

Aus der

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde IV

(Schwerpunkt: Neonatologie, neonatologische Intensivmedizin)

**Effekte von Surfactant und seinen Bestandteilen auf  
differenzierende mononukleäre Blutzellen als Modell  
der Alveolarmakrophagen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Basile-Blankenhorn, Denise, geb. Basile**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. W. Bernhard  
2. Berichterstatter: Professorin Dr. R. Klein

Tag der Disputation: 17.02.2023

*Meinen Kindern  
Ella und Thore,  
meinem Ehemann,  
in Liebe*

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Surfactant.....	1
1.1.1 Entstehung und Bildung.....	1
1.1.2 Zusammensetzung .....	3
1.1.3 Funktionen .....	9
1.1.4 Störungen .....	10
1.1.5 Therapiemöglichkeiten.....	11
1.2 Der Monozyt.....	14
1.2.1 Entstehung des Monozyten .....	14
1.2.2 Phänotypisierung des Monozyten.....	16
1.2.3 Funktion und Aufgaben im Organismus.....	18
1.3 Der Lymphozyt .....	21
1.3.1 Entstehung des Lymphozyten.....	21
1.3.2 Phänotypisierung des Lymphozyten .....	23
1.3.3 Funktion und Aufgaben im Organismus.....	24
1.4 OKT3 und seine Effekte auf Lymphozyten .....	27
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	28
2. Material und Methoden .....	31
2.1 Material .....	31
2.1.1 Chemikalien .....	31
2.1.2 Antikörper .....	32
2.1.3 Bakterien.....	33
2.1.4 Medien und Puffer.....	33
2.1.5 Geräte.....	33

2.1.6 Untersuchungsmaterial .....	34
2.2 Methoden .....	35
2.2.1 Isolierung von Monozyten aus Vollblut.....	35
2.2.2 Phosphatidylcholinpräparation und Inkubation mit Lipiden .....	36
2.2.3 Bakterien.....	37
2.2.4 Inkubation der vorinkubierten Monozyten mit E. coli.....	38
2.2.5 Zugabe von Polyglobin .....	38
2.2.6 Auswaschen der Lipide und Bakterien.....	38
2.2.7 Inkubation mit Antikörpern .....	39
2.2.8 Inkubation der Lymphozyten mit OKT3.....	39
2.2.9 Vitalitätskontrolle der Monozyten mit FACS-Analyse .....	41
2.2.10 FACS-Analyse der monozytären Phagozytose und Messung der Oberflächenrezeptoren von Monozyten/Lymphozyten.....	41
2.3 Statistische Analyse .....	45
3. Ergebnisse .....	46
3.1 Phagozytose von PBMC aus PB.....	46
3.1.1 Phagozytose-Index .....	46
3.1.2 Phagozytose-Kapazität .....	47
3.1.3 CD14-Expression der phagozytierenden PBMC .....	49
3.1.4 CD14-Expression der nicht phagozytierenden PBMC .....	51
3.2 Phagozytose der PBMC aus NSB.....	52
3.2.1 Phagozytose-Index .....	52
3.2.2 Phagozytose-Kapazität .....	53
3.2.3 CD14-Expression der phagozytierenden PBMC .....	55
3.2.4 CD14-Expression der nicht phagozytierenden PBMC .....	56
3.3 Phänotyp der PBMC aus PB.....	57

3.3.1 CD14-Expression.....	57
3.3.2 HLA-DR-Expression.....	58
3.3.3 CD86-Expression.....	59
3.3.4 Anteil der CD80+-Zellen an CD86+-Zellen .....	59
3.4 Phänotyp der PBMC aus NSB .....	59
3.4.1 CD14-Expression.....	59
3.4.2 HLA-DR-Expression.....	59
3.4.3 CD86-Expression.....	60
3.4.4 Anteil der CD80+-Zellen an CD86+-Zellen .....	60
3.5 Phänotyp der PBMC aus PB mit und ohne Inkubation von OKT3.....	61
3.5.1 CD28-Expression.....	61
3.5.2 CD4-Expression.....	62
3.5.3 Anteil der CD25+-Zellen an CD4+-Zellen .....	63
3.6 Phänotyp der PBMC aus NSB mit und ohne Inkubation von OKT3 .....	63
3.6.1 CD28-Expression.....	63
3.6.2 CD4-Expression.....	65
3.6.3 Anteil der CD25+-Zellen an CD4+-Zellen .....	67
4. Diskussion .....	68
5. Zusammenfassung .....	79
6. Literaturverzeichnis .....	81
7. Erklärung zum Eigenanteil.....	94
8. Veröffentlichungen .....	95
9. Anhang .....	96

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Alveole.....	3
Abbildung 2: Synthese von Phosphatidsäure .....	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hämatopoese .....	16
Abbildung 4: Reifung der T-Lymphozyten im Thymus.....	22
Abbildung 5: Schematische Darstellung des TCR.....	23
Abbildung 6: Schematische Darstellung des BCR.....	24
Abbildung 7: Differenzierung naiver T-Zellen zu T-Effektorzellen.....	26
Abbildung 8: Chemische Struktur von CFDA-SE.....	41
Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Durchflusszytometrie .....	43
Abbildung 10: Phagozytose-Index der PBMC aus PB ohne PG.....	46
Abbildung 11: Phagozytose-Index der PBMC aus PB mit PG.....	47
Abbildung 12: Phagozytose-Kapazität der PBMC aus PB mit PG.....	48
Abbildung 13: Phagozytose-Kapazität der PBMC aus PB ohne PG.....	49
Abbildung 14: CD14-Expression der phagozyt. PBMC aus PB ohne PG .....	50
Abbildung 15: CD14-Expression der phagozyt. PBMC aus PB mit PG .....	51
Abbildung 16: Phagozytose-Index der PBMC aus NSB ohne PG .....	52
Abbildung 17: Phagozytose-Index der PBMC aus NSB mit PG .....	53
Abbildung 18: Phagozytose-Kapazität der PBMC aus NSB ohne PG.....	54
Abbildung 19: Phagozytose-Kapazität der PBMC aus NSB mit PG .....	55
Abbildung 20: CD14-Expression der phagozyt. PBMC aus NSB mit PG. ....	56
Abbildung 21: CD14-Expression der nicht phagozyt. PBMC aus NSB mit PG .	57
Abbildung 22: CD14-Expression der PBMC aus PB .....	58
Abbildung 23: HLA-DR-Expression der PBMC aus NSB.....	60
Abbildung 24: CD28-Expression der PBMC aus PB mit OKT3 .....	61
Abbildung 25: CD28-Expression der PBMC aus PB ohne OKT3 .....	62
Abbildung 26: CD28-Expression der PBMC aus NSB mit OKT3.....	64
Abbildung 27: CD28-Expression der PBMC aus NSB ohne OKT3.....	65
Abbildung 28: CD4-Expression der PBMC aus NSB mit OKT3.....	66
Abbildung 29: CD4-Expression der PBMC aus NSB ohne OKT3.....	67

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der PC und freien FS.....	5
Tabelle 2: Originaldaten der Versuchsreihen zu Phagozytose, Phänotyp der PBMC und T-Zellen.....	96

## Abkürzungsverzeichnis

1-Acyl-DHAP	1-Acyldihydroxyaceton-Phosphat
1-Acyl-G-3-P	1-Acyl-Glycerin-3-Phosphat
ADP	Adenosindiphosphat
AgBS	Antigenbindungsstelle
Ak	Antikörper
ALI	Acute Lung Injury
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BCR	B-Zell-Rezeptor
C16:1	Palmitoleinsäure
C18:1	Ölsäure
C14:0	Myristinsäure
C16:0	Palmitinsäure
CD	cluster of differentiation
CDP	Cytidindiphosphat
CFDA-SE	5-Carboxyfluoreszein-Diazetat-Succinimidyl-Ester
CFSE	Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	Co-Enzym A
COPD	chronisch obstruktive Lungenkrankheit
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte antigen
CTP	Cytidintriphosphat
DAG	Diacylglycerin
DGKJ	Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DHPE	Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin
DMSO	Dimethylsulfoxid

E. coli	Escherichia coli
EMP	Erythro-myeloide Vorläuferzelle
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	fötale Kälberserum
FS	Fettsäure
FSC	Forward Scatter
G-3-P	Glycerin-3-Phosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GNPI	Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin
HLA	human leucocyte antigen
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Icos	induzierbarer T-Zell-Costimulator
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IQR	Interquartilsabstand
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
M-CSF	Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex
MMR	Makrophagen-Mannose-Rezeptor
MPS	mononukleär-phagozytäres System
NAD/NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP/NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NK	natürliche Killerzellen
NSB	Nabelschnurblut
OD	optical density
OKT3	Muromonab-CD3
PB	Blut von Erwachsenen
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PC14:0/16:0	Myristoyl-Palmitoyl-Phosphatidylcholin
PC16:0/18:2	Palmitoyl-Linoleoyl-Phosphatidylcholin
PC16:0/14:0	Palmitoyl-Myristoyl-Phosphatidylcholin
PC16:0/16:0	1,2-Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin
PC16:0/16:1	Palmitoyl-Palmitoleoyl-Phosphatidylcholin
PC16:0/18:1	Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin
PEMT-Pathway	Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase-Stoffwechselweg
PFA	Paraformaldehyd
PG	Phosphatidylglycerol

PG-3-P	Phosphatidylglycerol-3-Phosphat
PI	Phosphatidylinositol
PJ	Propidiumjodid
PL	Phospholipase
PLA2	Phospholipase A2
PN-I	Typ I Pneumozyten
PN-II	Typ II Pneumozyten
P <sub>i</sub>	Phosphat
PP <sub>a</sub>	Pyrophosphat
RDS	Respiratory Distress Syndrome
rpm	Mischfrequenz (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SSC	Side Scatter
TAG	Triacylglycerid, Triglyzerid
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Tumor growth factor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Treg	CD4+/CD25+-Zellen, regulatorische T-Zellen

# 1. Einleitung

## 1.1 Surfactant

### 1.1.1 Entstehung und Bildung

Die Lunge ist Ort des alveolären Gasaustauschs bei Säugetieren und somit auch beim Menschen. Über den passiven physikalischen Mechanismus der Diffusion kommt es zur Aufnahme von Sauerstoff ins Blut und zur Abgabe von Kohlenstoffdioxid in die ausgeatmete Luft. Da der Alveolarraum großflächigen Kontakt zur Umwelt hat und somit auch zu Allergenen, Schadstoffen, apathogenen sowie pathogenen Mikroorganismen, spielen immunologische Funktionen eine wichtige Rolle. Unspezifische Abwehrfunktionen des Respirationstraktes sind die mukoziliäre Reinigung durch das respiratorische Flimmerepithel, die Aktivierung von Alveolarmakrophagen sowie der Einsatz von antimikrobiellen Substanzen, die im Bronchialsekret produziert werden. Die Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten sowie die Aktivierung von sensibilisierten T-Zellen gehören zur spezifischen Immunantwort des Alveolarraumes.

95% der Lungenalveolen werden von flachen, unteilbaren Zellen mit nur wenigen Organellen, sogenannten Typ I Pneumozyten (PN-I), ausgekleidet. Ihre Hauptfunktion ist der Gasaustausch. In *Abbildung 1* wird der schematische Aufbau einer Alveole gezeigt.

Surfactant (= surface active agent) wird jedoch nur von den restlichen 5% der alveolären Zellen, den Typ II Pneumozyten (PN-II), produziert. Diese Zelltypen können sich teilen und zu PN-I differenzieren. Weil der sich beim Früh- und Neugeborenen entwickelnde Alveolarraum großflächigen Kontakt zum Atemgas hat, spielen immunologische Prozesse hier eine große Rolle. PN-II haben eine wichtige Rolle in der Lungenclearance und Reparatur, indem sie proliferieren und zu geschädigten Teilen der Lunge wandern. Zudem verfügen sie über spezielle Organellen, genannt Lamellarkörperchen. PN-II tragen auch zur Immunabwehr der Lunge bei, indem sie Zytokine und Chemokine sowohl produzieren als auch mit ihnen interagieren (Homer et al., 2002; Thorley et al., 2007; Vanderbilt et al.,

2003; Whiterden et al., 2004). Surfactant wird im endoplasmatischen Retikulum der PN-II gebildet, um dann anschließend zu deren intrazellulären Lamellarkörperchen transportiert und dort gespeichert zu werden. Es konnten bislang über 500 Proteine als Bestandteil von Lamellarkörperchen in Rattenlungen identifiziert werden (Ridsdale et al., 2011). Surfactant wird dann via Exozytose an das alveoläre Epithel abgegeben und ist dort an der Oberfläche aktiv. Die pränatale Bildung beginnt ab der 22. bis 24. Schwangerschaftswoche. Ab der 35. Schwangerschaftswoche liegen ausreichende Mengen an Surfactant vor, um eine adäquate Entfaltung der Lungen zu gewährleisten. Die Surfactant-Komponenten werden alle 4 bis 11 Stunden im Alveolarraum ersetzt, so dass eine kontinuierliche Bildung notwendig ist (Baritussio et al., 1981).

Surfactant besteht zu 80-85% aus Phospholipiden (Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylglycerol (PG) und Phosphatidylinositol (PI)), zu 10% aus neutralen Proteinen und zu 5-10% aus den Surfactant-Proteinen A - D.

Die Synthese der Phospholipide beruht auf der Bereitstellung seiner Synthesebausteine Cholin, Phosphat, Glycerol und Fettsäuren (FS) in PN-II. Letztere stammen zum einen als freie FS aus dem zirkulierenden Blut und zum anderen aus Lipiden der Lipoproteine, die durch die Lipoproteinlipase abgespalten werden. Durch das Membranfettsäurebindungsprotein werden FS aus der Blutzirkulation inkorporiert oder durch die Phospholipasen (PL) aus den Phospholipiden hydrolysiert.

Zentrale enzymatische Prozesse werden durch die Acetyl-CoA-Carboxylase, die Fettsäure-Synthase (FAS) und die Citrat-Lyase gesteuert.

Lipofibroblasten speichern Triglyzeride in der Lunge, um sie als Substrat für PN-II bereitzustellen (Torday et al., 1995). Ganz aktuell wurde das Vorhandensein von Lipofibroblasten in der menschlichen Lunge bewiesen, womit eindeutige Rückschlüsse in Bezug auf regenerative therapeutische Ansätze aus Mausexperimenten auf die menschliche Lunge gezogen werden können (Schipke et al., 2021).

Glukokortikoide erzeugen pränatal eine Stimulation der Fettsäure-Synthase; Schilddrüsenhormone (Pope et al., 1988) und der Transforming Growth Factor

$\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) führen wiederum zu einer Hemmung der Fettsäure-Synthase (Lu et al., 2001).

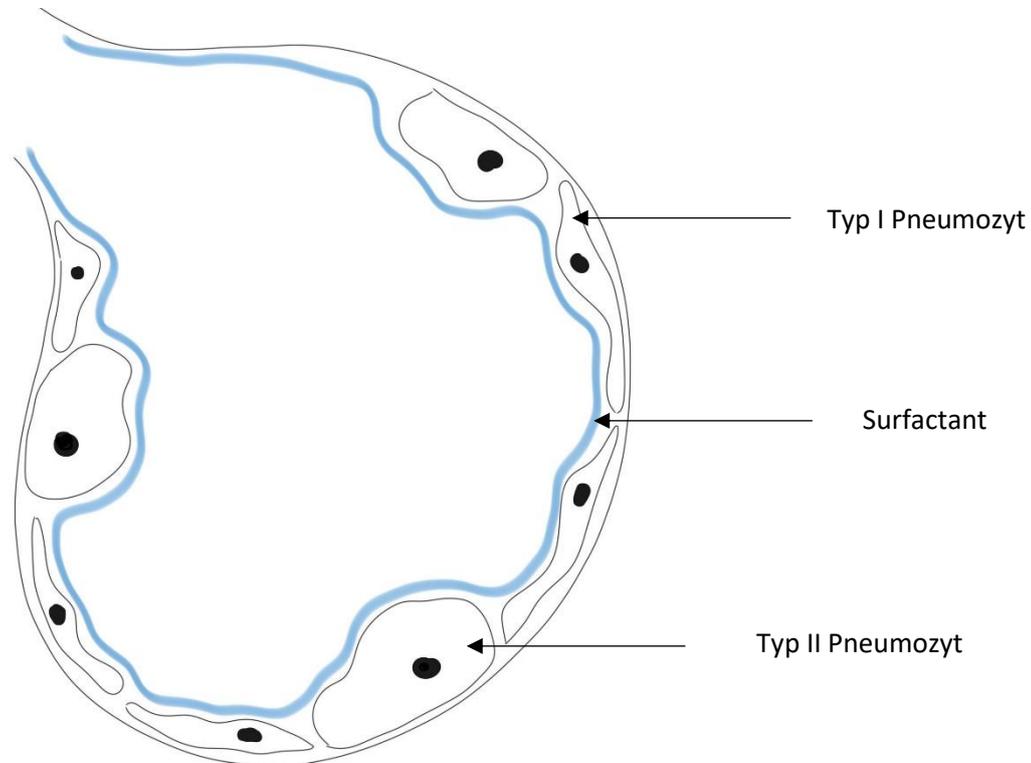


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Alveole (eigene Darstellung)

### 1.1.2 Zusammensetzung

Surfactant ist eine komplexe, multifunktionale Substanz, die zu 90% aus Lipiden besteht (Phospholipiden und Neutrallipiden) (Batenburg et al., 1992). Zu den weiteren Bestandteilen gehören eine Proteinfraction, die zur Hälfte aus Plasmaproteinen besteht und zur anderen Hälfte aus Surfactant-Proteinen (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D), sowie Kalzium-Ionen.

Der Lipidanteil besteht zu 80% aus PC. Die Zusammensetzung der PC enthält zwei Fettsäuren, Glycerol, Phosphatidsäure und Cholin. Diese FS haben eine Länge von 14 oder 16 Kohlenstoffatomen (14 Kohlenstoffatome (C14:0) = Myristinsäure; 16 Kohlenstoffatome (C16:0) = Palmitinsäure). Die FS sind

gesättigt oder haben eine cis-Doppelbindung und sind somit einfach ungesättigt (Palmitoleinsäure (C16:1)).

Die Hälfte der Phospholipidfraktion des Surfactant macht 1,2-Dipalmitoyl-PC (PC16:0/16:0) aus. PC16:0/16:0 ist ein zwitterionisches Molekül mit zwei gesättigten FS und erniedrigt die Oberflächenspannung. Es hat eine Phasenübergangstemperatur über 37°C mit dem Vorteil eine möglichst geringe Oberflächenspannung zu bilden.

Palmitoyl-Palmitoleoyl-PC (PC16:0/16:1), ein einfach ungesättigtes PC, ist eine weitere Hauptkomponente der PC des Surfactant und zudem spezifisch für Surfactant von Säugetieren.

Der dritte Hauptbestandteil der Surfactant-PC ist Palmitoyl-Myristoyl-PC (PC16:0/14:0).

Palmitoyl-Oleoyl-PC (PC16:0/18:1) sowie Palmitoyl-Linoleoyl-PC (PC16:0/18:2) liegen zwar ebenfalls aber in deutlich geringeren Konzentrationen vor.

Letztlich wird der Anteil der verschiedenen PC im Surfactant neben der Entwicklung auch von der Atemphysiologie beeinflusst. PC16:0/16:1 findet sich vermehrt bei Organismen mit erhöhter Atemruhefrequenz. PC16:0/14:0 findet sich in erhöhter Konzentration während der alveolären Entwicklung (Bernhard et al., 2001).

Der kommerzielle aus Schweinelungen gewonnene Surfactant Curosurf® enthält PC16:0/16:0 zu einem Anteil von  $50,2 \pm 2,2\%$ , PC16:0/14:0 zu  $8,3 \pm 1,4\%$  PC16:0/16:1 zu  $7,3 \pm 1,6\%$  und PC16:0/18:1 zu  $15,1 \pm 0,9\%$  in Bezug auf die gesamte Phospholipidkonzentration. Des Weiteren kommen mit absteigendem Anteil PC16:0/18:2, PC18:0/18:2, PC18:1/18:1, PC18:1/18:2, PC16:0/20:4, PC 18:0/20:4 und andere zu geringeren Prozentsätzen vor (Bernhard et al., 2000). In *Tabelle 1* sind die PC und FS mit dem Trivialnamen und der Strukturformel aufgelistet.

Phosphatidylcholin bzw. freie Fettsäure (Trivialname)	Anzahl der Kohlenstoffatome: Anzahl der Doppelbindungen	Strukturformel
1,2-Dipalmitoyl-PC * (DPPC)	PC16:0/16:0*	
Palmitoyl-Palmitoleoyl-PC*	PC16:0/16:1*	
Palmitoyl-Myristoyl-PC*	PC16:0/14:0*	
Myristoyl-Palmitoyl-PC	PC14:0/16:0	
Palmitoyl-Oleoyl-PC*	PC16:0/18:1*	
Palmitoyl-Linoleoyl-PC	PC16:0/18:2	
Hexadecensäure (Palmitinsäure)	C16:0	
Cis-Δ <sup>9</sup> -Hexadecensäure (Palmitoleinsäure)	C16:1	
Tetradecensäure (Myristinsäure)	C14:0	
Cis-Δ <sup>9</sup> -Octadecensäure (Ölsäure)	C18:1	
All-Cis-Δ <sup>9,12</sup> -Octadecadiensäure (Linolsäure)	C18:2	

*Tabelle 1: Auflistung der PC und freien FS mit systematischem Namen; Abkürzungen: PC – Phosphatidylcholin, C – freie Fettsäure; \*: Hauptbestandteil von Surfactant (eigene Darstellung)*

PG macht ca. 11% der Lipidfraktion des Surfactant aus. Durch seine ungesättigten Fettsäurereste wird die Viskosität der vom Surfactant gebildeten Lipidschicht herabgesetzt. In geringerem Anteil sind noch Neutralfette und Cholesterin vertreten.

Ein essentieller Bestandteil der Synthese der Phospholipide bzw. von Surfactant in PN-II ist Phosphatidsäure. Diese entsteht aus Glucose oder Glykogen via Glykolyse, woraus zuerst Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) entsteht. Es existieren zwei verschiedene Wege im Lungenstoffwechsel, wie aus DHAP

schließlich Phosphatidsäure entsteht (Wykle et al., 1977; Rooney, 1984). Zum einen wird aus DHAP durch Reduktion durch die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase Glycerin-3-Phosphat (G-3-P), was wiederum durch Acylierung durch die Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase zur 1-Acylglycerin-3-Phosphat (1-Acyl-G-3-P) wird. Zum anderen wird aus DHAP durch Acylierung über die Dihydroxyaceton-Phosphat-Acyltransferase zuerst 1-Acyldihydroxyaceton-Phosphat (1-Acyl-DHAP), was durch die Acyldihydroxyaceton-Phosphat-Reduktase zu 1-Acyl-G-3-P reduziert wird. Dies wird dann wieder durch die 1-Acylglycerin-3-Phosphat-Acyltransferase zu Phosphatidsäure acyliert.

Aus Phosphatidsäure wird 1,2-Diacylglycerin (DAG) gebildet, was ein Baustein der PC ist. Durch hydrolytische Phosphatabspaltung in den PN-II durch die Phosphatidat-Phosphatase entsteht 1,2-DAG. Durch die DAG-Acyl-Transferase entsteht schließlich Triacylglycerid (TAG), auch Triglyzerid genannt. 1,2-DAG ist zudem Ausgangspunkt für die PC-Synthese: durch hydrolytische Phosphatspaltung von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) entsteht aus Cholin Phosphocholin. Hieraus wird mit Cytidintriphosphat (CTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat ( $PP_a$ ) durch die CTP-Cholinphosphat-Cytidyltransferase Cytidindiphosphat (CDP)-Cholin, welches zusammen mit 1,2-DAG unter Abspaltung von Cytidinmonophosphat (CMP) zu PC synthetisiert wird. Zur de novo-Synthese der PC wird wie eben erwähnt als zweiter Baustein Cholin benötigt, welches aus der Nahrung aufgenommen wird und zellulär nur geringfügig über den Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase-Stoffwechselweg (PEMT-Pathway) selbst synthetisiert werden kann und damit zu den essentiellen Nährstoffen gehört (Shronts et al., 1997; Zhu et al., 2003). In *Abbildung 2* wird die Synthese von PC, PI und PG aus dem Zentralkmolekül Phosphatidsäure schematisch dargestellt. Durch Dephosphorylierung (Abspaltung von Pyrophosphat unter Einfluss von CTP) entsteht aus dem Zentralkmolekül Phosphatidsäure CDP-DAG, welches wiederum über Phosphatidylglycerol-3-Phosphat (PG-3-P) und dann via hydrolytische Phosphatabspaltung zu PG wird; in einem zweiten Syntheseweg entsteht aus CDP-DAG durch Hinzunahme von Inositol und unter CMP-Abspaltung PI.

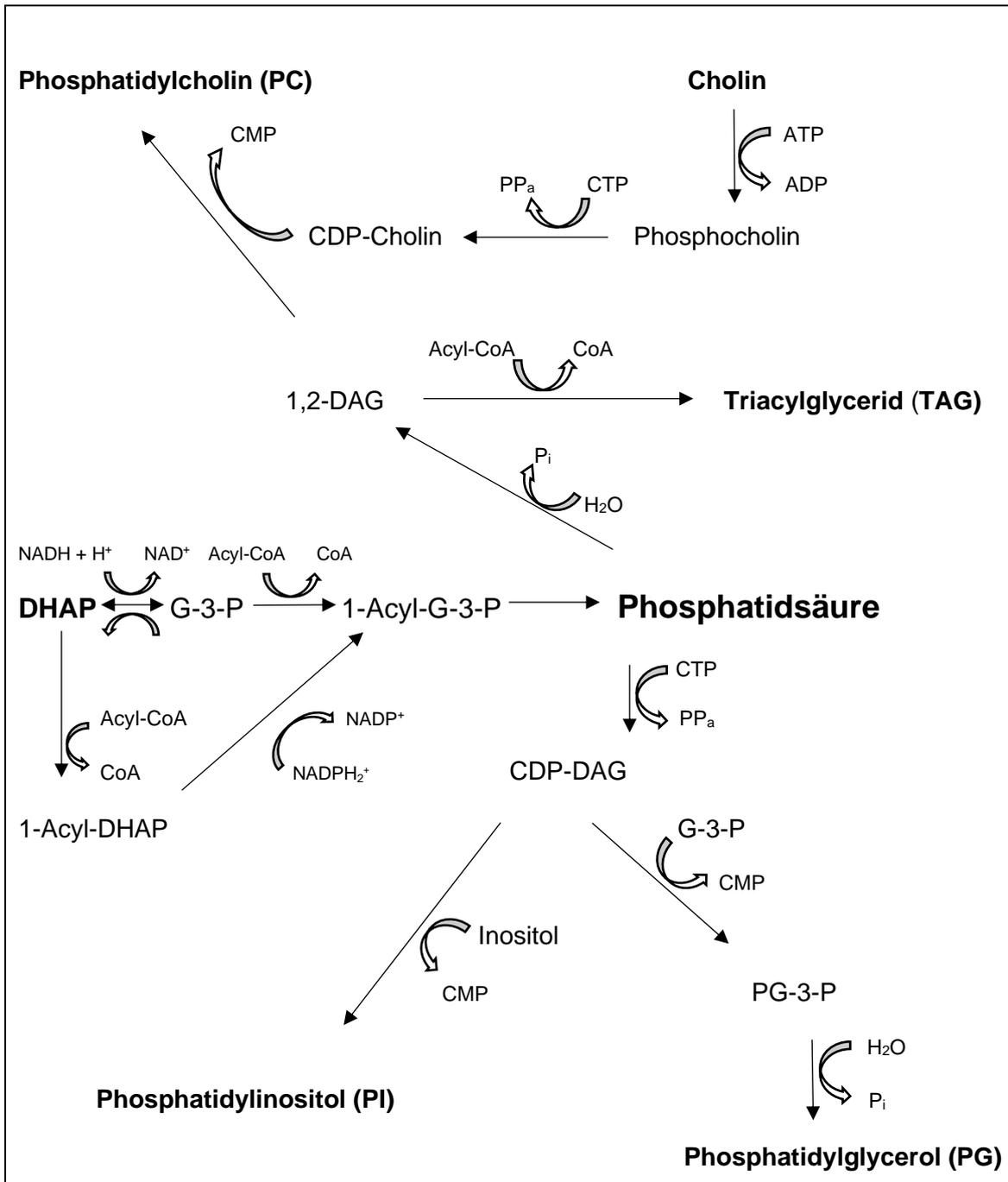


Abbildung 2: Synthese von Phosphatidsäure

Abkürzungen: ADP – Adenosindiphosphat, ATP – Adenosintriphosphat, CDP – Cytidindiphosphat, CMP – Cytidinmonophosphat, CoA - Coenzym A, CTP – Cytidintriphosphat, DAG – Diacylglycerol, DHAP – Dihydroxyacetonephosphat, G-3-P – Glycerol-3-Phosphat, NAD/NADH – Nicotinamadeninucleotid, NADP/NADPH – Nicotinamadeninucleotidphosphat, PG-3-P – Phosphatidylglycerol-3-Phosphat, PP<sub>a</sub> – Pyrophosphat (P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>4-</sup>), P<sub>i</sub> – Phosphat (PO<sub>4</sub><sup>-</sup>), TAG – Triacylglycerid  
(Quelle: adaptiert an Wolfgang Bernhard, Fetal and Neonatal Physiology, 2017)

Der PEMT-Pathway findet exklusiv in der Leber statt. Hierbei wird Phosphatidylethanolamin zu PC über die Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase, welche mit Methylgruppen aus Cholin bzw. Betain in drei Stufen Phosphatidylethanolamin zu PC methyliert.

Cholin wird in die PN-II aufgenommen und dann folgt eine Phosphorylierung über die Cholin kinase zur Cholinphosphat. Hieraus entsteht durch die CTP:Phosphocholin-Cytidyltransferase CDP-Cholin.

CDP-Cholin wird mit DAG durch die Cholin-Phosphotransferase zu PC.

Durch den Lands-Zyklus entsteht ca. die Hälfte der klassischen Surfactant-Komponente PC16:0/16:0 (Lands et al., 1982). Das de novo-synthetisierte PC wird durch die Phospholipase A2 (PLA2) und durch die Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase an seinen Fettsäureresten deacyliert und reacyliert (Zhao et al., 2008; Kazachkov et al., 2008). Am Beispiel der Entstehung des PC16:0/16:0 wird via Lands-Zyklus aus 1-Palmitoyl-2-Linoleoyl-PC durch die PLA2 das 1-Palmitoyl-Glycero-PC unter Abspaltung von Linolsäure. Aus 1-Palmitoyl-Glycero-PC entsteht durch die Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase schließlich PC16:0/16:0.

Bei Säugetieren sind die disaturierten PC16:0/16:0 und PC16:0/14:0 sowie das einfach ungesättigte PC16:0/16:1 die Hauptbestandteile der Phospholipidfraktion des Surfactant; die genaue Zusammensetzung ändert sich im Laufe der alveolären Entwicklung aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen an die Physiologie (Bernhard et al. 2001; Rau et al., 2004; Ridsdale et al., 2005).

Besonders der Effekt der Reduktion der Oberflächenspannung wird durch die sich leichter verflüssigenden PC16:0/14:0 (Phasenübergangstemperatur von 27°C) und PC16:0/16:1 verstärkt und finden sich daher erhöht im Surfactant Neugeborener als bei Erwachsenen auf Kosten des PC16:0/16:0. Ebenso ist die Konzentration der Surfactant-Proteine SP-B und SP-C im Surfactant Neugeborener erhöht (Bernhard et al., 2004).

PC16:0/16:0 gilt als Hauptbestandteil der Phospholipidfraktion des Surfactant. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass dies nicht bei allen Säugtieren der Fall ist, z.B. ist PC16:0/16:0 nicht Hauptbestandteil des Surfactant bei Wombats, Schmalfuß-Beutelmäusen und dem Beutelteufel (Lang C. et al., 2005).

Die Hypothese, dass eine erhöhte alimentäre Zufuhr von FS zu einer Veränderung der Phospholipidkonzentration von Surfactant führt, wurde in Bezug auf C14:0 bestätigt. Durch Anreicherung von C14:0 in Milch konnte eine erhöhte Konzentration von PC16:0/14:0 im Surfactant bei Ratten nachgewiesen werden (Bernhard et al., 2011).

### **1.1.3 Funktionen**

Surfactant bildet eine Grenzschicht der Alveole zwischen dem flüssigen und gasförmigen Kompartiment.

Surfactant ist ein essentieller Bestandteil der neonatalen Lungenreife sowie der Aufrechterhaltung der Lungenfunktion. Er sorgt dafür, dass durch eine Reduktion der Oberflächenspannung die Entfaltung der Lunge mit niedrigem intrapulmonalem Druck unterhalten wird.

Aufgrund der hohen Oberflächenspannung der Lunge im Bereich der Zwischenräume von Luft und Flüssigkeit ist eine Entfaltung der Lunge schwierig. Anhand der Druck-Volumen-Kurve konnte gezeigt werden, dass der pulmonale Öffnungsdruck von frühgeborenen Hasen, die noch keinen Surfactant bilden konnten, bei ca. 20 cm H<sub>2</sub>O lag, wohingegen der Öffnungsdruck der mit Surfactant behandelten Lungen auf 15 cm H<sub>2</sub>O fiel (Rider et al., 1992).

Die Young-Laplace-Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen Oberflächenspannung, Druck und Oberflächenkrümmung einer Flüssigkeit. Dadurch wird die Bedeutung von Surfactant auch bei der Expiration deutlich. Durch eine Verkleinerung des alveolären Radius und somit der Fläche der Alveole wird der Druck größer, was zu einem Kollaps der Alveole führt. Durch diese Änderung der Oberfläche der alveolären Gas-Flüssigkeitsgrenze muss die Oberflächenspannung reduziert werden, was eine Hauptfunktion des Surfactant darstellt.

Young-Laplace-Gleichung:  $\Delta p = \left( \frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \gamma$

$p$  = Innendruck einer Kugel [Kollapsdruck einer Kugel]

$\gamma$  = Oberflächenspannung

$r$  = Radius

Zudem hat Surfactant wichtige immunologische Funktionen.

Die hydrophilen Surfactant-Proteine SP-A und SP-D gehören zu diesen wichtigen, angeborenen immunmodulatorischen Substanzen. Sie haben die Fähigkeit, Kohlenhydrate zu erkennen und können dadurch mit den Oberflächenantigenen von Erregern interagieren und somit die Phagozytose durch Makrophagen induzieren. Zudem gibt es Hinweise, dass inflammatorische Prozesse durch SP-A und SP-D moduliert werden. Auch die Hemmung von T-Lymphozyten wird diesen Proteinfractionen zugeschrieben.

Zudem wird die Surfactant-Produktion über negative Rückkopplung durch SP-A angepasst. SP-D wird zudem eine Rolle im Metabolismus des Surfactant sowie dessen Homöostase nachgesagt (Herbein et al., 2000).

Die hydrophoben Surfactant-Proteine SP-B und SP-C regulieren die gleichmäßige Verteilung des Surfactant auf der Alveolaroberfläche und sind wichtig für dessen Stabilität.

Die exakte biologische Funktion von PG ist noch unbekannt; es wird jedoch angenommen, dass es einen Einfluss auf die Stabilität der Alveolen sowie eine Funktion in der angeborenen Immunantwort hat (Numata et al., 2010).

