben sie mich ermutigt weiter zu machen und diese Arbeit zu beenden.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Gabi Walter, die mir im Labor stets helfend zur Seite stand und mit Ihrem vielfältigen Wissen und ihrer Unterstützung sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ebenso bedanke ich mich beim Mathematischen Institut der Universität Göttingen für die statistische Beratung.

Besonderer Dank gilt auch meiner Frau Dorothee, die mir die zeitlichen Freiräume eingeräumt und geschaffen hat, diese Arbeit fertig zu stellen.

Die Surfactantpräparate wurden von der Firma Nycomed Arzneimittel GmbH, Ismaning zur Verfügung gestellt und das Personal der Wochenstation der Universitäts-Frauenklinik Göttingen half tatkräftig durch das Sammeln des Mekonium.

9. Lebenslauf

- 1976 Geburt am 16. November 1976
als zweites Kind von
Ernst-Ludwig Jung
(Polizeibeamter) und Gisela Jung
(Versicherungskauffrau, Hausfrau),
geborene Gerth, in Kassel
- 1983 bis 1996 Schulzeit mit Erlangung der allgemeinen Hochschulreife am
Wilhelmsgymnasium in Kassel
- 1996 bis 1999 Zivildienst und anschließende Ausbildung zum
Rettungsassistent
- 1999 bis 2006 Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität
in Göttingen und Erhalt der Approbation im Dezember 2006
- 2004 Beginn mit den Vorarbeiten der Dissertation
- seit 2007 Assistenzarzt in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des
Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
und Weiterführung der Laboruntersuchungen dieser
Dissertation
- 2007 Hochzeit mit Dorothee Jung, geborene Schmidt; Geburt
unserer 2 Söhne (2007 und 2010)



Veröffentlichungen

- 1) Stichtenoth G, Jung P, Walter G, Johansson J, Robertson B, Curstedt T, Herting E: Polymyxin B/pulmonary surfactant mixtures have increased resistance to inactivation by meconium and reduce growth of gram-negative bacteria in vitro. *Pediatr Res.* 59, 407-411 (2006)
- 2) Jung P, Stichtenoth G, Walter G, Johansson J, Herting E: Polymyxin B/Surfactant-Gemische reduzieren das Wachstum von E. coli in Mekoniumsuspensionen. Poster auf der GNPI-Jahrestagung (Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin) 2004 in Ulm, 3.Platz beim Posterwettbewerb
- 3) Jung P, Stichtenoth G, Härtel W, Göpel W, Herting E: Surfactant without mechanical ventilation. – What factors are influencing the response to treatment? Abstracts of the 17th European Workshop on Neonatology. *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine* 2, 209 (2009)