#### **1.1.4 Störungen**

Das Atemnotsyndrom bei Frühgeburtlichkeit (RDS = Respiratory Distress Syndrome) ist verursacht durch einen Surfactant-Mangel aufgrund einer noch nicht ausreichenden Bildung von Surfactant. Durch einen hepatischen Mangel an Cholin kommt es zu einer geringeren Synthese von PC.

Beim Gestationsdiabetes kommt es zu einer Störung der neonatalen Entwicklung von PN-II und somit zu einer unzureichenden Surfactant-Bildung.

Neonatale Infektionen oder eine Mekoniumaspiration haben einen zu hohen Verbrauch von Surfactant zur Folge oder hemmen dessen Produktion, was zu einem sekundärem Atemnotsyndrom führen kann.

Des Weiteren ist der genetisch verursachte Surfactant-Protein-B-Mangel bekannt, bei dem sich rasch postpartal ein Atemnotsyndrom entwickelt. Ein ebenfalls genetisch bedingter Mangel an dem intrazellulären Transportprotein ABC-A3 führt ebenso zu einem RDS. Beide Erkrankungen enden letal.

Der Surfactant-Protein-C-Mangel mit konsekutivem chronischem Surfactant-Mangel mit der Folge einer interstitiellen Lungenerkrankung kommt oft erst im Erwachsenenalter zur Ausprägung.

Einen entscheidenden Einfluss auf die alveoläre Homöostase hat auch die hochdosierte Sauerstofflangzeittherapie mit der Folge einer Schädigung des Surfactant.

Surfactant-Dysfunktionen sind zudem bei COPD, Asthma oder zystischer Fibrose bekannt (z.B. Hull et al., 1997).

Pneumonien und Sepsis bei Erwachsenen mit der Gefahr der Ausbildung eines Acute Lung Injury (ALI) oder eines Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) gehen ebenfalls mit einer Dysfunktion von Surfactant einher (Cogo et al., 2007).

Infektionen des Respirationstraktes können zu einer Hemmung der Surfactant-Synthese oder zu einer Beeinträchtigung der Surfactant-Sekretion führen (z.B. Alcorn et al., 2004; Wu Y et al., 2007; Henderson et al., 2006; Perino et al., 2011).

Toxische Stoffe, wie z.B. Tabakrauch, können die Surfactant-Bildung, seine Zusammensetzung und Sekretion negativ beeinflussen (Review von Scott, 2004).

### **1.1.5 Therapiemöglichkeiten**

Zur klinischen Anwendung kommt Surfactant bei Frühgeburten mit einem RDS, welches durch einen primären Surfactant-Mangel verursacht wurde. Dann wird Surfactant postnatal substituiert (z.B. Modanlou et al., 1997). Dieser wird

entweder aus tierischen Ressourcen (bovin oder porcin) hergestellt oder rekombinant synthetisiert.

Es wird zeitlich unterschieden zwischen einer primären oder frühen Therapie (ab Geburt bis 60 Minuten postnatal) und einer Interventionsbehandlung (1 bis 2 Stunden postnatal bei Zeichen eines RDS). Eine frühe Behandlung wird bei einem Gestationsalter von < 27 Schwangerschaftswochen und bei fehlender vorangegangener Therapie der Mutter mit Kortikosteroiden empfohlen.

Bei einem Gestationsalter von der 27. bis zur 32. Schwangerschaftswoche wird eine Interventionsbehandlung empfohlen. Hierdurch kann eine Übertherapie vermieden werden (AWMF-Leitlinie Leitlinie der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) und der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ) zur Surfactant-Therapie des Atemnotsyndroms Frühgeborener; zugrunde liegende Studie: Roja-Reyes et al., 2012). Aktuell gibt es zwei gleichwertige Surfactant-Präparate auf dem Markt: das bovine Surfactant-Präparat Alveofact® (Bovactant) sowie die porcine Präparation Curosurf® (Poractant alfa) (Proquitté et al., 2007). Die empfohlene initiale Dosierung beträgt für beide Präparate 100mg/kgKG zur Therapie des unkomplizierten RDS (zugrunde liegende Studien zur Dosisfindung: Halliday et al., 1993; Gortner et al., 1994). Bei schweren Verläufen ist eine höher dosierte Initialtherapie mit z.B. 200mg/kgKG zu erwägen (Jobe, 1983; Sweet et al., 2016), da neben dem primären Surfactant-Mangel auch eine sekundäre Surfactant-Inaktivierung möglich ist. Es werden bis zu drei Folgeapplikationen empfohlen mit einer Dosierung von je 50 bis 100mg/kgKG. Eine Gesamtdosis von 300mg/kgKG sollte dabei nicht überschritten werden.

Die Gabe erfolgt intratracheal über einen Trachealtubus mit konsekutiver kurzer mechanischer Beatmung (INSURE = Intubation, Surfactant, Extubation). Alternativ kann die Gabe über eine dünne, tracheale Sonde bei CPAP-Beatmung unter Spontanatmung erfolgen (LISA = Less Invasive Surfactant Aministration; MIST = Minimally Invasive Surfactant Therapy) (Herting et al., 2013).

Zudem kann die endogene Bildung durch verschiedene Substanzen (Kortikosteroide, Schilddrüsenhormone, Östrogen (z.B. Sullivan et al., 2002;

Review von Rooney, 1984; Martini et al., 2000; Patrone et al., 2003) oder  $\beta$ -2-Sympathikomimetika) angeregt werden.

Klinisch ist die antenatale Gabe von Kortikosteroiden an die Mutter bei drohender Frühgeburt ab dem Zeitpunkt der Lebensfähigkeit (d.h. ab der 24. Schwangerschaftswoche) bis zum Ende der 34. Schwangerschaftswoche in den Leitlinien fest verankert. Es werden 12mg Betamethason intramuskulär appliziert mit einer Wiederholung nach 24 Stunden mit dergleichen Dosis; der Wirkungseintritt wird nach 18 Stunden erwartet (Quelle: AWMF-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V.).

Für die Kombination aus einer antenatalen Kortikosteroid-Gabe an die Mutter und einer postnatalen Surfactant-Gabe an das Neugeborene bei einem RDS wurden additive Effekte bestätigt (Jobe et al., 1993; Kair et al., 1994).

Der Vorteil einer Kombination aus natürlichem Surfactant (Survanta®) und Budesonid, intratracheal appliziert, im Rahmen der initialen postnatalen Therapie wurde bestätigt; bei den in die Studie eingeschlossenen 265 beatmungsbedürftigen Frühgeborenen mit einem Geburtsgewichts von < 1.500g zeigte sich eine signifikante Senkung der Häufigkeit von Tod oder bronchopulmonaler Dysplasie (Yeh et al., 2016) (Quelle: AWMF-Leitlinie der GNPI und der DGKJ zur Surfactant-Therapie des Atemnotsyndroms Frühgeborener).

Die mütterliche Gabe von Ambroxol bei Frühgeburtlichkeit zur Prävention eines RDS hat sich als nicht effektiv erwiesen (Gonzalez et al., 2014).

Auch Prostaglandine haben einen positiven Einfluss auf die intrauterine Produktion von Surfactant. Westover et al. zeigten 2012 den Einfluss von Prostaglandinen im Rahmen intrauteriner Infektionen bei Schafen.

Im Gegensatz zu Kortikosteroiden hemmen Insulin (Martini et al., 2000) und Androgene wiederum die Surfactant-Synthese.

Eine Substitution von Surfactant bei Erwachsenen mit einem ARDS z.B. im Rahmen einer Pneumonie oder Sepsis wird derzeit nicht empfohlen (Lauer et al., 2006).

Es wird vermutet, dass die Gabe von Schilddrüsenhormonen (Trijodthyronin) bei Ratten im Rahmen einer Sepsis einen positiven Effekt auf die Lunge hat durch die Aufrechterhaltung der Surfactant-Homöostase (Ksenzenko et al., 1997).

Bei Ratten konnte bestätigt werden, dass eine Glutathion-Gabe die Surfactant-Phospholipide erhält und somit die Schwere der Lungenbeteiligung im Rahmen einer Sepsis abmildern kann (Velasquez et al., 2002).

## **1.2 Der Monozyt**

### **1.2.1 Entstehung des Monozyten**

In den Versuchsreihen dieser Arbeit wurden verschiedene Effekte von Surfactant-Bestandteilen auf differenzierende monozytäre Zellen als Modell für Alveolarmakrophagen untersucht.

Aus pluripotenten Knochenmarksstammzellen entstehen durch die Leukopoese drei Typen von Vorläuferzellen: Myeloblasten, Monoblasten und Lymphoblasten (*Abbildung 3*).

Aus mononukleären Zellen im Knochenmark reifen Monozyten. Diese werden beeinflusst durch Wachstumsfaktoren (GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor) und M-CSF (Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor)). Aus den Lymphoblasten entwickeln sich B- und T-Lymphozyten.

Über viele Jahrzehnte war die Theorie vorherrschend, dass Monozyten aus dem Knochenmark ins periphere Blut zirkulieren und aktiv ins Gewebe einwandern. Sie differenzieren in den spezifischen Organen zu Makrophagen weiter (van Furth und Cohn, 1968): Alveolarmakrophagen in der Lunge, dendritische Zellen in Lymphknoten und oberflächlichen Geweben, Kupffer-Zellen in der Leber, Histozyten im Bindegewebe, Mikroglia im Gehirn, Osteoklasten im Knochen, Langerhans-Zellen in der Haut und Hofbauer-Zellen in der Plazenta (Hume et al., 1983). Zudem können sie sich in dendritische Zellen bei inflammatorischen Prozessen entwickeln.

Zwischenzeitlich wurde diese Theorie jedoch kontrovers diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass zirkulierende Monozyten keinen Anteil an lokalen

Gewebemakrophagen (wie auch Alveolarmakrophagen) im Steady State haben (Hashimoto et al., 2013).

Es wurde *in vitro* gezeigt, dass Vorläuferzellen von Makrophagen vor ihrer Entwicklung aus den hämatopoetischen Knochenmarksstammzellen im Dottersack zu finden sind (Palis et al., 1999; Betrand et al., 2005; Lux et al., 2008; Kierdorf et al., 2013; Moore and Metcalf, 1970). Fetale Makrophagen können sich unabhängig von Myb, einem für die hämatopoetischen Stammzellen notwendigen Transkriptionsfaktor, entwickeln (Schulz et al., 2012).

Im Mausexperiment wurde gezeigt, dass sich mehrheitlich lokale Gewebemakrophagen der verschiedenen Gewebe, nämlich Alveolarmakrophagen der Lunge, Mikroglia des Hirns, Langerhans-Zellen der Epidermis und Kupffer-Zellen der Leber, unabhängig von hämatopoetischen Stammzellen über Tie2+ oder Tek-Zellen entwickeln, die Csflr+-Erythro-myeloide Vorläuferzellen (EMPs) erzeugen (Mass et al., 2016). Diese EMPs entwickeln sich im Dottersack an Tag 8.5 der Embryogenese, wandern und besiedeln die fetale Leber vor Tag 10.5 und bilden so die fetalen Erythrozyten, Makrophagen, Granulozyten und Monozyten bis Tag 16.5. Im Anschluss daran werden Erythrozyten, Granulozyten und Monozyten durch Zellen, die aus den hämatopoetischen Stammzellen hervorgingen, ersetzt. Alveolarmakrophagen wurden bei älteren Mäusen zunehmend ersetzt; Kupffer-Zellen, Mikroglia und Langerhans-Zellen wurden jedoch bei einjährigen Mäusen nur zu einem geringfügigen Anteil ersetzt. Schlussfolgernd wurde in der fetalen Leber eine Hämatopoese durch Dottersack-EMPs sowie durch hämatopoetische Stammzellen nachgewiesen. Dottersack-EMPs konnten als Ursprung für Gewebemakrophagen identifiziert werden (Gomez Perdiguero et al., 2015).

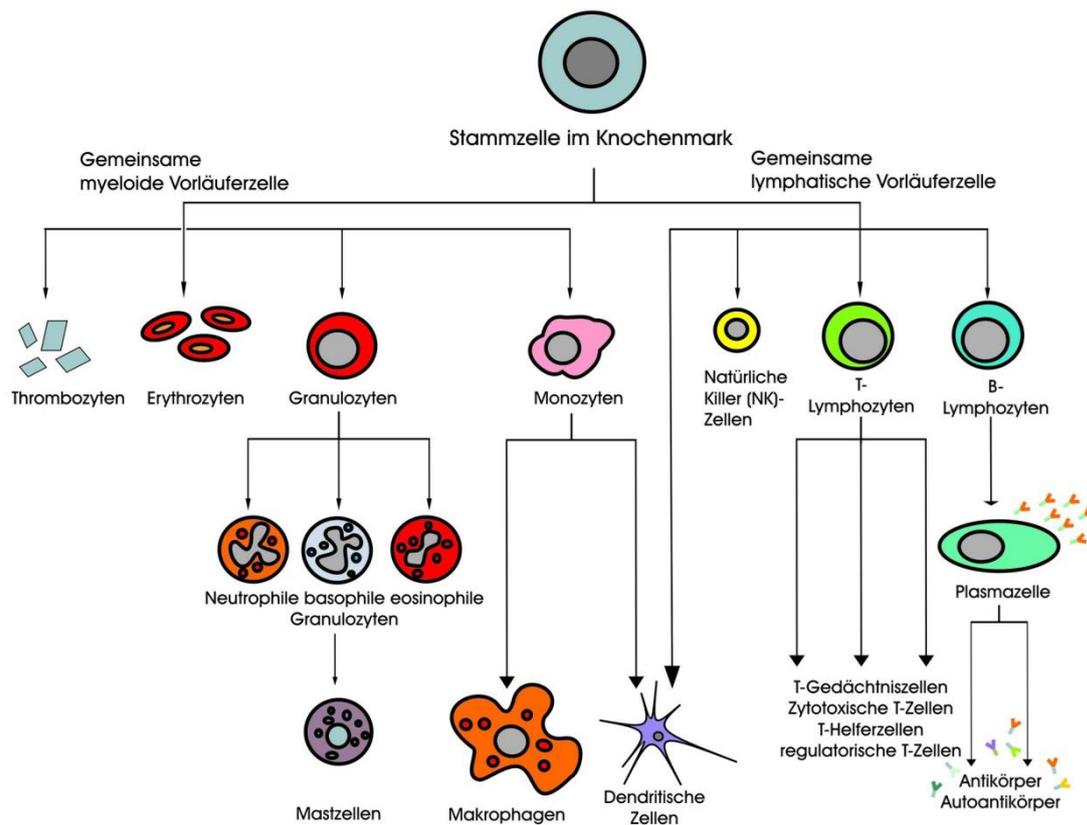


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hämatopoese  
 (Quelle: [http://dasimmunsystem.de/fileadmin/processed/csm\\_Grafik/Immunkzellen\\_Stammbaum\\_V3\\_ab609e3184.jpg](http://dasimmunsystem.de/fileadmin/processed/csm_Grafik/Immunkzellen_Stammbaum_V3_ab609e3184.jpg); 10.3.2017)

### 1.2.2 Phänotypisierung des Monozyten

Zirkulierende Monozyten entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren GM-CSF und M-CSF. Ihr für ihre Spezies typischer Oberflächenmarker ist CD14 (cluster of differentiation), ein Proteinkomplex an der Zelloberfläche, der eine Opsonin-Rezeptorfunktion besitzt und bakterielle FS sowie Bestandteile der bakteriellen Zellmembran, sogenannte Peptidoglykane, bindet.

In den untersuchten Versuchsreihen wurden mononukleäre Zellen verwendet, die das Oberflächenantigen CD14 trugen.

Im Jahr 2000 wurden Makrophagen in zwei verschiedene Phänotypen unterteilt (Mills et al., 2000):

Der M1-Phänotyp exprimiert CD80, CD86, CD68, MHC II, iNOS und SOCS3.

Die M2-Phänotypisierung ist sehr komplex mit vielen Markern und scheint noch nicht vollständig aufgeklärt zu sein. Der M2-Phänotyp exprimiert den Oberflächenmarker CD206 (auch bekannt als Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR)). Allerdings wurde in einer Studie gezeigt, dass CD206 auch von M1-Makrophagen exprimiert wird. Daher wurde vorgeschlagen, dass die Hochregulation von CD200R das spezifische phänotypische Merkmal von M2-Makrophagen ist (Jaguin et al., 2013).

CD163 kann ebenfalls nicht zur Spezifikation von M2-Makrophagen dienen, da dieser Marker nur in Kombination mit dem Transkriptionsfaktor CMAF M2-Makrophagen identifiziert (Barros et al., 2013).

M2-Makrophagen exprimieren den Makrophagen-Galaktose-Typ Lektin (MGL1 und MGL2). Diese Makrophagen werden bei parasitären Infektionen und allergischen Erkrankungen des Respirationstrakts aktiviert (Raes et al., 2005).

CD68 wird von Makrophagen exprimiert und bindet oxLDL, Phosphatidylserin und apoptotische Zellen. Dieses Oberflächenantigen dient als Rezeptor für Malaria-Sporoziten bei einer Leberinfektion (Ramprasad et al., 1996; Otnad et al., 1995; Sambrano et al., 1995; Chistiakov et al., 2017).

Reife differenzierte Makrophagen verlieren im Verlauf den Oberflächenmarker CD14 (Gordon et al., 2005).

Mittlerweile ist die Unterteilung in nur 2 Subtypen von Makrophagen überholt; Mantovani et al. beschrieben 2004 weitere Subtypen von M2-Makrophagen (den M2a-, M2b- und M2c-Typ (von manchen Autoren wird auch der M2d-Typ beschrieben)). Es wurden auch unabhängig vom M1- oder M2-Subtyp Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM), CD169+-Makrophagen (kommen in Milz, Lymphknoten, Leber und Knochenmark vor (Crocker et al., 1986)) und T-Zell-Rezeptor+- (TCR+)-Makrophagen beschrieben.

M2-Makrophagen können sich in vitro unter dem Einfluss von bestimmten Zytokinen wieder zu M1-Makrophagen umwandeln (Davis et al., 2013).

In den folgenden Versuchen wurden sowohl M1- als auch M2-Makrophagen untersucht. Der untersuchte Oberflächenmarker CD14 ist auf allen Alveolarmakrophagen zu finden.

### 1.2.3 Funktion und Aufgaben im Organismus

Das mononukleär-phagozytäre System (MPS) ist ein wichtiger Bestandteil der zellulären, unspezifischen Immunabwehr, indem mittels Phagozytose körperfremde Mikroorganismen bzw. Bestandteile eliminiert werden. CD14 bindet bakterielle FS und Peptidoglykane und mittels Antigenpräsentation wird die humorale, spezifische Immunantwort induziert. Auch körpereigene Substanzabfälle werden vom MPS eliminiert.

Monozyten zirkulieren im Blut und können ins spezifische Gewebe einwandern und dort weiter differenzieren; dies wurde jedoch in Frage gestellt und somit auch dass zirkulierende Monozyten einen Anteil an lokalen Gewebemakrophagen, dementsprechend auch an Alveolarmakrophagen, im Steady State haben (Hashimoto et al., 2013). Zudem exprimieren sie verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren, Chemokine und Enzyme (z.B. Murdoch et al., 2004; Lewis and Pollard, 2006).

Der Oberflächenrezeptor CD14 ist ein Glykoprotein, das sowohl über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker gebunden an der Zellmembran vorkommt als auch in löslicher Form vorliegen kann und insbesondere auf Monozyten, Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (Pugin et al., 1994). CD14 bindet zusammen mit dem Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4) den LPS-Rezeptor, der das Endotoxin LPS der Zellwand von gram-negativen Bakterien erkennt (Wright et al., 1990) und so eine inflammatorische Immunantwort induziert, was eine Sekretion von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) zur Folge hat. Dadurch wird eine Entzündungsreaktion initiiert. CD14 hat zudem die Funktion der Erkennung und Beseitigung von apoptotischen Zellen (Devitt et al., 1995).

Die Unterteilung in 2 Subgruppen von Makrophagen beinhaltet einerseits den M1-Phänotyp. Dieser gilt der als proinflammatorisch, indem er das Enzym iNOS (induzierbare NO-Synthase) bildet, was wiederum für die Produktion von zelltoxischen NO-Radikalen verantwortlich ist. Zudem bildet er proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1-beta, TNF, IL-12, IL-18 und IL-23). Der M1-Phänotyp wird durch den GM-CSF (Fleetwood et al., 2007), Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) (Nathan et al., 1983) und LPS (Guha et al., 2001) stimuliert.

Der M2-Phänotyp gilt als antiinflammatorisch, wird aktiviert durch Interleukin-4 (Stein et al., 1992), -10 und -13, Infektionen mit Pilzen, Parasiten oder Helminthen, apoptotische Zellen, Immunkomplexe, M-CSF, Tumor-growth-factor-beta (TGF- $\beta$ ) und andere Induktionswege. Er besitzt eine ausgeprägte Phagozytose-Kapazität und hat Einfluss auf die Differenzierung von Stammzellen. Zudem exprimiert er Wachstumsfaktoren und antiinflammatorische Zytokine. Es finden sich M2-Markerproteine bei allen soliden Gewebstumoren. Daher ist anzunehmen, dass diese einen antiinflammatorischen Effekt haben und somit für eine Art Immunsuppression der Tumoren sorgen und damit das Tumorwachstum unterstützen. Wundheilung und Angiogenese sind weitere Funktionen von M2-Makrophagen (Mantovani et al., 2002; Solinas et al., 2009). M1-Makrophagen sezernieren Tumornekrose-Faktor (TNF), IL-1 $\beta$ , IL-12 und weitere. M2-Makrophagen sezernieren in hohem Ausmaß IL-10 und weniger ausgeprägt IL-12.

HLA-DR (human leucocyte antigen) ist ein Oberflächenantigen der MHC-II-Klasse (major histocompatibility complex), das von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird, z.B. von Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen. Das HLA-System steht für das humane Leukozyten-Antigen-System. MHC-II-Komplexe besitzen zwei Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ), die in der Zellmembran verankert sind. Sie besitzen vier extrazelluläre Anteile ( $\alpha$ 1/2 und  $\beta$ 1/2), die schließlich das Antigen präsentieren. V.a. von fremden Zellen aufgenommene Antigene werden nach Spaltung in Peptide an HLA-DR gebunden und so den T-Lymphozyten für die weitere Immunantwort an der Oberfläche präsentiert; der T-Zell-Rezeptor auf den T-Zellen erkennt und bindet schließlich das präsentierte fremde Peptidantigen und führt so zu einer Aktivierung (Reith et al., 1995; Mach et al., 1995; Löffler/Petrides, 2014).

Marwitz et al. zeigten 1988, dass bei mononukleären Zellen von Neugeborenen die HLA-DR-Expression signifikant höher ist als bei Erwachsenen.

Die HLA-DR-Expression ist bei schwerer akuter Erkrankung (z.B. Sepsis) bei Kindern signifikant erniedrigt, wobei die Anzahl der Monozyten im Vergleich zu gesunden Kindern erhöht ist (Boeddha et al., 2018). Genel et al. zeigten 2010,

dass eine erniedrigte HLA-DR-Expression von Monozyten bei einer neonatalen Sepsis mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko einhergeht.

Perry et al. postulierten 2003 jedoch, dass HLA-DR kein guter Prognosemarker für das Outcome von Patienten mit schwerer Sepsis sei; ihre Ergebnisse wiesen keinen Zusammenhang einer niedrigen HLA-DR-Expression von Monozyten mit einer erhöhten Mortalität bei Erwachsenen nach. 2004 kamen Le Tulzo et al. jedoch in einer Vergleichsstudie zu dem Erkenntnis, dass eine verminderte HLA-DR-Expression auf Monozyten mit einer erhöhten Rate an Sekundärinfektionen und erhöhter Mortalität einhergeht. Hieraus wurde geschlossen, dass eine erniedrigte HLA-DR-Expression auf Monozyten mit einem schlechten Outcome bei einer Sepsis verbunden ist und es wurde vermutet, dass hohe endogene Cortisolspiegel die HLA-DR-Expression durch eine erniedrigte Klasse II-Transaktivator A (CIITA)-Transkription vermindern.

Die Expression des Oberflächenantigens CD80, dem sogenannten Lymphozyten-Aktivierungsantigen, erfolgt nach Aktivierung auf antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen oder dendritischen Zellen. CD80 ist ein Co-Stimulator für die Aktivierung von T-Zellen über die Bindung an CD28; über die Bindung an CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) wird eine Inaktivierung der T-Zellen induziert (Hathcock et al., 1994). CD80 wird nicht von frisch isolierten humanen Monozyten exprimiert; durch LPS wird die Expression von CD80 initiiert und weniger ausgeprägt auch von IFN- $\gamma$  (Schmittel et al., 1995). CD86 ist ein Oberflächenantigen, das von aktivierten B-Zellen und Monozyten exprimiert wird und als Co-Stimulator für die T-Zell-Aktivierung fungiert. Die Expression von CD86 wird durch LPS stimuliert (Lenschow et al., 1993).

Wie bei CD80 läuft über die Bindung an CD28 eine Aktivierung von T-Zellen ab und über CTLA-4 eine Inaktivierung der T-Zellen. Die Aktivierung der T-Zellen läuft über einen dualen Weg: das über MHC-II-Moleküle präsentierte Antigen auf der antigenpräsentierenden Zelle interagiert mit dem T-Zell-Rezeptor der T-Zelle und auf derselben antigenpräsentierenden Zelle interagiert CD86 (CD80) mit CD28 der T-Zelle (Murphy and Weaver, 2017; Coyle et al., 2001; Gause et al., 1995).

In den folgenden Versuchsreihen wurden neben CD14 die Oberflächenmarker HLA-DR, CD80, CD86, CD28, CD25 und CD 4 untersucht.

Vorwiegend M1-Makrophagen exprimieren CD80; CD86 wird sowohl von M1-Makrophagen als auch von M2b-Makrophagen exprimiert.

## **1.3 Der Lymphozyt**

### **1.3.1 Entstehung des Lymphozyten**

Lymphozyten differenzieren aus den Knochenmarksstammzellen zu 3 Subtypen: den B-Lymphozyten, den T-Lymphozyten und den natürlichen Killerzellen (NK). B- und T-Lymphozyten gehören zum System der spezifischen Immunantwort, indem sie mit ihren B- und T-Zell-Rezeptoren spezifische Antigene erkennen und bekämpfen können.

B-Lymphozyten reifen größtenteils im Knochenmark zu selbsttoleranten naiven B-Lymphozyten, wandern dann ins periphere Blut und schließlich in die sekundären lymphatischen Organe (Milz, Lymphknoten, Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT)). Dort geschieht die Aktivierung zu B-Effektorzellen, also reifen Plasmazellen, die wiederum die spezifischen Immunglobuline (Ig) produzieren (zuerst IgM, dann daraus durch den sogenannten Isotypenswitch IgD, IgE, IgG und IgA).

T-Lymphozyten reifen im Thymus und werden in CD4+-T-Helferzellen und CD8+ zytotoxische Zellen unterteilt (schematische Darstellung in *Abbildung 4*).

Während der Reifung im Thymus wandern die Lymphozyten von der Thymusrinde in das Thymusmark. Hierbei entstehen über verschiedene Stadien die Oberflächenmarker CD4 und CD8 sowie die T-Zell-Rezeptoren. Diese haben die Funktion, Antigene zu erkennen. Es sind sogenannte selbsttolerante Zellen und sie verhindern eine autoimmune Reaktion. Dieser Reifeprozess unterliegt einer strengen Autoregulation, was zu einem apoptotischen Absterben von 98% der noch unreifen T-Lymphozyten führt. Die verbleibenden 2% besitzen schließlich die CD4- oder CD8-Oberflächenmarker sowie die Fähigkeit zur Selbsttoleranz.

Nach der Reifung wandern sie in das periphere Blut sowie die sekundären lymphatischen Organe (Milz, Lymphknoten, MALT), um von dort aus ihren weiteren Aufgaben nachgehen zu können.

Zum Zwecke der klonalen Expansion der aktivierten T-Lymphozyten und somit einer adäquaten Immunantwort werden Chemokine benötigt (z.B. IL-2).

CD28 ist ein Oberflächenantigen der T-Zellen und ist an der Aktivierung von T-Zellen über die Bindung mit CD80 und CD86 der antigenpräsentierenden Zelle beteiligt. CD4 als Co-Rezeptor des TCR dient der Antigenerkennung durch den TCR. CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten werden als T-Helferzellen bezeichnet. CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>-Zellen, sogenannte regulatorische T-Zellen (Treg), verhindern eine Aktivierung des Immunsystems und produzieren die Zytokine IL-4, IL-10 und TGF-β.

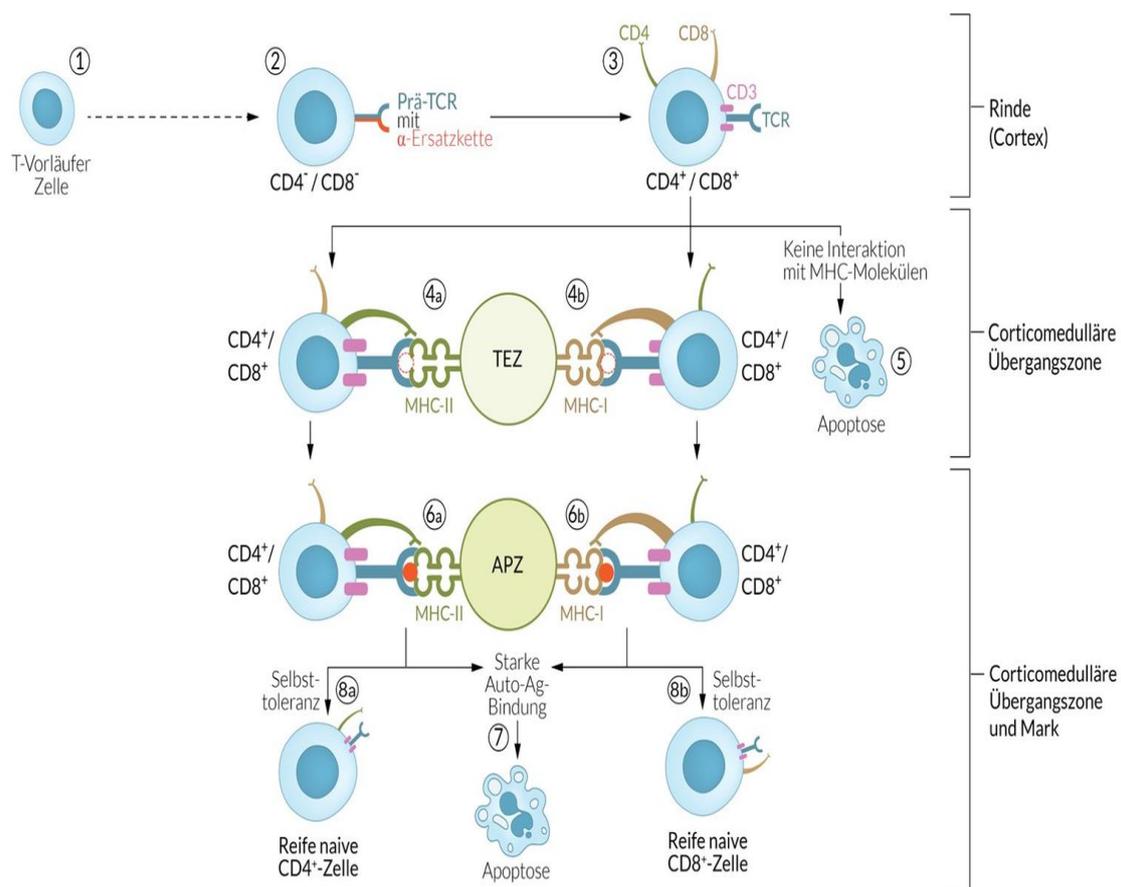
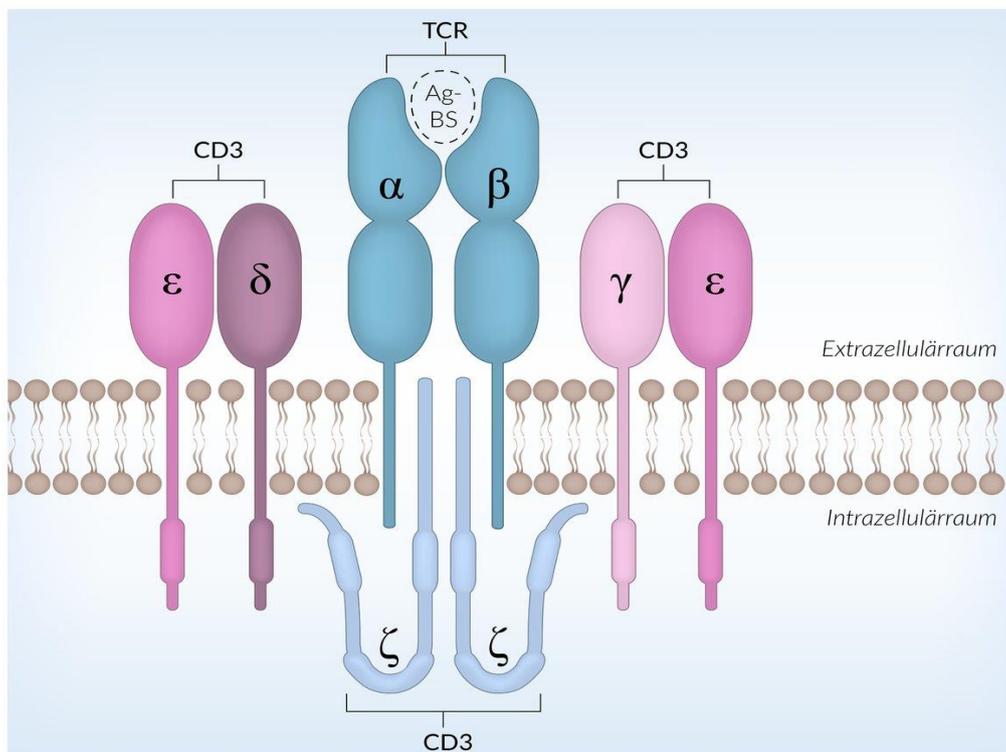


Abbildung 4: Reifung der T-Lymphozyten im Thymus  
 (Quelle: ©Amboss GmbH, Berlin und Köln, Germany;  
[https://www.amboss.com/de/wissen/Spezifisches\\_Immunsystem/](https://www.amboss.com/de/wissen/Spezifisches_Immunsystem/); 18.3.2019)

### 1.3.2 Phänotypisierung des Lymphozyten

T-Lymphozyten tragen als typischen Oberflächenmarker CD3; zusätzlich besitzen sie entweder CD4 oder CD8 als weiteres Oberflächenprotein.

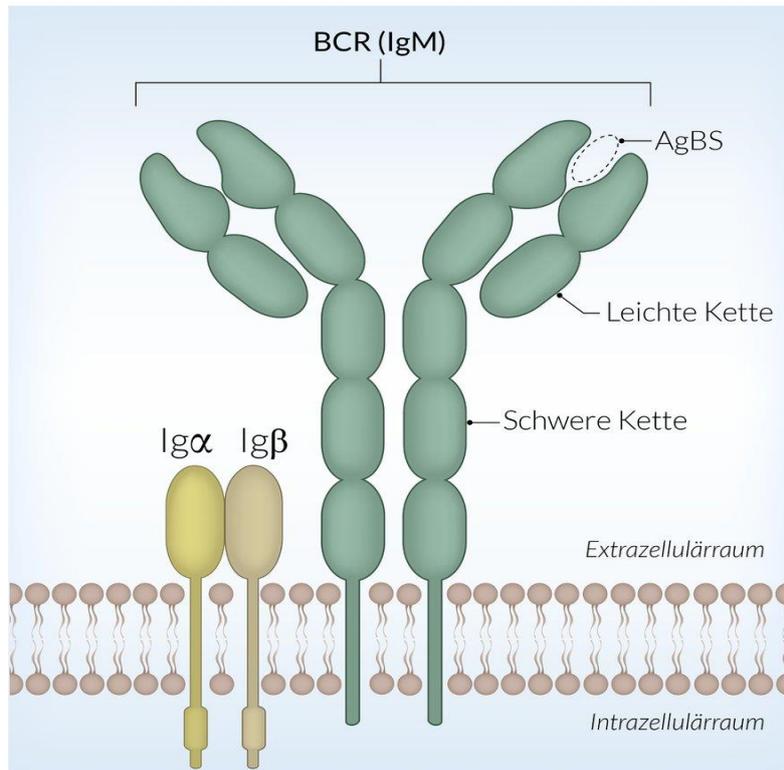
Der T-Zell-Rezeptor (TCR) ist ein membranständiges Immunglobulin an der Oberfläche der T-Lymphozyten mit einer heterodimeren Struktur von zwei unterschiedlichen Ketten (*Abbildung 5*). Der TCR besteht zu 95% aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette (bei 5% der Zellen aus einer  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette), die zusammen die Antigenbindungsstelle (AgBS) bilden. Der CD3-Komplex ist ein Co-Rezeptor, bildet mit dem TCR den TCR/CD3-Komplex und ist für die Signaltransduktion ins Zellinnere zuständig. Dieser ist im Aufbau variabel. Im experimentellen Setting ist CD28 ein geeigneter Oberflächenmarker, um T-Zellen zu identifizieren, siehe *Methodenteil*. Über CD4 werden T-Helferzellen bestimmt und CD4+/CD25+-Zellen kennzeichnen die Treg. Die Versuchsreihen für diese Arbeit untersuchten folgende Oberflächenantigene der T-Zellen: CD28, CD4 und CD25.



*Abbildung 5: Schematische Darstellung des TCR variabler Aufbau des CD3-Komplexes, hier exemplarisch die Heterodimere  $\epsilon\delta$  und  $\gamma\epsilon$  sowie das Homodimer  $\zeta\zeta$*

(Quelle: ©Amboss GmbH, Berlin und Köln, Germany;  
[https://www.amboss.com/de/wissen/Spezifisches\\_Immunsystem/](https://www.amboss.com/de/wissen/Spezifisches_Immunsystem/); 18.3.2019)

B-Lymphozyten sind charakterisiert durch CD20 als Oberflächenprotein. Der B-Zell-Rezeptor (BCR), ein Immunglobulin, befindet sich ebenfalls an der Oberfläche der B-Lymphozyten, ist membranständig und Y-förmig (*Abbildung 6*). Die beiden schweren Kette sind in der Zellmembran verankert, die leichten Ketten dienen der Antigenbindung. Die Ketten  $Ig\alpha$  und  $Ig\beta$  sorgen für die Signaltransduktion ins Zellinnere.



*Abbildung 6: Schematische Darstellung des BCR  
B-Zell-Rezeptor (BCR) am Beispiel des IgM  
(Quelle: ©Amboss GmbH, Berlin und Köln, Germany;  
[https://www.amboss.com/de/wissen/Spezifisches\\_Immunsystem/](https://www.amboss.com/de/wissen/Spezifisches_Immunsystem/); 18.3.2019)*

Die Expression von IgD und IgM auf der Zellmembran ist typisch für reife B-Lymphozyten.

### 1.3.3 Funktion und Aufgaben im Organismus

Die in den folgenden Versuchsreihen untersuchten T-Lymphozyten zirkulieren im peripheren Blut sowie in die sekundären lymphatischen Organe.

Wenn ihnen ein Antigen von einer antigenpräsentierenden Zelle (z.B. einer dendritischen Zelle) gezeigt wird, die das Antigen zuvor in der Peripherie aufgenommen hat, interagieren die CD4+-T-Helferzellen mit dem MHC II-Rezeptor der antigenpräsentierenden Zelle. Dadurch geschieht das Priming dieser zuvor naiven Zellen und die CD4+-T-Helferzellen entwickeln sich zu weiteren Subtypen mit unterschiedlicher Funktion: TH1- (Abwehr intrazellulärer Pathogene), TH2- (Abwehr extrazellulärer Pathogene, v.a. Parasiten/Helminthen), TH17- (Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze), T<sub>H</sub> und Treg-Zellen (Regulation von T-Zell-Subtypen, verhindern Autoimmunreaktionen) wie in *Abbildung 7* vereinfacht dargestellt.

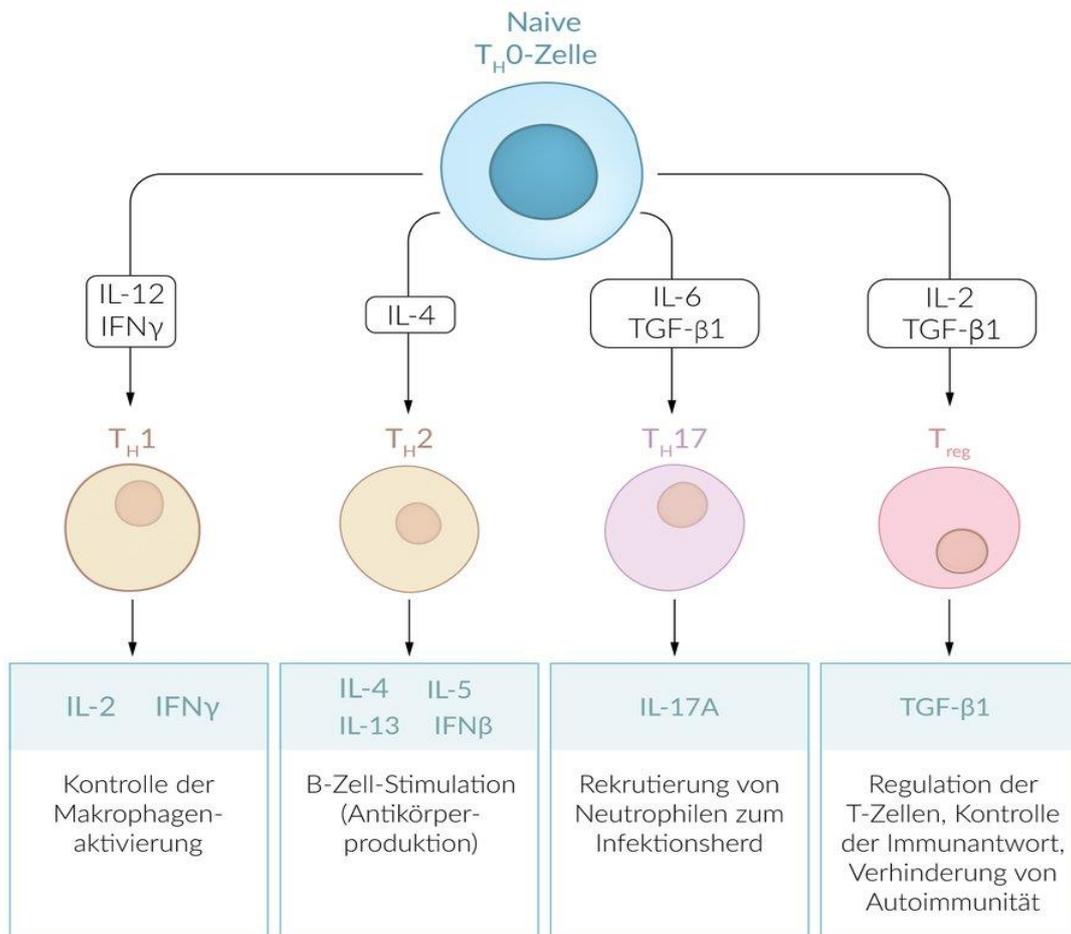
T-Helferzellen produzieren auch verschiedene Zytokine je nach Unterart und tragen somit zum Priming weiterer naiver CD4+-T-Zellen bei.

Die TH1-Zellen haben als Hauptaufgabe die Abwehr intrazellulärer Pathogene und produzieren IFN- $\gamma$  und IL-2. Sie wirken auf B-Lymphozyten, indem sie die Antikörperproduktion von opsonierenden IgG-Antikörpern anregen. Sie unterstützen Makrophagen, indem sie die antimikrobielle Fähigkeit verstärken, um somit intrazelluläre Pathogene zu eliminieren. Sie haben zudem einen Einfluss auf natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Zellen, wodurch die Lyse bzw. Apoptose infizierter Zellen induziert wird.

Die TH2-Zellen kümmern sich um die Abwehr extrazellulärer Pathogene, v.a. von Parasiten bzw. Helminthen. Sie sezernieren IL-4, -5 und -13.

Sie regen die Antikörperproduktion der B-Lymphozyten von IgE-Antikörpern an, welche einen antiparasitären Effekt besitzen. Zudem interagieren sie mit Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen.

Eine weitere Subgruppe der T-Zellen sind die T-Gedächtniszellen. Sie zirkulieren im peripheren Blut und kommen auch in den sekundären lymphatischen Organen sowie in anderen Organen vor. Ihre Funktion ist die eines immunologischen Gedächtnisses zur Wiedererkennung dadurch schnelleren Reaktion auf ein bereits bekanntes Antigen.



*Abbildung 7: Differenzierung naiver T-Zellen zu T-Effektorzellen  
 (Quelle: ©Amboss GmbH, Berlin und Köln, Germany;  
[https://www.amboss.com/de/wissen/Spezifisches\\_Immunsystem/](https://www.amboss.com/de/wissen/Spezifisches_Immunsystem/); 18.3.2019)*

CD8+-Effektorzellen interagieren mit den MHC I-Rezeptoren der antigenpräsentierenden Zelle. Sie wirken zytotoxisch, indem sie die Apoptose durch einen Virus infizierter Zellen oder entarteter Zellen einleiten. Sie setzen zytotoxische Proteine frei (Perforine; diese bilden Poren in den Zielzellen) und Enzyme (Granzyme; diese gelangen durch die neu entstandenen Poren in das Zellinnere und lösen dort die Apoptose aus). Oder sie aktivieren direkt den Fas-Rezeptor, auch als Todesrezeptor bekannt; über diesen extrinsischen Weg werden Caspasen aktiviert und somit die Apoptose eingeleitet.

Mononukleäre Zellen und T-Lymphozyten beeinflussen sich gegenseitig. Makrophagen als antigenpräsentierende Zellen aus der monozytären Zelllinie präsentieren den T-Lymphozyten Teile eines zuvor phagozytierten Erregers über den MHC II-Rezeptor. Das Antigen wird durch den TCR erkannt.

B-Lymphozyten wandern zwischen peripherem Blut und den sekundären lymphatischen Organen. Sie können Antigene selbst über ihren BCR erkennen, nehmen diese auf und präsentieren sie über ihren eigenen MHC II-Rezeptor oder sie interagieren mit dem MHC II-Rezeptor der antigenpräsentierenden Zelle.

Im Rahmen der primären Immunantwort im lymphatischen Organ wandern sie aus dem Zentrum des Primärfollikels an die Marginalzone, um dort Kontakt mit einem aktivierten T-Lymphozyten aufzubauen, der zum präsentierten Antigen passt. Ein Teil der aktivierten B-Lymphozyten bildet den sogenannten Primärfokus. Dadurch entstehen Plasmablasten, die IgM produzieren, jedoch nach einiger Zeit absterben. Der andere Teil der B-Lymphozyten wandert zusammen mit der entsprechend passenden T-Zelle ins Zentrum des Primärfollikels, um dort ein sogenanntes Keimzentrum zu bilden. Hier werden dann Plasmazellen gebildet, die die spezifischen Immunglobuline für das Antigen produzieren. Zudem werden B-Gedächtniszellen gebildet, um für die sekundäre Immunantwort bei erneuter Präsentation des spezifischen Antigens schnell eine Immunantwort zu induzieren. Diese B-Gedächtniszellen finden sich vor allem in der Milz und in den Lymphknoten.

#### **1.4 OKT3 und seine Effekte auf Lymphozyten**

OKT3 ist ein monoklonaler Antikörper gegen die Epsilon-Kette des humanen CD3-Komplexes, der sich als Transmembranprotein auf T-Lymphozyten befindet. Muromonab-CD3 (OKT3) war der erste zugelassene therapeutische monoklonale Antikörper. Der CD3-Komplex besteht insgesamt aus 4 Polypeptidketten (eine Gamma- und Delta-Untereinheit und zwei Epsilon-Ketten), welche für den TCR von Bedeutung sind; die Gene, die für diese Untereinheiten kodieren, befinden sich auf Chromosom 11. Zusammen mit dem TCR bildet CD3 den TCR-CD3-Komplex (Terhorst et al., 1996). Die Bindung

eines von der antigenpräsentierenden Zelle gezeigten MHC-Antigens an diesen TCR-CD3-Komplex führt über eine zusätzliche Costimulation (z.B. CD28 (dem induzierbaren T-Zell-Costimulator (Icos) und dem Icos-Liganden) zu einer Signaltransduktion ins Zellinnere des T-Lymphozyten, was wiederum zu einer Phosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils des CD3-Komplexes führt (Hutloff et al., 1997). Dadurch wird das Protein ZAP-70 aktiviert und dies ist wieder Ausgangspunkt für Signalkaskaden zur Aktivierung von CD8-Effektorzellen oder für die Produktion von Zytokinen.

CD3 wird von Thymozyten sowie von allen reifen T-Zellen exprimiert.

OKT3 hat eine ausgeprägte immunsuppressive Wirkung und wird daher nach einer Herz-, Leber- oder Nierentransplantation als therapeutischer Ansatz bei einer akuten, steroidresistenten Abstoßungsreaktion eingesetzt.

OKT3 induziert die DNA-Synthese in Kulturen von humanen peripheren Lymphozyten (Van Waave et al., 1984). Anti-CD3-Ak werden auch zur Stimulation von T-Zellen benutzt. Dieser Effekt wird in einem Teil der Versuche genutzt.

### **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Pulmonale Infekte stellen in der Neonatologie ein großes Problem für das frühgeborene Kind dar mit einer Vielzahl an Begleitkomplikationen. Die unreife Lunge ist anfälliger für Infekte. Zudem ist die Abwehrfunktion noch nicht ausgereift, was das Risiko für schwere bronchopulmonale Infekte birgt mit möglicher Beatmungspflicht und hochdosierter Sauerstofftherapie. Die Entwicklung einer durch den pulmonalen Infekt getriggerten Sepsis ist eine gefürchtete Komplikation, zumal diese auch mit einer erhöhten Mortalität einhergeht. Eine Early-onset-Sepsis (innerhalb der ersten 3 Lebenstage auftretend) kommt in westlichen Ländern mit einer Inzidenz von 0,05 bis 0,12% aller lebend geborenen Kinder vor (Weston et al., 2011) und bei 1,5% aller Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von < 1500g (Wynn et al., 2013).

Eine Late-onset-Sepsis (ab dem 4. Lebenstag bzw. bei Infektionen mit B-Streptokokken ab dem 8. Lebenstag) tritt in westlichen Ländern bei etwa 0,62% aller Lebendgeborener auf (Didier et al., 2012).

Der Antrieb, diese experimentelle Arbeit zu initiieren, war es, einen kleinen Baustein für die Konzeption eines artifiziellen Surfactant beizutragen, der in Zukunft in vitro hergestellt werden kann und der alle benötigten Eigenschaften mitbringt, um das Outcome eines frühgeborenen Kindes von Seiten der Lungenreifung und der pulmonalen Abwehr optimal zu verbessern.

Zum einen sollte die Phagozytose-Kapazität der Alveolarmakrophagen maximal ausgelastet werden, um somit Infekte im besten Fall zu verhindern oder zumindest in ihrer Ausprägung abzuschwächen. Denn Phospholipide beeinflussen den Alveolarraum in vielfältiger Weise. Das in den folgenden experimentellen Settings verwendete Bakterium *Escherichia coli* ist der häufigste Keim einer Early-onset-Sepsis bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von < 1500g (Hornik et al., 2012; Stoll et al., 2011; Zaidi et al., 1995).

Zum anderen war das Ziel, den Phänotyp dieser Makrophagen in vitro durch Surfactant-Bestandteile so zu verändern, dass eine modulierte Expression von Oberflächenmarkern ebenfalls die Abwehrfunktion der Lunge positiv beeinflusst und neonatale pulmonale Infekte somit minimiert werden können.

Die Untersuchung der Effekte der einzelnen Surfactant-Bestandteile (PC sowie einzelne FS) zum einen auf periphere Monozyten, die aus Nabelschnurblut isoliert wurden, und zum anderen auf periphere Monozyten aus Blut von gesunden Erwachsenen sollte zum einen Aufschluss auf eine mögliche Veränderung der Phagozytose-Kapazität bzw. des Phagozytose-Index geben je nach angewandtem PC oder FS. Zum anderen wurde nach Inkubation mit den Lipiden die Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern analysiert (z.B. CD14, CD86, CD80, HLA-DR, CD4, CD25 und CD28). Als weiteren Vergleich wurde sowohl im Phagozytose-Ansatz als auch in der Phänotyp-Analyse das in der Klinik verwendete Surfactant-Präparat Curosurf® verwendet und die Monozyten auch hiermit inkubiert.

Die Hypothese ist, dass die jeweiligen PC und FS einen unterschiedlichen Effekt auf die Phagozytose-Kapazität bzw. den Phagozytose-Index und den Phänotyp

(bzw. die Expression von Oberflächenmarkern) bzw. die T-Zell-Proliferation haben. Unter dieser Vorstellung wäre eine in vitro-Herstellung eines Surfactant mit entsprechend höher dosiertem Anteil von PC oder FS, die einen positiven Effekt auf die Phagozytose und auf die Expression von immunologisch bedeutsamen Oberflächenmarkern haben, ein Therapieansatz, der in Zukunft die Entwicklung von pulmonalen Infekten der Frühgeborenen positiv beeinflussen könnte.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Curosurf®	Nycomed (Unterschleißheim, D)
PC16:0/16:0	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, Vereinigte Staaten von Amerika)
PC16:0/16:1	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, Vereinigte Staaten von Amerika)
PC16:0/14:0	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, Vereinigte Staaten von Amerika)
PC14:0/16:0	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, Vereinigte Staaten von Amerika)
PC16:0/18:1	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, Vereinigte Staaten von Amerika)
freie FS C18:1	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, Vereinigte Staaten von Amerika)
freie FS C16:1	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, Vereinigte Staaten von Amerika)
freie FS C16:0	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, Vereinigte Staaten von Amerika)
freie FS C14:0	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, Vereinigte Staaten von Amerika)
Propidiumjodid	Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, Vereinigte Staaten von Amerika)
Heparin-Natrium	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
IPTG	Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, Vereinigte Staaten von Amerika)

Kanamycin	Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, Vereinigte Staaten von Amerika)
Polyglobin 10%	Bayer (Leverkusen, D)
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, Vereinigte Staaten von Amerika)
Lissamin-DHPE	Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR, Vereinigte Staaten von Amerika)
Monocyte Isolation Kit II	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Vybrant CFDA-SE	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, Vereinigte Staaten von Amerika)
Cell Tracer Kit	Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR, Vereinigte Staaten von Amerika)

### **2.1.2 Antikörper**

Anti-CD14 Antikörper	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Anti-CD3 Antikörper (OKT3)	Ortho Diagnostics (Raritan, NJ, Vereinigte Staaten von Amerika)
Anti-CD4 Antikörper	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Anti-CD14 Antikörper	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Anti-CD25 Antikörper	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Anti-CD28 Antikörper	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Anti-CD80 Antikörper	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Anti-CD86 Antikörper	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Anti-HLA-DR Antikörper	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Anti-IgG1 Kontrolle	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Anti-IgG2 Kontrolle	BD Biosciences (Heidelberg, D)

### 2.1.3 Bakterien

Escherichia coli (DH5α GFP-mute2 Plasmid pCD353)

### 2.1.4 Medien und Puffer

Fötiales Kälberserum (FCS)      Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, Vereinigte Staaten von Amerika)

Histopaque      Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, Vereinigte Staaten von Amerika)

Luminol      Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, Vereinigte Staaten von Amerika)

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung,

PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>      Biochrom AG (Berlin, D)

RPMI-Medium      Biochrom AG (Berlin, D)

Biocoll (Density 1.077g/ml)      Biochrom AG (Berlin, D)

FACS-Flow      Becton-Dickinson (Heidelberg, D)

Lennox L Broth Medium      Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, Vereinigte Staaten von Amerika)

### 2.1.5 Geräte

Brutschrank      Heraeus GmbH (Hanau, D)

Zentrifuge      Eppendorf AG (Hamburg, D)

FACS-Gerät      Becton-Dickinson (Heidelberg, D)

Sysmex      Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, D)

Vortexer      Agitateur Top-Mix, Bioblock Scientific (Illkirch-Graffenstaden, F)

Schüttler	NeoLab Migge (Heidelberg, D)
Wasserbad	Köttermann (Uetze-Hänigsen, D)
Autoklave	Wesa AG (Eupen, Belgien)
Sterilbank HeraSafe	Heraeus GmbH (Hanau, D)
Ultraschallbad Transsonic 420	Elma GmbH (Singen, D)
24-/48-Well Platte	Costar (Bodenheim, D)
FACS-Röhrchen	Becton-Dickinson (Heidelberg, D)
50ml Spritzen	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Butterfly-Nadeln	Becton-Dickinson (Heidelberg, D)
50ml konische Röhrchen	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Ö)
Verschiedene Pipettenspitzen	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Ö)

### **2.1.6 Untersuchungsmaterial**

Zur Präparierung peripherer mononukleärer Blutzellen („peripheral blood mononuclear cells“, PBMC) wurde Vollblut von Erwachsenen und reifen Neugeborenen benutzt. Die untersuchten Vollblutproben stammten zum einen von zufällig akquirierten, gesunden Erwachsenen (PB) und zum anderen von ebenfalls zufällig ausgewähltem Nabelschnurblut (NSB). Die Blutentnahme bei Erwachsenen sowie aus der Nabelschnur wurde mit einer sterilen Butterfly-Nadel und einer 50ml-Spritze durchgeführt.

Das Studienprotokoll wurde durch das Ethikkomitee der Universität Tübingen genehmigt (Ethikvotum 248/2005A). Die PBMC wurden aus peripherem Vollblut mittels einer Biocoll-Trennlösung und einer Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert (siehe 2.2.2).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Isolierung von Monozyten aus Vollblut**

Die Isolierung der PBMC erfolgte mittels Biocoll-Trennlösung, indem eine Dichtegradienten-Zentrifugation angewendet wurde (Orlikowsky et al., 2005).

Hierbei werden die verschiedenen festen Bestandteile des Vollblutes mittels Zentrifugation anhand ihrer unterschiedlichen Dichtegrade getrennt und die Monozyten können so abpipettiert werden. Es wurde zunächst unter der Sterilbank 50ml Vollblut mit 200IE Heparin-Natrium versetzt und dann das Vollblut 1:1 mit PBS verdünnt. Jeweils 25ml des verdünnten Vollblut-PSB-Gemisches wurden dann in ein konisches 50ml-Röhrchen auf jeweils 15ml Biocoll-Trennlösung mit einer hohen Dichte von 1,077g/ml verteilt und dann bei 400 x g bei 18°C für 25 Minuten zentrifugiert. Durch die dann entstandene Schichtung konnte das zuoberst liegende Plasma inklusive der Thrombozyten mit einer 10ml-Pipette abpipettiert werden. Die darunter liegende dünne Schicht, die sogenannte Interphase, aus den peripheren mononukleären Zellen und Lymphozyten lag direkt auf der Biocoll-Schicht und konnte abpipettiert und weiterverwendet werden. Am Boden der 50ml-Röhrchen befand sich eine Schicht aus Erythrozyten und Granulozyten, die ebenfalls verworfen wurde.

Die Zellen der Interphase wurden auf 50ml mit kalter Phosphat-gepufferter isotonomischer Kochsalzlösung (PBS ohne Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup>) plus 5% hitzeinaktiviertem fötalem bovinem Serum (FCS) verdünnt, in ein 50ml-Röhrchen überführt und wieder bei 500 x g bei 4°C über 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet am Konus des Röhrchens aufgerüttelt und die Waschung in PBS plus 5% FCS wiederholt. Dann wurde mit 400 x g bei 4°C über 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand wieder verworfen, das Zellpellet aufgerüttelt und in 10-20ml des Mediums VLE-RPMI 1640 mit 10% FCS resuspendiert. Die Zellzahl wurde im Sysmex bestimmt.

Die gewonnenen Zellen wurden dann zu jeweils 500µl pro Vertiefung in eine 48-Well-Zellkulturplatte aufgeteilt zu je 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml. Sie wurden dann in einem Brutschrank bei 37°C über 24 Stunden und einer halbfeuchten Atmosphäre mit 5% CO<sup>2</sup> mit den Surfactant-Bestandteilen inkubiert.

Die Reinheit der entstandenen Zellpopulation lag bei > 92% CD14+-Zellen, wie mittels FACS-Analyse nachgewiesen wurde. Hierzu wurde der Inhalt einer Zelle mit 500µl mit FACS-Flow gewaschen und mit dem fluoreszierenden Antikörper CD14 inkubiert (siehe Abschnitt 2.2.4). Anschließend folgte die Messung im FACS-Gerät.

## **2.2.2 Phosphatidylcholinpräparation und Inkubation mit Lipiden**

Die PC-Spezies PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0 (Myristoyl-Palmitoyl-PC), PC16:0/18:1 sowie die freien FS C18:1, C16:1, C16:0 und C14:0 wurden als Fertigpräparate des Herstellers verwendet.

Die PC-Spezies wurden zudem durch das Forschungsteam Neonatologie nach der Lipidextraktionsmethode (Bligh und Dyer, 1959) mittels Chloroform-Methanol-Gemisch extrahiert, die lipidhaltige organische Phase eingedampft, in PBS resuspendiert und nach einer Konzentrationsbestimmung (nach Barlett, 1959) für die folgenden Versuche zur Verfügung gestellt.

Anschließend wurde eine Reinheitsprüfung mittels einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) (beschrieben in Bernhard et al., 2001) durchgeführt.

Mittels elektrischem Vortexer über 3 Minuten mit Hilfe von sterilen Glaskügelchen und anschließender Ultraschall-Homogenisierung wurde das getrocknete Substrat in PBS über ihrer spezifischen Sol-Gel-Übergangstemperatur wieder aufgelöst (Raumtemperatur: PC16:0/14:0 und PC16:0/18:1, 45°C: PC16:0/16:0). Nach Überprüfung der Phospholipidkonzentrationen (Barlett, 1959) wurden diese einheitlich auf eine Konzentration von 11µmol/ml in dem Medium PBS verdünnt. Die Phospholipidkonzentration von Curosurf® wurde ebenfalls ermittelt und auf 11µmol/ml angepasst.

Aufbewahrt in 100µl-Portionen bei einer Lagerung von -70°C wurden die Suspensionen vor dem erneuten Gebrauch wieder auf eine Temperatur von 37°C erwärmt und mit einer Drehzahl von 1400 rpm im Thermomixer über eine Minute vermischt.

Die Suspensionen wurden in einer endgültigen Konzentration von 1µmol/ml in 1ml des Kulturmediums verwendet. Hierzu wurden die Surfactant-Bestandteile in eine 24-Well Platte gegeben mit einer Endkonzentration von 1µmol/ml. Dann wurden die PBMC mit einer Konzentration von  $2 \times 10^6$ /ml ebenfalls in die 24-Well Platte gegeben zu je 100µl pro Well. Es folgte die Inkubation bei 37°C im Inkubator in einer halbfeuchten Atmosphäre mit 5% CO<sup>2</sup> über 24 Stunden.

### **2.2.3 Bakterien**

Es wurde *Escherichia coli* DH5α vermehrt. Dies ist ein Bakterium, welches das für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodierende Plasmid pCD353 (*E. coli*-GFP) enthält, das eine prokaryotische Variante des GFP unter Kontrolle eines Laktatpromoters exprimiert (Dehio et al., 1998).

Die Bakterienkultur wurde zur GFP-Induktion auf Agarplatten gezüchtet, die mit Kanamycin (30µg/ml) und Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranosid (IPTG) (100mM) versetzt worden waren. Hierzu wurden wenige Bakterien mit einer Impföse aus dem -70°C-Glycerol-Stock entnommen und in einem 50ml Röhrchen in 5ml Lennox L Broth Medium mit 30µl Kanamycin aus dem Vorrat und 50µl IPTG aus dem Vorrat angeimpft.

Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttelgerät wurden 100µl der Kultur in 5ml neues Lennox L Broth Medium überführt und nach 2 Stunden gemessen. Die Bakterien sollten sich in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden. 100µl des Lennox L Broth Mediums wurden in eine Küvette überführt und der OD (optical density) -Leerwert bestimmt. 100µl der *E. coli*-Probe wurden bei einer OD<sub>600</sub> mit 10mm-Strahlengang gemessen. Bei einer OD<sub>600</sub> > 0,4 (frühe logarithmische Wachstumsphase = OD<sub>600</sub> 0.4–0.5) wurde der Bakterienansatz auf Eis gestellt und die Bakterienanzahl errechnet. Die Bakterien wurden anschließend gewaschen, in PBS resuspendiert und umgehend weiterverarbeitet (Gille et al., 2006).

#### **2.2.4 Inkubation der vorinkubierten Monozyten mit E. coli**

Die Zellkulturen wurden mit dem Ziel einer Multiplicity of Infection (MOI) von 1:50 mit E. coli-GFP bei einer Temperatur von 37°C in 5%igem CO<sup>2</sup> für 45 Minuten beimpft. Danach wurden die Zellen resuspendiert. Um nicht resorbierte bzw. phagozytierte E. coli zu entfernen, wurde der Ansatz auf ein Kissen aus 1,5ml inaktiviertem FCS in ein FACS-Röhrchen gegeben. Dann folgte die Zentrifugation bei 200 x g und 4°C über 5 Minuten. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet am Boden des Röhrchens aufgerüttelt und 100µl 2%iges Paraformaldehyd (PFA) zugegeben und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Dann wurde mit FACS-Flow bis zur Hälfte des Röhrchens aufgefüllt, bei 200 x g und 4°C 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Zellpellet aufgerüttelt und dann der CD14-Ak zugegeben (Gille et al., 2006).

#### **2.2.5 Zugabe von Polyglobin**

Polyvalentes IgG (Polyglobin 10%) wurde der Hälfte der einzelnen Proben zeitgleich mit den Bakterien zu den Zellkulturen auf eine Endkonzentration von 1mg/ml zugegeben und bei einer Temperatur von 37°C in 5%igem CO<sup>2</sup> im Inkubator für 45 Minuten inkubiert und in 20µl PBS resuspendiert.

#### **2.2.6 Auswaschen der Lipide und Bakterien**

Bevor eine Analyse der Zellen im FACS-Gerät stattfinden kann, ist eine Reinigung der Zellsuspension von den Surfactant-Bestandteilen notwendig, da sonst die Autofluoreszenz die Messung beeinflussen und stören würde. Daher wurden die inkubierten Monozyten im Anschluss gewaschen und in FACS-Röhrchen mit jeweils 2ml Histopaque-PBS-Kissen in einem Verhältnis von 1:2 gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 400 x g und bei einer Temperatur von 4°C über 10 Minuten ohne Bremse. Die Surfactant-Bande wurde mit einer blauen Pipettenspitze abgezogen, der Überstand verworfen und danach wurde das Zellpellet wiederholt gewaschen und in 100µl PBS gegeben.

Durch die Durchflusszytometrie konnte bestätigt werden, dass die Zellkultur keine freien Bakterien oder extrazellulären Surfactant-Komplexe enthielt.

Die Zellen wurden in 2%iges PFA bei Raumtemperatur für 10 Minuten gegeben, anschließend wieder gewaschen und gefärbt.

### **2.2.7 Inkubation mit Antikörpern**

Die Zellproben (jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in 100 $\mu$ l PBS resuspendiert) wurden nach Ablauf der 48 Stunden zweimalig mit PBS gewaschen und jeweils mit den fluoreszenzmarkierten Ak Anti-CD14, Anti-HLA-DR, Anti-CD86-, Anti-CD4-, Anti-CD28-Ak bzw. den AK-Kombinationen Anti-CD80/Anti-CD86 und Anti-CD4/Anti-CD25 oder der isotypen-spezifischen Kontrolle (titriert mit einer Verdünnung von 1:20 bis 1:100, entsprechend 3-5 $\mu$ l des jeweiligen Ak) für 20 Minuten im Dunkeln auf Eis oder im Kühlschrank inkubiert und wieder mit FACS-Flow gewaschen (eiskaltes FACS-Flow bis zur Hälfte des Röhrchens auffüllen, 5-minütige Zentrifugation bei 200 x g und 4°C). Der Überstand wurde wieder dekantiert und das Zellpellet am Boden des Röhrchens aufgerüttelt. Dann folgte die Messung mit dem FACS-Gerät.

### **2.2.8 Inkubation der Lymphozyten mit OKT 3**

Zur Bewertung der T-Zell-Proliferation wurde das Vybrant CFDA-SE Cell Tracer Kit verwendet.

Zunächst erfolgte wie oben beschrieben die Inkubation mit den Surfactant-Bestandteilen über 24 Stunden. Anschließend wurden die Surfactant-Bestandteile wieder ausgewaschen mittels einem Histopaque-PBS-Kissen in einem Verhältnis von 1:2. Die Surfactant-Bande wurde abgezogen, der Überstand wurde dekantiert und das Pellet erneut zweimal gewaschen.

Dann erfolgte die Inkubation mit dem murinen, monoklonalen CD3-Rezeptor-Antikörper OKT3 über 48 Stunden und schließlich die CFSE-Färbung. 10 $\mu$ l wurden aus dem OKT3-Stock (Konzentration des Stocks  $c_{\text{stock}} = 500\mu\text{g/ml}$ ) auf 1ml Zellsuspension gegeben. Die Endkonzentration lag dann bei  $c_{\text{End}} = 5\mu\text{g/ml}$ .

Dieser Ansatz wurde bei 37°C im Brutschrank über 48 Stunden in einer halbfeuchten Atmosphäre mit 5%igem CO<sup>2</sup> inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder auf die Biocoll:PBS-Lösung gegeben und mit 400 x g bei Raumtemperatur ohne Bremse über 10 Minuten zentrifugiert.

OKT3 bindet an die Epsilon-Protein-Untereinheit des CD3-Rezeptors der T-Zellen, welcher nur auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten sowie Thymozyten und zerebellären Purkinje-Zellen zu finden ist. Der CD3-Rezeptor ist mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert und interagiert mit diesem bei der Signaltransduktion und der Aktivierung der T-Lymphozyten. Er wirkt somit als Proliferationsstimulus.

Zur CFSE-Färbung wurde 5-Carboxyfluoreszein-Diazetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE) benutzt (*Abbildung 8*). Dieses diffundiert passiv in das Zytoplasma und ist zunächst farblos sowie nicht-fluoreszent. Erst nach der Spaltung von zwei seiner Azetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen wird es zum fluoreszenten, Amin-reaktiven Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester (CFSE), kann dann die zytoplasmatische Membran nicht mehr passieren und bleibt dadurch intrazellulär eingeschlossen. Nebenprodukte sowie unkonjugierte Reagenzien diffundieren wieder passiv nach extrazellulär und werden bei der Waschung entfernt.

Während der Zellteilung kommt es zu einer gleichmäßigen Verteilung von CFSE an die neuen Zellen, die dann weniger fluoreszent sind als die Mutterzelle.

Die CFSE-Färbung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Molecular Probes): dazu wurde Reagens A (=500µg CFSE) in 90µl von Reagens B (DMSO=Dimethylsulfoxid) gelöst. Hieraus wurden 2µl in 98µl PBS auf eine Konzentration von 200µM verdünnt.

Aus dieser CFSE-Färbelösung wurden 25µl mit 1ml Zellsuspension (=2,5 x 10<sup>7</sup> PBMC) versetzt (Verhältnis Monozyten zu T-Zellen ca. 1:3), was zu einer CFSE-Endkonzentration von 5µM führte. Die PBMC-Aufbereitung wurde für diesen Versuchsansatz ohne FCS durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 9 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Färbung durch Zugabe von 6ml RPMI mit 10% FCS wieder gestoppt.

Es folgte nach 2 Minuten Wartezeit bei Raumtemperatur die Waschung mit 25ml PBS mit einer Zentrifugation bei 200 x g über 10 Minuten. Der Überstand wurde

dekantiert, das Zellpellet aufgerüttelt und mit RPMI mit 10% FCS auf eine Konzentration der Zellkulturen von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt. Dann wurden die Zellen auf eine 24-Well-Platte zu je 100µl pro Well verteilt, was dann 200 000 Zellen pro Well entsprach.

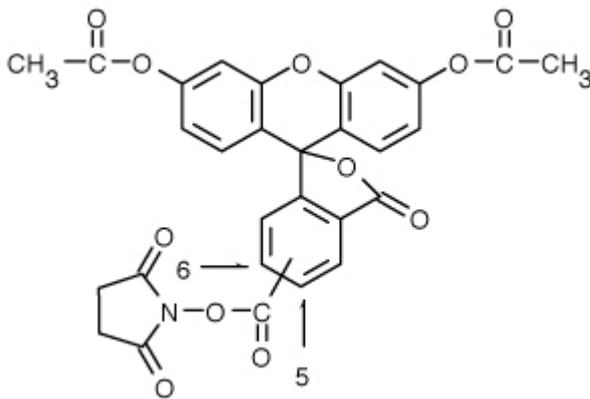


Abbildung 8: Chemische Struktur von CFDA-SE

Molekularformel:  $C_{29}H_{19}NO_{11}$ .

(Quelle: ThermoFisher Scientific,

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C1157>; 25.5.2019)

### 2.2.9 Vitalitätskontrolle der Monozyten mit FACS-Analyse

Die Vitalitätskontrolle der Zellen erfolgte zunächst über die Zugabe von Propidiumjodid (PJ) über 5 Minuten (5 mg/ml). Anschließend erfolgte die Bestimmung der PJ<sup>+</sup>- Zellen in der FACS-Analyse. Bei vitalen Zellen kann die Zellmembran nicht von PJ durchdrungen werden.

Apoptotische Zellen hingegen weisen Perforationen der Zellmembran auf, wodurch PJ diese passieren kann und sich in die Zellen bzw. die DNA einlagert.

### 2.2.10 FACS-Analyse der monozytären Phagozytose und Messung der Oberflächenrezeptoren von Monozyten/Lymphozyten

Die Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht es, Zellen anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und emittierter Fluoreszenzstrahlung zu charakterisieren (Abbildung 9). Phänotyp sowie

funktionelle Eigenschaften können durch intrazelluläre Moleküle bestimmt und die Zellpopulationen dadurch analysiert werden.

Nach Färbung der Zellen mit monoklonalen Antikörpern, die wiederum selbst oder über sekundäre Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe gebunden sind, werden die einzelnen Zellen einer Einzelzellsuspension nacheinander hydrodynamisch in eine Messkammer in einem Flüssigkeitsstrom gezogen und durch einen monochromatischen Laserstrahl angeleuchtet. Dadurch werden die Elektronen auf ein höheres Energieniveau gebracht. Nach Abgabe des Laserpulses gehen die Elektronen wieder in ihr ursprüngliches Energieniveau zurück und geben dabei die Energie in Form von Photonen ab.

Ein Photodetektor misst die Konzentration der emittierten Photonen, welche in einem proportionalen Verhältnis zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle steht.

Die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe haben jeweils ein für sie charakteristisches Emissionsspektrum. Dadurch können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe im FACS gleichzeitig gemessen werden.

Es werden spezifische, mit einem fluoreszierenden Molekül versehene Antikörper gegen das zu untersuchende Oberflächenantigen eingesetzt.

Auch die zu untersuchenden Zellen streuen das Licht des Laserstrahls. Dieses Streulicht wird gemessen. Zum einen ist dies das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter), welches das in einen kleinen Winkel zum Laserstrahl gestreute Licht misst. Somit kann eine Aussage über die Größe einer Zelle getroffen werden. Zum anderen wird das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) gemessen, welches das um 90° gestreute Licht des Laserstrahls misst und damit die Granularität und die Membranfaltung der Zelle charakterisiert.

Die Zellen werden in einer sogenannten Dot-Plot-Grafik gezeigt; dabei kodiert die X-Achse das FSC und die Y-Achse das SSC bzw. für die jeweiligen Oberflächenantigene, die bestimmt wurden.

Dadurch können verschiedene Zellgruppen sowie die phänotypischen und molekularen Eigenschaften voneinander unterschieden und analysiert werden.

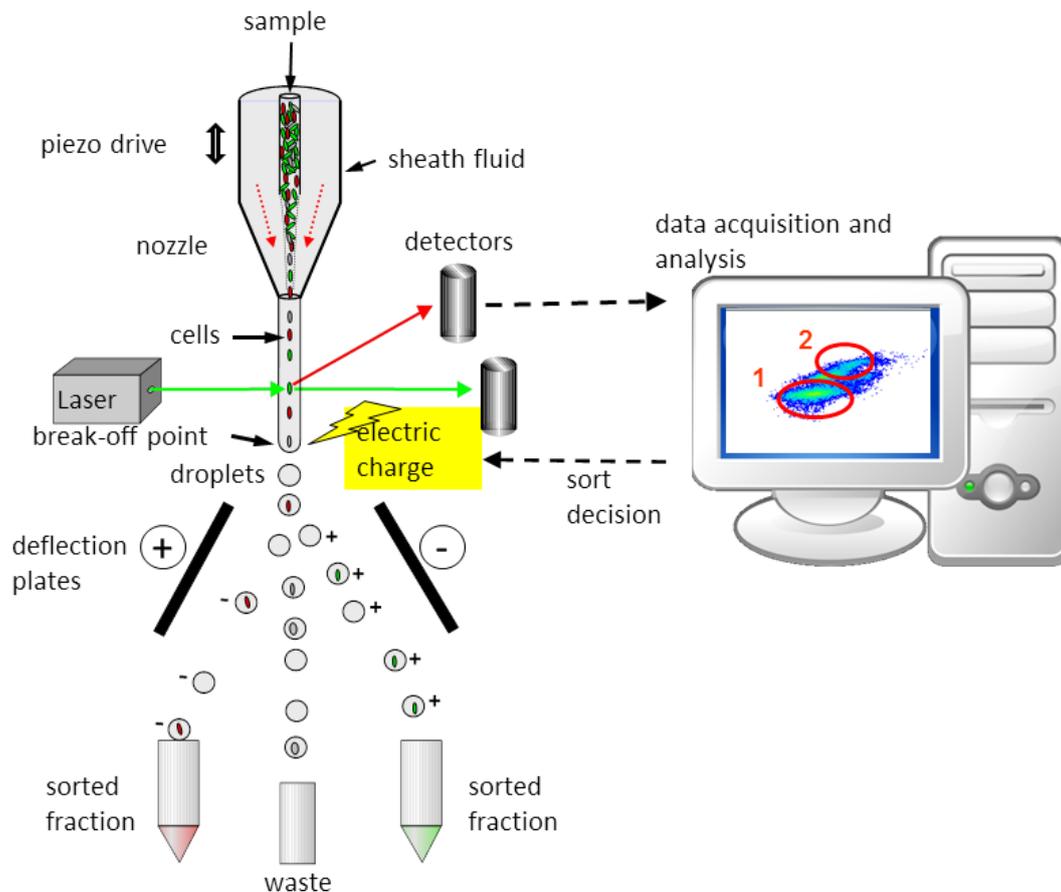


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)  
 (Quelle: ©B. Fuchs/Max Planck Institute for Marine Microbiology; <https://www.mpi-bremen.de/en/Flow-Cytometry.html>; 11.06.2019)

Mittels täglich neu kalibrierter FACS-Analyse wurden sowohl die Effekte auf den Phänotyp als auch die Phagozytose-Aktivität gemessen.

Die Zellkulturen wurden auch zur Phänotypen-Analyse gewaschen und über ein Histopaque-PBS-Kissen gegeben mit anschließender Zentrifugation bei  $400 \times g$  über 10 Minuten. Danach folgte erneut zweimaliges Waschen der Zellen und schließlich eine Resuspension in  $100\mu\text{l}$  PBS mit einer Endkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml. Durch die Durchflusszytometrie konnte bestätigt werden, dass die so erhaltene Zellkultur keine freien Bakterien oder extrazellulären Surfactant-Komplexe enthielt.

Das Inkubieren der Zellen mit 10% Humanserum auf Eis für 10 Minuten vor dem Färben mit monoklonalen Antikörpern oder der isotypen-spezifischen Kontrolle

auf Eis im Dunkeln über eine Dauer von 20 Minuten wurde mit dem Ziel der Verhinderung einer unspezifischen Bindung durchgeführt.

Um eine Färbung der Zellen mit den jeweiligen monoklonalen Ak zu erreichen, wurden diese entsprechend titriert (Verdünnung von 1:20 bis 1:100), ebenso die isotypen-spezifische Kontrolle in derselben Verdünnung.

Nach einer Inkubationszeit der PBMC mit den Antikörpern über 20 Minuten folgte eine dreimalige Waschung der Zellen mit dem FACS-Puffer bei 1600 rpm bei einer Temperatur von 4°C über 3 Minuten und anschließend die Analyse im FACS-Gerät. Die FACS-Analyse generiert ein typisches Bild anhand der Größe im FSC (x-Achse) und der Granularität im SSC (y-Achse). Durch das Färben mit dem CD14-Ak ist eine Abgrenzung der mononukleären Zellen möglich, da CD14 ein für Monozyten und Makrophagen typischer Oberflächenmarker ist. Auf diese Weise konnte ein Monozyten-Gate festgelegt werden.

Der Phagozytose-Index steht für den Anteil von GFP+-Makrophagen an den CD14+-Makrophagen ( $\text{CD14}^{+-}$ ,  $\text{GFP}^{+-}$ -Makrophagen:  $\text{CD14}^{+-}$ -Makrophagen) und wurde als Prozentwert angegeben.

Die Phagozytose-Kapazität steht für die Menge an GFP der CD14+-Makrophagen und wurde mit der Einheit MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) gemessen. Dies entspricht der bakteriellen Beladung der Zellen. Dies bedeutet, je größer die MFI, desto größer ist die bakterielle Beladung.

Die Expression der Antigene auf den PBMC wurde ebenfalls als MFI gemessen. Die MFI ist ein Maß für die Menge gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Partikel. Bei Inkubation von Zellen mit fluoreszenzmarkierten Ak, wie in unseren Versuchen durchgeführt, ist die MFI proportional zur Anzahl der Antigene auf der Zelle. Je höher die MFI, desto mehr Antigene sind vorhanden.

Der Phagozytose-Index sowie die Phagozytose-Kapazität und die Expression der Oberflächenmarker wurden mit der Cellquest 3.3-Software für Apple Macintosh (BD Biosciences (Heidelberg, D)) analysiert.

Die Vergleiche beziehen sich stets auf die Kontrollgruppe, der kein Lipid zugefügt wurde. Zur Darstellung der Ergebnisse als Grafik wurde die Kontrollgruppe auf 100% gesetzt und somit der relative Phagozytose-Index, die relative

Phagozytose-Kapazität mit relativer Fluoreszenzintensität bzw. die relative Expression der Oberflächenmarker bestimmt. Messgröße ist Prozent.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch die Angabe von Median mit Interquartilsabstand (IQR) und unterem bzw. oberem Whisker (entsprechend dem Minimal- und Maximalwert) als sogenannte Boxplots.

### **2.3 Statistische Analyse**

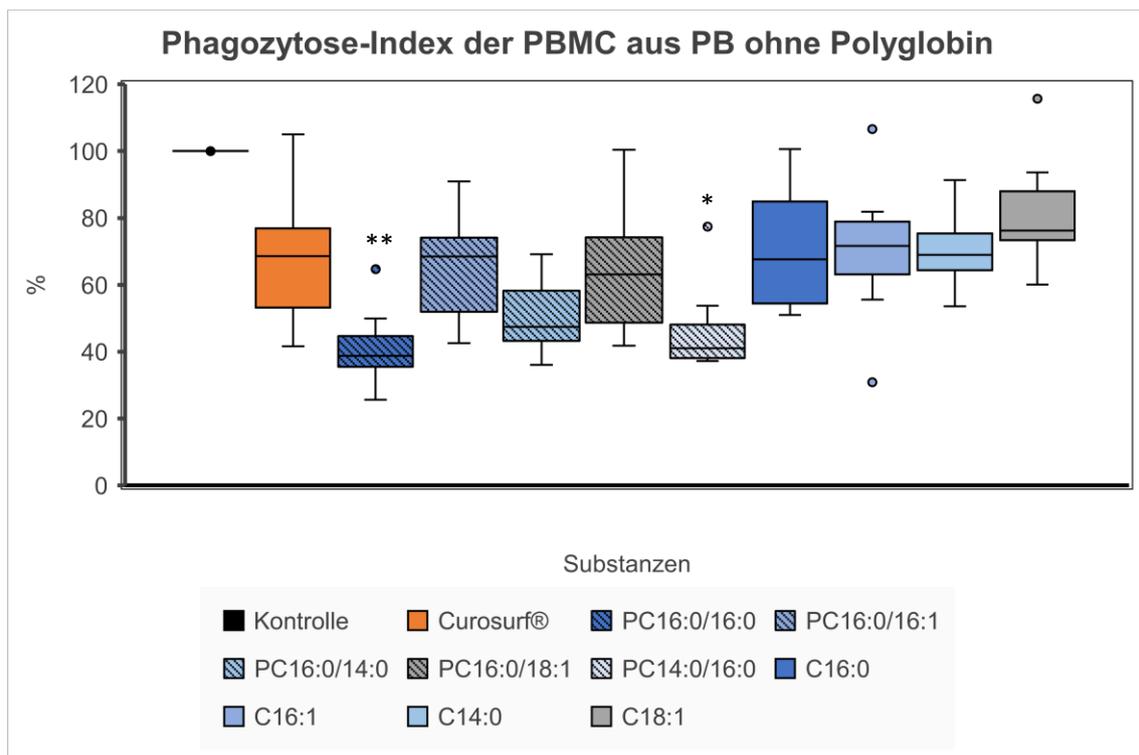
Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPad InStat (Version 3.0, GraphPad Software, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika). Es wurde eine nicht-parametrische multiple Analyse zur Auswertung der Daten mit dem Dunn's-Test durchgeführt, da bei den vorliegenden Daten keine Normalverteilung ermittelt werden konnte. Ein p-Wert von kleiner 0,05 wurde als Signifikanzniveau angenommen. Ein p-Wert kleiner 0,01 wurde als sehr signifikant angenommen und ein p-Wert kleiner 0,001 als höchst signifikant.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Phagozytose von PBMC aus PB

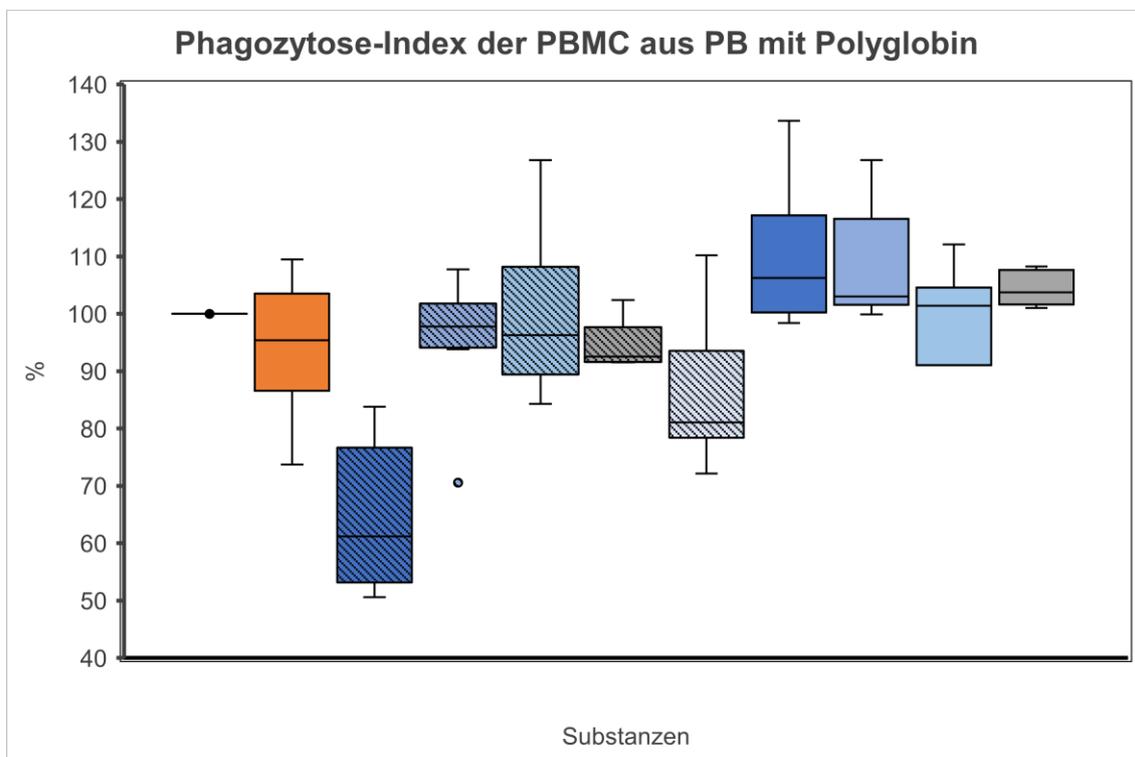
##### 3.1.1 Phagozytose-Index

Der Phagozytose-Index von Escherichia coli (E. coli)-GFP der PBMC von adulten Personen wurde nach Inkubation mit PC16:0/16:0 im Vergleich zur Kontrolle ohne Lipid und ohne Zugabe von Polyglobin von 100% auf median 38,8% (IQR 35,45-44,6%) sehr signifikant reduziert ( $p < 0,01$ ) (Gille et al., 2006). Nach Inkubation mit PC14:0/16:0 kam es zu einer signifikanten Verminderung des Phagozytose-Index auf median 41% (38,0-48,1%) ( $p < 0,05$ ). Unter den anderen Substanzen kam es zu keinen signifikanten Ergebnissen (für PC16:0/18:1 gezeigt von Gille et al., 2006); siehe *Abbildung 10*.



*Abbildung 10: Phagozytose-Index (CD14<sup>+</sup>, GFP<sup>+</sup>-Makrophagen: CD14<sup>+</sup>-Makrophagen) der PBMC von Adulten ohne Polyglobin; n=7 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=4 für C16:0 und C14:0. Abkürzungen: GFP – grün fluoreszierendes Protein, PB – Blut von Erwachsenen, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen, PC – Phosphatidylcholin, C – freie Fettsäure.  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\*. Daten sind Mediane mit Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker mit Ausreißern, in Prozent dargestellt, Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.*

Mit Zugabe von Polyglobin wurde keine signifikante Änderung des Phagozytose-Index bei den getesteten Substanzen festgestellt wie in *Abbildung 11* dargestellt.



*Abbildung 11: Phagozytose-Index (CD14<sup>-</sup>, GFP<sup>+</sup>-Makrophagen:CD14<sup>+</sup>Makrophagen) der PBMC von Adulten mit Polyglobin; n=6 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=4 für C16:0 und C14:0. Abkürzungen: GFP – grün fluoreszierendes Protein, PB – Blut von Erwachsenen, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen. Daten sind Mediane mit Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker mit Ausreißern, in Prozent dargestellt, Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt. Farbabkürzungen siehe Legende zu *Abbildung 10*.*

### 3.1.2 Phagozytose-Kapazität

Die Phagozytose-Kapazität der PBMC aus Blut von Adulten wurde durch PC16:0/16:0 und PC14:0/16:0 mit Polyglobin von 100% auf 58,1% (44,5-60,1%) bzw. auf 57,5% (55,2-62,1%) sehr signifikant reduziert ( $p$  jeweils  $<0,01$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Lipid. Dies wird in *Abbildung 12* dargestellt.

Ohne Polyglobin wurde dieser Effekt ebenfalls für PC16:0/16:0 und PC14:0/16:0 bestätigt (Abbildung 13). Es kam zu einer höchst signifikanten Verminderung der Phagozytose-Kapazität auf 38,8% im Median (35,4-44,6%) für PC16:0/16:0 (Gille et al., 2006) bzw. 41,0% (38,0-48,1%) für PC14:0/16:0 (p jeweils <0,001). Mit PC16:0/14:0 wurde in diesem Versuchsansatz zudem die Phagozytose-Kapazität sehr signifikant vermindert (p<0,01) auf 47,4% (43,3-58,2%) (Gille et al., 2006).

Die anderen PC und FS sowie Curosurf® führten zu keinem signifikanten Effekt bezüglich der Phagozytose-Kapazität mit oder ohne Zugabe von Polyglobin (für Curosurf® und PC16:0/18:1 ohne PG gezeigt von Gille et al., 2006).

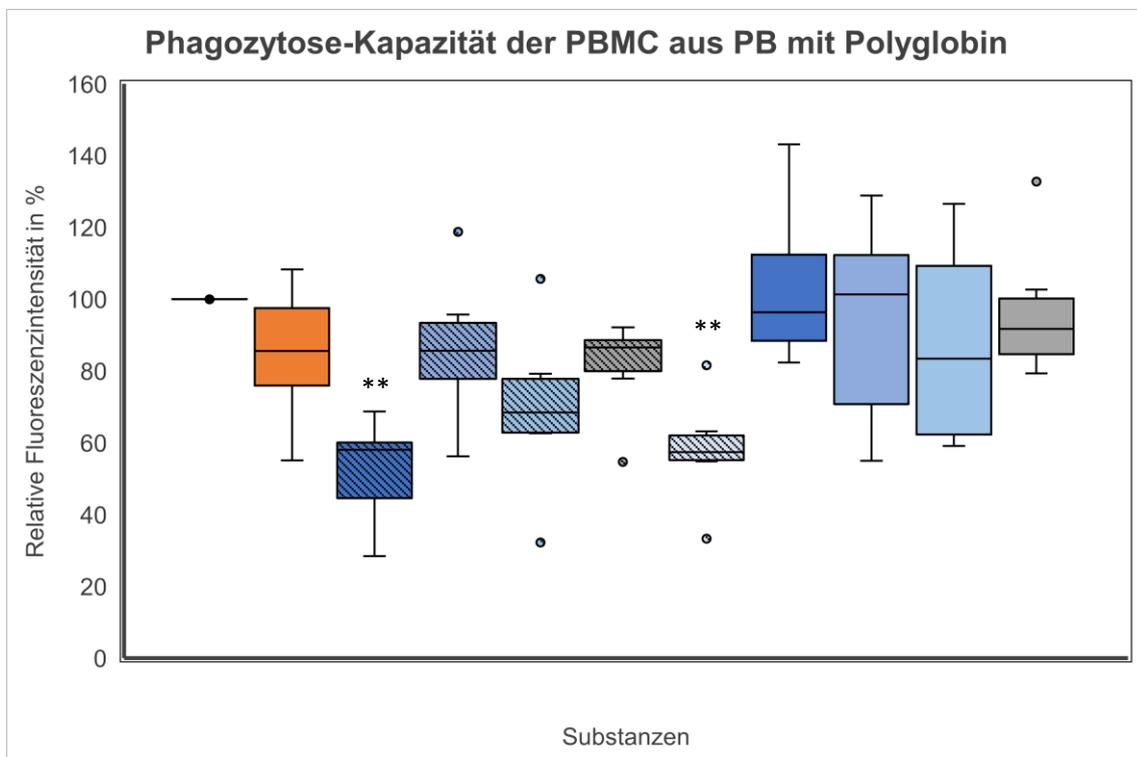


Abbildung 12: Phagozytose-Kapazität (als relative FI der CD14<sup>+</sup>-Makrophagen, was der bakteriellen Beladung entspricht) der PBMC von Adulten mit Polyglobin; n=6 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=4 für C16:0 und C14:0.

Abkürzungen: GFP – grün fluoreszierendes Protein, FI – Fluoreszenzintensität, PB – Blut von Erwachsenen, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen. p<0,01 \*\*.

Daten sind Mediane mit Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker, relative Fluoreszenzintensität in Prozent und mit Ausreißern dargestellt, Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.

Farbabbkürzungen siehe Legende zu Abbildung 10.

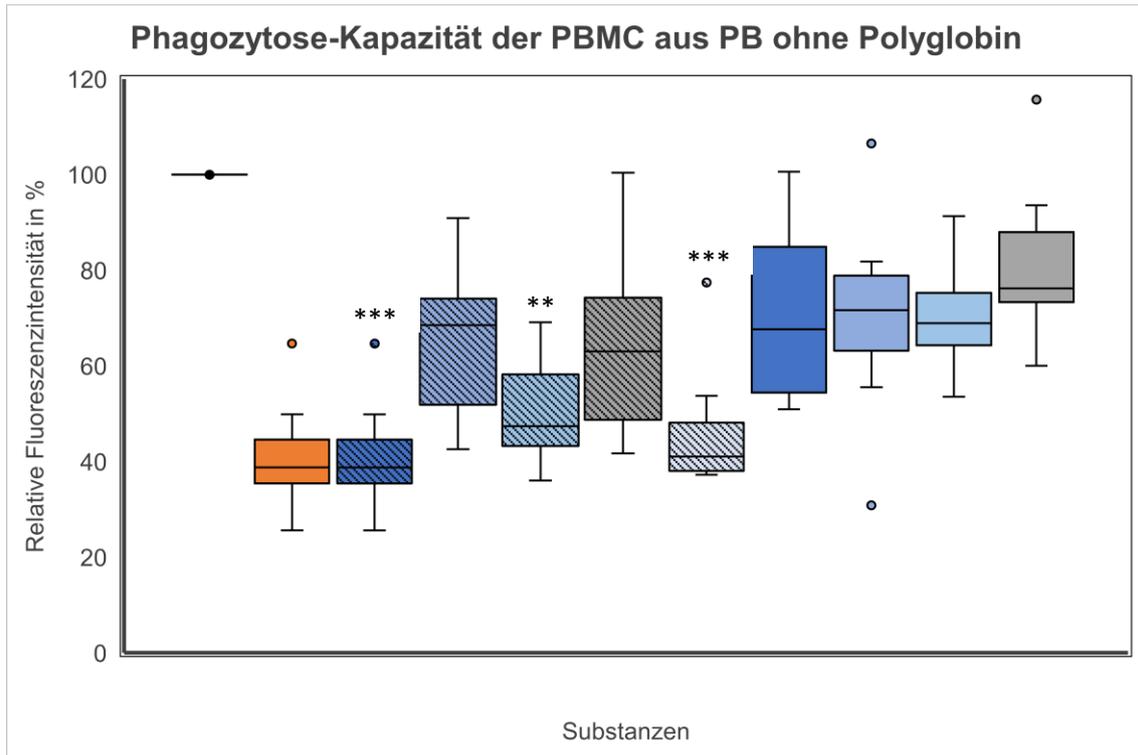


Abbildung 13: Phagozytose-Kapazität (als relative FI der CD14<sup>+</sup>-Makrophagen, was der bakteriellen Beladung entspricht) der PBMC von Adulten ohne Polyglobin; n=7 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=4 für C16:0 und C14:0.

Abkürzungen: GFP – grün fluoreszierendes Protein, FI – Fluoreszenzintensität, PB – Blut von Erwachsenen, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen.

p<0,01 \*\*, p<0,001 \*\*\*.

Daten sind Mediane mit Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker, relative Fluoreszenzintensität in Prozent und mit Ausreißern dargestellt, Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.

Farbabbkürzungen siehe Legende zu Abbildung 10.

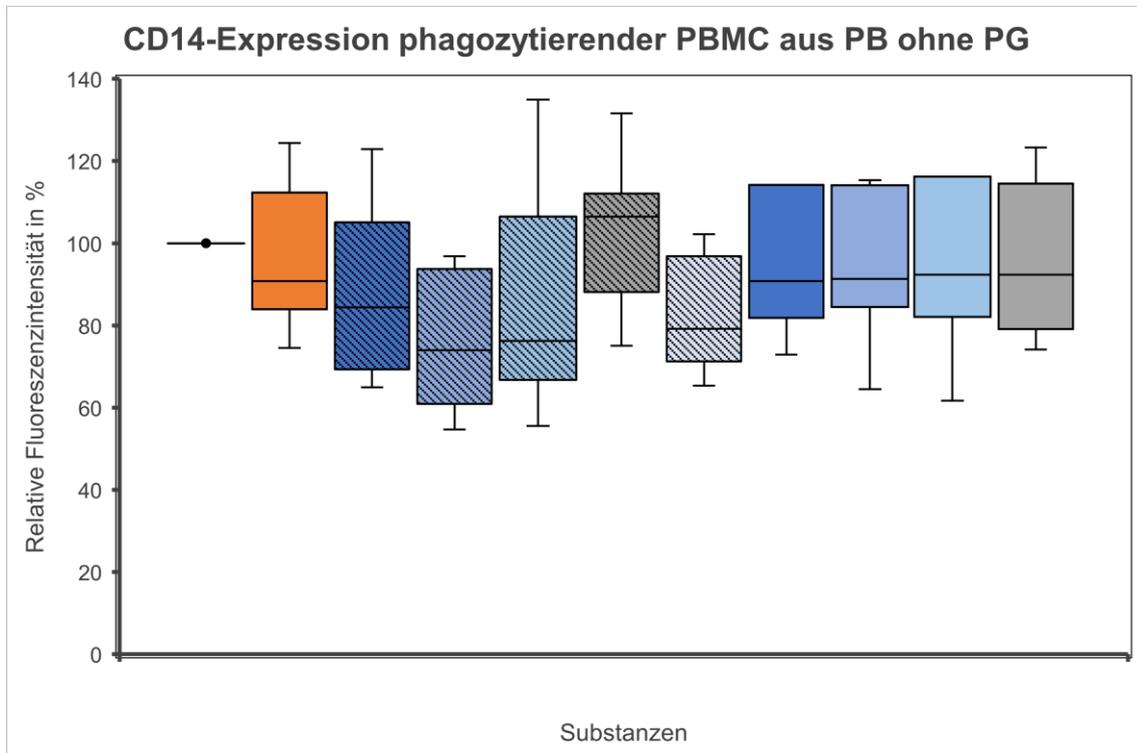
### 3.1.3 CD14-Expression der phagozytierenden PBMC

Nach Inkubation der phagozytierenden Zellen mit PC16:0/16:0 kam es mit Zugabe von Polyglobin zu einer signifikanten Verminderung der CD14-Expression von 100% der Kontrollgruppe auf median 59,6% (57,7-66,3%) (p<0,05).

In *Abbildung 15* wird dieser Effekt dargestellt.

Bei den weiteren Substanzen dieser Versuchsreihe wurden keine signifikanten Änderungen der Expression des Oberflächenmarkers CD14 der PBMC aus PB festgestellt.

Dies gilt auch für die gesamte Versuchsreihe ohne Polyglobin, siehe *Abbildung 14*. Hier konnte keine signifikante Änderung der CD14-Expression festgestellt werden.



*Abbildung 14: Expression des Oberflächenmarkers CD14 der phagozytischen PBMC aus PB ohne PG, als relative FI in Prozent mit Medianen, Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker ohne Ausreißer dargestellt. Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.*

*n=7 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=4 für C16:0 und C14:0.*

*Abkürzungen: FI – Fluoreszenzintensität, PB – Blut von Erwachsenen, PG – Polyglobin, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen.*

*Farbakürzungen siehe Legende zu Abbildung 10.*

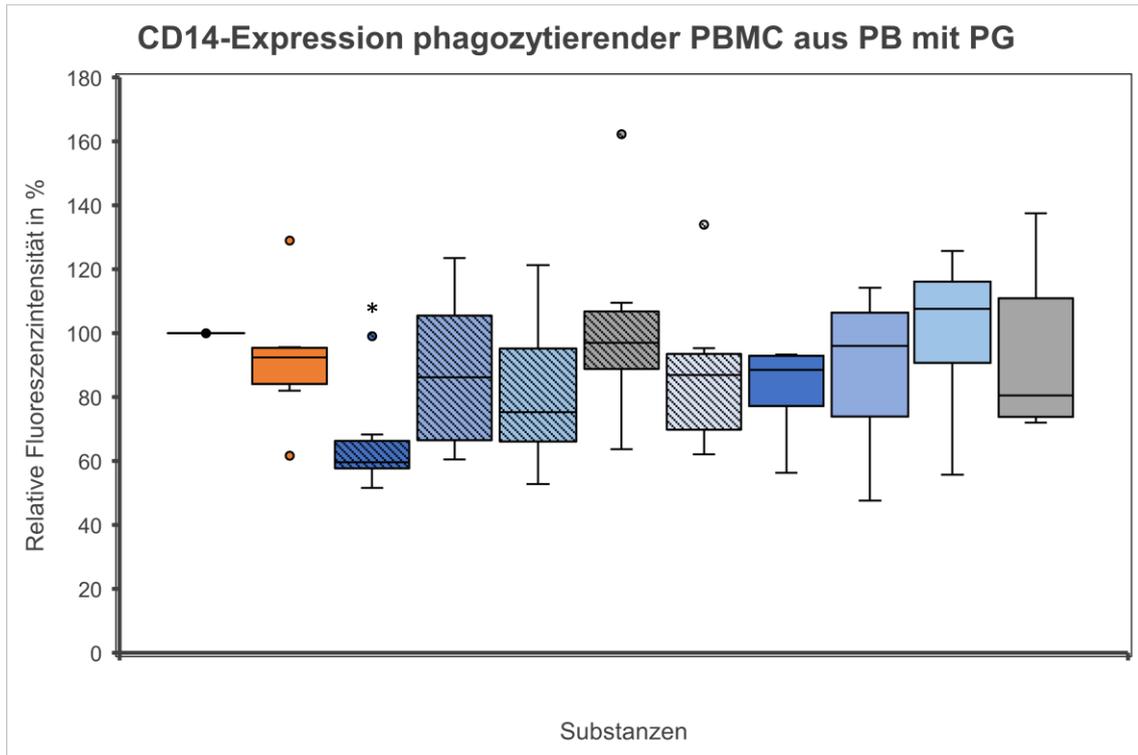


Abbildung 15: Expression des Oberflächenmarkers CD14 der phagozytierenden PBMC aus PB mit PG, als relative FI in Prozent mit Medianen, Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker mit Ausreißern dargestellt. Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.

$n=6$  für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1;  $n=4$  für C16:0 und C14:0.  $p<0,05$  \*.

Abkürzungen: FI – Fluoreszenzintensität, PB – Blut von Erwachsenen, PG – Polyglobin, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen.

Farbakürzungen siehe Legende zu Abbildung 10.

### 3.1.4 CD14-Expression der nicht phagozytierenden PBMC

Die Expression des Oberflächenmarkers CD14 der nicht phagozytierenden PBMC von Adulten wurde ohne Bakterienzugabe nach Inkubation mit dem Fertig-Surfactant Curosurf® sowie PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1 sowie C18:1, C16:1, C16:0 und C14:0 weder mit noch ohne Polyglobin im Vergleich zur Kontrollgruppe beeinflusst (für PC16:0/18:1 ohne PG gezeigt von Gille et al., 2006; Versuche mit/ohne Polyglobin  $n=6/7$  für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1;  $n=4$  für C16:0 und C14:0).

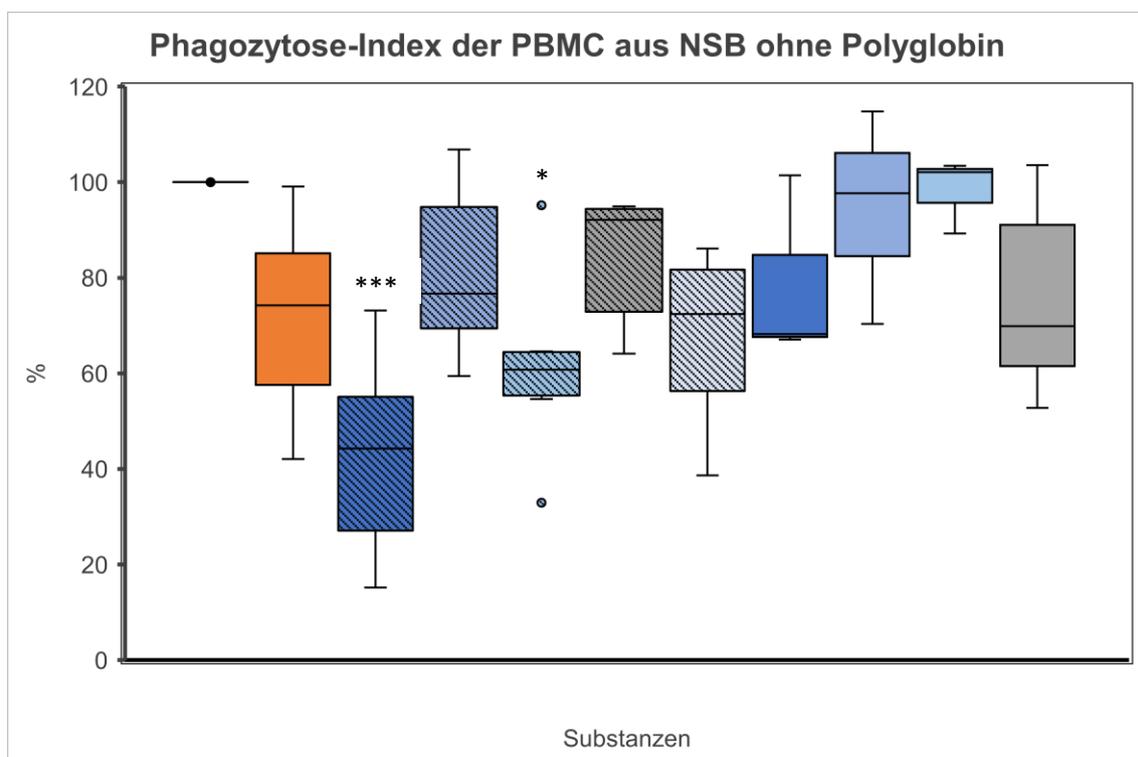
## 3.2 Phagozytose der PBMC aus NSB

### 3.2.1 Phagozytose-Index

Der Phagozytose-Index der PBMC aus NSB wurde höchst signifikant vermindert nach Inkubation mit PC16:0/16:0 und ohne zusätzliche Polyglobin-Zugabe von 100% auf 44,3% (27,1-55,1%) ( $p < 0,001$ ). Mit Polyglobin war dieser Effekt zwar tendenziell sichtbar, allerdings nicht signifikant.

Unter PC16:0/14:0 kam es ohne Polyglobin-Zugabe ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des Phagozytose-Index auf einen Median von 60,8% (55,3-64,4%) ( $p < 0,05$ ), siehe *Abbildung 16*.

Mit Polyglobin wurde dieser Effekt nicht bestätigt (*Abbildung 17*).



*Abbildung 16: Phagozytose-Index (CD14<sup>+</sup>, GFP<sup>+</sup>-Makrophagen: CD14<sup>+</sup>-Makrophagen) der PBMC aus NSB ohne Polyglobin; n=6 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=3 für C16:0 und C14:0. Abkürzungen: GFP – grün fluoreszierendes Protein, NSB – Nabelschnurblut, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen.  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\*\*. Daten sind Mediane mit Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker mit Ausreißern, in Prozent dargestellt, Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt. Farbabkürzungen siehe Legende zu *Abbildung 10*.*

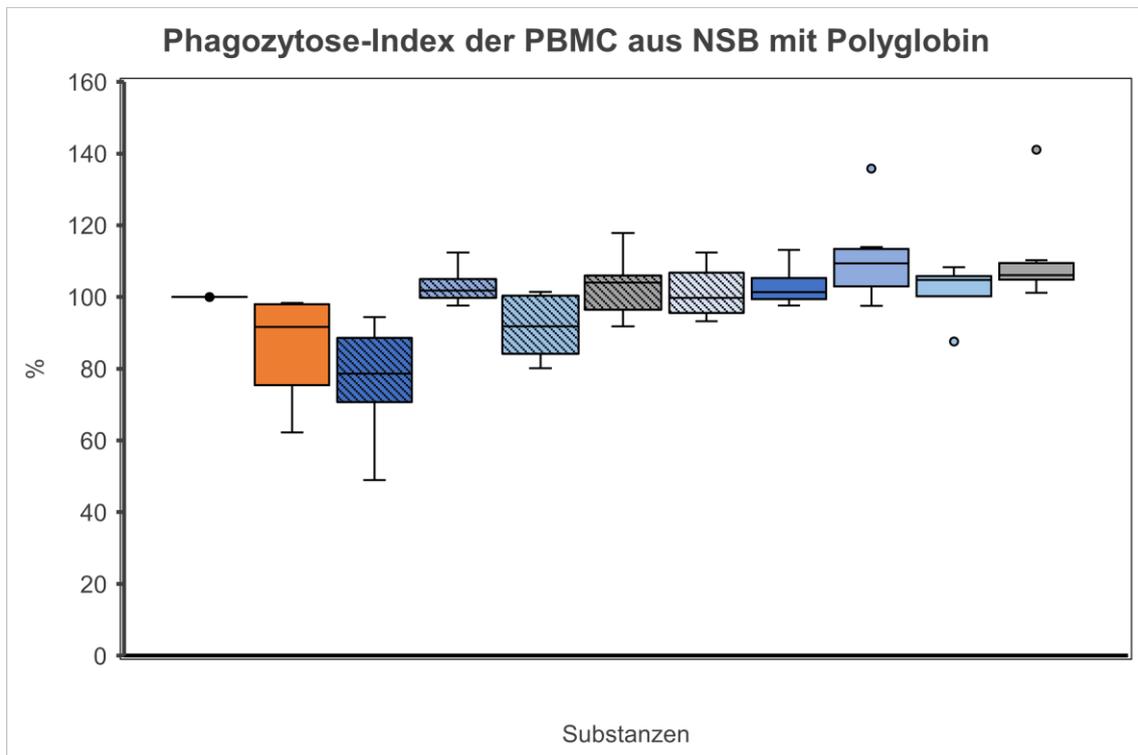


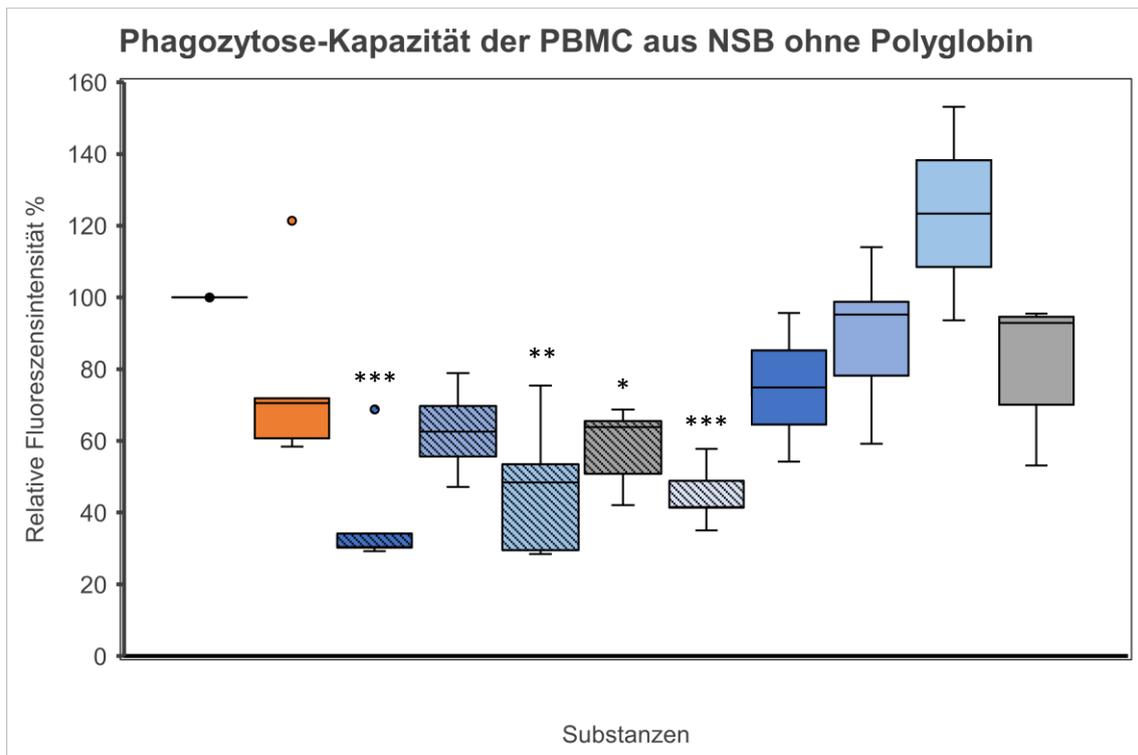
Abbildung 17: Phagozytose-Index (CD14<sup>+</sup>-, GFP<sup>+</sup>-Makrophagen: CD14<sup>+</sup>-Makrophagen) der PBMC aus NSB mit Polyglobin; n=6 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=4 für C16:0 und C14:0. Abkürzungen: GFP – grün fluoreszierendes Protein, NSB – Nabelschnurblut, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen. Daten sind Mediane mit Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker mit Ausreißern, in Prozent dargestellt, Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt. Farbabkürzungen siehe Legende zu Abbildung 10.

### 3.2.2 Phagozytose-Kapazität

Mit PC16:0/16:0 sowie mit PC14:0/16:0 kam es ohne Polyglobin zu einer höchst signifikanten Verminderung ( $p < 0,001$ ), unter PC16:0/14:0 zu einer sehr signifikanten Verminderung ( $p < 0,01$ ) sowie unter PC16:0/18:1 zu einer signifikanten Verminderung ( $p < 0,05$ ) der Phagozytose-Kapazität. Der Median sank unter PC16:0/16:0 ohne Lipidzugabe auf 32,3% (30,3-42,4%), unter PC14:0/16:0 auf 43,8% (41,4-48,1%), unter PC16:0/14:0 auf 50,7% (34,2-53,4%)

und unter PC16:0/18:1 auf 58,9% (51,6-65,1%) ohne Zugabe von Polyglobin, dargestellt in *Abbildung 18*.

Für Curosurf<sup>®</sup>, PC16:0/16:1, sowie die FS ergab sich kein signifikanter Effekt auf die Phagozytose-Kapazität.



*Abbildung 18: Phagozytose-Kapazität (als relative FI der CD14+-Makrophagen, was der bakteriellen Beladung entspricht) der PBMC aus NSB ohne Polyglobin; n=6 für Kontrolle, Curosurf<sup>®</sup>, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=3 für C16:0 und C14:0.*

*Abkürzungen: GFP – grün fluoreszierendes Protein, FI – Fluoreszenzintensität, NSB – Nabelschnurblut, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen.*

*p<0,05 \*, p<0,01 \*\*, p<0,001 \*\*\*.*

*Daten sind Mediane mit Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker, relative Fluoreszenzintensität in Prozent und mit Ausreißern dargestellt, Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.*

*Farbakürzungen siehe Legende zu *Abbildung 10*.*

Mit Polyglobin wurde die Phagozytose-Kapazität nach Inkubation mit Curosurf<sup>®</sup> und PC16:0/16:0 sehr signifikant (p jeweils <0,01) und mit PC16:0/14:0 signifikant vermindert (p<0,05), *Abbildung 19*. Im Median wurde die Phagozytose-Kapazität auf 46,0% (21,3-56,0%) für Curosurf<sup>®</sup> und auf 39,3%

(18,6-47,6%) für PC16:0/16:0 gesenkt. Unter PC16:0/14:0 fiel der Median auf 50,8% (24,4-55,5%) ab.

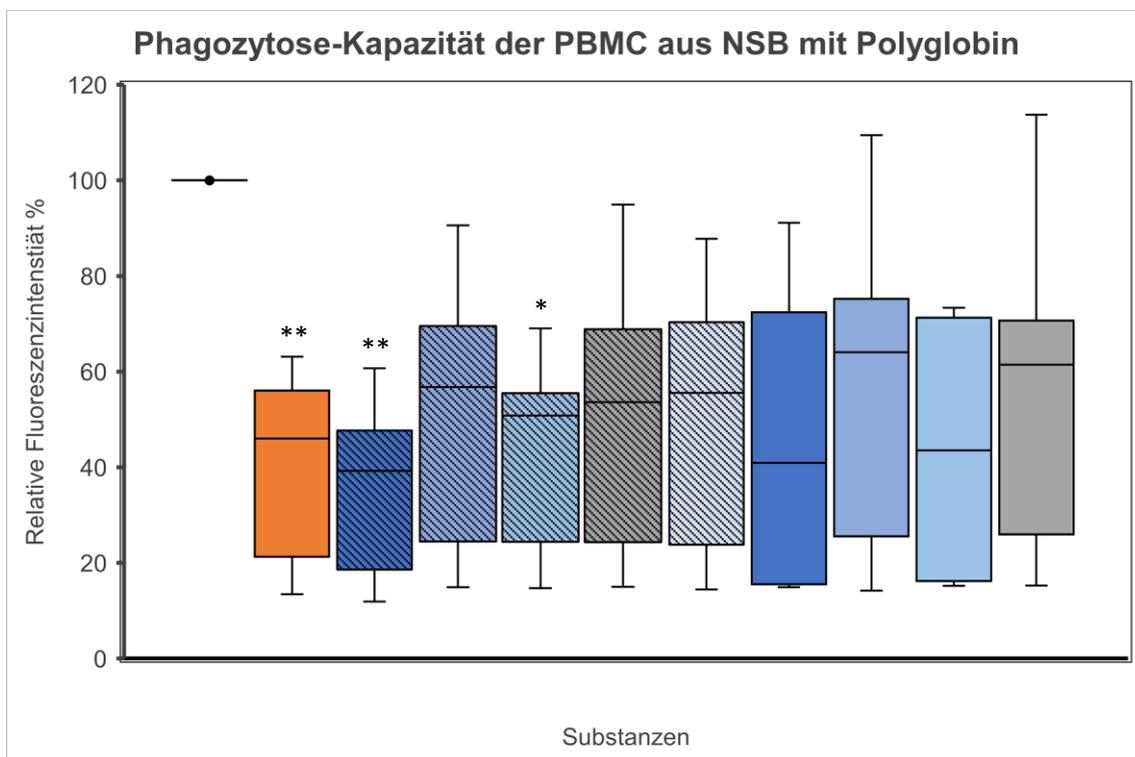


Abbildung 19: Phagozytose-Kapazität (als relative FI der CD14+-Makrophagen, was der bakteriellen Beladung entspricht) der PBMC aus NSB mit Polyglobin; n=6 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=4 für C16:0 und C14:0.

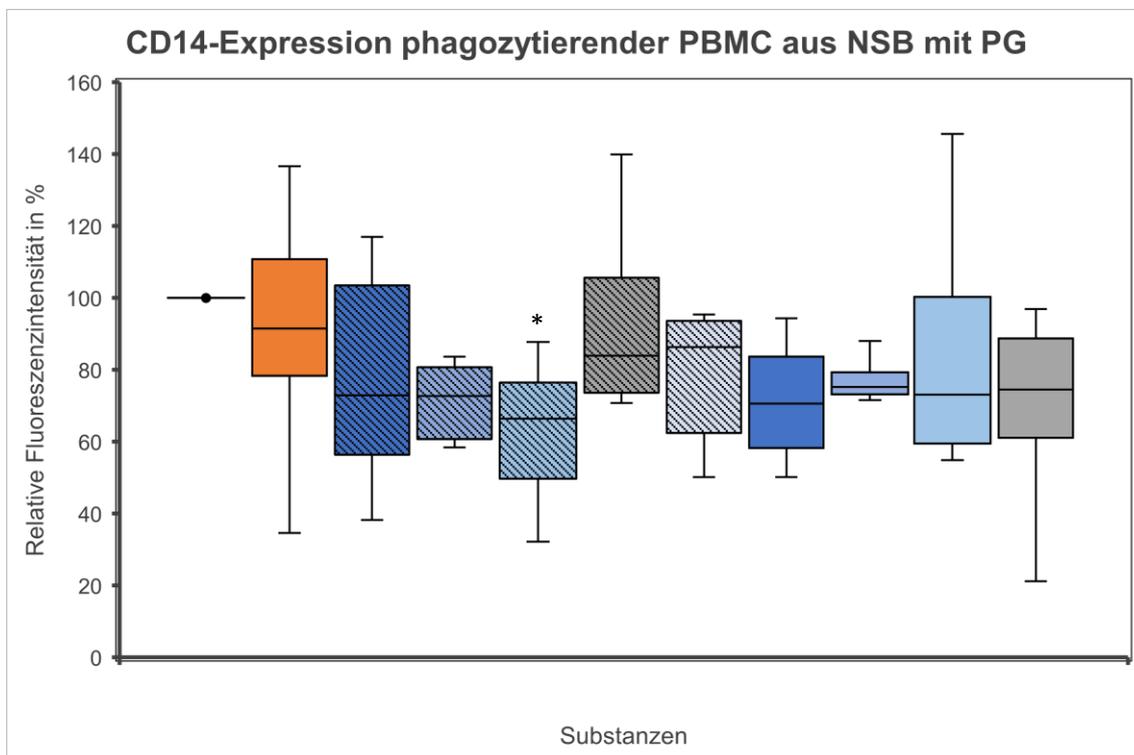
Abkürzungen: GFP – grün fluoreszierendes Protein, FI – Fluoreszenzintensität, NSB – Nabelschnurblut, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen.  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\*. Daten sind Mediane mit Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker, relative Fluoreszenzintensität in Prozent und mit Ausreißern dargestellt, Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.

Farbabkürzungen siehe Legende zu Abbildung 10.

### 3.2.3 CD14-Expression der phagozytierenden PBMC

Die Expression des Oberflächenmarkers CD14 phagozytierender Makrophagen wurde durch keine der 10 getesteten Substanzen ohne Polyglobin signifikant beeinflusst (n=6 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=3 für C16:0 und C14:0). Durch die Zugabe von Polyglobin zu den Versuchsansätzen wurde eine signifikante Verminderung der CD14-Expression in Anwesenheit von

PC16:0/14:0 festgestellt ( $p < 0,05$ ), *Abbildung 20*. Im Median wurde die CD14-Expression von 100% der Kontrollgruppe auf 66,4% (49,7-76,5%) gesenkt.



*Abbildung 20: Expression des Oberflächenmarkers CD14 der phagozytierenden PBMC aus NSB mit PG, als relative FI dargestellt mit Medianen, Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker, mit Ausreißern dargestellt. Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.*

*n=6 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=4 für C16:0 und C14:0.  $p < 0,05$  \*.*

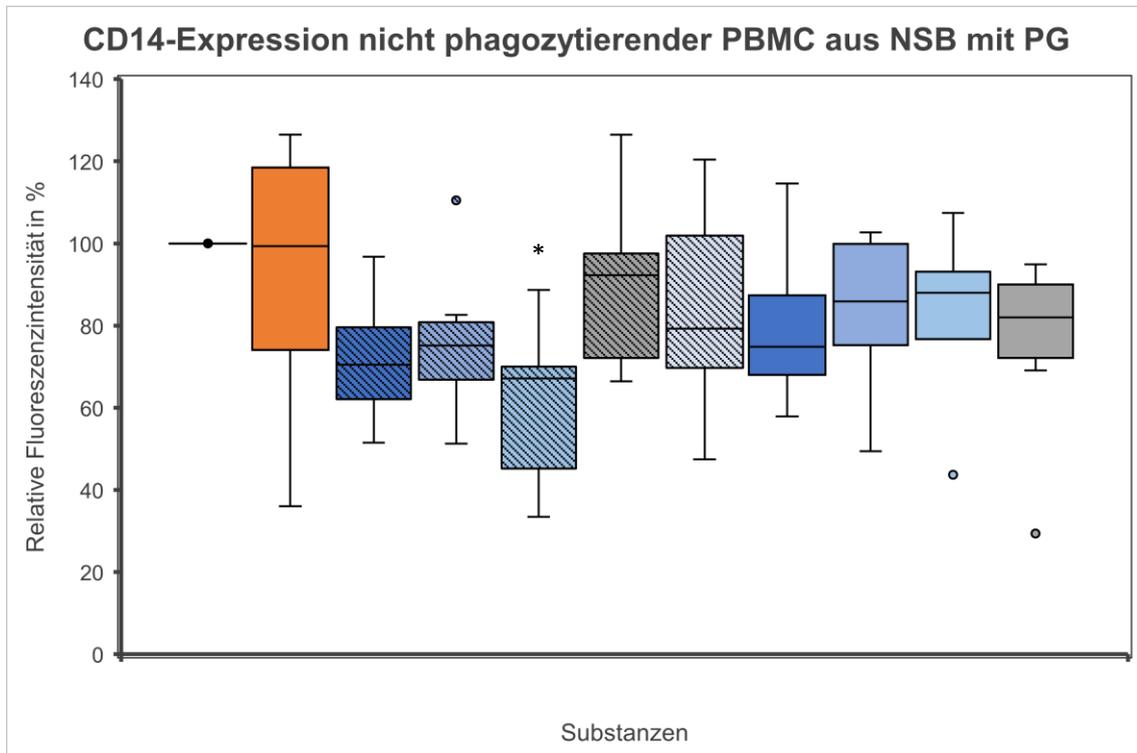
*Abkürzungen: FI – Fluoreszenzintensität, NSB – Nabelschnurblut, PG – Polyglobin, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen.*

*Farbakürzungen siehe Legende zu *Abbildung 10*.*

### 3.2.4 CD14-Expression der nicht phagozytierenden PBMC

Die Expression des Oberflächenmarkers CD14 nicht phagozytierender PBMC aus NSB wurde ohne Polyglobin durch keine der 10 getesteten Substanzen signifikant beeinflusst ( $n=6$  für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1;  $n=3$  für C16:0 und C14:0).

Mit Polyglobin kam es wie schon bei dem Versuchsansatz mit den phagozytierenden PBMC auch hier bei den nicht phagozytierenden PBMC unter PC16:0/14:0 zu einer signifikant verminderten CD-14-Expression ( $p < 0,05$ ) auf median 67,1% (45,2-70,1%), *Abbildung 21*.



*Abbildung 21: Expression des Oberflächenmarkers CD14 der nicht phagozytierenden PBMC aus NSB mit PG, als relative FI dargestellt mit Medianen, Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker, mit Ausreißern dargestellt. Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.*

*n=6 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=4 für C16:0 und C14:0.  $p < 0,05$  \*.*

*Abkürzungen: FI – Fluoreszenzintensität, NSB – Nabelschnurblut, PG – Polyglobin, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen.*

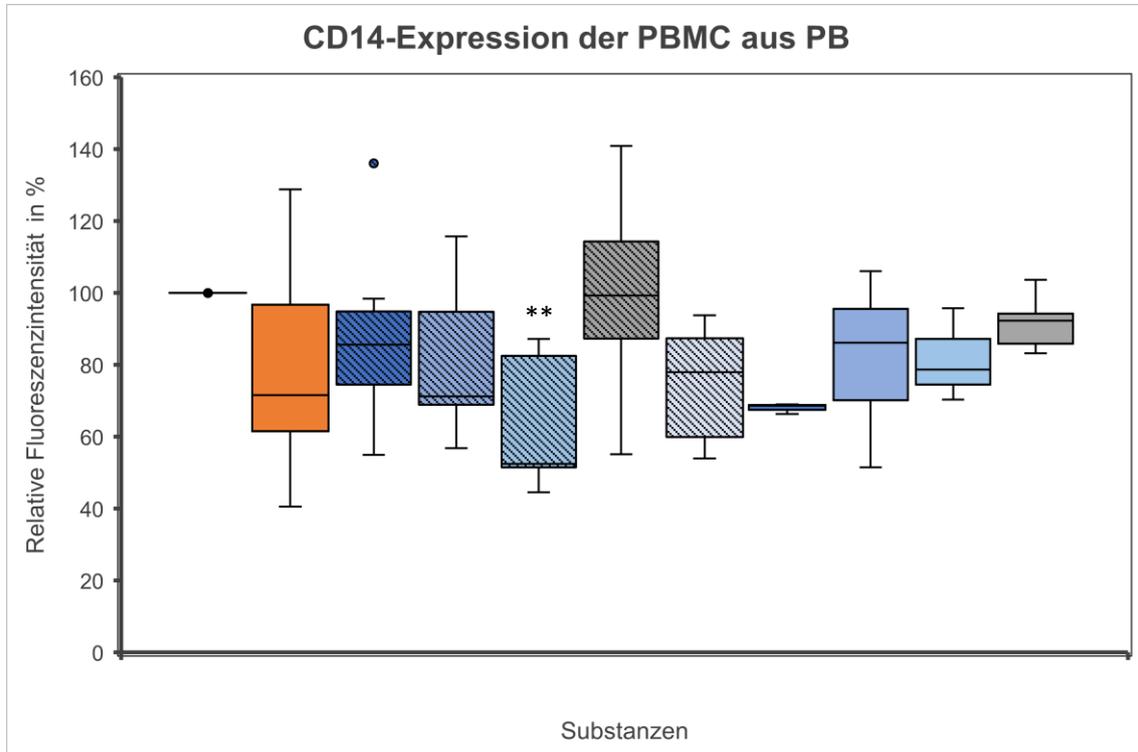
*Farbakürzungen siehe Legende zu *Abbildung 10*.*

### 3.3 Phänotyp der PBMC aus PB

#### 3.3.1 CD14-Expression

Es wurde eine sehr signifikant verminderte CD14-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Lipid analog zu den Ergebnissen der Phagozytose-Versuchsreihen aus NSB mit PC16:0/14:0 von 100% in der Kontrollgruppe auf

52,5% (51,5-82,5%) ( $p < 0,01$ ) festgestellt, dargestellt in *Abbildung 22* (Gille et al., 2006).



*Abbildung 22: Expression des Oberflächenmarkers CD14 der PBMC aus PB, als relative FI dargestellt mit Medianen, Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker, mit Ausreißern dargestellt. Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.*

*n=7 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=3 für C16:0 und C14:0.  $p < 0,01$  \*\*.*

*Abkürzungen: FI – Fluoreszenzintensität, PB – Blut von Erwachsenen, PG – Polyglobin, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen.*

*Farbabkürzungen siehe Legende zu *Abbildung 10*.*

### 3.3.2 HLA-DR-Expression

Es wurde kein signifikanter Effekt auf die Expression von HLA-DR durch Curosurf® oder die 9 weiteren Substanzen festgestellt (für PC16:0/16:0 und PC16:0/18:1 gezeigt von Gille et al., 2006; n=7 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=3 für C16:0 und C14:0).

### **3.3.3 CD86-Expression**

Es kam zu keiner signifikanten Änderung der Expression von CD86 nach Zugabe der Substanzen im Vergleich zur Kontrollgruppe (für Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/14:0 und PC16:0/18:1 gezeigt von Gille et al., 2006; n=7 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=3 für C16:0 und C14:0).

### **3.3.4 Anteil der CD80+-Zellen an CD86+-Zellen**

Die Zugabe der Surfactant-Bestandteile sowie von Curosurf® führte zu keiner signifikanten Zu- oder Abnahme des Anteils an CD80-positiven Makrophagen (für PC16:0/16:0 und PC16:0/18:1 gezeigt von Gille et al., 2006; n=7 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=3 für C16:0 und C14:0).

## **3.4 Phänotyp der PBMC aus NSB**

### **3.4.1 CD14-Expression**

Nach Zugabe der Surfactant-Bestandteile sowie Curosurf® kam es zu keinem signifikanten Effekt bezüglich der Expression von CD14 (n=6 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=1 für C16:0 und C14:0).

### **3.4.2 HLA-DR-Expression**

In dieser Versuchsreihe wurde kein signifikanter Effekt auf die Expression von HLA-DR durch Curosurf® oder die 9 Surfactant-Bestandteile nachgewiesen, wie in *Abbildung 23* dargestellt.

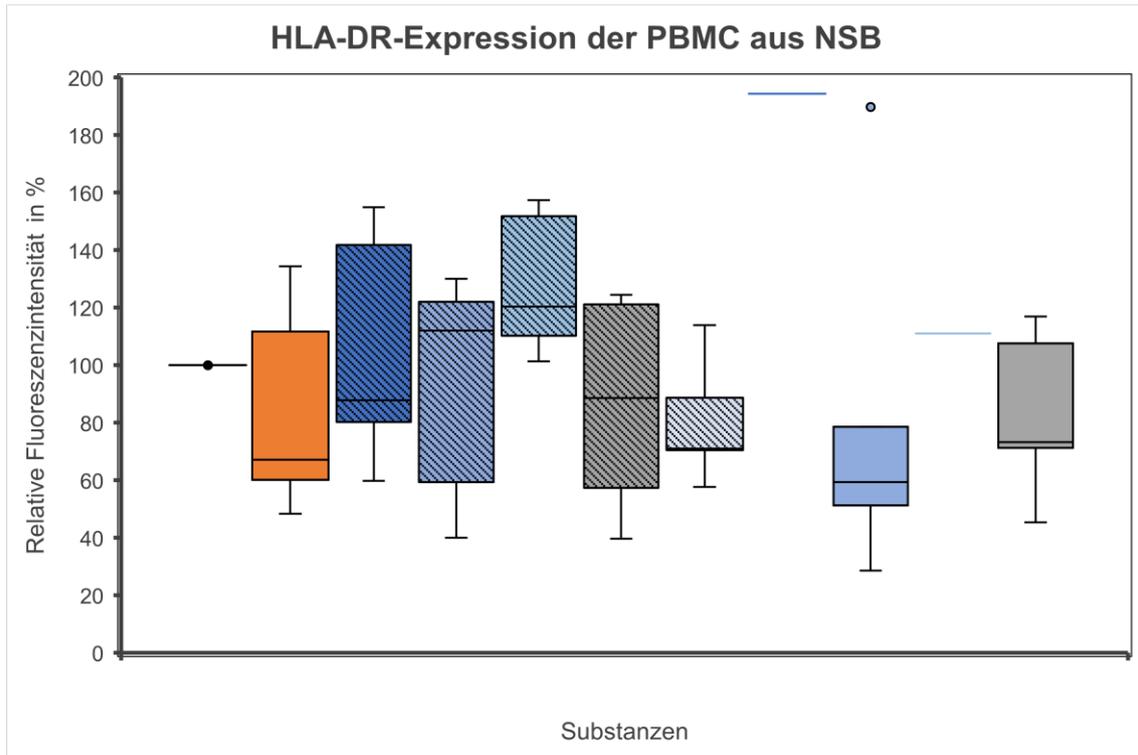


Abbildung 23: Expression des Oberflächenmarkers HLA-DR der PBMC aus NSB, als relative FI dargestellt mit Medianen, Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker, mit Ausreißern dargestellt. Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.  $n=5$  für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1;  $n=1$  für C16:0 und C14:0. Abkürzungen: FI – Fluoreszenzintensität, NSB – Nabelschnurblut, PG – Polyglobin, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen. Farbakürzungen siehe Legende zu Abbildung 10.

### 3.4.3 CD86-Expression

Auch in diesen Versuchen kam zu keiner signifikanten Änderung der Expression von CD86 nach Zugabe der Substanzen im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $n=5$  für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1;  $n=1$  für C16:0 und C14:0).

### 3.4.4 Anteil der CD80+-Zellen an CD86+-Zellen

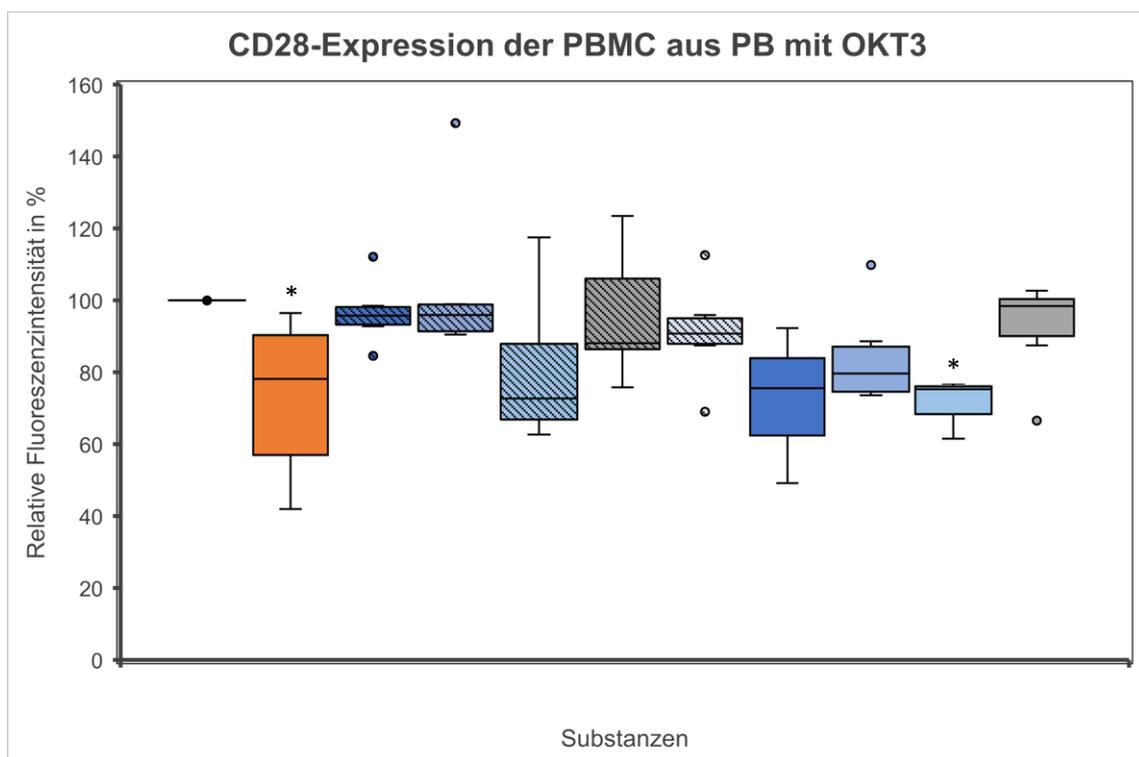
Der prozentuale Anteil CD80+-Zellen an CD86+-Zellen der PBMC aus NSB änderte sich nach Inkubation mit den 10 verwendeten Substanzen nicht signifikant im Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne Lipid-Zugabe ( $n=5$  für

Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=1 für C16:0 und C14:0).

### 3.5 Phänotyp der PBMC aus PB mit und ohne Inkubation von OKT3

#### 3.5.1 CD28-Expression

Die CD28-Expression wurde mit OKT3 und mit Curosurf® signifikant vermindert auf median 78,1% ( $p < 0,05$ ) (Gille et al., 2006) und mit C14:0 auf median 75,3% ( $p < 0,05$ ), siehe *Abbildung 24*. Die anderen PC und FS veränderten die CD28-Expression nicht (für PC16:0/16:0 und PC16:0/18:1 gezeigt von Gille et al., 2006).



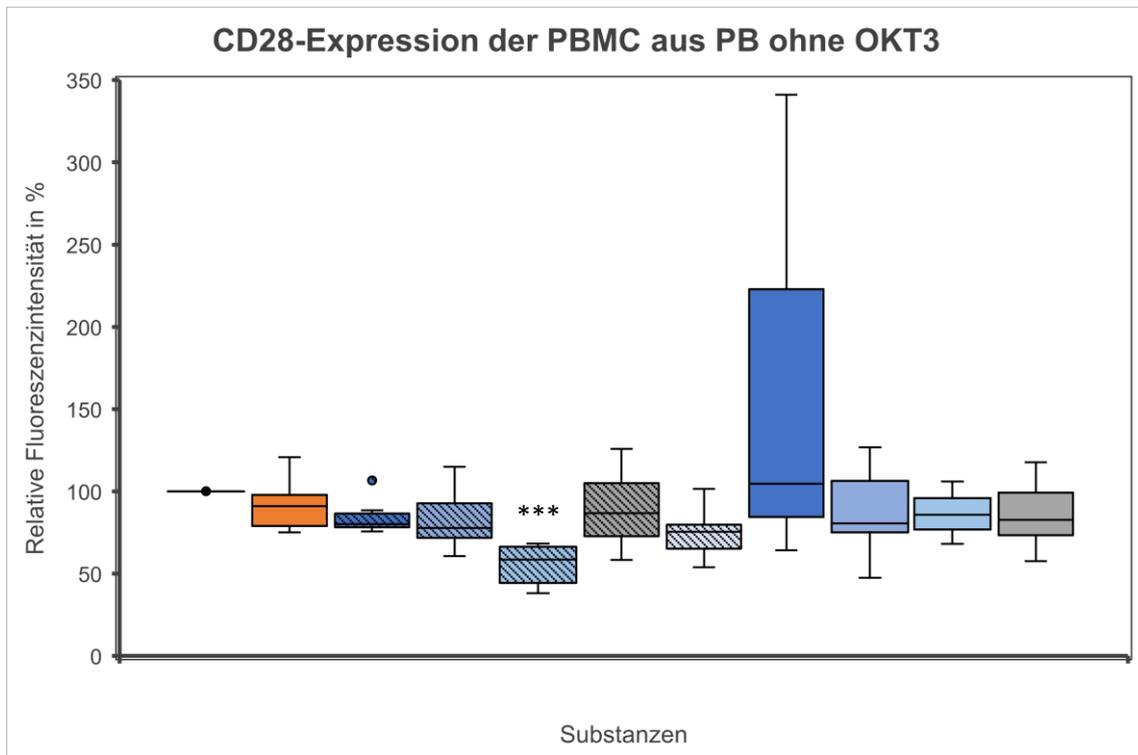
*Abbildung 24: CD28-Expression der PBMC aus PB mit OKT3; als relative FI dargestellt mit Medianen, Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker, mit Ausreißern dargestellt. Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.*

*n=6 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=3 für C16:0 und C14:0.  $p < 0,05$  \*.*

*Abkürzungen: FI – Fluoreszenzintensität, PB – Blut von Erwachsenen, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen.*

*Farbabbkürzungen siehe Legende zu *Abbildung 10*.*

Ohne OKT wurde eine höchst signifikante Verminderung der CD28-Expression der PBMC aus PB mit PC16:0/14:0 auf median 58,5% (44,3-66,4%) ( $p < 0,001$ ) festgestellt, siehe *Abbildung 25*.



*Abbildung 25: CD28-Expression der PBMC aus PB ohne OKT3; als relative FI dargestellt mit Medianen, Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker, mit Ausreißern dargestellt. Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.*

*n=6 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=3 für C16:0 und C14:0.  $p < 0,001$  \*\*\*.*

*Abkürzungen: FI – Fluoreszenzintensität, PB – Blut von Erwachsenen, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen.*

*Farbakürzungen siehe Legende zu *Abbildung 10*.*

### 3.5.2 CD4-Expression

Weder mit noch ohne OKT3 wurde eine signifikante Änderung der CD4-Expression unter den getesteten Substanzen beobachtet ( $n=6$  für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1;  $n=3$  für C16:0 und C14:0).

### **3.5.3 Anteil der CD25+-Zellen an CD4+-Zellen**

Auch in dieser Versuchsreihe wurden keine signifikanten Effekte durch die verwendeten Substanzen nachgewiesen (n=6 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=3 für C16:0 und C14:0).

## **3.6 Phänotyp der PBMC aus NSB mit und ohne Inkubation von OKT3**

### **3.6.1 CD28-Expression**

Dieser Ansatz untersuchte die CD28-Expression der PBMC aus NSB mit OKT3. Es kam zu einem höchst signifikanten Rückgang der CD28-Expression unter PC16:0/14:0 auf median 61,5% (59,1-66,9%) ( $p < 0,001$ ), zu einem sehr signifikanten Rückgang unter Curosurf® auf median 67,4% (61,9-77,7%) ( $p < 0,01$ ) und zu einer signifikanten Reduktion unter PC14:0/16:0 auf 75,8% (68,4-76,8%) ( $p < 0,05$ ), unter C18:1 auf 74,0% (68,9-76,7%) ( $p < 0,05$ ) und unter C16:0 auf 60,0% (55,4-71,7%) ( $p < 0,05$ ) siehe *Abbildung 26*.

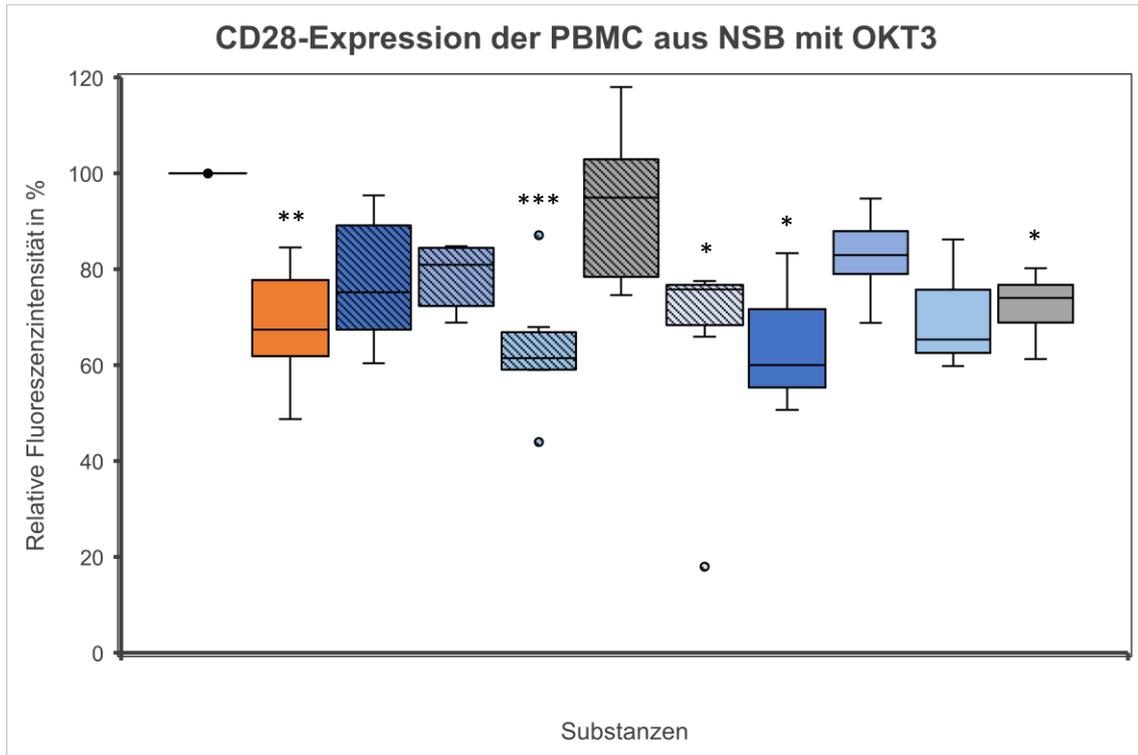


Abbildung 26: CD28-Expression der PBMC aus NSB mit OKT3; als relative FI dargestellt mit Medianen, Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker, mit Ausreißern dargestellt. Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.  $n=6$  für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1;  $n=3$  für C16:0 und C14:0.  $p<0,05$  \*,  $p<0,01$  \*\*,  $p<0,001$  \*\*\*. Abkürzungen: FI – Fluoreszenzintensität, NSB – Nabelschnurblut, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen. Farbabkürzungen siehe Legende zu Abbildung 10.

Ohne OKT3 wurde eine sehr signifikant verminderte CD28-Expression der PBMC aus NSB mit PC16:0/14:0 auf median 47,6% (45,5-47,8%) ( $p<0,01$ ) beobachtet (Abbildung 27).

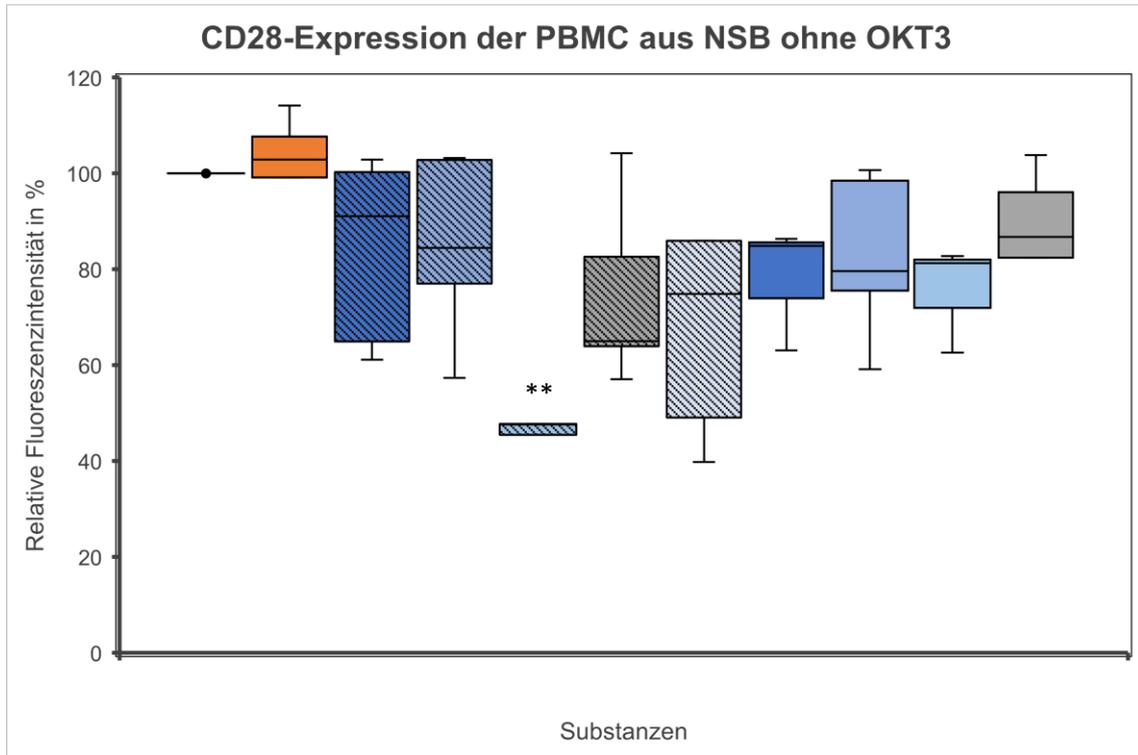


Abbildung 27: CD28-Expression der PBMC aus NSB ohne OKT3; als relative FI dargestellt mit Medianen, Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker, ohne Ausreißer dargestellt. Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.  $n=5$  für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1;  $n=3$  für C16:0 und C14:0.  $p<0,01$  \*\*. Abkürzungen: FI – Fluoreszenzintensität, NSB – Nabelschnurblut, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen. Farbabkürzungen siehe Legende zu Abbildung 10.

### 3.6.2 CD4-Expression

Diese Versuchsreihe ergab eine sehr signifikant verminderte CD4-Expression der PBMC aus NSB unter Inkubation mit OKT3 und Curosurf® auf median 58,2% (51,3-70,2%) ( $p<0,01$ ), siehe Abbildung 28.

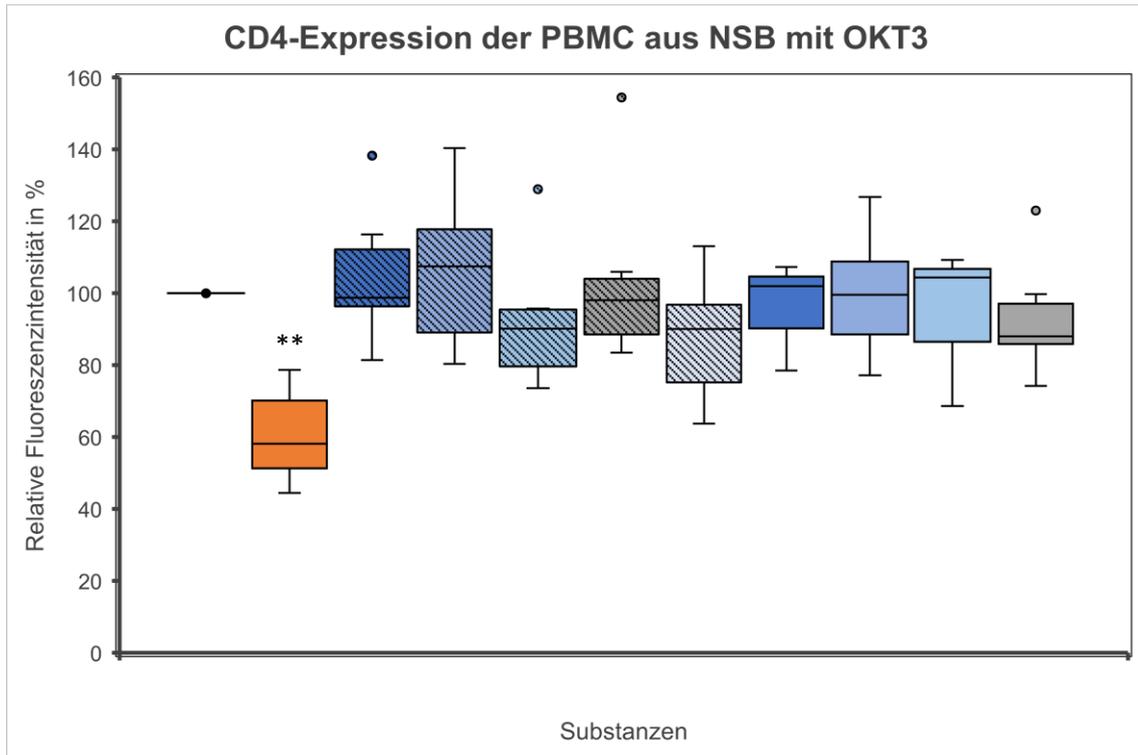


Abbildung 28: CD4-Expression der PBMC aus NSB mit OKT3; als relative FI dargestellt mit Medianen, Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker, mit Ausreißern dargestellt. Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt.  $n=6$  für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1;  $n=3$  für C16:0 und C14:0.  $p<0,01$  \*\*. Abkürzungen: FI – Fluoreszenzintensität, NSB – Nabelschnurblut, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen. Farbabkürzungen siehe Legende zu Abbildung 10.

Ohne OKT3 wurde keine Änderung der CD4-Expression festgestellt wie in Abbildung 29 dargestellt.

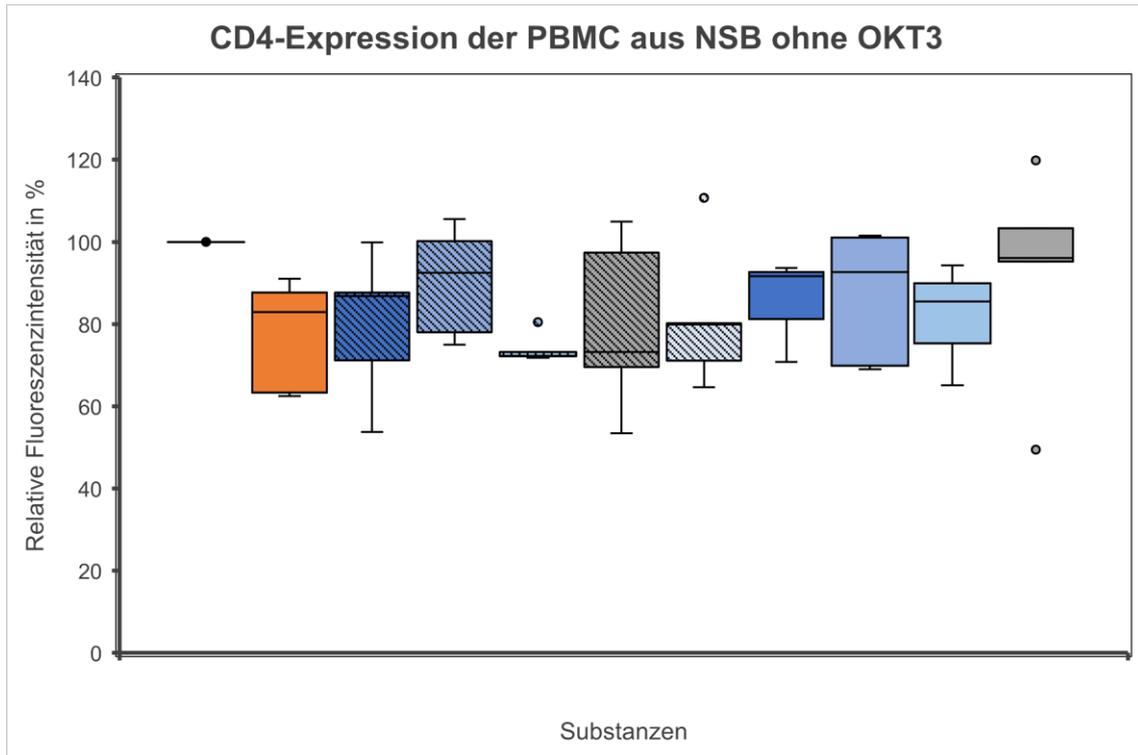


Abbildung 29: CD4-Expression der PBMC aus NSB ohne OKT3; als relative FI dargestellt mit Medianen, Interquartilsabständen und oberem/unterem Whisker, mit Ausreißern dargestellt. Kontrollgruppe auf 100% festgesetzt. n=5 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=3 für C16:0 und C14:0. Abkürzungen: FI – Fluoreszenzintensität, NSB – Nabelschnurblut, PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen. Farbakürzungen siehe Legende zu Abbildung 10.

### 3.6.3 Anteil der CD25+-Zellen an CD4+-Zellen

Weder mit noch ohne OKT kam es zu keiner signifikanten Änderung des Anteils an CD25+-Zellen an CD4+-Zellen der PBMC aus NSB (Versuche mit/ohne OKT3: n=6/5 für Kontrolle, Curosurf®, PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0, PC14:0/16:0, PC16:0/18:1, C18:1, C16:1; n=3 für C16:0 und C14:0).

## 4. Diskussion

Die Surfactant-Zusammensetzung besteht aus vielen verschiedenen Bestandteilen. Hier sind in erster Linie Phospholipide zu nennen, dann Neutrallipide und schließlich Surfactant-spezifische Proteine (SP-A bis SP-D) sowie Kalzium-Ionen.

Das 1,2-Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/16:0) ist ein Hauptbestandteil der Phospholipidfraktion des Surfactant. Zusammen mit Palmitoyl-Myristoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/14:0) und Palmitoyl-Palmitoleoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/16:1) macht es ca. 75-80% der Phospholipidfraktion des Surfactant aus. Die Zusammensetzung des Surfactant ändert sich im Laufe der alveolären Entwicklung. Der Anteil von PC16:0/14:0 und PC16:0/16:0 steigt, um die Oberflächenspannung zu reduzieren. Der Anteil von Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/18:1) sinkt. Die Konzentration von PC16:0/14:0 sinkt jedoch bei Lungenerkrankungen wie z.B. der bronchopulmonalen Dysplasie oder dem Lungenemphysem ab (Bernhard et al., 2001; Ridsdale et al., 2005).

Durch die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) entsteht eine hydrolytische Spaltung der Fettsäure an der sn<sub>2</sub>-Position der Phospholipide, wodurch eine freie Fettsäure und Lysophosphatidylcholin (LPC) entsteht. Es wurde eine erhöhte Aktivität der PLA<sub>2</sub> bei Asthma, ARDS, akuter Pankreatitis und Prostata-Ca gesehen. Die Spaltprodukte sollen die Surfactant-Funktion beeinflussen, indem die Reduktion der Oberflächenspannung beeinträchtigt wird (Hall et al., 1992). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass PC16:0/16:0 die durch den Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose hemmt und LPC die Phagozytose steigert (Morito et al., 2000).

In unseren Experimenten wurden Makrophagen verwendet, die sich aus PBMC entwickelten und noch keinen Kontakt zu Surfactant-Bestandteilen hatten. Diese „Surfactant-naiven“ Makrophagen sind noch unbeeinflusst von immunmodulatorischen Effekten der Surfactant-Bestandteile. Im Gegensatz hierzu stehen die Alveolarmakrophagen, die bereits mit Surfactant in Kontakt kamen. Im Hinblick auf die Pathophysiologie einer pulmonalen Inflammationsreaktion wandern ebenfalls „Surfactant-naive“ PBMC in das Lungengewebe ein. Die Verminderung der dort ansässigen Alveolarmakrophagen ist hierfür Ausschlag gebend. Die eingewanderten PBMC

kommen erst dann mit Surfactant in Kontakt und unterliegen ggf. dort dann möglichen immunmodulatorischen Effekten (Sherman et al., 1994; Gille et al., 2006).

Die Effekte der einzelnen Surfactant-Bestandteile auf sowohl die Phagozytose-Kapazität als auch den Phänotyp zu untersuchen ist essentiell, um sowohl die physiologischen Prozesse als auch die Pathophysiologie bei z.B. ARDS, Lungenemphysem, bronchopulmonaler Dysplasie etc. zu verstehen. In vivo beeinflusst schließlich der gesamte Surfactant-Komplex mit allen Komponenten die Homöostase des Alveolarraumes. Im Hinblick auf pathologische Veränderungen wie z.B. inflammatorische Prozesse oder Surfactant-Mangel beim Atemnotsyndrom der Frühgeborenen und mögliche therapeutische Interventionen kann die Kenntnis über die Effekte der einzelnen Surfactant-Bestandteile den therapeutischen Ansatz grundlegend beeinflussen. Dies betrifft besonders die Surfactant-Applikation bei Frühgeborenen. Das Ziel ist es, therapeutischen Surfactant perspektivisch aus Einzelbestandteilen so herzustellen, dass Komponenten, die z.B. die Phagozytose positiv beeinflussen oder andere positive immunologische Effekte erzielen, zu einem größeren Anteil verwendet werden als solche, für die ein negativer Effekt wie z.B. eine Hemmung der Phagozytose-Kapazität beschrieben wurde.

Im Vergleich zu den Effekten auf Makrophagen aus Erwachsenenblut wurden Makrophagen aus NSB verwendet mit der Hypothese, dass die Surfactant-Bestandteile unterschiedliche Auswirkungen auf die beiden Zellpopulationen haben.

### **Unspezifische Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems der Lunge nach Inkubation mit Surfactant-Bestandteilen**

Die erste Versuchsreihe beschreibt den Phagozytose-Index (CD14<sup>+</sup>-, GFP<sup>+</sup>-Makrophagen: CD14<sup>+</sup>-Makrophagen) der PBMC aus PB, also den Anteil von CD14-positiven, gfp-positiven Makrophagen an CD14-positiven Makrophagen zum einen mit und ohne Zugabe von polyvalenten IgG (Polyglobin) unter dem Einfluss der einzelnen PC (PC16:0/16:0, PC16:0/16:1, PC16:0/14:0,

PC14:0/16:0, PC16:0/18:1) sowie den FS C18:1, C16:1, C16:0 und C14:0 im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Lipid-Zugabe.

Unter Zugabe von PC16:0/16:0 ohne Polyglobin-Zugabe kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer sehr signifikanten Verminderung des Phagozytose-Index (Gille et al., 2006). Mit PC14:0/16:0 wurde ebenfalls ohne Polyglobin eine signifikante Verminderung festgestellt.

Im Versuchsansatz mit NSB wurde der Phagozytose-Index höchst signifikant reduziert nach Inkubation mit PC16:0/16:0 ohne zusätzliche Polyglobin-Zugabe. Mit Polyglobin und somit unter opsonierten Bakterien war dieser Effekt mit PC16:0/16:0 zwar tendenziell sichtbar, allerdings nicht signifikant.

Mit PC16:0/14:0 kam es ohne Polyglobin-Zugabe bei den Versuchen mit NSB ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung des Phagozytose-Index. Diese Versuche bestätigen die Hypothese, dass Surfactant-Bestandteile einen Effekt auf das angeborene Immunsystem haben, indem der Phagozytose-Index signifikant vermindert wurde. Mit opsonierten Bakterien durch Polyglobin konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden.

Polyglobin hat antiinfektiöse Eigenschaften (Collins et al. 1987; Fisher et al., 1958). Unsere Ergebnisse untermauern diesen Effekt, dass die Zugabe von Polyglobin eine durch PC16:0/16:0 bzw. PC16:0/14:0 und PC14:0/16:0 ausgelöste Verminderung des Phagozytose-Index verhindert.

Die Phagozytose-Kapazität (gemessen in mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) der CD14<sup>+</sup>-Makrophagen, was der bakteriellen Beladung entspricht) von PBMC aus PB wurde nach Inkubation jeweils mit PC16:0/16:0 (Gille et al., 2006) und mit PC14:0/16:0 ohne Polyglobin sehr signifikant vermindert.

In dem Versuchsansatz mit PBMC aus PB kam es mit Polyglobin zu einem signifikanten Effekt: mit PC16:0/16:0 und PC14:0/16:0 wurde eine sehr signifikante Verminderung der Phagozytose-Kapazität nachgewiesen. Dies steht im Gegensatz zum neutralisierenden Effekt von Polyglobin auf den Phagozytose-Index.

Im Versuchsansatz mit PBMC aus NSB wurde für PC16:0/16:0 und PC14:0/16:0 eine höchst signifikante, für PC16:0/14:0 eine sehr signifikante sowie für das ubiquitär in Zellmembranen von Eukaryonten vorkommende PC16:0/18:1 eine

signifikante Verminderung der Phagozytose-Kapazität ohne Zugabe von Polyglobin festgestellt.

Mit Polyglobin wurde die Phagozytose-Kapazität der PBMC aus NSB mit Curosurf® und PC16:0/16:0 sehr signifikant und mit PC16:0/14:0 signifikant verringert.

In Zusammenschau der Ergebnisse wurde ein hemmender Effekt eines der Hauptbestandteile des Surfactant, nämlich PC16:0/16:0 auf sowohl den Phagozytose-Index als auch die Phagozytose-Kapazität der PBMC aus PB und aus NSB ohne Polyglobin-Zugabe nachgewiesen, sowie auf die Phagozytose-Kapazität beider Übergruppen mit Polyglobin. Der Phagozytose-Index wurde zudem noch von einem wichtigen Surfactant-Bestandteil, PC16:0/14:0, in der Versuchsreihe der PBMC aus PB und mit PC14:0/16:0 bei PBMC aus NSB vermindert, jeweils ohne Polyglobin-Zugabe. Es wurde ferner in einem Teil der Versuche bestätigt, dass der Einsatz des Immunglobulins Polyglobin diese Effekte der Surfactant-Bestandteile auf die Phagozytose verhindert.

Die Hypothese, dass Surfactant-Bestandteile nicht nur physikalische Eigenschaften im alveolären Raum besitzen, sondern vielmehr auch für immunologische Effekte verantwortlich sind, wird durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt. Polyglobin hebt diese Effekte teilweise wieder auf.

Es lässt sich zudem vermuten, dass PBMC aus NSB anfälliger für Immunmodulatoren in Form von PC als Surfactant-Bestandteile sind als jene Zellen aus PB. Bei dem Versuchsansatz mit NSB führten sowohl PC16:0/16:0 als auch PC16:0/14:0, PC14:0/16:0 und PC16:0/18:1 zu einer Verminderung des Phagozytose-Index (ohne Polyglobin). Im Gegensatz hierzu wurde bei den PB-Zellen nur bei 2 Substanzen ein verminderter Phagozytose-Index nachgewiesen. Der Versuchsansatz der Zellen aus NSB mit Polyglobin ergab zudem signifikante Ergebnisse in Bezug auf die Verminderung des Phagozytose-Index nach der Inkubation mit folgenden 3 Substanzen: Curosurf®, PC16:0/16:0 und PC16:0/14:0.

Die erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen von Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen ist nicht durch eine unterschiedliche Anzahl von

mononukleären Zellen oder einen Unterschied in der Phagozytose-Kapazität im Vergleich zu Adulten zu erklären (Dretschmer et al., 1976; Orłowski et al., 1976; Speer et al., 1988; Gille et al., 2006). Der Grund für die erhöhte Anfälligkeit der PBMC aus NSB im Vergleich zu denen aus PB für die o.g. immunmodulatorischen Effekte der PC ist noch unklar. Es bedarf hier weiterer Untersuchungen.

Es wurden keine signifikanten Änderungen festgestellt bezüglich der Expression des für die Erkennung des LPS der bakteriellen Zellwand wichtigen Oberflächenmarkers CD14 der phagozytierenden PBMC von Adulten nach Inkubation mit den 10 getesteten Substanzen ohne Polyglobin.

Mit Polyglobin und nach Inkubation mit PC16:0/16:0 wurde jedoch eine signifikante Verminderung der CD14-Expression der phagozytierenden PBMC festgestellt.

Dies untermauert wiederum die Hypothese, dass Surfactant-Bestandteile immunmodulatorische Effekte aufweisen. Insbesondere PC16:0/16:0 scheint hier eine besondere Rolle zuzukommen. In vorangegangenen Studien wurde bereits eine verminderte Expression des Oberflächenmarkers CD14 nach Inkubation mit Surfactant-Lipiden bei Monozyten der Zelllinie THP-1 beschrieben sowie eine erhöhte CD14-Expression durch SP-A (Kremlev et al., 1997).

Die Expression des Oberflächenmarkers CD14 von nicht phagozytierenden PBMC von Adulten wurde durch keine der getesteten Substanzen beeinflusst (für PC16:0/18:1 gezeigt von Gille et al., 2006). Dies galt für die Versuchsreihen mit und ohne Polyglobin.

In der Versuchsgruppe der phagozytierenden PBMC aus NSB ergab sich kein signifikanter Effekt auf die Expression des Oberflächenmarkers CD14 mit den getesteten Surfactant-Bestandteilen oder dem Fertig-Surfactant Curosurf® ohne Polyglobin-Zugabe.

Ebenso verhielt sich das Ergebnis der Versuchsreihe mit nicht phagozytierenden PBMC aus NSB: auch hier konnte kein Effekt auf die Expression von CD14 nach Inkubation mit den genannten Substanzen festgestellt werden.

Mit Polyglobin wurde jedoch sowohl im Versuchsansatz mit phagozytierenden als auch mit nicht-phagozytierenden PBMC aus NSB eine signifikante Verminderung der CD14-Expression in Anwesenheit von PC16:0/14:0 festgestellt.

Es bedarf weiterer Versuche mit ggf. einer veränderten Konzentration der Surfactant-Bestandteile oder einer verlängerten Inkubationszeit der untersuchten Substanzen, um die vorliegenden heterogenen Ergebnisse weiter zu analysieren.

### **Veränderungen des Phänotyps der PBMC nach Inkubation mit Surfactant-Bestandteilen**

In dieser Versuchsreihe wurde die Expression der Oberflächenantigene CD14, CD80, CD86 und HLA-DR der isolierten PBMC aus PB nach Inkubation mit den 10 bereits erwähnten Substanzen untersucht.

Es wurde eine sehr signifikante Reduktion der CD14-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Lipid mit PC16:0/14:0 festgestellt. PC16:0/14:0 kommt eine besondere Bedeutung zu, da dies im Laufe der alveolären Entwicklung zunehmend von den Typ II-Pneumozyten gebildet wird und für die Reduktion der Oberflächenspannung zusammen mit PC16:0/16:0 verantwortlich ist.

Frühere Studien belegen eine positive Korrelation der Atemfrequenz und des Anteils an PC16:0/14:0 und PC16:0/16:0 bei folgenden Säugetieren: Mäusen, Ratten und Schweinen (Bernhard et al., 2001).

Numata et al. konnten im Jahr 2010 zeigen, dass durch den Surfactant-Bestandteil Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylglycerol (PG16:0/18:1) eine Infektion und Inflammation durch das RSV-Virus verhindert werden kann. Dies wird durch Interaktion des PG16:0/18:1 mit dem TLR4 hervorgerufen. Dieser bildet zusammen mit CD14 die AgBS für das LPS der gramnegativen Bakterien.

Die hier vorliegende Versuchsreihe bestätigt eine verminderte CD14-Expression durch die Surfactant-Komponente PC16:0/14:0 bei PB (Gille et al., 2006). Dies könnte eine verschlechterte Immunabwehr in Anwesenheit von PC16:0/14:0 bedeuten. Versuche an Mäusen mit einer Depletion von CD14 bestätigten, dass eine niedrige LPS-Stimulation zu keiner Makrophagen-Aktivierung führte und auch weniger Zytokine sezerniert wurden (Moore et al., 2000). Eine vermehrte CD14-Expression der Monozyten-Zelllinie THP-1 durch das Surfactant-Protein A

ist bereits von Kremlev et al. vorbeschrieben. Durch die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Lipidbestandteilen des Surfactant wurde diese vermehrte CD14-Expression wieder blockiert (Kremlev et al., 1997). Die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen einen inhibierenden Effekt auf die CD14-Expression durch einzelne Surfactant-Lipide.

Im Versuchsansatz der PBMC aus NSB wurde kein signifikanter Effekt der Surfactant-Lipide oder Curosurf® auf die Expression des Oberflächenantigens CD14 nachgewiesen.

Die Analyse der Expression des Oberflächenmarkers HLA-DR ergab weder für die Monozyten aus PB noch für die aus NSB eine signifikante Änderung nach Inkubation mit den Surfactant-Lipiden oder mit Curosurf®.

Die Hypothese, dass Surfactant-Bestandteile, bzw. die hier getesteten PC oder freien FS einen Effekt auf die Expression von HLA-DR und somit über diesen Weg einen Effekt auf die angeborene Immunabwehr haben, wurde in diesen Versuchen nicht bestätigt. Vorhergehende Studien konnten den Einfluss der HLA-DR-Expression auf die Immunabwehr belegen: Eine negative Korrelation einer niedrigen HLA-DR-Expression auf humanen Leukozyten mit einer erhöhten Mortalität bei septischem Schock wurde bereits 2006 gezeigt (Monneret et al.). Kampalath et al. zeigten 1998 eine niedrigere CD4- und HLA-DR-Expression bei PBMC aus NSB im Vergleich zu PBMC aus PB. Es wurde zudem nachgewiesen, dass ca. 10% der CD14-positiven Monozyten weder CD4 noch HLA-DR exprimierten. Dies könnte die beeinträchtigte Immunantwort bei Neugeborenen mitbegründen. Auch El-Mohandes et al. konnten 1995 zeigen, dass HLA-DR auf PBMC aus NSB vermindert exprimiert wird.

Im Jahr 2004 zeigten Hallwirth et al., dass bei Frühgeborenen mit einem sehr niedrigen Geburtsgewicht (Geburt zwischen der 24. und 31. Gestationswoche) die Phagozytose-Kapazität und die CD64-Expression der PBMC aus NSB am höchsten war im Vergleich zu Frühgeborenen der 32. bis 36. Gestationswoche und im Vergleich zu Termingeborenen. Die HLA-DR-Expression war jedoch signifikant reduziert bei Frühgeborenen mit einem sehr niedrigen Geburtsgewicht. Hieraus schlossen die Autoren, dass dies zu einer erniedrigten Kapazität führt, Antigen zu präsentieren. Zudem wurde postuliert, dass

Monozyten verschiedene funktionelle Eigenschaften im Laufe der fortschreitenden Schwangerschaft haben. Laut den Autoren ist dies ein möglicher Grund für die hohe Inzidenz von Infektionen bei Frühgeborenen mit einem sehr niedrigen Geburtsgewicht.

Mit einer weiteren Versuchsreihe für diese Arbeit wurde der Effekt der Surfactant-Bestandteile bzw. des Fertig-Surfactant Curosurf® auf den Anteil an CD80-positiven Makrophagen untersucht. Sowohl im Ansatz mit PBMC aus PB als auch im Ansatz mit den Zellen aus NSB wurde kein signifikanter Effekt beobachtet.

Die Expression von CD86 wurde durch die bereits genannten Substanzen ebenfalls nicht signifikant beeinflusst – weder im Ansatz mit PB noch in dem mit NSB.

Der Zusammenhang einer vermehrten oder verminderten Expression von CD80 bzw. CD86 mit immunmodulatorischen Effekten wurde in der Vergangenheit bereits nachgewiesen: IFN-gamma verursacht eine Differenzierung der Makrophagen durch Hochregulation der CD80- und CD86-Expression. IL-10 kann die Expression von CD80 und CD86 reduzieren. Dies führt zu einer Zerstörung von T-Zellen durch Makrophagen und somit zu einer beeinträchtigten Immunantwort (Orlikowsky et al., 1999).

Die Hypothese, dass Surfactant-Bestandteile einen Effekt auf den Phänotyp von Monozyten und somit auf die Immunitätslage haben, wurde in diesen Versuchen für HLA-DR, CD80 und CD86 nicht bestätigt (für PB und PC16:0/16:0 und PC16:0/18:1 gezeigt von Gille et al., 2006).

### **Veränderungen des Phänotyps der PBMC nach Inkubation mit Surfactant-Bestandteilen bzw. FS und OKT3**

Die Auswirkung von Surfactant-Bestandteilen und FS auf die adaptive Immunantwort und somit die T-Zell-Stimulation war das Thema dieser Versuchsreihen.

CD28 ist ein Oberflächenantigen der T-Zellen und ist an der Aktivierung von T-Zellen über die Bindung mit CD80 und CD86 der antigenpräsentierenden Zelle beteiligt.

CD4 als Co-Rezeptor des TCR dient der Antigenerkennung durch den TCR. CD4+-T-Lymphozyten werden als T-Helferzellen bezeichnet.

CD4+/CD25+-Zellen, sogenannte regulatorische T-Zellen (Treg), verhindern eine Aktivierung des Immunsystems und produzieren die Zytokine IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$ .

Anti-CD3-Ak (OKT3) wurde der Hälfte der Versuche zur T-Zell-Stimulation zugegeben. Die vorliegenden Versuche zeigten einen signifikanten Effekt vieler der getesteten Substanzen auf die CD28-Expression mit OKT3. Dies gilt sowohl für den Ansatz mit PB als auch für den mit NSB. In der Versuchsreihe mit Zellen aus PB wurde eine signifikante Verminderung der CD28-Expression mit Curosurf® (Gille et al., 2006) und C14:0 festgestellt. In der NSB-Versuchsreihe verursachten fünf Substanzen eine unterschiedlich signifikante Verminderung der CD28-Expression: mit PC16:0/14:0 wurde eine höchst signifikante, mit Curosurf® eine sehr signifikante und mit PC14:0/16:0, C18:1 und C16:0 eine signifikante Verminderung nachgewiesen.

Ohne OKT3 wurde für PC16:0/14:0 eine höchst signifikante Verminderung der CD28-Expression im Ansatz mit PB festgestellt. Die NSB-Versuchsreihe lieferte eine sehr signifikant verminderte CD28-Expression nach Inkubation mit PC16:0/14:0.

Die CD4-Expression der PBMC aus PB wurde weder mit OKT3 noch ohne OKT3 durch eine der getesteten Substanzen signifikant beeinflusst.

Die Versuche mit NSB zeigten nach Inkubation mit Curosurf® und mit OKT3 eine sehr signifikant verminderte CD4-Expression. Ohne OKT3 wurde kein signifikanter Effekt nachgewiesen.

Der Anteil CD25+-Zellen an CD4+-Zellen, der Treg, wurde in beiden Versuchsgruppen (PB und NSB) weder mit noch ohne OKT3 durch eine der Substanzen signifikant beeinflusst. Die Treg scheinen weder durch OKT3 noch durch Lipide stimuliert oder gehemmt zu werden.

Die Versuche zeigen deutlich, dass nach der Inkubation mit OKT3 zur T-Zell-Stimulation mehr der untersuchten Substanzen signifikante Effekte auf die Expression der Oberflächenantigene CD28 und CD4 ausüben als ohne die Stimulation durch OKT3. Dies hat möglicherweise quantitative sowie qualitative

Ursachen: zum einen die erhöhte Rezeptordichte der durch OKT3 stimulierten T-Zellen und zum anderen die vermutete erhöhte Empfindlichkeit der Rezeptoren nach OKT3-Stimulation.

Ebenso scheinen die Zellen aus NSB empfänglicher auf die getesteten Substanzen zu reagieren, da hier fünf Substanzen zu einer verminderten CD28-Expression geführt haben. Im Vergleich dazu wurde die CD28-Expression der PBMC aus PB nur durch zwei Substanzen vermindert. Dieser Effekt der erhöhten Empfindlichkeit der NSB-Zellen auf immunmodulatorische Substanzen könnte eine der Ursachen für die reduzierte Immunität von Neugeborenen sein.

### **Schlussfolgerung**

Die zweifach gesättigten PC16:0/16:0, PC16:0/14:0 und PC14:0/16:0 hatten in Zusammenschau aller Daten am häufigsten einen Effekt in Bezug auf Phagozytose und Phänotyp auf die mononukleären Zellen. Keine der freien FS erzielte einen signifikanten Effekt, genauso wenig wie das einfach ungesättigte PC16:0/16:1. Das ebenfalls einfach ungesättigte PC16:0/18:1 führte nur in einer Versuchsreihe zu einem signifikanten Effekt: es induzierte eine signifikante Verminderung der Phagozytose-Kapazität ohne Polyglobin-Zugabe bei PBMC aus NSB. PC16:0/18:1 kommt in der Zellmembran von Eukaryonten vor. Zudem kommt es mehr im Lungengewebe selbst vor als sezerniert im Alveolarraum (Bernhard et al., 2001). Die ubiquitäre Präsenz dieses PC spiegelt sich möglicherweise in einer Art Neutralität in Bezug auf die Reaktionsfreudigkeit wider als sogenannte inerte Substanz. Dies könnte eine Erklärung für den fehlenden Effekt auf den Phänotyp sein.

Auch nach der Inkubation mit Curosurf® ergab sich nur in einer Versuchsreihe ein sehr signifikanter Effekt: eine verminderte Phagozytose-Kapazität mit Polyglobin bei PBMC aus NSB.

Unterschiedliche Phasenübergangstemperaturen der einzelnen PC (PC16:0/16:0 ist fest bei Körpertemperatur) sind ein möglicher kleiner Baustein für die Erklärung der unterschiedlichen Effekte. Sie erklären die oben genannten Ergebnisse aber nicht suffizient.

Das zweifach gesättigte und häufig zu den o.g. Effekten führende PC16:0/14:0 hat eine kurze Fettsäurekette, was möglicherweise die Reaktionsfähigkeit beeinflusst.

Die T-Zell-Versuche zeigen deutlich, dass unter der Inkubation mit OKT3 zur T-Zell-Stimulation mehrere der untersuchten Substanzen signifikante Effekte auf die Expression der Oberflächenantigene CD28 und CD4 ausüben. Dies hat möglicherweise quantitative sowie qualitative Ursachen: zum einen die erhöhte Rezeptordichte der durch OKT3 stimulierten T-Zellen und zum anderen die vermutete erhöhte Empfindlichkeit der Rezeptoren nach OKT3-Stimulation.

CD25+/CD4+-Zellen wurden jedoch in keinem Versuch signifikant beeinflusst.

Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Surfactant-Bestandteile eindeutige immunmodulatorische Effekte ausüben. In allen Versuchsreihen wirkten sich die Effekte der Lipide inhibitorisch auf die Immunkompetenz der Zellen aus: die Phagozytose-Kapazität sowie der Phagozytose-Index wurden vermindert, ebenso die Expression der Oberflächenantigene CD14, CD4 und CD 28.

Zudem scheinen PBMC aus NSB anfälliger auf eben diese Substanzen zu reagieren.

Über die pathophysiologischen und biochemischen Mechanismen, die diese Effekte verursachen, kann ohne weitere Versuchsreihen keine genaue Aussage getroffen werden.

Um der Fragestellung weiter nachzugehen, in welcher Ausprägung Surfactant-Bestandteile bzw. FS Effekte auf die Phagozytose oder den Phänotyp der PBMC haben, sollten weitere Versuchsreihen folgen mit modifizierten Parametern wie z.B. unterschiedlichen Konzentrationen der Surfactant-Bestandteile oder einer prolongierten Inkubation der Monozyten mit Surfactant-Bestandteilen.

## 5. Zusammenfassung

In dieser experimentellen Arbeit wurden Effekte von Surfactant-Lipiden auf differenzierende monozytäre Zellen als Modell für Alveolarmakrophagen untersucht.

Hintergrund ist die erhöhte Infektanfälligkeit und hohe Inzidenz pulmonaler Infektionen bei Frühgeborenen. Die postnatale Surfactant-Gabe ist therapeutischer Standard der Therapie des Atemnotsyndroms Frühgeborener in der Neonatologie. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Surfactant-Lipiden auf differenzierende mononukleäre Blutzellen geprüft.

Die Effekte von Surfactant-Bestandteilen (Phosphatidylcholine), ihrer Fettsäuren und des klinisch verwendeten Surfactant-Präparats Curosurf® auf periphere mononukleäre Blutzellen wurde untersucht an mononukleären Blutzellen Erwachsener sowie von Nabelschnurblut. Zielparameter waren Veränderungen der Phagozytose-Kapazität bzw. des Phagozytose-Index und potentielle Unterschiede zwischen den Erwachsenen und reifen Neugeborenen. Die Hälfte der Proben wurde mit polyvalentem Immunglobulin versetzt. Des Weiteren wurden die Effekte auf die Expression von Oberflächenmarkern analysiert (CD14, CD86, CD80 und HLA-DR).

Die dritte Versuchsreihe beinhaltete die Analyse der Oberflächenmarker von T-Zellen (CD4+, CD28+ und CD25+) mit und ohne Stimulation durch den murinen, monoklonalen CD3-Rezeptor-Antikörper OKT3. Es wurden immunmodulierende Effekte surfactant-spezifischer Phosphatidylcholine, Curosurf® und einzelner Fettsäuren nachgewiesen.

Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/16:0), Hauptbestandteil des humanen Surfactant, erniedrigt ohne Polyglobin den Phagozytose-Index sowohl bei den Zellen Erwachsener als auch des Nabelschnurblutes. Mit Myristoyl-Palmitoyl-PC (PC14:0/16:0) wurde dies bei Erwachsenen und mit Palmitoyl-Myristoyl-PC (PC16:0/14:0) bei Nabelschnurblutzellen gefunden. Die Phagozytose-Kapazität wurde durch Dipalmitoyl-PC, Palmitoyl-Myristoyl-PC und Myristoyl-Palmitoyl-PC bei Erwachsenen- und Nabelschnurblutzellen (ohne Polyglobin) vermindert. Palmitoyl-Oleoyl-PC (PC16:0/18:1) erzielte diesen Effekt zudem bei

Nabelschnurblut. In Anwesenheit von Polyglobin wurde eine verminderte Phagozytose-Kapazität durch Dipalmitoyl-PC und Myristoyl-Palmitoyl-PC bei den Zellen Erwachsener und durch Curosurf®, Dipalmitoyl-PC und Palmitoyl-Myristoyl-PC bei Nabelschnurblut festgestellt.

Dipalmitoyl-PC verminderte die CD14-Expression phagozytischer Zellen aus Erwachsenenblut mit Polyglobin, Palmitoyl-Myristoyl-PC mit Nabelschnurblut sowohl bei phagozytierenden als auch bei nicht-phagozytierenden monozytären Zellen. Dipalmitoyl-PC verursachte eine Verminderung von Phagozytose-Index und -Kapazität. Analoge Wirkungen hatten Palmitoyl-Myristoyl-PC und Myristoyl-Palmitoyl-PC, nicht aber die Fettsäuren.

Palmitoyl-Myristoyl-PC verminderte bei Zellen Erwachsener die CD14-Expression, nicht aber die Oberflächenmarker HLA-DR, CD86 und CD80+/CD86+. T-Zellen mit und ohne OKT3-Stimulation zeigten bei Erwachsenen mit OKT3 eine Reduktion der CD28-Expression unter Curosurf® und auch mit Myristinsäure (C14:0), ohne OKT3 durch Palmitoyl-Myristoyl-PC.

Im Nabelschnurblut-Ansatz wurde eine Reduktion der CD28-Expression mit OKT3 bei Palmitoyl-Myristoyl-PC, Curosurf®, Myristoyl-Palmitoyl-PC, Ölsäure (C18:1) und Palmitinsäure (C16:0) nachgewiesen. Ohne OKT3 wurde dieser Effekt bei Palmitoyl-Myristoyl-PC festgestellt. Curosurf® verminderte zudem die CD4-Expression OKT3-stimulierter Zellen aus Nabelschnurblut. OKT3 scheint die Zellen aus Nabelschnurblut anfälliger für die immunmodulatorischen Effekte der Lipide zu machen. Auf CD4 im Erwachsenenblut-Ansatz sowie auf die CD25+/CD4+-Zellen sowohl bei Blut von Erwachsenen als auch bei Nabelschnurblut wurden keine Effekte festgestellt. Offensichtlich hat das surfactant-spezifische Lipidgemisch einen Einfluss auf die Immunfunktion der Alveolarmakrophagen. Dabei zeigten sich differenzierte Effekte der einzelnen Substanzen auf die Phagozytose, den Phänotyp und die T-Zell-Proliferation.

Die inhibitorischen, immunmodulatorischen Effekte der Phosphatidylcholine und Fettsäuren sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Surfactant-Phospholipide spielen offenbar eine Rolle in der Makrophagenfunktion und Differenzierung sowie T-Zellaktivierung. Dies kann für das Lipid-Design synthetisch hergestellter therapeutischer Surfactants von großer Bedeutung sein.

## 6. Literaturverzeichnis

- Agassandian M, Mallampalli RK. Surfactant phospholipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Mar;1831(3):612-25. doi: 10.1016/j.bbali.2012.09.010. Epub 2012 Sep 29. PMID: 23026158; PMCID: PMC3562414.
- Alcorn JF, Wright JR. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem*. 2004 Jul 16;279(29):30871-9. doi: 10.1074/jbc.M400796200. Epub 2004 May 3. PMID: 15123664.
- Amboss GmbH, Berlin und Köln, Germany; [https://www.amboss.com/de/wissen/Spezifisches\\_Immunsystem/](https://www.amboss.com/de/wissen/Spezifisches_Immunsystem/); 18.3.2019
- Baritussio AG, Magoon MW, Goerke J, Clements JA. Precursor-product relationship between rabbit type II cell lamellar bodies and alveolar surface-active material. Surfactant turnover time. *Biochim Biophys Acta*. 1981 Dec 23;666(3):382-93. doi: 10.1016/0005-2760(81)90297-6. PMID: 6895699.
- Barlett, G R. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem*. 1959 Mar;234(3):466-8. PMID: 13641241.
- Barros MH, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One*. 2013 Nov 15;8(11): e80908. doi: 10.1371/journal.pone.0080908. PMID: 24260507; PMCID: PMC3829941.
- Batenburg JJ. Surfactant phospholipids: synthesis and storage. *Am J Physiol*. 1992 Apr;262(4 Pt 1):L367-85. doi: 10.1152/ajplung.1992.262.4.L367. PMID: 1566854.
- Bernhard W, 82 - Regulation of Surfactant-Associated Phospholipid Synthesis and Secretion, Editor(s): Richard A. Polin, Steven H. Abman, David H. Rowitch, William E. Benitz, William W. Fox, *Fetal and Neonatal Physiology (Fifth Edition)*, Elsevier, 2017, Pages 813-824.e6, ISBN 9780323352147, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35214-7.00082-2>.
- Bernhard W, Gebert A, Vieten G, Rau GA, Hohlfeld JM, Postle AD, Freihorst J. Pulmonary surfactant in birds: coping with surface tension in a tubular lung. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001 Jul;281(1):R327-37. doi: 10.1152/ajpregu.2001.281.1.R327. PMID: 11404309.
- Bernhard W, Haslam PL, Floros J. From birds to humans: new concepts on airways relative to alveolar surfactant. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Jan;30(1):6-11. doi: 10.1165/rcmb.2003-0158TR. PMID: 14678944.
- Bernhard W, Hoffmann S, Dombrowsky H, Rau GA, Kamlage A, Kappler M, Haitzma JJ, Freihorst J, von der Hardt H, Poets CF. Phosphatidylcholine molecular species in lung surfactant: composition in relation to respiratory rate and lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Dec;25(6):725-31. doi: 10.1165/ajrcmb.25.6.4616. PMID: 11726398.
- Bernhard W, Mottaghian J, Gebert A, Rau GA, von Der HARDT H, Poets CF. Commercial versus native surfactants. Surface activity, molecular components, and the effect of calcium. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Oct;162(4 Pt 1):1524-33. doi: 10.1164/ajrccm.162.4.9908104. PMID: 11029372.

- Bernhard W, Pynn CJ, Jaworski A, Rau GA, Hohlfeld JM, Freihorst J, Poets CF, Stoll D, Postle AD. Mass spectrometric analysis of surfactant metabolism in human volunteers using deuterated choline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Jul 1;170(1):54-8. doi: 10.1164/rccm.200401-089OC. Epub 2004 Mar 24. PMID: 15044202.
- Bernhard W, Raith M, Pynn CJ, Gille C, Stichtenoth G, Stoll D, Schleicher E, Poets CF. Increased palmitoyl-myristoyl-phosphatidylcholine in neonatal rat surfactant is lung specific and correlates with oral myristic acid supply. *J Appl Physiol (1985)*. 2011 Aug;111(2):449-57. doi: 10.1152/jappphysiol.00766.2010. Epub 2011 Jun 2. PMID: 21636561.
- Bertrand JY, Jalil A, Klaine M, Jung S, Cumano A, Godin I. Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood*. 2005 Nov 1;106(9):3004-11. doi: 10.1182/blood-2005-02-0461. Epub 2005 Jul 14. PMID: 16020514.
- Bertrand JY, Giroux S, Golub R, Klaine M, Jalil A, Boucontet L, Godin I, Cumano A. Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 4;102(1):134-9. doi: 10.1073/pnas.0402270102. Epub 2004 Dec 27. PMID: 15623562; PMCID: PMC544043.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959 Aug;37(8):911-7. doi: 10.1139/o59-099. PMID: 13671378.
- Boeddha NP, Kerklaan D, Dunbar A, van Puffelen E, Nagtzaam NMA, Vanhorebeek I, Van den Berghe G, Hazelzet JA, Joosten KF, Verbruggen SC, Dik WA, Driessen GJ. HLA-DR Expression on Monocyte Subsets in Critically Ill Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2018 Oct;37(10):1034-1040. doi: 10.1097/INF.0000000000001990. PMID: 29570588.
- Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest*. 2017 Jan;97(1):4-13. doi: 10.1038/labinvest.2016.116. Epub 2016 Nov 21. PMID: 27869795.
- Cogo PE, Toffolo GM, Ori C, Vianello A, Chierici M, Gucciardi A, Cobelli C, Baritussio A, Carnielli VP. Surfactant disaturated-phosphatidylcholine kinetics in acute respiratory distress syndrome by stable isotopes and a two compartment model. *Respir Res*. 2007 Feb 21;8(1):13. doi: 10.1186/1465-9921-8-13. PMID: 17313681; PMCID: PMC1819376.
- Collins MS, Hector RF, Roby RE *et al*. Prophylaxe gramnegativer und grampositiver Infektionen mit drei intravenösen Immunglobulin-Präparaten und Therapie der experimentellen polymikrobiellen Verbrennungssepsis mit intravenösem Pseudomonas-Immunglobulin G und Ciprofloxacin im Tiermodell. *Infection* 15, S51–S59 (1987).
- Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol*. 2001 Mar;2(3):203-9. doi: 10.1038/85251. PMID: 11224518.
- Crocker PR, Gordon S. Properties and distribution of a lectin-like hemagglutinin differentially expressed by murine stromal tissue macrophages. *J Exp Med*. 1986 Dec 1;164(6):1862-75. doi: 10.1084/jem.164.6.1862. PMID: 3783087; PMCID: PMC2188478.

- Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, Olszewski MA. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *mBio*. 2013 Jun 18;4(3):e00264-13. doi: 10.1128/mBio.00264-13. PMID: 23781069; PMCID: PMC3684832.
- Dehio M, Knorre A, Lanz C, Dehio C. Construction of versatile high-level expression vectors for *Bartonella henselae* and the use of green fluorescent protein as a new expression marker. *Gene*. 1998 Jul 30;215(2):223-9. doi: 10.1016/s0378-1119(98)00319-9. PMID: 9714815.
- Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*. 1998 Apr 2;392(6675):505-9. doi: 10.1038/33169. PMID: 9548256.
- Didier C, Streicher MP, Chognot D, Campagni R, Schnebelen A, Messer J, Donato L, Langer B, Meyer N, Astruc D, Kuhn P. Late-onset neonatal infections: incidences and pathogens in the era of antenatal antibiotics. *Eur J Pediatr*. 2012 Apr;171(4):681-7. doi: 10.1007/s00431-011-1639-7. Epub 2011 Dec 2. PMID: 22134805.
- Dretschmer RR, Stewardson RB, Papierniak CK, Gotoff SP. Chemotactic and bactericidal capacities of human newborn monocytes. *J Immunol*. 1976 Oct;117(4):1303-7. PMID: 977952.
- Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J, Preisser L, Anegon I, Catala L, Ifrah N, Descamps P, Gamelin E, Gascan H, Hebbar M, Jeannin P. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4319-30. doi: 10.1182/blood-2007-02-072587. Epub 2007 Sep 11. PMID: 17848619.
- El-Mohandes AA, Rivas RA, Kiang E, Wahl LM, Katona IM. Membrane antigen and ligand receptor expression on neonatal monocytes. *Biol Neonate*. 1995;68(5):308-17. doi: 10.1159/000244251. PMID: 8835085.
- Fisher MW, Manning MC. Studies on the immunotherapy of bacterial infections. I. The comparative effectiveness of human gamma-globulin against various bacterial species in mice. *J Immunol*. 1958 Jul;81(1):29-31. PMID: 13563876.
- Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol*. 2007 Apr 15;178(8):5245-52. doi: 10.4049/jimmunol.178.8.5245. PMID: 17404308.
- Gause WC, Urban JF, Linsley P, Lu P. Role of B7 signaling in the differentiation of naive CD4+ T cells to effector interleukin-4-producing T helper cells. *Immunol Res*. 1995;14(3):176-88. doi: 10.1007/BF02918215. PMID: 8778208.
- Genel F, Atlihan F, Ozsu E, Ozbek E. Monocyte HLA-DR expression as predictor of poor outcome in neonates with late onset neonatal sepsis. *J Infect*. 2010 Mar;60(3):224-8. doi: 10.1016/j.jinf.2009.12.004. Epub 2009 Dec 16. PMID: 20025903.
- Gille C, Spring B, Tewes L, Poets CF, Orlikowsky T. A new method to quantify phagocytosis and intracellular degradation using green fluorescent protein-labeled *Escherichia coli*: comparison of cord blood macrophages and peripheral

blood macrophages of healthy adults. *Cytometry A*. 2006 Mar;69(3):152-4. doi: 10.1002/cyto.a.20222. PMID: 16479601.

- Gille C, Spring B, Bernhard W, Gebhard C, Basile D, Lauber K, Poets CF, Orlikowsky TW. Differential effect of surfactant and its saturated phosphatidylcholines on human blood macrophages. *J Lipid Res*. 2007 Feb;48(2):307-17. doi: 10.1194/jlr.M600451-JLR200. Epub 2006 Nov 10. PMID: 17099186.
- Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, Garner H, Trouillet C, de Bruijn MF, Geissmann F, Rodewald HR. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*. 2015 Feb 26;518(7540):547-51. doi: 10.1038/nature13989. Epub 2014 Dec 3. PMID: 25470051; PMCID: PMC5997177.
- Gonzalez Garay AG, Reveiz L, Velasco Hidalgo L, Solis Galicia C. Ambroxol for women at risk of preterm birth for preventing neonatal respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Oct 31;(10):CD009708. doi: 10.1002/14651858.CD009708.pub2. PMID: 25361381.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005 Dec;5(12):953-64. doi: 10.1038/nri1733. PMID: 16322748.
- Gortner L, Pohlandt F, Bartmann P, Bernsau U, Porz F, Hellwege HH, Seitz RC, Hieronimi G, Kuhls E, Jorch G, et al. High-dose versus low-dose bovine surfactant treatment in very premature infants. *Acta Paediatr*. 1994 Feb;83(2):135-41. doi: 10.1111/j.1651-2227.1994.tb13036.x. PMID: 8193488.
- Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 2001 Feb;13(2):85-94. doi: 10.1016/s0898-6568(00)00149-2. PMID: 11257452.
- Hall SB, Lu RZ, Venkitaraman AR, Hyde RW, Notter RH. Inhibition of pulmonary surfactant by oleic acid: mechanisms and characteristics. *J Appl Physiol* (1985). 1992 May;72(5):1708-16. doi: 10.1152/jappl.1992.72.5.1708. PMID: 1601776.
- Halliday HL, Tarnow-Mordi WO, Corcoran JD, Patterson CC. Multicentre randomised trial comparing high and low dose surfactant regimens for the treatment of respiratory distress syndrome (the Curosurf 4 trial). *Arch Dis Child*. 1993 Sep;69(3 Spec No):276-80. doi: 10.1136/adc.69.3\_spec\_no.276. PMID: 8215564; PMCID: PMC1029491.
- Hallwirth U, Pomberger G, Pollak A, Roth E, Spittler A. Monocyte switch in neonates: high phagocytic capacity and low HLA-DR expression in VLBWI are inverted during gestational aging. *Pediatr Allergy Immunol*. 2004 Dec;15(6):513-6. doi: 10.1111/j.1399-3038.2004.00168.x. PMID: 15610364.
- Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, García-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, Merad M. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013 Apr 18;38(4):792-804. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.004. PMID: 23601688; PMCID: PMC3853406.
- Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med*. 1994

- Aug 1;180(2):631-40. doi: 10.1084/jem.180.2.631. PMID: 7519245; PMCID: PMC2191623.
- Henderson FC, Miakotina OL, Mallampalli RK. Proapoptotic effects of *P. aeruginosa* involve inhibition of surfactant phosphatidylcholine synthesis. *J Lipid Res.* 2006 Oct;47(10):2314-24. doi: 10.1194/jlr.M600284-JLR200. Epub 2006 Jul 25. PMID: 16868337.
  - Herbein JF, Savov J, Wright JR. Binding and uptake of surfactant protein D by freshly isolated rat alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Apr;278(4):L830-9. doi: 10.1152/ajplung.2000.278.4.L830. PMID: 10749761.
  - Herting E. Less invasive surfactant administration (LISA) - ways to deliver surfactant in spontaneously breathing infants. *Early Hum Dev.* 2013 Nov;89(11):875-80. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2013.08.023. Epub 2013 Sep 26. PMID: 24075206.
  - Homer RJ, Zheng T, Chupp G, He S, Zhu Z, Chen Q, Ma B, Hite RD, Gobran LI, Rooney SA, Elias JA. Pulmonary type II cell hypertrophy and pulmonary lipoproteinosis are features of chronic IL-13 exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002 Jul;283(1):L52-9. doi: 10.1152/ajplung.00438.2001. PMID: 12060560.
  - Hornik CP, Fort P, Clark RH, Watt K, Benjamin DK Jr, Smith PB, Manzoni P, Jacqz-Aigrain E, Kaguelidou F, Cohen-Wolkowicz M. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev.* 2012 May;88 Suppl 2(Suppl 2):S69-74. doi: 10.1016/S0378-3782(12)70019-1. PMID: 22633519; PMCID: PMC3513766.
  - Hull J, South M, Phelan P, Grimwood K. Surfactant composition in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Jul;156(1):161-5. doi: 10.1164/ajrccm.156.1.9609090. PMID: 9230741.
  - Hume DA, Robinson AP, MacPherson GG, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells, and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs. *J Exp Med.* 1983 Nov 1;158(5):1522-36. doi: 10.1084/jem.158.5.1522. PMID: 6355361; PMCID: PMC2187139.
  - Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature.* 1999 Jan 21;397(6716):263-6. doi: 10.1038/16717. PMID: 9930702.
  - [http://dasimmunsystem.de/fileadmin/\\_processed\\_/csm\\_Grafik\\_Immunezellen\\_Stammbaum\\_V3\\_ab609e3184.jpg](http://dasimmunsystem.de/fileadmin/_processed_/csm_Grafik_Immunezellen_Stammbaum_V3_ab609e3184.jpg); 10.3.2017
  - Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecreur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol.* 2013 Jan;281(1):51-61. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.01.010. Epub 2013 Feb 4. PMID: 23454681.
  - Jobe A. Respiratory distress syndrome--new therapeutic approaches to a complex pathophysiology. *Adv Pediatr.* 1983;30:93-130. PMID: 6369946.

- Jobe AH, Mitchell BR, Gunkel JH. Beneficial effects of the combined use of prenatal corticosteroids and postnatal surfactant on preterm infants. *Am J Obstet Gynecol.* 1993 Feb;168(2):508-13. doi: 10.1016/0002-9378(93)90483-y. PMID: 8438919.
- Kampalath B, Cleveland RP, Kass L. Reduced CD4 and HLA-DR expression in neonatal monocytes. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998 Apr;87(1):93-100. doi: 10.1006/clin.1997.4505. PMID: 9576015.
- Kari MA, Hallman M, Eronen M, Teramo K, Virtanen M, Koivisto M, Ikonen RS. Prenatal dexamethasone treatment in conjunction with rescue therapy of human surfactant: a randomized placebo-controlled multicenter study. *Pediatrics.* 1994 May;93(5):730-6. PMID: 8165070.
- Kazachkov M, Chen Q, Wang L, Zou J. Substrate preferences of a lysophosphatidylcholine acyltransferase highlight its role in phospholipid remodeling. *Lipids.* 2008 Oct;43(10):895-902. doi: 10.1007/s11745-008-3233-y. Epub 2008 Sep 10. PMID: 18781350.
- Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med.* 2001 Sep 6;345(10):747-55. doi: 10.1056/NEJMra993360. PMID: 11547745.
- Ksenzenko SM, Davidson SB, Saba AA, Franko AP, Raafat AM, Diebel LN, Dulchavsky SA. Effect of triiodothyronine augmentation on rat lung surfactant phospholipids during sepsis. *J Appl Physiol (1985).* 1997 Jun;82(6):2020-7. doi: 10.1152/jappl.1997.82.6.2020. PMID: 9173972.
- Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Hölscher C, Müller DN, Luckow B, Brouckers T, Debowski K, Fritz G, Opdenakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F, Rosenbauer F, Prinz M. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci.* 2013 Mar;16(3):273-80. doi: 10.1038/nn.3318. Epub 2013 Jan 20. PMID: 23334579.
- Kremlev SG, Phelps DS. Effect of SP-A and surfactant lipids on expression of cell surface markers in the THP-1 monocytic cell line. *Am J Physiol.* 1997 Jun;272(6 Pt 1):L1070-7. doi: 10.1152/ajplung.1997.272.6.L1070. PMID: 9227506.
- Lands WE, Inoue M, Sugiura Y, Okuyama H. Selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylcholine by rat liver microsomes. *J Biol Chem.* 1982 Dec 25;257(24):14968-72. PMID: 7174678.
- Lang CJ, Postle AD, Orgeig S, Possmayer F, Bernhard W, Panda AK, Jürgens KD, Milsom WK, Nag K, Daniels CB. Dipalmitoylphosphatidylcholine is not the major surfactant phospholipid species in all mammals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Nov;289(5):R1426-39. doi: 10.1152/ajpregu.00496.2004. Epub 2005 Jul 21. PMID: 16037124.
- Lauer S, Fischer LG, Stubbe HD, Van Aken H, Westphal M. (K)eine Surfactant-Therapie bei Patienten mit "acute respiratory distress syndrome"? : Bedeutung einer Surfactant-Substitutionstherapie in der Behandlung des akuten Lungenversagens [Value of surfactant replacement therapy in the treatment of acute respiratory distress syndrome]. *Anaesthesist.* 2006 Apr;55(4):433-42. German. doi: 10.1007/s00101-006-0978-7. PMID: 16440205.

- Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, Guilloux V, Tribut O, Arvieux C, Camus C, Fauchet R, Thomas R, Drénou B. Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 May 15;169(10):1144-51. doi: 10.1164/rccm.200309-1329OC. Epub 2004 Mar 17. PMID: 15028560.
- Lenschow DJ, Su GH, Zuckerman LA, Nabavi N, Jellis CL, Gray GS, Miller J, Bluestone JA. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 1;90(23):11054-8. doi: 10.1073/pnas.90.23.11054. PMID: 7504292; PMCID: PMC47920.
- Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 2006 Jan 15;66(2):605-12. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4005. PMID: 16423985.
- Löffler/Petrides, P.E. *Immunsystem in Biochemie und Pathobiochemie*, Löffler, G. and Petrides, P.E., Editors. 2014, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York.
- Lu Z, Gu Y, Rooney SA. Transcriptional regulation of the lung fatty acid synthase gene by glucocorticoid, thyroid hormone and transforming growth factor-beta 1. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Jun 29;1532(3):213-22. doi: 10.1016/s1388-1981(01)00135-4. PMID: 11470242.
- Lux CT, Yoshimoto M, McGrath K, Conway SJ, Palis J, Yoder MC. All primitive and definitive hematopoietic progenitor cells emerging before E10 in the mouse embryo are products of the yolk sac. *Blood*. 2008 Apr 1;111(7):3435-8. doi: 10.1182/blood-2007-08-107086. Epub 2007 Oct 11. PMID: 17932251; PMCID: PMC2275011.
- Mach B. MHC class II regulation--lessons from a disease. *N Engl J Med*. 1995 Jan 12;332(2):120-2. doi: 10.1056/NEJM199501123320211. PMID: 7990888.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004 Dec;25(12):677-86. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015. PMID: 15530839.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002 Nov;23(11):549-55. doi: 10.1016/s1471-4906(02)02302-5. PMID: 12401408.
- Martini WZ, Irtun O, Chinkes DL, Barrow RE, Wolfe RR. Glucose effects on lung surfactant kinetics in conscious pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 Oct;279(4):E920-6. doi: 10.1152/ajpendo.2000.279.4.E920. PMID: 11001777.
- Marwitz PA, Van Arkel-Vigna E, Rijkers GT, Zegers BJ. Expression and modulation of cell surface determinants on human adult and neonatal monocytes. *Clin Exp Immunol*. 1988 May;72(2):260-6. PMID: 2457464; PMCID: PMC1541519.
- Mass E, Ballesteros I, Farlik M, Halbritter F, Günther P, Crozet L, Jacome-Galarza CE, Händler K, Klughammer J, Kobayashi Y, Gomez-Perdiguero E, Schultze JL, Beyer M, Bock C, Geissmann F. Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science*. 2016 Sep 9;353(6304):aaf4238. doi: 10.1126/science.aaf4238. Epub 2016 Aug 4. PMID: 27492475; PMCID: PMC5066309.

- Max Planck Institute for Marine Microbiology, B. Fuchs; <https://www.mpi-bremen.de/en/Flow-Cytometry.html>; 11.06.2019
- Mebs D (2005) Wichtige Gifte und Vergiftungen. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, München, pp 1068-1072
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000 Jun 15;164(12):6166-73. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166. PMID: 10843666.
- Modanlou HD, Beharry K, Padilla G, Norris K, Safvati S, Aranda JV. Comparative efficacy of exosurf and survanta surfactants on early clinical course of respiratory distress syndrome and complications of prematurity. *J Perinatol.* 1997 Nov-Dec;17(6):455-60. PMID: 9447532.
- Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard AL, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 2006 Aug;32(8):1175-83. doi: 10.1007/s00134-006-0204-8. Epub 2006 Jun 2. PMID: 16741700.
- Moore KJ, Andersson LP, Ingalls RR, Monks BG, Li R, Arnaout MA, Golenbock DT, Freeman MW. Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. *J Immunol.* 2000 Oct 15;165(8):4272-80. doi: 10.4049/jimmunol.165.8.4272. PMID: 11035061.
- Moore MA, Metcalf D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol.* 1970 Mar;18(3):279-96. doi: 10.1111/j.1365-2141.1970.tb01443.x. PMID: 5491581.
- Morito T, Oishi K, Yamamoto M, Matsumoto K. Biphasic regulation of Fc-receptor mediated phagocytosis of rabbit alveolar macrophages by surfactant phospholipids. *Tohoku J Exp Med.* 2000 Jan;190(1):15-22. doi: 10.1620/tjem.190.15. PMID: 10750736.
- Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood.* 2004 Oct 15;104(8):2224-34. doi: 10.1182/blood-2004-03-1109. Epub 2004 Jul 1. PMID: 15231578.
- Murphy K, Weaver C, Janeway C (2017). *Janeway's immunobiology* (9th ed.). New York.
- Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med.* 1983 Sep 1;158(3):670-89. doi: 10.1084/jem.158.3.670. PMID: 6411853; PMCID: PMC2187114.
- Numata M, Chu HW, Dakhama A, Voelker DR. Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jan 5;107(1):320-5. doi: 10.1073/pnas.0909361107. Epub 2009 Dec 22. PMID: 20080799; PMCID: PMC2806703.
- Orlikowsky TW, Dannecker GE, Spring B, Eichner M, Hoffmann MK, Poets CF. Effect of dexamethasone on B7 regulation and T cell activation in neonates and

- adults. *Pediatr Res.* 2005 May;57(5 Pt 1):656-61. doi: 10.1203/01.PDR.0000156211.48307.F5. Epub 2005 Feb 17. PMID: 15718366.
- Orlikowsky T, Dannecker GE, Wang Z, Horowitz H, Niethammer D, Hoffmann MK. Activation or destruction of T cells via macrophages. *Pathobiology.* 1999;67(5-6):298-301. doi: 10.1159/000028084. PMID: 10725807.
  - Orłowski JP, Sieger L, Anthony BF. Bactericidal capacity of monocytes of newborn infants. *J Pediatr.* 1976 Nov;89(5):797-801. doi: 10.1016/s0022-3476(76)80810-4. PMID: 789842.
  - Otnad E, Parthasarathy S, Sambrano GR, Ramprasad MP, Quehenberger O, Kondratenko N, Green S, Steinberg D. A macrophage receptor for oxidized low density lipoprotein distinct from the receptor for acetyl low density lipoprotein: partial purification and role in recognition of oxidatively damaged cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Feb 28;92(5):1391-5. doi: 10.1073/pnas.92.5.1391. PMID: 7533292; PMCID: PMC42525.
  - Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development.* 1999 Nov;126(22):5073-84. PMID: 10529424.
  - Patrone C, Cassel TN, Pettersson K, Piao YS, Cheng G, Ciana P, Maggi A, Warner M, Gustafsson JA, Nord M. Regulation of postnatal lung development and homeostasis by estrogen receptor beta. *Mol Cell Biol.* 2003 Dec;23(23):8542-52. doi: 10.1128/MCB.23.23.8542-8552.2003. PMID: 14612399; PMCID: PMC262653.
  - Perino J, Crouzier D, Spehner D, Debouzy JC, Garin D, Crance JM, Favier AL. Lung surfactant DPPG phospholipid inhibits vaccinia virus infection. *Antiviral Res.* 2011 Jan;89(1):89-97. doi: 10.1016/j.antiviral.2010.11.009. Epub 2010 Nov 21. PMID: 21095206.
  - Perry SE, Mostafa SM, Wenstone R, Shenkin A, McLaughlin PJ. Is low monocyte HLA-DR expression helpful to predict outcome in severe sepsis? *Intensive Care Med.* 2003 Aug;29(8):1245-52. doi: 10.1007/s00134-003-1686-2. Epub 2003 May 28. PMID: 12774155.
  - Poelma DL, Zimmermann LJ, Scholten HH, Lachmann B, van Iwaarden JF. In vivo and in vitro uptake of surfactant lipids by alveolar type II cells and macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002 Sep;283(3):L648-54. doi: 10.1152/ajplung.00478.2001. PMID: 12169585.
  - Pope TS, Smart DA, Rooney SA. Hormonal effects on fatty-acid synthase in cultured fetal rat lung; induction by dexamethasone and inhibition of activity by triiodothyronine. *Biochim Biophys Acta.* 1988 Mar 25;959(2):169-77. doi: 10.1016/0005-2760(88)90028-8. PMID: 3349095.
  - Proquitté H, Dushe T, Hammer H, Rüdiger M, Schmalisch G, Wauer RR. Observational study to compare the clinical efficacy of the natural surfactants Alveofact and Curosurf in the treatment of respiratory distress syndrome in premature infants. *Respir Med.* 2007 Jan;101(1):169-76. doi: 10.1016/j.rmed.2006.03.033. Epub 2006 May 15. PMID: 16698258.
  - Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, Glauser MP, Tobias PS, Ulevitch RJ. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity.* 1994 Sep;1(6):509-16. doi: 10.1016/1074-7613(94)90093-0. PMID: 7534618.

- Raes G, Brys L, Dahal BK, Brandt J, Grooten J, Brombacher F, Vanham G, Noël W, Bogaert P, Boonefaes T, Kindt A, Van den Bergh R, Leenen PJ, De Baetselier P, Ghassabeh GH. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol.* 2005 Mar;77(3):321-7. doi: 10.1189/jlb.0304212. Epub 2004 Dec 9. PMID: 15591125.
- Ramprasad MP, Terpstra V, Kondratenko N, Quehenberger O, Steinberg D. Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 10;93(25):14833-8. doi: 10.1073/pnas.93.25.14833. PMID: 8962141; PMCID: PMC26222.
- Rau GA, Vieten G, Haitsma JJ, Freihorst J, Poets C, Ure BM, Bernhard W. Surfactant in newborn compared with adolescent pigs: adaptation to neonatal respiration. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004 May;30(5):694-701. doi: 10.1165/rcmb.2003-0351OC. Epub 2003 Oct 24. PMID: 14578213.
- Reith W, Steimle V, Durand B, Kobr M, Mach B. Regulation of MHC class II gene expression. *Immunobiology.* 1995 Jul;193(2-4):248-53. doi: 10.1016/S0171-2985(11)80550-4. PMID: 8530150.
- Rider ED, Jobe AH, Ikegami M, Sun B. Different ventilation strategies alter surfactant responses in preterm rabbits. *J Appl Physiol* (1985). 1992 Nov;73(5):2089-96. doi: 10.1152/jappl.1992.73.5.2089. PMID: 1474089.
- Ridsdale R, Na CL, Xu Y, Greis KD, Weaver T. Comparative proteomic analysis of lung lamellar bodies and lysosome-related organelles. *PLoS One.* 2011 Jan 26;6(1):e16482. doi: 10.1371/journal.pone.0016482. PMID: 21298062; PMCID: PMC3027677.
- Ridsdale R, Roth-Kleiner M, D'Ovidio F, Unger S, Yi M, Keshavjee S, Tanswell AK, Post M. Surfactant palmitoylmyristoylphosphatidylcholine is a marker for alveolar size during disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Jul 15;172(2):225-32. doi: 10.1164/rccm.200501-109OC. Epub 2005 May 5. PMID: 15879423.
- Rojas-Reyes MX, Morley CJ, Soll R. Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Mar 14;(3):CD000510. doi: 10.1002/14651858.CD000510.pub2. PMID: 22419276.
- Rooney SA. Lung surfactant. *Environ Health Perspect.* 1984 Apr;55:205-26. doi: 10.1289/ehp.8455205. PMID: 6145585; PMCID: PMC1568359.
- Sambrano GR, Steinberg D. Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Feb 28;92(5):1396-400. doi: 10.1073/pnas.92.5.1396. PMID: 7877989; PMCID: PMC42526.
- Schipke J, Kuhlmann S, Hegermann J, Fassbender S, Kühnel M, Jonigk D, Mühlfeld C. Lipofibroblasts in Structurally Normal, Fibrotic, and Emphysematous Human Lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* 2021 Jul 15;204(2):227-230. doi: 10.1164/rccm.202101-0043LE. PMID: 34015242.
- Schmittel A, Scheibenbogen C, Keilholz U. Lipopolysaccharide effectively up-regulates B7-1 (CD80) expression and costimulatory function of human

- monocytes. *Scand J Immunol.* 1995 Dec;42(6):701-4. doi: 10.1111/j.1365-3083.1995.tb03714.x. PMID: 8552995.
- Schmitz G, Müller G. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J Lipid Res.* 1991 Oct;32(10):1539-70. PMID: 1797938.
  - Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science.* 2012 Apr 6;336(6077):86-90. doi: 10.1126/science.1219179. Epub 2012 Mar 22. PMID: 22442384.
  - Scott JE. The pulmonary surfactant: impact of tobacco smoke and related compounds on surfactant and lung development. *Tob Induc Dis.* 2004 Mar 15;2(1):3-25. doi: 10.1186/1617-9625-2-1-3. PMID: 19570267; PMCID: PMC2671518.
  - Sherman MP, Campbell LA, Merritt TA, Long WA, Gunkel JH, Curstedt T, Robertson B. Effect of different surfactants on pulmonary group B streptococcal infection in premature rabbits. *J Pediatr.* 1994 Dec;125(6 Pt 1):939-47. doi: 10.1016/s0022-3476(05)82013-x. PMID: 7996369.
  - Shronts EP. Essential nature of choline with implications for total parenteral nutrition. *J Am Diet Assoc.* 1997 Jun;97(6):639-46, 649; quiz 647-8. doi: 10.1016/S0002-8223(97)00161-2. PMID: 9183326.
  - Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009 Nov;86(5):1065-73. doi: 10.1189/jlb.0609385. Epub 2009 Sep 9. PMID: 19741157.
  - Speer CP, Gahr M, Wieland M, Eber S. Phagocytosis-associated functions in neonatal monocyte-derived macrophages. *Pediatr Res.* 1988 Aug;24(2):213-6. doi: 10.1203/00006450-198808000-00015. PMID: 2847109.
  - Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 1992 Jul 1;176(1):287-92. doi: 10.1084/jem.176.1.287. PMID: 1613462; PMCID: PMC2119288.
  - Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Shankaran S, Laptook AR, Walsh MC, Hale EC, Newman NS, Schibler K, Carlo WA, Kennedy KA, Poindexter BB, Finer NN, Ehrenkranz RA, Duara S, Sánchez PJ, O'Shea TM, Goldberg RN, Van Meurs KP, Faix RG, Phelps DL, Frantz ID 3rd, Watterberg KL, Saha S, Das A, Higgins RD; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics.* 2010 Sep;126(3):443-56. doi: 10.1542/peds.2009-2959. Epub 2010 Aug 23. PMID: 20732945; PMCID: PMC2982806.
  - Stoll BJ, Hansen NI, Sánchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs KP, Bizzarro MJ, Goldberg RN, Frantz ID 3rd, Hale EC, Shankaran S, Kennedy K, Carlo WA, Watterberg KL, Bell EF, Walsh MC, Schibler K, Laptook AR, Shane AL, Schrag SJ, Das A, Higgins RD; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease

- continues. *Pediatrics*. 2011 May;127(5):817-26. doi: 10.1542/peds.2010-2217. Epub 2011 Apr 25. Erratum in: *Pediatrics*. 2011 Aug;128(2):390. PMID: 21518717; PMCID: PMC3081183.
- Sullivan LC, Orgeig S, Daniels CB. Control of the development of the pulmonary surfactant system in the saltwater crocodile, *Crocodylus porosus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 Nov;283(5):R1164-76. doi: 10.1152/ajpregu.00009.2002. PMID: 12376410.
  - Sweet DG, Carnielli V, Greisen G, Hallman M, Ozek E, Plavka R, Saugstad OD, Simeoni U, Speer CP, Vento M, Visser GH, Halliday HL. European Consensus Guidelines on the Management of Respiratory Distress Syndrome - 2016 Update. *Neonatology*. 2017;111(2):107-125. doi: 10.1159/000448985. Epub 2016 Sep 21. PMID: 27649091.
  - Terhorst, C., Spits, H., Stall, F., and Exley, M. (1996): T Lymphocyte signal transduction. In: Hames and D.M. Glover. (Eds.) *Molecular Immunology*. Vol. 2 Edition; S. 132-188.
  - ThermoFisher Scientific, Chemische Struktur von CFDA-SE; <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C1157>; 25.5.2019
  - Thorley AJ, Ford PA, Giembycz MA, Goldstraw P, Young A, Tetley TD. Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated primary human lung alveolar type II epithelial cells and macrophages. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):463-73. doi: 10.4049/jimmunol.178.1.463. PMID: 17182585.
  - Torday J, Hua J, Slavin R. Metabolism and fate of neutral lipids of fetal lung fibroblast origin. *Biochim Biophys Acta*. 1995 Jan 20;1254(2):198-206. doi: 10.1016/0005-2760(94)00184-z. PMID: 7827125.
  - van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*. 1968 Sep 1;128(3):415-35. doi: 10.1084/jem.128.3.415. PMID: 5666958; PMCID: PMC2138527.
  - Vanderbilt JN, Mager EM, Allen L, Sawa T, Wiener-Kronish J, Gonzalez R, Dobbs LG. CXC chemokines and their receptors are expressed in type II cells and upregulated following lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Dec;29(6):661-8. doi: 10.1165/rcmb.2002-0227OC. Epub 2003 Jun 26. PMID: 12829448.
  - Van Wauwe JP, Goossens JG, Beverley PC. Human T lymphocyte activation by monoclonal antibodies; OKT3, but not UCHT1, triggers mitogenesis via an interleukin 2-dependent mechanism. *J Immunol*. 1984 Jul;133(1):129-32. PMID: 6327822.
  - Velasquez A, Bechara RI, Lewis JF, Malloy J, McCaig L, Brown LA, Guidot DM. Glutathione replacement preserves the functional surfactant phospholipid pool size and decreases sepsis-mediated lung dysfunction in ethanol-fed rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002 Aug;26(8):1245-51. doi: 10.1097/01.ALC.0000024269.05402.97. PMID: 12198401.
  - Weston EJ, Pondo T, Lewis MM, Martell-Cleary P, Morin C, Jewell B, Daily P, Apostol M, Petit S, Farley M, Lynfield R, Reingold A, Hansen NI, Stoll BJ, Shane AL, Zell E, Schrag SJ. The burden of invasive early-onset neonatal sepsis in the United States, 2005-2008. *Pediatr Infect Dis J*. 2011 Nov;30(11):937-41. doi: 10.1097/INF.0b013e318223bad2. PMID: 21654548; PMCID: PMC3193564.

- Westover AJ, Hooper SB, Wallace MJ, Moss TJ. Prostaglandins mediate the fetal pulmonary response to intrauterine inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012 Apr 1;302(7):L664-78. doi: 10.1152/ajplung.00297.2011. Epub 2012 Jan 27. PMID: 22287609.
- Witherden IR, Vanden Bon EJ, Goldstraw P, Ratcliffe C, Pastorino U, Tetley TD. Primary human alveolar type II epithelial cell chemokine release: effects of cigarette smoke and neutrophil elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Apr;30(4):500-9. doi: 10.1165/rcmb.4890. PMID: 15033639.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990 Sep 21;249(4975):1431-3. doi: 10.1126/science.1698311. PMID: 1698311.
- Wu Y, Xu Z, Henderson FC, Ryan AJ, Yahr TL, Mallampalli RK. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection reduces surfactant levels by inhibiting its biosynthesis. *Cell Microbiol*. 2007 Apr;9(4):1062-72. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00852.x. Epub 2006 Dec 12. PMID: 17166234.
- Wykle RL, Malone B, Snyder F. Biosynthesis of dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine by adenoma alveolar type II cells. *Arch Biochem Biophys*. 1977 May;181(1):249-56. doi: 10.1016/0003-9861(77)90503-3. PMID: 577668.
- Wynn JL, Hansen NI, Das A, Cotten CM, Goldberg RN, Sánchez PJ, Bell EF, Van Meurs KP, Carlo WA, Lupton AR, Higgins RD, Benjamin DK Jr, Stoll BJ; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Early sepsis does not increase the risk of late sepsis in very low birth weight neonates. *J Pediatr*. 2013 May;162(5):942-8.e1-3. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.11.027. Epub 2013 Jan 5. PMID: 23295144; PMCID: PMC3622770.
- Yeh TF, Chen CM, Wu SY, Husan Z, Li TC, Hsieh WS, Tsai CH, Lin HC. Intratracheal Administration of Budesonide/Surfactant to Prevent Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Jan 1;193(1):86-95. doi: 10.1164/rccm.201505-0861OC. PMID: 26351971.
- Zaidi AK, Knaut AL, Mirrett S, Reller LB. Value of routine anaerobic blood cultures for pediatric patients. *J Pediatr*. 1995 Aug;127(2):263-8. doi: 10.1016/s0022-3476(95)70305-5. PMID: 7636652.
- Zhao Y, Chen YQ, Bonacci TM, Bredt DS, Li S, Bensch WR, Moller DE, Kowala M, Konrad RJ, Cao G. Identification and characterization of a major liver lysophosphatidylcholine acyltransferase. *J Biol Chem*. 2008 Mar 28;283(13):8258-65. doi: 10.1074/jbc.M710422200. Epub 2008 Jan 14. PMID: 18195019.
- Zhu X, Song J, Mar MH, Edwards LJ, Zeisel SH. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) knockout mice have hepatic steatosis and abnormal hepatic choline metabolite concentrations despite ingesting a recommended dietary intake of choline. *Biochem J*. 2003 Mar 15;370(Pt 3):987-93. doi: 10.1042/BJ20021523. PMID: 12466019; PMCID: PMC1223223.

## **7. Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abteilung für Neonatologie der Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Wolfgang Bernhard durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Wolfgang Bernhard und Prof. Dr. med. Thorsten Orlikowsky.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Prof. Dr. med. Christian Gille, Dr. rer. nat. Bärbel Spring und Prof. Dr. med. Thorsten Orlikowsky) von mir eigenständig sowie in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Eva Caroline Gebhard durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Beratung durch Frau Dr. sc. hum. Anette Stauch durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig und nach Anleitung durch Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Wolfgang Bernhard verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

## 8. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

- Gille C, Spring B, Bernhard W, Gebhard C, Basile D, Lauber K, Poets CF, Orlikowsky TW. 2007. Differential effect of surfactant and its saturated phosphatidylcholines on human blood macrophages. *J Lipid Res.* 48(2):307-17.

Tübingen, den 31. Mai 2022

## 9. Anhang

### Original-Daten zu Phagozytose, Phänotyp der PBMC und T-Zellen

	Kontr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ad 3.1.1	<i>ohne PG</i>										
Median	100	68,6	38,8	68,5	47,4	63,1	41,0	67,7	71,7	69,0	76,2
IQR	100; 100	53,1; 76,9	35,4; 44,6	51,9; 74,1	43,3; 58,2	48,7; 74,3	38,0; 48,1	54,5; 84,9	63,2; 78,9	64,3; 75,3	73,4; 88,0
Ad 3.1.1	<i>mit PG</i>										
Median	100	95,4	61,2	97,8	96,3	92,5	81,1	106,3	103,0	101,4	103,7
IQR	100; 100	86,6; 103,5	53,2; 76,7	94,1; 101,8	89,4; 108,2	91,6; 97,7	78,4;9 3,5	100,2; 117,2	101,6; 116,5	91,0;1 04,6	101,6; 107,6
Ad 3.1.2	<i>ohne PG</i>										
Median	100	68,6	38,8	68,5	47,4	63,1	41,0	67,7	71,7	69,0	76,2
IQR	100; 100	53,1; 76,9	35,4; 44,6	51,9; 74,1	43,3; 58,2	48,7; 74,3	38,0; 48,1	54,5; 84,9	63,2; 78,9	64,3; 75,3	73,4; 88,0
Ad 3.1.2	<i>mit PG</i>										
Median	100	85,6	58,1	85,7	68,5	86,5	57,5	96,4	101,4	83,5	91,7
IQR	100; 100	76,0; 97,5	44,5; 60,1	77,8; 93,4	62,9; 77,8	80,0; 88,6	55,2; 62,1	88,5; 112,4	70,8; 112,3	62,3; 109,3	84,7; 100,2
Ad 3.1.3	<i>ohne PG</i>										
Median	100	90,8	84,4	74,0	76,2	106,5	79,2	90,8	91,3	92,3	92,4
IQR	100; 100	84,0; 112,4	69,3; 105,1	60,9; 93,7	66,7; 106,5	88,2; 112,1	71,3; 96,9	81,8; 114,2	84,5; 114,1	82,1; 116,2	79,1; 114,5
Ad 3.1.3	<i>mit PG</i>										
Median	100	92,4	59,6	86,2	75,3	97,1	86,9	88,5	96,0	107,6	80,5
IQR	100;10 0	84,1; 95,4	57,7; 66,3	66,5; 105,5	66,1; 95,3	88,8; 106,9	69,8; 93,6	77,2; 92,9	73,9; 106,4	90,7; 116,1	73,8; 110,9
Ad 3.1.4	<i>ohne PG</i>										
Median	100	110,6	81,4	87,7	93,1	101,1	93,3	92,7	97,9	93,8	110,2
IQR	100; 100	94,9; 135,3	73,3; 98,3	70,9; 99,2	78,3; 107,6	76,8; 118,3	78,9; 96,0	77,3; 113,6	78,9; 112,8	77,2; 125,3	87,7; 118,4
Ad 3.1.4	<i>mit PG</i>										
Median	100	94,1	78,7	71,6	96,8	101,0	86,0	86,8	100,2	88,8	100,5
IQR	100; 100	86,8; 129,1	61,6; 88,6	70,6; 96,9	75,5; 130,2	68,6; 128,1	77,0; 112,2	80,3; 99,6	83,5; 119,2	73,9; 115,0	77,1; 132,2
Ad 3.2.1	<i>ohne PG</i>										
Median	100	74,2	44,3	76,7	60,8	92,1	72,4	68,2	97,7	102,1	69,8
IQR	100; 100	57,6; 85,1	27,1; 55,1	69,4; 94,8	55,3; 64,4	72,9; 94,4	56,3; 81,7	67,6; 84,8	84,5; 106,1	95,7; 102,8	61,5; 91,1
Ad 3.2.1	<i>mit PG</i>										
Median	100	91,6	78,6	101,8	91,8	104,0	99,8	101,4	109,4	104,7	106,1

IQR	100; 100	75,4; 98,0	70,7; 88,6	99,7; 105,0	84,2; 100,4	96,5; 106,0	95,6; 106,8	99,4; 105,3	103,0; 113,4	100,2; 105,8	104,8; 109,5
Ad 3.2.2	<i>ohne PG</i>										
Median	100	71,2	32,3	66,1	50,7	58,9	43,8	54,2	97,0	93,6	86,3
IQR	100; 100	63,2; 92,8	30,3; 42,4	57,4; 76,6	34,2; 53,4	51,6; 65,1	41,4; 48,1	53,4; 74,9	82,5; 110,2	84,8; 123,4	72,5; 94,2
Ad 3.2.2	<i>mit PG</i>										
Median	100	46,0	39,3	56,8	50,8	53,6	55,5	40,9	64,1	43,5	61,4
IQR	100; 100	21,3; 56,0	18,6; 47,6	24,5; 69,5	24,4; 55,5	24,3; 68,9	23,8; 70,4	15,5; 72,4	25,6; 75,2	16,2; 71,3	26,0; 70,7
Ad 3.2.3	<i>ohne PG</i>										
Median	100	151,9	99,1	92,3	87,3	100,2	120,3	122,3	80,3	83,6	116,4
IQR	100; 100	113,5; 193,6	72,9; 114,6	77,9; 111,2	62,6; 116,7	89,3; 120,8	111,7; 136,2	105,1; 163,2	69,4; 93,4	75,2; 137,6	72,6; 138,7
Ad 3.2.3	<i>mit PG</i>										
Median	100	91,5	72,9	72,7	66,4	83,9	86,3	70,6	75,2	73,1	74,5
IQR	100; 100	78,3; 110,7	56,4; 103,5	60,7; 80,7	49,7; 76,5	73,6; 105,6	62,4; 93,6	58,3; 83,7	73,2; 79,3	59,5; 100,3	61,1; 88,7
Ad 3.2.4	<i>ohne PG</i>										
Median	100	99,9	86,4	95,2	94,9	92,6	90,4	161,8	78,7	125,9	120,8
IQR	100; 100	88,0; 116,7	80,8; 89,6	75,8; 108,8	82,8; 103,8	77,0; 105,3	88,1; 99,3	124,7; 165,2	58,7; 82,5	115,4; 153,7	94,8; 148,3
Ad 3.2.4	<i>mit PG</i>										
Median	100	99,4	70,4	75,1	67,1	92,3	79,3	74,8	85,9	88,0	82,0
IQR	100;10 0	74,0;1 18,5	62,1;7 9,6	66,8;8 0,9	45,2;7 0,1	72,1;9 7,5	69,7;1 01,9	68,0;8 7,3	75,2;9 9,9	76,7;9 3,1	72,1;9 0,0
Ad 3.3.1											
Median	100	71,5	85,6	71,2	52,5	99,3	78,0	68,7	86,2	78,7	92,3
IQR	100; 100	61,6; 96,7	74,5; 94,8	68,9; 94,8	51,5; 82,5	87,3; 114,3	60,0; 87,4	67,5; 68,8	70,2; 95,6	74,5; 87,2	85,9; 94,2
Ad 3.3.2											
Median	100	65,0	108,7	104,7	145,9	75,6	124,0	109,9	109,0	84,7	62,7
IQR	100; 100	55,6; 227,8	87,1; 164,3	104,3; 160,7	137,9; 344,3	57,9; 159,1	82,1; 174,0	71,8; 122,5	55,7; 134,4	61,5; 85,8	58,9; 99,4
Ad 3.3.3											
Median	100	82,7	131,7	113,1	107,4	113,4	88,3	116,6	94,9	116,6	100,2
IQR	100; 100	79,0; 118,4	111,0; 153,6	94,4; 127,4	100,7; 112,2	97,2; 122,0	83,8; 95,1	102,6; 118,3	87,0; 100,4	102,6; 118,3	89,0; 118,9
Ad 3.3.4											
Median	100	134,8	205,7	70,9	86,1	139,4	92,3	166,0	92,7	117,8	109,6
IQR	100; 100	94,7; 236,3	135,4; 244,7	43,5; 216,1	73,8; 97,6	97,0; 211,7	43,1; 128,5	153,9; 166,7	76,6; 120,2	90,5; 282,3	93,8; 226,4
Ad 3.4.1											
Median	100	73,7	93,3	81,4	83,4	85,7	86,9	74,7	76,2	116,2	98,4

IQR	100; 100	67,6; 76,2	83,1; 109,0	77,1; 96,4	67,6; 106,5	78,3; 87,9	70,9; 112,2	74,7; 74,7	70,6; 98,0	116,2; 116,2	77,3; 111,2
Ad 3.4.2											
Median	100	67,2	87,8	112,0	120,3	88,6	71,0	194,4	59,3	111,0	73,3
IQR	100; 100	60,1; 111,7	80,2; 141,8	59,3; 122,0	110,2; 151,8	57,3; 121,1	70,4; 88,7	194,4; 194,4	51,2; 78,5	111,0; 111,0	71,3; 107,6
Ad 3.4.3											
Median	100	103,6	82,0	97,6	32,6	103,8	52,4	80,6	101,9	82,7	85,7
IQR	100; 100	90,7; 120,4	74,5; 171,4	41,3; 225,0	28,0; 73,5	77,4; 140,3	43,9; 74,9	80,6; 80,6	87,9; 121,4	82,7; 82,7	65,2; 110,2
Ad 3.4.4											
Median	100	134,8	205,7	70,9	86,1	139,4	92,3	166,0	92,7	117,8	109,6
IQR	100; 100	94,7; 236,3	135,4; 244,7	43,5; 216,1	73,8; 97,6	97,0; 211,7	43,1; 128,5	153,9; 166,7	76,6; 120,2	90,5; 282,3	93,8; 226,4
Ad 3.5.1	<i>ohne OKT3</i>										
Median	100	91,0	80,1	77,8	58,5	86,7	75,5	104,5	80,6	85,7	82,7
IQR	100; 100	79,1; 97,8	78,3; 86,5	71,8; 92,9	44,3; 66,4	72,7; 105,1	65,1; 79,8	84,4; 222,8	75,2; 106,3	76,9; 95,8	73,4; 99,2
Ad 3.5.1	<i>mit OKT3</i>										
Median	100	78,1	95,7	95,9	72,8	88,1	90,8	75,6	79,7	75,3	98,5
IQR	100; 100	57,0; 90,3	93,3; 98,1	91,4; 98,9	66,9; 87,9	86,4; 106,1	87,9; 95,1	62,4; 83,9	74,6; 87,1	68,4; 76,1	90,1; 100,4
Ad 3.5.2	<i>ohne OKT3</i>										
Median	100	88,5	98,2	100,1	73,3	93,0	79,9	73,9	88,1	77,7	90,0
IQR	100; 100	77,9; 92,8	88,8; 101,	93,1; 105,7	65,7; 83,9	80,0; 101,3	66,9; 89,6	71,0; 138,0	75,6; 102,0	72,5; 90,8	79,1; 99,3
Ad 3.5.2	<i>mit OKT3</i>										
Median	100	81,4	102,6	96,0	88,1	101,6	93,2	97,5	98,5	87,3	98,2
IQR	100; 100	69,4; 91,5	94,3; 107,5	92,9; 115,6	79,6; 102,2	98,0; 104,1	89,8; 103,8	84,8; 98,0	93,8; 101,9	86,5; 97,0	92,3; 102,3
Ad 3.5.3	<i>ohne OKT3</i>										
Median	100	87,0	91,5	75,2	58,9	86,5	85,4	202,1	100,0	487,2	83,7
IQR	100; 100	80,5; 100,3	80,1; 107,5	61,2; 103,0	44,9; 94,9	70,3; 105,4	66,6; 104,6	110,8; 336,9	80,1; 134,9	252,9; 635,7	61,4; 113,0
Ad 3.5.3	<i>mit OKT3</i>										
Median	100	94,3	101,8	94,0	73,3	98,5	93,8	96,8	102,6	105,3	98,6
IQR	100; 100	78,4; 113,3	88,9; 108,2	86,3; 108,1	72,3; 89,0	94,1; 100,7	80,4; 107,4	80,7; 105,9	92,3; 109,7	97,4; 109,3	87,2; 113,1
Ad 3.6.1	<i>ohne OKT3</i>										
Median	100	102,9	91,1	84,5	47,6	65,0	74,9	84,9	79,6	81,3	86,8
IQR	100; 100	99,1; 107,7	65,0; 78,0	77,0; 102,8	45,5; 47,8	64,0; 82,6	49,1; 86,0	74,0; 85,6	75,5; 98,5	71,9; 82,0	82,4; 96,1
Ad 3.6.1	<i>mit OKT3</i>										
Median	100	67,4	75,2	81,0	61,5	95,0	75,8	60,0	82,9	65,3	74,0
IQR	100;	61,9;	67,4;	72,4;	59,1;	78,4;	68,4;	55,4;	79,0;	62,6;	68,9;

	100	77,7	89,1	84,5	66,9	103,0	76,8	71,7	87,9	75,8	76,7
Ad 3.6.2	<i>ohne OKT3</i>										
Median	100	82,9	86,8	92,5	72,3	73,2	79,9	91,7	92,7	85,5	96,1
IQR	100; 100	63,3; 87,7	71,2; 87,7	78,0; 100,2	72,2; 73,2	69,6; 97,4	71,1; 80,2	81,2; 92,7	69,9; 101,0	75,3; 89,9	95,3; 103,3
Ad 3.6.2	<i>mit OKT3</i>										
Median	100	58,2	98,7	107,5	90,2	98,1	90,0	102,0	99,6	104,3	88,0
IQR	100; 100	51,3; 70,2	96,4; 112,2	89,1; 117,8	79,7; 95,5	88,6; 104,1	75,2; 96,8	90,3; 104,7	88,5; 108,8	86,5; 106,8	85,9; 97,1
Ad 3.6.3	<i>ohne OKT3</i>										
Median	100	128,7	113,0	110,7	71,4	127,8	78,6	144,9	98,1	99,2	72,1
IQR	100; 100	103,7; 181,3	85,7; 117,1	109,7; 157,9	70,4; 95,8	125,0; 144,6	41,8; 96,3	103,7; 158,3	89,3; 139,9	60,7; 134,7	35,7; 100,0
Ad 3.6.3	<i>mit OKT3</i>										
Median	100	79,8	122,5	126,2	93,0	97,5	77,3	108,1	83,6	87,4	75,4
IQR	100; 100	59,6; 105,4	105,0; 140,7	102,6; 136,7	69,9; 114,0	92,7; 108,8	48,2; 104,0	79,9; 122,5	72,1; 95,3	58,7; 103,1	69,0; 92,3

*Tabelle 3: Median und IQR der Original-Daten, Kontrolle auf 100% gesetzt  
Abkürzungen: IQR – Interquartilsabstand, PG – Polyglobin, Kontr. – Kontrolle, 1 - Curosurf®, 2 – PC16:0/16:0, 3 – PC16:0/16:1, 4 – PC16:0/14:0, 5 – PC16:0/18:1, 6 – PC14:0/18:1, 7 – C16:0, 8 – C16:1, 9 – C14:0, 10 – C18:1*